



Aplicación de los pulsos eléctricos de alto voltaje al proceso de vinificación

Eduardo Puértolas Gracia



Aplicación de los pulsos eléctricos de alto voltaje al proceso de vinificación

CONSEJO ECONÓMICO Y SOCIAL DE ARAGÓN
COLECCIÓN TESIS DOCTORALES

Premio Tesis Doctoral
Consejo Económico y Social de Aragón 2010

Autor de la Tesis Doctoral:

Eduardo Puértolas Gracia

Directores de la Tesis:

Javier Raso Pueyo
Ignacio Álvarez Lanzarote

Calificación obtenida:

Sobresaliente *cum laude*

La responsabilidad de las opiniones expresadas en las publicaciones editadas por el CES de Aragón incumbe exclusivamente a sus autores y su publicación no significa que el Consejo se identifique con las mismas

La reproducción de esta publicación está permitida citando su procedencia

© Primera edición CONSEJO ECONÓMICO Y SOCIAL DE ARAGÓN

© Para el resto de ediciones el autor

Primera edición, 2012

Portada:

Foto: Mario Ayguavives
Composición: AD-HOC Gestión Cultural

Edita:

CONSEJO ECONÓMICO Y SOCIAL DE ARAGÓN
C/ Joaquín Costa, 18, 1ª planta. 50071 Zaragoza (España)
Teléfono: 976 71 38 38 – Fax: 976 71 38 41
cesa@aragon.es
www.aragon.es/cesa

ISBN: 978-84-694-2438-4

D.L.: Z 564-2012

Impresión:

Talleres Editoriales COMETA, S.A.

Aplicación de los pulsos eléctricos de alto voltaje al proceso de vinificación

Eduardo Puértolas Gracia



A mis abuelos, seguro que os habrías sentido orgullosos

A mis padres, todo lo que soy os lo debo a vosotros

A María, eres lo más importante de mi vida

Premios a tesis doctorales CESA 2010

El CES de Aragón con el fin de promover y divulgar la investigación en las materias relacionadas con sus funciones convoca anualmente los Premios a trabajos de investigación concluidos o tesis doctorales, en cuya convocatoria del año 2010, efectuada por Resolución de 24 de agosto de 2010, de la Presidencia del Consejo Económico y Social de Aragón (BOA nº 172, de 2 de septiembre de 2010), pudieron participar los autores de trabajos concluidos o tesis doctorales presentadas para la colación del grado de doctor, leídas y calificadas de sobresaliente “cum laude”, por unanimidad, entre el 1 de octubre de 2009 y 30 de septiembre de 2010.

Por Resolución de 25 de noviembre de 2010, de la Secretaría General Técnica de la Presidencia (BOA nº 245, de 17 de diciembre de 2010), se otorgaron los premios del CESA a trabajos de investigación concluidos o tesis doctorales correspondientes a 2010.

El premio, dotado con 4.000 euros y diploma acreditativo, se otorgó a la tesis doctoral “Aplicación de los pulsos eléctricos de alto voltaje al proceso de vinificación”, realizada por D. Eduardo Puértolas Gracia.

El accésit, con una dotación de 3.000 euros y diploma acreditativo, se otorgó a la tesis doctoral “Estimación de biomasa residual mediante imágenes de satélite y trabajo de campo. Modelización del potencial energético de los bosques turolenses”, realizada por D. Alberto García Martín.

El Jurado ha estado compuesto por los siguientes miembros:

Presidente: D. José Félix Sáenz Lorenzo †

Secretaría: D^a. Belén López Aldea

Vocales: D. Salvador Coreá Bergua

D^a. M^a José González Ordovás

D^a. Marga Lasmarías Bustín

Este trabajo ha sido desarrollado gracias a una beca de postgrado (AP20052190) otorgada por el Ministerio de Ciencia e Innovación del Gobierno de España dentro del programa de Formación de Profesorado Universitario (FPU).

Presentación

En la coyuntura actual de crisis económica, el sector vitivinícola ocupa una posición relevante en Aragón como motor de la economía, siendo además no desdeñable su importancia estratégica como agente dinamizador de las zonas rurales. Ante los nuevos desafíos del sector, centrados en ampliar mercados y en la exportación de nuestros caldos, se hace necesaria una profunda reestructuración orientada a la mejora de la calidad y competitividad de los vinos frente a otras zonas productoras. Para ello, en los últimos años, se ha realizado un importante esfuerzo inversor tanto del sector privado para la mejora de la infraestructura y tecnología de las bodegas, como del sector público financiando programas de investigación científica y desarrollo tecnológico.

Debido a la especial transcendencia de dicho sector, el Consejo Económico y Social de Aragón (CESA) ha querido contribuir al conocimiento y divulgación de ese esfuerzo realizado en nuestro territorio, premiando la Tesis Doctoral “Aplicación de los pulsos eléctricos de alto voltaje al proceso de vinificación”, presentada por Eduardo Puértolas, dada su calidad científica y su importante grado de innovación.

La presente monografía es una versión adaptada y resumida de este trabajo, en la cual se ha intentado exponer los principales resultados obtenidos con un lenguaje claro y con un marcado carácter divulgativo.

Si se desea una lectura más profunda y técnica, a esta obra acompaña una copia electrónica de la Tesis Doctoral original, incluyendo la transcripción íntegra de los 7 artículos científicos surgidos de la misma, publicados todos ellos en revistas internacionales de reconocido prestigio.

Índice

I. Síntesis descriptiva	21
I.1. Introducción y objetivos	23
I.1.1. Sector vinícola español y aragonés: pasado, presente y futuro.....	23
I.1.2. Los pulsos eléctricos de alto voltaje	24
I.1.3. Alteración microbiana del vino	25
I.1.4. Los compuestos fenólicos: importancia y extracción	27
I.1.5. Objetivo general.....	28
I.2. Principales resultados obtenidos.....	28
I.2.1. Inactivación de microorganismos alterantes del vino tinto mediante pulsos eléctricos de alto voltaje	28
I.2.2. Mejora de la extracción fenólica mediante pulsos eléctricos de alto voltaje	29
I.3. Análisis económico de la aplicación de los pulsos eléctricos de alto voltaje.....	36
II. El vino tinto	41
II.1. Breve reseña histórica.....	43
II.2. Situación del sector vinícola.....	43
II.2.1. Situación del sector vinícola internacional	43
II.2.2. Situación del sector vinícola europeo.....	44
II.2.3. Situación del sector vinícola español.....	46
II.2.4. Situación del sector vinícola aragonés	47
II.3. Proceso de elaboración de vino tinto	47
II.3.1. Recepción de la uva	48
II.3.2. Despalillado, estrujado y sulfitado	48
II.3.3. Fermentación alcohólica	49
II.3.4. Maceración.....	50
II.3.5. Descube	51
II.3.6. Fermentación maloláctica	51
II.3.7. Estabilización del vino	52
II.3.8. Crianza del vino	53
II.4. Los compuestos fenólicos	54
II.4.1. Propiedades generales	54
II.4.2. Clasificación química	55
II.4.3. Estabilización del color en los vinos tintos.....	56
II.4.3.1. Antocianos oligoméricos.....	57
II.4.3.2. Fenómenos de copigmentación.....	58
II.4.3.3. Fenómenos de condensación.....	58
II.4.4. Extracción de los compuestos fenólicos	58
II.4.4.1. Potencial fenólico de la uva	58
II.4.4.2. Evolución general de la extracción fenólica.....	59
II.4.4.3. Factores que afectan a la extracción fenólica.....	61
II.4.4.3.1. Concentración de etanol	61
II.4.4.3.2. Concentración de anhídrido sulfuroso	62
II.4.4.3.3. Temperatura de extracción.....	62
II.4.4.4. Tecnologías de mejora de la extracción fenólica	62

II.4.4.4.1. La vinificación en doble pasta y el sangrado	63
II.4.4.4.2. La criomaceración.....	63
II.4.4.4.3. La maceración sulfítica.....	64
II.4.4.4.4. La termovinificación y la técnica flash-expansión.....	64
II.4.4.4.5. Adición de enzimas pectolíticas	65
II.5. Alteración microbiana del vino tinto.....	66
II.5.1. Alteración del vino por levaduras	67
II.5.1.1. Alteraciones producidas por el género dekkera/ brettanomyces ..	67
II.5.1.2. “Flores” del vino.....	68
II.5.1.3. Refermentaciones.....	68
II.5.2. Alteración del vino por bacterias	69
II.5.2.1. Alteraciones producidas por bacterias lácticas	69
II.5.2.2. Picado acético y avinagrado del vino.....	69
II.5.3. Control del crecimiento microbiano.....	70
III. Los pulsos eléctricos de alto voltaje.....	73
III.1. Mecanismo de acción.....	75
III.2. Aspectos técnicos de los peav.....	79
III.2.1. Parámetros del proceso.....	79
III.2.1.1. Intensidad del campo eléctrico	79
III.2.1.2. Forma del pulso, anchura del pulso y tiempo de tratamiento ...	79
III.2.1.3. Energía por pulso.....	80
III.2.1.4. Frecuencia	81
III.2.2. Principales componentes de un equipo de PEAV.....	82
III.2.2.1. Generador de PEAV.....	82
III.2.2.2. Cámara de tratamiento	83
III.3. Aplicaciones de los PEAV.....	84
III.3.1. Inducción de reacciones de respuesta al estrés.....	84
III.3.2. Inactivación microbiana en alimentos líquidos	85
III.3.2.1. Factores que afectan a la inactivación microbiana	85
III.3.2.1.1. Características de los microorganismos	85
III.3.2.1.2. Características del medio de tratamiento.....	88
III.3.2.1.3. Condiciones de tratamiento.....	89
III.3.3. Inactivación enzimática en alimentos líquidos.....	92
III.3.4. Mejora de los procesos de transferencia de masa	92
III.3.4.1. Extracción de componentes intracelulares	93
III.3.4.2. Obtención de zumos de frutas y hortalizas	93
III.3.4.3. Extracción de aceites de origen vegetal.....	94
III.3.4.4. Deshidratación.....	94
III.3.4.5. Curado y marinado de carnes y pescados.....	95
III.4. Análisis económico del uso de los PEAV.....	95
III.4.1. Análisis de costes: inactivación microbiana.....	96
III.4.2. Análisis de costes: transferencia de masa.....	97

IV. Inactivación de microorganismos alterantes del vino mediante pulsos eléctricos de alto voltaje	99
IV.1. Introducción y objetivos	101
IV.2. Material y métodos	101
IV.2.1. Microorganismos	101
IV.2.2. Medios de cultivo y tratamiento	102
IV.2.3. Suspensiones y curvas de crecimiento	102
IV.2.4. Tratamientos de PEAV	105
IV.2.4.1. Generador de PEAV.....	105
IV.2.4.2. Cámara de tratamiento	106
IV.2.4.3. Condiciones de tratamiento	106
IV.2.5. Tratamiento estadístico de los datos.....	107
IV.2.5.1. Modelización de las curvas de supervivencia	107
IV.2.5.2. Análisis estadístico.....	108
IV.3. Resultados y discusión	108
IV.4. Análisis de costes	109
V. Mejora de la extracción fenólica en la elaboración de vino tinto mediante pulsos eléctricos de alto voltaje	113
V.1. Introducción y objetivos	115
V.2. Material y métodos	116
V.2.1. Uva.....	116
V.2.2. Vinificaciones.....	116
V.2.2.1. Diseño de las vinificaciones	116
V.2.2.2. Proceso de elaboración de vino tinto.....	117
V.2.2.2.1. Vinificaciones a escala planta piloto	117
V.2.2.2.2. Vinificaciones a escala bodega	119
V.2.3. Tratamientos de peav	120
V.2.3.1. Generador de PEAV.....	120
V.2.3.2. Cámaras de tratamiento	121
V.2.3.2.1. Características de las cámaras de tratamiento.....	121
V.2.3.2.2. Diseño de las cámaras de tratamiento	123
V.2.3.2.3. Cálculo del campo eléctrico de tratamiento	129
V.2.3.3. Condiciones de tratamiento.....	130
V.2.4. Análisis del vino	131
V.2.4.1. Determinaciones generales.....	131
V.2.4.1.1. Peso de 100 bayas, relación mosto/sólidos y diámetro medio de baya.....	131
V.2.4.1.2. Grados brix y grado alcohólico probable.....	131
V.2.4.1.3. Densidad	131
V.2.4.1.4. pH	132
V.2.4.1.5. Acidez total.....	132
V.2.4.1.6. Acidez volátil.....	133
V.2.4.1.7. Ácido l-málico	133
V.2.4.1.8. Azúcares reductores	133

V.2.4.1.9. Nitrógeno fácilmente asimilable (FAN).....	133
V.2.4.1.10. Grado alcohólico.....	134
V.2.4.2. Determinaciones espectrofotométricas	134
V.2.4.2.1. Características cromáticas	134
V.2.4.2.2. Compuestos fenólicos	135
V.2.4.3. Determinación de compuestos fenólicos por HPLC.....	136
V.2.4.4. Análisis sensorial.....	137
V.2.5. Tratamiento estadístico de los datos.....	139
V.2.5.1. Modelización de las curvas de extracción.....	139
V.2.5.2. Análisis estadístico.....	139
V.3. Resultados y discusión	139
V.3.1. Antecedentes: aplicación de los PEAV a escala de laboratorio	139
V.3.2. Aplicación de los PEAV a escala planta piloto.....	141
V.3.2.1. Evaluación de la aplicación de los PEAV a escala planta piloto ...	141
V.3.2.2. Efecto de los PEAV en la evolución cromática y fenólica del vino tinto.....	142
V.3.2.3. Efecto de los PEAV en las características sensoriales del vino tinto.....	147
V.3.2.4. Comparación de los PEAV con el uso de enzimas pectolíticas ...	148
V.3.3. Aplicación de los PEAV a escala bodega.....	149
V.4. Análisis de costes	151
VI. Conclusiones	153
VII. Bibliografía	157

I. Síntesis descriptiva

I.1. Introducción y objetivo

I.1.1. SECTOR VITÍCOLA ESPAÑOL Y ARAGONÉS: PASADO, PRESENTE Y FUTURO

Desde que la Organización Internacional de la Viña y el Vino (OIV) recoge periódicamente los datos de producción y consumo mundiales de vino, España ha jugado un claro papel protagonista. Hoy por hoy, nuestro país se ha consolidado en el tercer escalafón de los productores mundiales de vino, siendo únicamente superado por los dos países que tradicionalmente han copado alternativamente la primera plaza en la producción vinícola: Italia y Francia. Además, desde que España entró a formar parte de la Unión Europea se aprecia un incremento paulatino de la producción de vino hasta situarse en media en la actualidad en torno a los 40 millones de hectolitros.

Por contra, este incremento en la producción no se ha reflejado en un aumento del consumo de vino en España. Así, al igual que ha sucedido a nivel europeo, el consumo interno ha disminuido gradualmente hasta alcanzar un mínimo de alrededor de 13,5 millones de hectolitros en el año 2006 (OIV). Esta cifra supone un consumo por habitante de 24,9 Litros al año, menos de la mitad que en la década de los 80 (MARM, 2008). Este descenso se ha debido a la bajada en el consumo de vino de mesa, o vino de baja calidad, achacada fundamentalmente a los cambios en los hábitos de los españoles y al aumento del consumo de cerveza y de bebidas refrescantes. En cambio, a tenor de las estadísticas, el consumo de los llamados vinos de calidad, amparados por las Denominaciones de Origen, ha aumentado progresivamente, aunque no lo suficiente para compensar la caída de los vinos de mesa. Según las estadísticas iniciales de la OIV hasta el año 2009, la crisis económica ha agravado esta situación, acelerándose la caída en el consumo de vino en Europa y en el mundo llegando a cotas históricas. Esta aceleración ha sido especialmente acusada en España, lo que ha hecho que en los últimos 4 años haya pasado de ser el quinto país consumidor de vino en el mundo, a ser el séptimo.

El lento pero constante aumento de producción en zonas no tradicionales, como Chile o EE.UU., la no menos preocupante bajada del consumo de vino y los excedentes de producción continuos desde hace años, son las principales causas de la crisis estructural que el sector vitivinícola sufre en la actualidad, no sólo en España, si no también en Europa. La actual crisis económica no ha hecho más que agravar esta situación. Las primeras medidas serias por parte de la Comisión Europea (CE) para lograr un sector vitivinícola competitivo y sostenible dentro de la UE, se plasmaron en el Reglamento 1493/1999. Sin embargo, gran parte de las herramientas que dispuso resultaron no ser eficaces, hasta el punto de haber fomentado incluso los excedentes estructurales sin imponer mejoras estructurales. Ante estos resultados y con el fin de intentar reencauzar la situación, recientemente la propia CE decidió derogar el Reglamento 1493/1999 y sustituirlo por el Reglamento 479/2008, marcando como objetivos principales aumentar la competitividad de los productores vitivinícolas comunitarios frente al resto de zonas productoras, consolidar la fama de los vinos comunitarios como los mejores del mundo y, finalmente, recuperar antiguos mercados y conquistar otros nuevos, tanto en la UE como a escala mundial. Para ello, las principales medidas del reglamento van dirigidas al fomento de la exportación de los vinos comunitarios, así como a apoyar las inversiones dentro del sector encaminadas a mejorar el rendimiento económico de las propias empresas, con especial hincapié en el desarrollo tecnológico del sector. De hecho, en España

este mercado exterior ha superado en los últimos años al mercado interior, gracias en gran parte al bajo precio de nuestros vinos de gama media, en relación con los caldos italianos o franceses. Sin embargo, el desarrollo de las zonas emergentes de producción vinícola, como Australia o Chile, así como sus estrategias comerciales agresivas, abre un nuevo escenario de alta competencia, en la que la entrada y consolidación del vino español en nuevos mercados, como el ruso o el chino (el único que ha resistido los embates de la crisis), se antoja fundamental para mantener la situación preponderante de nuestros vinos en el mundo.

El sector vinícola aragonés constituye una de las actividades económicas más importantes de Aragón, ejerciendo también un papel fundamental en la vertebración del territorio, fijando industria y población en las zonas rurales. Fruto a partes iguales de la tradición y del desarrollo tecnológico, hoy contamos con cuatro denominaciones de origen (Cariñena, Somontano, Borja y Calatayud) reconocidas por su calidad no sólo en España, si no también en otros países como EE.UU., Reino Unido o Canadá. A pesar de la coyuntura actual del sector, Aragón está superando esta crisis mejor que otras zonas productoras españolas. Así, la búsqueda de nuevos mercados exteriores ha sido la calve para el mantenimiento del sector. Según datos de la Cámara de Comercio e Industria de Zaragoza, las exportaciones de vino aragonés en el año 2009 se cifraron en 60 millones de euros, siendo en la actual coyuntura de crisis económica, el único sector productivo en el que crecieron (un 1,2 %). Sin embargo, para poder seguir manteniendo esta tendencia y reforzar la presencia de los vinos aragoneses en los mercados, es necesario mejorar su competitividad frente a los vinos de otras zonas productoras tanto nacionales como internacionales, mediante una estrategia de diferenciación basada en la calidad. Para ello, en los últimos años se ha realizado un importante esfuerzo inversor, tanto del sector privado para la mejora de la infraestructura y tecnología de las bodegas, como del sector público financiando programas de investigación científica y desarrollo tecnológico. Resultado de dicho interés tanto público como privado, surgió la elaboración de esta Tesis Doctoral basada en los potenciales usos de una nueva tecnología de procesado alimentario en el proceso de vinificación: los pulsos eléctricos de alto voltaje. Ésta se desarrolló gracias a la concesión de dos proyectos financiados por la Diputación General de Aragón: "Aplicación de nuevas tecnologías al proceso de vinificación" (COOP04-12) y "Potenciales aplicaciones de los pulsos eléctricos de alto voltaje al proceso de vinificación" (Redes 2004-PM061).

I.1.2. LOS PULSOS ELÉCTRICOS DE ALTO VOLTAJE

Una de las estrategias esenciales para mejorar la competitividad de la industria alimentaria es la introducción de nuevas tecnologías de procesado que permitan la mejora de la calidad de los productos, el desarrollo de otros nuevos o la optimización de los procesos reduciendo sus costes energéticos. Una de estas técnicas son los Pulsos eléctricos de alto voltaje (PEAV). Esta tecnología consiste en la aplicación intermitente de campos eléctricos de alta intensidad (1-50 kV/cm) y corta duración (microsegundos) sin apenas aumentar la temperatura del producto tratado, y por lo tanto, sin alterar sustancialmente sus propiedades sensoriales y nutricionales (Wouters et al., 2001a). Estos campos eléctricos producen un fenómeno denominado electroporación consistente en la formación de poros en las membranas celulares. La formación de poros en la membrana de las formas vegetativas de los microorganismos (levaduras y bacterias) provoca su inactivación, por lo que esta tecnología se está investigando

como alternativa a la pasteurización de los alimentos por calor (Wouters et al., 2001a). Por otro lado, recientemente también se está considerando el empleo de esta tecnología para facilitar la extracción de distintos componentes del interior celular (Vorobiev y Lebovka, 2006). En el proceso de elaboración de vino tinto podrían tener interés ambas aplicaciones.

I.1.3. ALTERACIÓN MICROBIANA DEL VINO

Desde el siglo XIX hasta nuestros días, el conocimiento de las transformaciones y alteraciones del vino ha evolucionado profundamente en función del desarrollo de las disciplinas científicas sobre las cuales se apoyan estos fenómenos. Esto ha dado como resultado un mejor control del proceso de elaboración y conservación del vino y, así mismo, una mejora de la calidad, tanto desde el punto de vista sanitario, como sensorial y nutricional. Por lo tanto, el progreso del sector vinícola exige una investigación constante que se vea reflejada en la introducción de nuevas tecnologías en las bodegas que resuelvan los problemas existentes en la elaboración de vinos de calidad.

En los últimos años, se ha realizado un esfuerzo muy importante en la caracterización y desarrollo de cultivos iniciadores de levaduras para su utilización en la elaboración del vino (Esteve-Zarzoso et al., 2000). Su empleo tiene como objetivo asegurar la reproducibilidad de la fermentación, así como la calidad y homogeneidad del producto final. La utilización de las levaduras salvajes de la uva en la fermentación puede provocar, por una parte, una falta de reproducibilidad en el proceso de fermentación debido a la variabilidad en el tipo y cantidad de levaduras presentes en la uva; y por otra, que se den fermentaciones incompletas del azúcar debido a levaduras salvajes carentes de las propiedades enológicas apropiadas (baja tolerancia al alcohol). La inhibición o disminución de la actividad de las levaduras y bacterias salvajes presentes en el mosto previamente a su fermentación, sin afectar a sus propiedades sensoriales, podría facilitar la acción de los cultivos iniciadores y conseguir fermentaciones más reproducibles.

En la actualidad, uno de los problemas que produce mayores pérdidas económicas en las bodegas es el deterioro del vino debido al desarrollo de microorganismos alterantes. El vino durante su elaboración constituye un medio de cultivo muy apropiado para el crecimiento de un buen número de microorganismos alterantes, debido a su riqueza en ácidos orgánicos, aminoácidos, azúcares, factores de crecimiento y sales minerales. Sin embargo, existen tres factores fundamentales que van a limitar el desarrollo de los mismos: la alta concentración de etanol del vino, su bajo pH y la presencia de anhídrido sulfuroso. En general, estas tres barreras son suficientes para garantizar la estabilidad microbiológica del vino tinto (Suárez-Lepe e Iñigo-Leal, 2004). Los problemas generalmente surgen asociados a la falta de higiene. Los microorganismos causantes de alteración, tanto bacterias como levaduras provienen de la piel de la uva. Generalmente se asientan en los equipos de la bodega, fundamentalmente en las barricas, cuando la limpieza es deficiente, siendo muy complicada su eliminación y pudiendo contaminar todo el vino que se produzca en la bodega (Couto et al., 2005).

El género *Dekkera/Brettanomyces* es probablemente la causa de alteración del vino más importante. Las especies de este género están implicadas en dos de las alteraciones más temidas por los enólogos: el desarrollo del llamado “gusto a ratón” debido a la producción de tetrahidropiridinas, y la aparición en el vino de olores que recuerdan a “cuero” y, en el peor de los casos, a “sudor de caballo” (Heresztyn, 1986; Loureiro y Malfeito-Ferreira, 2003).

Esta segunda alteración es debida a la producción de etil-4-fenol y etil-4-guayacol durante el periodo de crianza en barricas. Estas levaduras pueden contaminar de manera crónica los diferentes equipos de las bodegas, sobre todo las barricas, siendo muy complicada su eliminación.

El otro grupo de microorganismos alterantes de importancia son las bacterias lácticas. Éstas están implicadas en diversas alteraciones del vino. La más importante de ellas es el picado láctico, producido fundamentalmente por bacterias del género *Lactobacillus*, siendo la más importante *Lactobacillus hilgardii* (Campos et al., 2003). Esta alteración se produce por el uso del azúcar residual del vino por todo tipo de bacterias lácticas, generando ácido láctico, ácido acético y, en consecuencia, un aumento de la acidez volátil (Lonvaud-Funel, 1999). Organolépticamente, los vinos que han sufrido el picado láctico se caracterizan por presentar un aspecto algo turbio, color y olor normales, y un sabor claramente ácido o agri dulce, en el caso de la existencia de restos de azúcares (Suárez-Lepe e Iñigo-Leal, 2004).

Se han propuesto diferentes estrategias con el fin de controlar las distintas poblaciones microbianas y así evitar la alteración microbiana del vino. La más importante es sin duda la adición de anhídrido sulfuroso (SO_2). Este compuesto permite controlar el crecimiento de un gran número de microorganismos perjudiciales, y además, favorece la extracción de los compuestos fenólicos y tiene cierta actividad antioxidante (Boulton et al., 1996; Fugelsang, 1989). Todo ello, añadido a su facilidad de uso, ha hecho que la adición de SO_2 haya perdurado hasta nuestros días, siendo en la actualidad, la técnica de control microbiano más generalizada en las bodegas.

A pesar de todos los efectos positivos del anhídrido sulfuroso, esta sustancia, en dosis elevadas, puede provocar la aparición de olores y sabores defectuosos y, lo que es más importante, en personas especialmente sensibles al mismo, ciertos efectos tóxicos (hipersensibilidad). Por ello, la propia Organización Mundial de la Salud (OMS) recomendó limitar su uso o sustituirlo por otra sustancia o técnica sin efectos perjudiciales en la salud humana (Usseglio-Thomasset, 1992). Además, a pesar de su uso generalizado, las alteraciones microbianas siguen generando grandes pérdidas económicas en las bodegas. Por todo ello, en los últimos años, se está realizando un gran esfuerzo con el fin de sustituir el uso del SO_2 por otras técnicas más efectivas o, cuando menos, desarrollar nuevas estrategias que permitan reducir las dosis utilizadas del mismo (Suárez et al., 2007).

Así, se ha propuesto el uso de diferentes técnicas, como la filtración o las proteínas de afinado, con el fin de reducir la carga microbiana inicial del mosto. Se ha observado que las técnicas propuestas, sin llegar a ser totalmente efectivas, pueden modificar las propiedades sensoriales del vino. Por ejemplo, la filtración, que reduce notablemente el número de microorganismos alterantes, afecta a las estructuras coloidales del vino, lo que reduce la intensidad de color. Por ello, se hace necesaria la búsqueda de otros sistemas alternativos que permitan eliminar o reducir el número de microorganismos alterantes sin modificar las características sensoriales del vino y sin afectar a la salud del consumidor. La tecnología de los PEAV podría ser uno de estos sistemas. Un tratamiento de PEAV permitiría eliminar, o cuando menos reducir, la flora alterante presente en los mostos y vinos, reduciendo las posibilidades del desarrollo de alteraciones. Así mismo, la reducción de la población de levaduras salvajes del mosto mediante un tratamiento PEAV, podría facilitar el desarrollo de los cultivos iniciadores y permitir que el proceso de fermentación fuera más reproducible.

I.1.4. LOS COMPUESTOS FENÓLICOS: IMPORTANCIA Y EXTRACCIÓN

En el proceso de elaboración de vino tinto, la fermentación de los azúcares del mosto se realiza en presencia de los hollejos de la uva. En esta etapa, por una parte, los azúcares se transforman en alcohol por acción de las levaduras, y por otra, se produce la extracción de diversas sustancias, fundamentalmente compuestos fenólicos. Éstos, especialmente los antocianos, son los máximos responsables del color del vino tinto. La cantidad de los diversos fenoles presentes, así como las reacciones químicas en las que intervienen, son las dos piezas claves que van a fijar las características del color del vino tinto, así como la evolución y el envejecimiento del mismo. Hoy, es bien conocido que estos compuestos no sólo determinan el color del vino tinto, sino también otras características sensoriales fundamentales como el cuerpo, la estructura, el amargor, la aspereza, la dureza o la astringencia, contribuyendo asimismo al perfil olfatorio del vino (Boulton, 2001; Fischer y Noble, 1994; Zoecklein et al., 2001). A pesar de su contribución positiva a las características del vino, es reseñable que también son responsables de defectos que deben ser evitados, como el amargor, la aspereza, la dureza o la astringencia excesiva.

Además de sus cualidades organolépticas, numerosos estudios *in vitro* han puesto de manifiesto que las sustancias fenólicas poseen actividad bactericida, antiviral, antiinflamatoria, antialérgica y antioxidante, lo que puede tener importantes implicaciones positivas en la salud humana (Frankel et al., 1993; Lurton, 2003; Meyer et al., 1997). Es más, hoy en día se cree que estos compuestos son los principales responsables de los efectos beneficiosos para la salud atribuidos al consumo de vino tinto (Estruch, 2000; Nichenametla et al., 2006; Stoclet et al., 2004). Esta afirmación se basa en el aparente efecto protector de los fenoles frente a enfermedades degenerativas como la diabetes, el cáncer o la osteoporosis, en estudios llevados a cabo en animales. El mecanismo de acción que explica este efecto protector no se sabe con detalle. El más aceptado está basado en la actividad antioxidante de estos compuestos. Las enfermedades degenerativas están fuertemente asociadas al envejecimiento celular, causado por el daño oxidativo de los compuestos celulares como el ADN o las proteínas. Los compuestos fenólicos, debido a su actividad antioxidante, poseen la capacidad de atrapar radicales libres y, por tanto, impedirían ese daño oxidativo (Chen et al., 1996; Rice-Evans et al., 1996).

Debido a la importancia de los compuestos fenólicos en las características del vino tinto, su extracción constituye una etapa fundamental en el proceso de elaboración del mismo. La evolución actual del mercado enológico mundial está dirigido principalmente a la obtención de vinos tintos de color intenso y de alta concentración fenólica. Con el fin de conseguir estos objetivos, en el proceso de elaboración de los vinos tintos se promueven maceraciones de larga duración, incluso superiores a las 3 semanas, especialmente si los vinos se quieren envejecer (Peynaud, 1996). Este hecho dificulta la rotación en el uso de los depósitos de fermentación en las bodegas, y produce un peor aprovechamiento del volumen útil de los depósitos de fermentación, debido a que aproximadamente el 20% de su volumen está ocupado por los hollejos. Además, la presencia de una mezcla de hollejos y mosto a lo largo de todo el proceso de fermentación complica el control de la temperatura de fermentación, existiendo riesgos de que la actividad de las levaduras se detenga.

Con objeto de acortar y mejorar el proceso de extracción de los compuestos fenólicos, se han propuesto distintas alternativas al proceso de vinificación clásico de los vinos tintos,

como el aumento de la temperatura de fermentación, prolongación del tiempo de maceración, congelación de las uvas antes de la fermentación, la termovinificación o el empleo de enzimas (Sacchi et al., 2005). Sin embargo, se han detectado distintos problemas cuando estas prácticas se aplican al proceso de elaboración del vino. El aumento de la temperatura de fermentación del vino puede provocar que se detenga la fermentación y pérdidas de compuestos volátiles. La prolongación del tiempo de maceración requiere incrementar el número de tanques de fermentación en la bodega y algunos autores han descrito incluso que está práctica da lugar a vinos con un color pobre e inestable (Ribéreau-Gayon et al., 1976). Por otro lado, el calentamiento o la congelación de la vendimia suele afectar a las propiedades sensoriales del vino dando lugar a vinos con un aroma vegetal, etéreo y amilítico, y a una pérdida de su frescor y astringencia (Coffelt y Berg, 1965). Finalmente, el empleo de preparados enzimáticos para favorecer la extracción de los componentes de los hollejos es una práctica cada vez más utilizada en las bodegas. Sin embargo, resultados presentados por algunos autores demuestran que el efecto obtenido es muy variable y que depende de la variedad de uva o de una cosecha a otra (Bautista-Ortín et al., 2005, 2007; Gambuti et al., 2007; Kelebek et al., 2007).

Previamente a esta Tesis Doctoral, nuestro grupo de investigación demostró a escala de laboratorio (microvinificación de 100 g) que un tratamiento de PEAV a los hollejos de la uva, previo al proceso de fermentación, acelera e incluso aumenta la extracción de compuestos polifenólicos totales y de antocianos totales, lo que permite acortar el periodo de maceración y mejorar la intensidad de color de los vinos (López et al., 2008a, 2008d, 2009a). En estos experimentos, los tratamientos de PEAV fueron aplicados en discontinuo, utilizando cámaras de tratamiento estáticas que permitían el procesado de tan sólo 20 gramos de hollejos. Si bien los resultados obtenidos fueron prometedores, la posible transferencia de esta tecnología a las bodegas exige tanto el desarrollo de equipos de PEAV que permitan aplicar tratamientos en continuo a escala planta piloto (100- 200 kg/h), como profundizar en el estudio del efecto de los PEAV en las características fisicoquímicas y sensoriales del vino tinto, no sólo durante la fermentación, si no también durante la crianza en barrica y el almacenamiento en botella.

I.1.5. OBJETIVO GENERAL

El objetivo global de esta investigación fue evaluar la viabilidad técnica del empleo de los PEAV para mejorar el proceso de vinificación, aprovechando los efectos que estos tratamientos ejercen sobre los materiales biológicos: la inactivación microbiana y la permeabilización de las envolturas celulares.

I.2. Principales resultados obtenidos

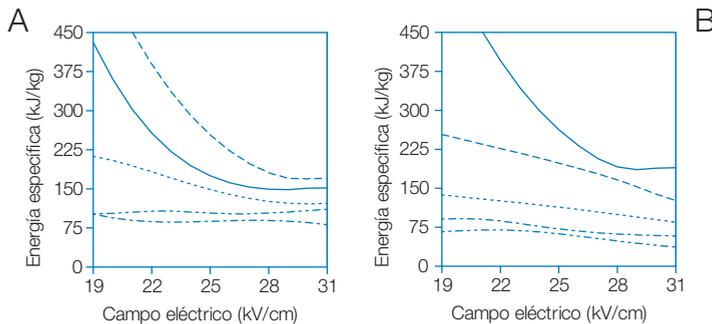
I.2.1. INACTIVACIÓN DE MICROORGANISMOS ALTERANTES DEL VINO TINTO MEDIANTE PULSOS ELÉCTRICOS DE ALTO VOLTAJE

En esta Tesis Doctoral se estudió la resistencia a los PEAV de cuatro especies microbianas alterantes (*Dekkera anomala*, *Dekkera bruxellensis*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus hilgardii*) y una levadura utilizada como cultivo iniciador para la fermentación del vino (*Saccharomyces bayanus*) tanto en mosto como en vino de uva tinta (Puértolas et al., 2009a). En la

Figura I.1, se muestran las condiciones de tratamiento necesarias, campo eléctrico y energía específica, para conseguir 3 ciclos logarítmicos de inactivación de los diferentes microorganismos estudiados, en mosto y en vino.

■ FIGURA I.1

Condiciones de tratamiento necesarias, campo eléctrico y energía específica, para conseguir 3 ciclos logarítmicos de inactivación de los diferentes microorganismos estudiados, en mosto (A) y en vino (B). *D. anomala* (-----), *D. bruxellensis* (----), *S. bayanus* (----), *L. plantarum* (—), *L. hilgardii* (---)



Como se observa, las levaduras se mostraron mucho más sensibles a los PEAV que las bacterias. Dentro de las levaduras, independientemente del medio de tratamiento, *D. anomala* fue la más resistente. Por el contrario, el medio de tratamiento utilizado determinó la bacteria, y por ende, el microorganismo más resistente. Mientras que *L. hilgardii* fue el microorganismo más resistente en el mosto, *L. plantarum* lo fue en el vino. Tanto en mosto como en vino, un tratamiento de PEAV de 29 kV/cm y 186 kJ/kg permitiría reducir en 3 ciclos logarítmicos la flora alterante presente. Esta reducción podría ser suficiente para disminuir la incidencia de las alteraciones producidas por estos microorganismos y para facilitar el desarrollo de los cultivos iniciadores utilizados en las bodegas. A pesar de los buenos resultados obtenidos, la aplicación de los PEAV con fines letales en las bodegas requiere el desarrollo de equipos que permitan la aplicación de las altas intensidades del campo eléctrico necesarias para esta aplicación a los flujos de producto habituales de las bodegas.

I.2.2. MEJORA DE LA EXTRACCIÓN FENÓLICA MEDIANTE PULSOS ELÉCTRICOS DE ALTO VOLTAJE

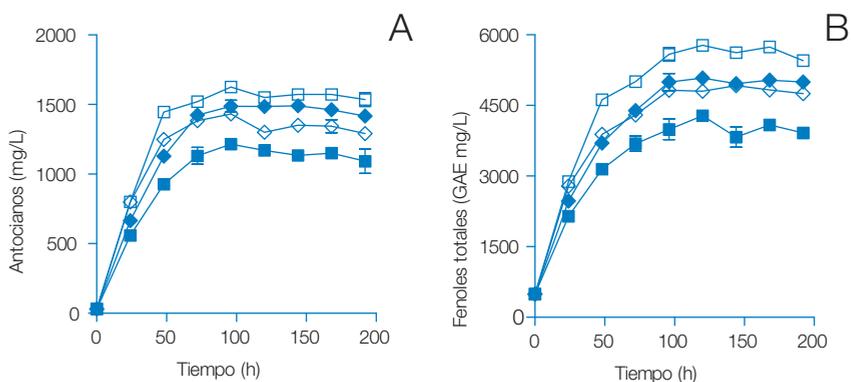
Evaluación de la aplicación de los PEAV a escala planta piloto

Con el fin de estudiar la viabilidad de la aplicación de los PEAV en continuo para mejorar la extracción fenólica en la elaboración del vino tinto, en esta Tesis Doctoral se desarrolló un sistema a escala planta piloto que permite la aplicación de tratamientos de PEAV de una intensidad del campo eléctrico de hasta 7 kV/cm, utilizando una velocidad de flujo de 118 kg/h. Para ello, se diseñó y construyó una cámara de tratamiento colineal basada en un diseño previo de Toepfl et al. (2007b).

En un primer momento, para establecer las condiciones de tratamiento por PEAV en flujo continuo con el equipo desarrollado, se decidió estudiar la cinética de extracción de sustancias antociánicas y de fenoles totales, realizando vinificaciones de 10 kg de tres variedades de uva, Cabernet Sauvignon, Merlot y Syrah (Puértolas et al, 2010a). Con objeto de poder comparar los resultados con aquellos obtenidos a escala de laboratorio (López et al., 2008a, 2008d, 2009c), los hollejos estuvieron en contacto con el mosto durante toda la fermentación. En la Figura 1.2, se muestran, a modo de ejemplo, las curvas de extracción de antocianos y de fenoles totales durante el proceso de maceración-fermentación del vino procedente de uvas de la variedad Cabernet Sauvignon tratadas y sin tratar por PEAV. En general, la evolución de ambos parámetros fue similar en el control y en las muestras tratadas. En todos los casos, se constató un incremento rápido de los índices analizados hasta alcanzar un valor máximo tras el cual se mantuvieron más o menos constantes. Como se observa, todos los tratamientos de PEAV aplicados (2, 5 y 7 kV/cm; 50 pulsos) permitieron mejorar la extracción de antocianos y de fenoles totales. Sin embargo, de manera similar a lo observado con la variedad Graciano en los tratamientos en estático, la mejora no aumentó con la intensidad del tratamiento, siendo el tratamiento óptimo el de 5 kV/cm y 50 pulsos.

FIGURA 1.2

Evolución de la extracción de los antocianos (A) y de los fenoles totales (B) durante la maceración-fermentación de los vinos tintos de la variedad Cabernet Sauvignon controles (■) y de los obtenidos mediante diferentes tratamientos de PEAV: 2 kV/cm; 50 pulsos (◆), 5 kV/cm; 50 pulsos (□) y 7 kV/cm; 50 pulsos (◇)



A modo de resumen, en la Tabla 1.1 se muestra la mejora en la intensidad de color (IC), el contenido antociánico (mg/L) (CA) y en el índice de polifenoles totales (IPT) de los vinos tintos obtenidos mediante el equipo de PEAV de escala planta piloto desarrollado en esta Tesis Doctoral. El efecto de los PEAV dependió de la variedad estudiada. En la variedad Cabernet Sauvignon la aplicación de un tratamiento de PEAV de 5 kV/cm y 50 pulsos permitió obtener una mejora en la IC, el CA y el IPT de un 32, un 34 y un 40%, respectivamente. Por otro lado, mientras que en el caso de la variedad Merlot las condiciones óptimas de tratamiento fueron las más intensas ensayadas (7 kV/cm; 50 pulsos), en Syrah, al igual que en Cabernet Sau-

vignon, el tratamiento que mejores resultados arrojó fue el de 50 pulsos de 5 kV/cm, aunque la diferencia con el tratamiento de 2 kV/cm fue escasa. En estas dos últimas variedades, en las condiciones óptimas de tratamiento, las mejoras obtenidas en la IC, el CA y en el IPT se situaron, en valor medio, alrededor del 9%.

Efecto de los PEAV en la evolución cromática y fenólica del vino tinto

Una vez demostrada la posibilidad del tratamiento de PEAV a la uva en flujo continuo, el siguiente paso acometido en esta Tesis Doctoral fue estudiar si las mejoras obtenidas tras la fermentación se mantenían durante el resto del proceso de elaboración del vino hasta su consumo (Puértolas et al., 2010b, 2010c, 2010d). En este caso, se realizaron vinificaciones de 100 kg de uva de la variedad Cabernet Sauvignon, aplicando el tratamiento óptimo determinado previamente, 50 pulsos de 5 kV/cm (Puértolas et al., 2010a).

En estos experimentos, la duración de la maceración se estableció en función de la extracción fenólica verificada durante la maceración. Así, mientras que en los vinos control la duración de la maceración fue de 144 horas, la de los vinos tratados por PEAV fue de 96 horas. Por lo tanto, ésta se acortó en 48 horas. Además, los vinos obtenidos mediante PEAV mostraron al final de la fermentación mayor contenido fenólico que los controles (Puértolas et al., 2010b). Estos resultados confirman los obtenidos por López et al. (2009c) a escala de laboratorio. La utilización de maceraciones más cortas podría facilitar la rotación de depósitos de fermentación en las bodegas, mejorando el aprovechamiento del volumen útil de los depósitos y el control de la temperatura de fermentación, disminuyendo el riesgo de parada fermentativa.

■ TABLA I.1

Mejoras obtenidas en la intensidad de color (ΔCI), contenido antocianico (ΔAC) e índice de polifenoles totales (ΔTPI) en los vinos obtenidos mediante la aplicación de PEAV de onda cuadrada con un equipo de escala planta piloto. (Puértolas et al., 2010a)

Variedad	Condiciones de tratamiento	ΔCI (%)*	ΔAC (%)	ΔTPI (%)
<i>Cabernet Sauvignon</i>	2 kV/cm; 50 pulsos; 0,6 kJ/kg	19	29	26
	5 kV/cm; 50 pulsos; 3,7 kJ/kg	32	34	40
	7 kV/cm; 50 pulsos; 6,8 kJ/kg	18	16	19
<i>Merlot</i>	2 kV/cm; 50 pulsos; 0,6 kJ/kg	0	0	7
	5 kV/cm; 50 pulsos; 3,7 kJ/kg	2	0	6
	7 kV/cm; 50 pulsos; 6,8 kJ/kg	8	7	13
<i>Syrah</i>	2 kV/cm; 50 pulsos; 0,6 kJ/kg	5	8	9
	5 kV/cm; 50 pulsos; 3,7 kJ/kg	6	8	10
	7 kV/cm; 50 pulsos; 6,8 kJ/kg	2	3	5

*Datos no publicados

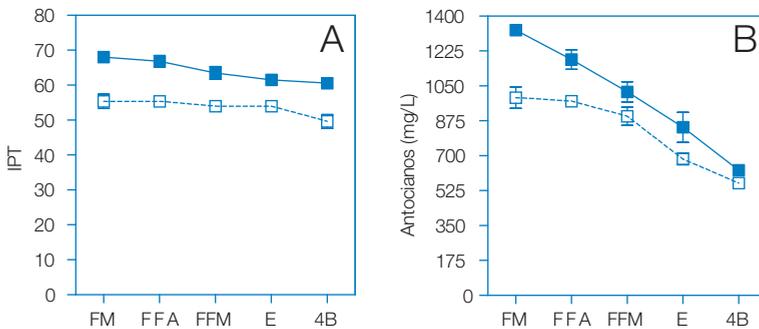
En un primer momento, se estudió la evolución del CA, del IPT y de las características cromáticas de los vinos (IC y parámetros CIELAB), desde el fin de la fermentación hasta los

4 meses de almacenamiento en botella (Puértolas et al., 2010b). A modo de ejemplo, en la Figura 1.3 se muestra la evolución del CA y del IPT. Como se observa, las mejoras obtenidas debido al tratamiento de PEAV se mantuvieron, en general, durante la fermentación maloláctica, tras el embotellado y tras los 4 meses de almacenamiento en botella.

Con objeto de caracterizar los vinos, tras los 4 meses de almacenamiento se realizó un análisis físico-químico general, incluyendo grado alcohólico, pH, acidez total y volátil, azúcares reductores, TPI, antocianos totales, taninos y polifenoles individuales mediante HPLC (Puértolas et al., 2010b). Aunque existieron diferencias en el grado alcohólico, pH, acidez total, acidez volátil y concentración de azúcares reductores entre los vinos, éstas no poseían significado enológico importante. Tras los 4 meses de almacenamiento, el vino obtenido mediante PEAV presentó una IC, TPI, contenido antociánico y una concentración de taninos un 27, un 18, un 10 y un 23% mayor que el vino control. Por su parte, el análisis HPLC de las sustancias fenólicas desveló que los perfiles fenólicos del vino tratado por PEAV y el control fueron similares, por lo que se puede deducir que los tratamientos de PEAV no afectan de manera específica a una determinada familia de sustancias fenólicas, aumentando la concentración de todas ellas de una manera similar. López et al. (2009c) obtuvieron resultados similares en el estudio del perfil antociánico de los vinos de Cabernet Sauvignon tratados mediante PEAV a escala de laboratorio.

FIGURA 1.3

Evolución del índice de polifenoles totales (IPT) (A) y del contenido antociánico (B) durante la vinificación y la maduración de los vinos obtenidos de uva sin tratar (□) y de uva tratada por PEAV (■). FM: fin de la maceración; FFA: fin de la fermentación alcohólica; FFM: fin de la fermentación maloláctica; E: embotellado; 4B: 4 meses de almacenamiento en botella



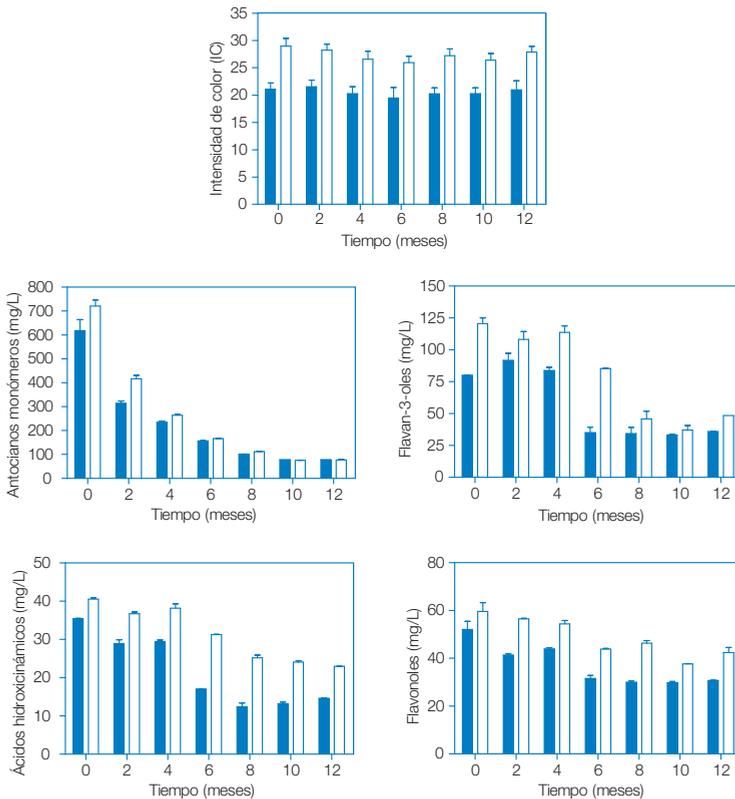
Posteriormente, debido a la importancia del proceso de envejecimiento del vino en la estabilización del color y en la producción de vinos de calidad, se decidió estudiar la evolución del color y de los principales compuestos fenólicos: antocianos monómeros, flavan-3-oles, ácidos hidroxicinámicos y flavonoles, durante el envejecimiento en botella (Figura 1.4) (Puértolas et al., 2010c).

Las diferencias en la IC entre el vino control y el elaborado mediante PEAV obtenidas tras el embotellado permanecieron constantes durante 12 meses de envejecimiento en botella. Tanto en el vino control como el obtenido mediante PEAV, los antocianos fueron la familia

de compuestos predominante, representando en el momento del embotellado alrededor del 77% de la concentración fenólica total. Todas las sustancias fenólicas investigadas siguieron un patrón de evolución similar. La concentración total de antocianos, flavan-3-oles, ácidos hidroxicinámicos y flavonoles decreció a lo largo de los 12 meses de envejecimiento. Tras finalizar los 12 meses en botella, mientras que la concentración de antocianos monómeros fue similar en ambos vinos, la concentración de flavan-3-oles, flavonoles y ácidos hidroxicinámicos fue mayor en los vinos obtenidos mediante PEAV. Similares resultados se obtuvieron cuando se estudió la evolución de las características cromáticas y fenólicas del vino control y el obtenido mediante PEAV tras 6 meses de envejecimiento en bodega y 8 meses de posterior almacenamiento en botella (Puértolas et al., 2010d). De acuerdo a estos estudios, la tecnología de los PEAV es una prometedora técnica enológica para conseguir el alto contenido fenólico necesario en la producción de vinos envejecidos de alta calidad.

■ FIGURA 1.4

Evolución de la intensidad de color (IC) y la concentración de antocianos monómeros, flavan-3-oles, ácidos hidroxicinámicos y flavonoles, tanto del vino control (barras azules) como del obtenido mediante PEAV (5 kV/cm; 50 pulsos) (barras blancas) a lo largo de 12 meses de almacenamiento en botella. Tiempo de maceración: 144 horas para el control y 96 horas para el vino obtenido mediante PEAV

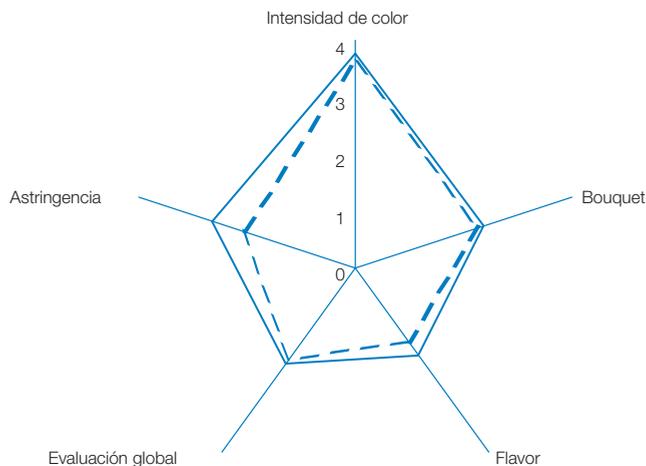


Efecto de los PEAV en las características sensoriales del vino tinto

Con objeto de determinar la existencia de diferencias organolépticas entre los vinos, se decidió evaluar sensorialmente los vinos tintos Cabernet Sauvignon tras 4 meses de almacenamiento en botella (Figura I.5) (Puértolas et al., 2010b). Los descriptores utilizados fueron intensidad de color, astringencia, bouquet, flavor y evaluación global.

FIGURA I.5

Valores obtenidos en el análisis sensorial de los vinos elaborados a partir de uva tratada por PEAV (—) y sin tratar (---), tras 4 meses de almacenamiento en botella. Descriptores: intensidad de color, astringencia, bouquet, flavor y evaluación global



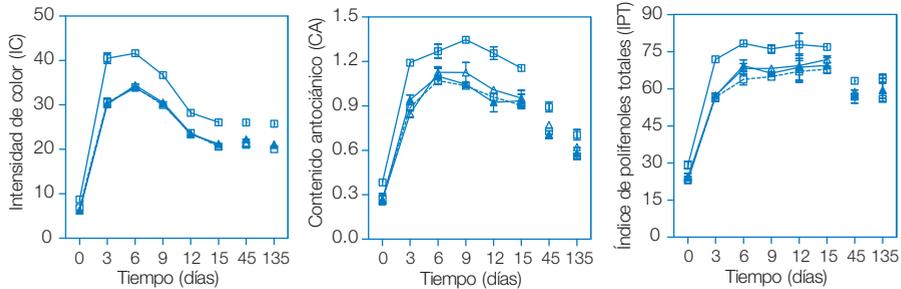
No se determinaron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre los vinos. Sin embargo, el vino obtenido mediante PEAV mostró mayor astringencia y flavor. Esto podría ser explicado debido a la mayor cantidad de compuestos fenólicos presentes en el vino PEAV. Los vinos envejecidos en bodega de roble también fueron sometidos a análisis sensorial tras 8 meses de almacenamiento en botella, no detectándose diferencias entre ellos (Puértolas et al., 2010d). Como resultado de estos análisis, también cabe destacar que los catadores no detectaron ningún aroma o sabor extraño asociado al tratamiento de PEAV.

Comparación de los PEAV con el uso de enzimas pectolíticas

Para determinar si los PEAV pudieran ser una buena herramienta para sustituir las técnicas actuales para mejorar la extracción fenólica, se comparó su uso con una de las técnicas enológicas más extendidas en las bodegas para conseguir este fin: el uso de enzimas pectolíticas (Puértolas et al., 2009b). Para ello, se estudió el efecto de la adición de 2 preparados enzimáticos comerciales y del tratamiento de PEAV óptimo (5 kV/cm; 50 pulsos) para la variedad utilizada, Cabernet Sauvignon, en la evolución de la IC, el CA y el IPT en los vinos hasta los 3 meses de almacenamiento en botella (135 días) (Figura I.6).

■ FIGURA I.6

Evolución de la intensidad de color (IC), contenido antocianico (CA) e índice de plifenoles totales (IPT) de los vinos, desde el inicio de la fermentación hasta los 3 meses de almacenamiento en botella. PEAV (■), Enzima₁ (▲), Enzima₂ (△), control (□)



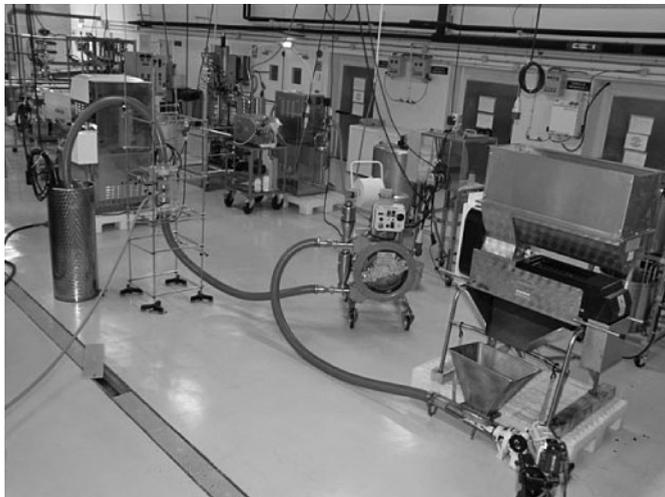
Todos los tratamientos mejoraron la extracción fenólica durante la maceración con respecto al control. Tras 3 meses de almacenamiento en botella, el vino obtenido mediante PEAV mostró una IC, un CA y un IPT un 28, un 26 y un 11% mayores, respectivamente, que el vino control. Por el contrario, mientras que ambos preparados enzimáticos aumentaron la IC alrededor de un 5%, sólo uno de ellos aumentó el CA y el IPT, y tan sólo en un 11 y un 3%, respectivamente. Esta variabilidad de efectos en función del preparado enzimático, concuerda con los resultados obtenidos por otros investigadores (Bautista-Ortín et al., 2005, 2007; Kelebek et al., 2007). En definitiva, bajo las mismas condiciones experimentales, el tratamiento de PEAV para mejorar la extracción de sustancias fenólicas se mostró mucho más efectivo que la adición de enzimas pectolíticas.

Desarrollo de un equipo de PEAV escala bodega

En el último año de realización de esta Tesis Doctoral, se dedicó un gran esfuerzo en reescalar el sistema de procesado por PEAV para poder aplicar tratamientos a flujos próximos a los requerimientos de una bodega media. Para ello, fue necesario adquirir una nueva bomba de impulsión, modificar las conducciones y construir una nueva cámara de tratamiento. Para comprobar el funcionamiento del sistema de PEAV desarrollado, se realizó una prueba en la Planta Piloto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos de la Universidad de Zaragoza (Figura I.7) (Puértolas et al., 2010e).

La evaluación inicial de la instalación nos permitió comprobar que con el equipo desarrollado se podía trabajar con un flujo de hasta 1600 kg/h, aplicando un tratamiento de 20 pulsos de 3 μ s a una intensidad máxima de 4,3 kV/cm. En estas condiciones se trató uva de la variedad Tempranillo, realizándose dos vinificaciones de 100 kg que se compararon con dos controles. Cabe destacar que el comportamiento de la instalación fue óptimo, consiguiéndose una buena homogeneidad de flujo de producto y forma de pulso.

■ FIGURA 1.7

Sistema de PEAV desarrollado en esta Tesis Doctoral para la aplicación de tratamientos a la uva a un flujo de 1.600 kg/h

En estos experimentos, los hollejos se mantuvieron en contacto con el mosto durante toda la fermentación. El tratamiento de PEAV permitió acelerar la extracción de los tres índices estudiados. Sin embargo, las diferencias obtenidas en los primeros momentos disminuyeron a lo largo de la fermentación. Así, al concluir la misma, el vino obtenido mediante PEAV poseía una IC, un CA y un IPT, un 5, un 2 y un 8% superiores al control, respectivamente. Los resultados obtenidos hasta el momento distan en gran medida a los publicados para la variedad Tempranillo (López et al., 2008a). Estas diferencias podrían ser debidas a la baja intensidad del campo eléctrico aplicado (4,3 kV/cm), al bajo número de pulsos (20) y, fundamentalmente, al grado de madurez de la uva utilizada.

1.3. Análisis económico de la aplicación de los PEAV

Cuando la investigación de la aplicación de una nueva tecnología arroja buenos resultados, es necesario preguntarse si es realmente posible su aplicación en la industria alimentaria. Ante ello, son múltiples las cuestiones a abordar, como la aceptación de la tecnología por el consumidor, si el producto final posee la calidad suficiente o, la más importante desde el punto de vista de su aplicabilidad real, cuál es la inversión inicial y el coste económico del proceso. Cualquier cálculo económico del desarrollo de una tecnología en la industria es sumamente complicado. Ello se debe fundamentalmente a que depende de las condiciones locales (coste de agua, luz, mano de obra, ingredientes, etc.) y que el coste de la inversión inicial, una vez que la tecnología comienza a aplicarse, cae vertiginosamente debido al desarrollo industrial de la propia tecnología (Toepfl, 2007d). Todo esto implica que cualquier cálculo que se realice es una estimación somera que puede quedarse desfasada en poco tiempo.

Las dos aplicaciones más importantes de los PEAV, la inactivación microbiana y la transferencia de masa, poseen costes energéticos bien diferentes. La pasteurización de alimentos líquidos mediante PEAV requiere conseguir un nivel de inactivación de, al menos, 5 ciclos logarítmicos de la especie microbiana más resistente presente en el alimento. Para conseguir dicho nivel de inactivación, se requieren intensidades del campo eléctrico superiores a los 25 kV/cm, lo que encarece considerablemente los equipos y aumenta el gasto energético (Toepfl et al., 2006). En cambio, debido a que las células eucariotas tienen un mayor tamaño que las procariontas, la mejora de la transferencia de masa por PEAV requiere la aplicación de campos eléctricos inferiores a los 10 kV/cm, por lo que tanto el coste de los equipos como los requerimientos energéticos del proceso son mucho menores.

En la Tabla I.2 se comparan las características y los costes generales estimados de un equipo para la pasteurización de los alimentos, con las características y los costes de un equipo destinado a la permeabilización de las membranas celulares con objeto de mejorar la transferencia de masa (Loeffler, 2006; Toepfl et al., 2006).

Análisis de costes: inactivación microbiana

Como muestra la Tabla I.2, la pasteurización de alimentos líquidos mediante PEAV requiere la aplicación de campos eléctricos mucho más elevados que los necesarios para la transferencia de masa (25-35 kV/cm). Dependiendo del tipo de producto, de la geometría de la cámara de tratamiento y de los parámetros del proceso, la energía específica necesaria para obtener resultados positivos podría variar entre 50 y 700 kJ/kg.

■ TABLA I.2

Características y costes generales estimados del procesado mediante PEAV para la pasteurización de alimentos y para la permeabilización de las membranas celulares con objeto de mejorar la transferencia de masa. Adaptado de Toepfl et al. (2006)

Requerimientos	Pasteurización	Permeabilización
Campo eléctrico (kV/cm)	25-35	1-5
Flujo (ton/h)	10	10
Energía (kJ/kg)	50-700	10-20
Costes		
Equipo (€)	4.000.000-5.800.000	75.000-150.000
Procesado (€/ton)	1,4-19,4	0,33-1

En el mejor de los casos (energía específica de 50 kJ/kg), el consumo eléctrico se sitúa en torno a 13 kWh por tonelada de producto, lo que supone un coste económico de 1,4 € por tonelada procesada (Heinz et al., 2003, Toepfl et al., 2006). En el caso de que el tratamiento requerido llegara a los 700 kJ/kg, el coste económico por tonelada de producto alcanzaría los 19,4 € (Evrendilek y Zhang, 2005, Toepfl et al., 2006). Teniendo en cuenta los sistemas de recuperación de energía, un tratamiento de pasteurización térmica de 85°C y 30 s, tiene un coste energético aproximado de 20 kJ/kg. Por lo tanto, los tratamientos de PEAV para la pasteurización microbiana requieren hasta 35 veces más energía que los tratamientos

térmicos habituales, por lo que su coste económico también es mucho mayor. Además, la aplicación de campos eléctricos tan elevados, de 25 a 35 kV/cm, puede provocar aumentos de la temperatura del producto y fenómenos de ruptura dieléctrica (Puértolas et al., 2008a). Para evitar estos problemas a nivel industrial, sería necesario el uso de sistemas de refrigeración por lo que el coste energético y económico podría ser todavía mayor.

A los gastos energéticos del proceso, es necesario sumar la inversión inicial, derivada de la compra del equipo de PEAV. Debido a los elevados requerimientos energéticos, ésta podría alcanzar los 5,8 millones de euros (Toepfl et al., 2006). Estas estimaciones son similares a las obtenidas previamente por Braakman (2003), el cual publicó que los costes de los equipos de pasteurización mediante PEAV a nivel industrial podrían situarse entre los 2 y los 4 millones de euros, en función de su capacidad (5-10 ton/h).

A pesar de las dificultades económicas de la aplicación de los PEAV para pasteurizar los alimentos, el uso de esta tecnología para aplicaciones concretas en las que el objetivo principal sea mejorar la estabilidad de los productos, podría llegar a ser rentable en un futuro cercano. Por ejemplo: la inactivación de microorganismos alterantes del vino. En este caso, un nivel de inactivación de tan sólo 3-4 ciclos logarítmicos podría ser suficiente para evitar su alteración, por lo que los requerimientos energéticos globales serían menores. Según los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral, para obtener dicha inactivación es necesaria la aplicación de un campo eléctrico de 29 kV/cm y de energías específicas de entre 150 y 300 kJ/kg. De acuerdo con los cálculos realizados por Toepfl et al. (2006), teniendo en cuenta un precio del kWh de 10 céntimos de euro, estas energías podrían traducirse a un coste aproximado de entre 4,2 y 8,4 € por tonelada (Puértolas et al., 2010e). Estos costes, aumentarían en gran medida al tener en cuenta el coste inicial necesario para la compra e instalación de un equipo de PEAV lo suficientemente potente.

Los sistemas de PEAV actuales únicamente permiten la aplicación de tratamientos de pasteurización a escala de planta piloto (<1 ton/h). El coste de estos equipos es cada vez menor gracias al gran desarrollo de la ingeniería eléctrica acaecido en los últimos años, situándose en la actualidad alrededor de los 150.000 €. Diversos autores han apuntado la posibilidad real del desarrollo de equipos mucho más potentes que permitan la aplicación de tratamientos de pasteurización a escala industrial (Braakman, 2003; Evrendilek y Zhang, 2005; Toepfl et al., 2006). El coste de la construcción e instalación de los mismos podría situarse, en función de su capacidad de producción, entre los 2 y los 4 millones de euros. Según Hoogland y Hann (2007), asumiendo un periodo de amortización de 5 años y 5.000 horas de producción al año, una instalación de PEAV con una capacidad de 5 ton/h supondría un incremento aproximado en el coste de los tratamientos de 8 € por cada tonelada producida.

En las bodegas, a pesar de que los gastos de equipo podrían abarataarse debido al tratamiento poco intenso necesario, los costes de amortización del equipo de PEAV por tonelada de vino producida podrían dispararse ya que la producción de una bodega de tamaño medio no suele superar el millón de litros al año. Por ello, en la actualidad, la aplicación de los PEAV en la industria del vino con este fin es poco viable económicamente. Es de esperar que en los próximos años, al igual que está sucediendo hoy en día con los equipos de escala planta piloto, el desarrollo constante de nuevos sistemas de PEAV a escala industrial permita abaratar en gran medida su coste. Si esto no sucede, la aplicación de los PEAV únicamente cobraría sentido si se demuestra que el vino tratado por PEAV posee una calidad muy superior al vino obtenido mediante técnicas tradicionales (SO₂).

Análisis de costes: extracción fenólica

Cuando se realizan estudios sobre la viabilidad económica de la aplicación de nuevos tratamientos en la industria alimentaria, es necesario comparar los costes con los tratamientos habituales. Uno de los pocos estudios económicos del uso de los PEAV en la transferencia de masa, fue realizado por Toepfl et al. (2006). En él, los autores compararon el uso de los PEAV para la extracción de zumo de frutas con el uso de enzimas de maceración. Concluyeron que para procesar 10 toneladas/hora con un tratamiento de 1-2 kV/cm y 10 kJ/kg, el consumo eléctrico aproximado sería de alrededor de 3 kWh por tonelada de producto. Asumiendo un precio del kWh de 10 céntimos de euro, situaron el coste de electricidad para el tratamiento de PEAV en aproximadamente 0,3 € por tonelada. Considerando un 10% más de gastos indirectos, el consumo total podría encontrarse según los autores en alrededor de 0,33 €/ton. Por el contrario, el coste de una maceración enzimática para el mismo objetivo fue estimada en torno a los 7,5 €/ton. La gran diferencia entre los costes de producción, alrededor de 7,2 €/ton, permitiría amortizar rápidamente los 75.000-150.000 € que se estima que costaría el equipo de PEAV necesario. Además de ser económicamente más rentable la aplicación de los PEAV que el uso de enzimas, los PEAV permitirían obtener zumos de mayor calidad, así como reducir el tiempo de procesado enormemente.

Basándonos en los datos publicados en la literatura para otras aplicaciones concretas, como el secado o la extracción de compuestos intracelulares de interés, podrían ser suficientes tratamientos inferiores a los 5 kV/cm y 20 kJ/kg, por lo que los costes del proceso podrían ser verdaderamente reducidos, e incluso inferiores a 1 €/ton. Esto, junto al relativo bajo coste inicial de inversión en el equipo (Tabla 2), hace que el uso de los PEAV para la transferencia de masa pueda ser verdaderamente rentable ya en la actualidad, para cualquiera de sus aplicaciones.

La aplicación de los PEAV para mejorar la extracción fenólica requiere la aplicación de tratamientos poco intensos. Así, de acuerdo con los resultados presentados, para conseguir dicha mejora se requieren campos eléctricos de entre 2 y 7 kV/cm y energías específicas de entre 0,56 y 6,76 kJ/kg. Estos tratamientos, con un precio del kWh de 10 céntimos de euro, se traducen en un coste aproximado de entre 0,01 y 0,2 €/ton (Puértolas et al., 2010e). Costes que resultan mucho menores a los de los tratamientos necesarios para la inactivación de los microorganismos alterantes del vino citados en el apartado anterior y, por tanto, más fáciles de asumir por las bodegas.

En cuanto a los sistemas de PEAV para la mejora de la transferencia de masa, la mayor parte de las barreras existentes para la construcción de equipos de escala industrial han sido salvadas. Los equipos existentes en la actualidad son día a día más potentes, acercándose cada vez más a esas necesidades industriales. Así, utilizando un generador que permite la aplicación de pulsos de onda cuadrada de un voltaje máximo de 30 kV y una cámara de tratamiento colineal de 3 cm de diámetro, en esta Tesis Doctoral se ha logrado la aplicación de un tratamiento de 4,3 kV/cm y 20 pulsos, utilizando un flujo de producto de 1,6 ton/h, cercano a las necesidades de una bodega pequeña. El bajo coste de este sistema de PEAV, 100.000 €, permitiría teóricamente su rápida amortización. De ello se puede concluir que, al contrario que lo que ocurre con la inactivación microbiana, el uso de los PEAV en las bodegas para mejorar la extracción fenólica es, hoy por hoy, económicamente viable. Eso sí, para la

aplicación real de la tecnología en la industria enológica, es necesario realizar vinificaciones mediante esta tecnología en las propias bodegas para verificar los buenos resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral, así como solventar los posibles problemas que pueden acontecer al trasladar la tecnología a la industria alimentaria.

II. El vino tinto

II.1. Breve reseña histórica

El vino, entendido como resultado de la fermentación alcohólica del mosto de la uva, constituye uno de los alimentos elaborados más antiguos que se conocen. Fruto de la propia evolución del hombre, su origen es incierto y se pierde en el tiempo, arraigándose a partes iguales en el inicio de la recolección de uva y en la aparición de la alfarería (6000 a.C.). El primer vestigio de elaboración de vino se encontró en los montes Zagros (Irán), en el asentamiento neolítico de Hajji Firuz Tepe (5400-5000 a.C.). En los años 60, la profesora Mary M. Voigt de la Universidad de Pensilvania desenterró en esta zona una vasija que contenía residuos de color amarillento que, posteriormente, debido a la presencia de ácido tartárico, fueron identificados como vino (McGovern et al., 1996). A partir de este descubrimiento, no parece descabellado deducir que el primer vino elaborado por la humanidad surgiera de la fermentación espontánea de granos de uva, recolectados y almacenados por el hombre neolítico en tinajas de barro. Hoy en día es aceptado, por lo tanto, que la producción y el consumo de vino comenzaron hace alrededor de 7.000 años en Mesopotamia, concretamente en una región situada entre los actuales países de Irán y Georgia, gracias al cultivo por parte del hombre de la especie *Vitis silvestris*, la cual evolucionó rápidamente en un proceso de selección hasta la actual *Vitis vinifera*. Posteriormente, su producción y consumo se extendieron con los movimientos migratorios y las rutas comerciales a Oriente Medio y a lo que hoy conocemos como Egipto y Grecia, y más tarde al resto de la cuenca mediterránea. Finalmente, ayudado en gran medida por la expansión del cristianismo, el vino se globalizó, convirtiéndose en lo que es hoy, una de las bebidas alcohólicas más consumidas en todo el mundo (McGovern, 2003).

A pesar de que, como ha quedado patente, el vino y la humanidad han caminado juntos desde hace milenios, es de destacar que las transformaciones que originan el vino sólo comenzaron a estudiarse en profundidad a partir del siglo XIX, de la mano de Louis Pasteur (Hidalgo-Togores, 2003a). Él fue el primero en demostrar que el proceso de fermentación y, por tanto, la producción de alcohol a partir de los azúcares, es debido al desarrollo de levaduras. Desde entonces y hasta nuestros días, el estudio de la composición del vino y de las transformaciones que sufre a lo largo de su elaboración y evolución han ido enriqueciéndose exponencialmente a partir del desarrollo de diversas disciplinas científicas, como la Microbiología o la Bioquímica, hasta constituir por sí mismo una rama de la ciencia, la Enología. Todo este gran esfuerzo investigador ha dado como resultado un mejor control del proceso de elaboración y conservación del vino y, así mismo, una mejora de la calidad, tanto desde el punto de vista sanitario como sensorial y nutricional.

II.2. Situación del sector vinícola

II.2.1. SITUACIÓN DEL SECTOR VINÍCOLA INTERNACIONAL

La Tabla II.1 muestra la producción y el consumo de vino a nivel mundial, según las estadísticas oficiales publicadas por la Organización Internacional de la Viña y el Vino (OIV) en coordinación con la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) (2005). Con objeto de eliminar las posibles interferencias resultantes de factores climáticos circunstanciales que afectan a la producción anual, los datos se presentan como medias de quinquenios desde el año 1971. Como se observa en la Tabla, se ha producido

una reducción progresiva de la producción desde los 313,11 millones de hectolitros en el periodo comprendido entre el año 1971 y el año 1975, hasta los 274,96 millones de hectolitros en el periodo 2001-2005. Según los datos provisionales de la OIV, esta tendencia continúa en la actualidad. Así, para el año 2008 se espera que la producción se sitúe en torno a 240 millones de hectolitros, una de las más bajas desde que se registran datos estadísticos del sector (Castellucci, 2008).

■ TABLA II.1

Cifras medias de producción y consumo mundial de vino en los últimos siete quinquenios. Datos expresados en millones de hectolitros. Fuente: Organización Internacional de la Viña y el Vino (OIV)

Periodo temporal	Producción	Consumo
1971-1975	313,11	280,36
1976-1980	326,05	285,75
1981-1985	333,55	280,72
1986-1990	304,19	240,24
1991-1995	263,09	224,25
1996-2000	272,56	224,25
2001-2005	274,96	233,29

Similar tendencia que en la producción se observa en el consumo de vino. Desde el año 1971 hasta 1990, éste disminuyó alrededor de 40 millones de hectolitros (Tabla II.1). Sin embargo, a partir del año 1990, la velocidad de este decrecimiento fue mucho menor, auspiciada en gran medida por el desarrollo del mercado vinícola en países emergentes como EE.UU., Rusia o China. De hecho, según las previsiones para el año 2008, el consumo se habrá situado en torno a 243 millones de hectolitros, similar dato al recogido durante el periodo que comprenden los años 1986 y 1990 (Castellucci, 2008).

Uno de los factores más preocupantes en el mercado vinícola internacional es el registro continuo de excedentes mundiales de producción de vino desde los años 70. Por lo tanto, uno de los retos más importantes del sector es equilibrar la producción con el consumo. Según las previsiones de la OIV para el año 2008, esta tendencia parece engañosamente corregida, fruto en gran medida de la escasez extraordinaria de producción de ese año (Castellucci, 2008).

II.2.2. SITUACIÓN DEL SECTOR VINÍCOLA EUROPEO

Europa ha estado tradicionalmente, y está en la actualidad, a la cabeza de la producción vinícola mundial. Según la OIV (2005), en el año 2005, el continente europeo produjo 191 millones de hectolitros de vino de los cuales 174,76, el 91,5%, corresponden a países integrados en la Unión Europea (UE). Dentro de la misma, Italia se situó a la cabeza de los países productores con más de 54 millones de hectolitros, mientras que Francia y España se situaron en segundo y tercer lugar, produciendo alrededor de 52 y 36 millones de hectolitros respectivamente (Tabla II.2).

A pesar del claro liderazgo de Europa en la producción mundial, en los últimos años su hegemonía se ha visto amenazada por la emergencia de nuevas zonas productoras, como

EE.UU. u Oceanía, y en la última década, al crecimiento espectacular de producción vinícola en China. Así, según las previsiones para el 2008 de la OIV, Europa, que a finales de los años 80 ostentaba alrededor del 78% de la producción mundial con más de 230 millones de hectolitros, habrá copado en torno al 67%, con una producción cercana a 162 millones de hectolitros, una de las más escasas de los últimos años (Castellucci, 2008).

En el año 2005, Europa constituyó el primer continente consumidor, con alrededor de 160 millones de hectolitros (67% del consumo mundial), perteneciendo 138,1 millones al consumo dentro de los países miembros de la UE. Entre los países tradicionalmente consumidores de vino, Francia se situó a la cabeza con cerca de 34 millones de hectolitros. Tras ella, se situaron Italia, Alemania y España con alrededor de 27, 20 y 14 millones de hectolitros respectivamente (Tabla II.2).

Como ya se ha mencionado anteriormente, a pesar de que a partir de 1990 el consumo mundial apenas ha descendido significativamente gracias al crecimiento de mercados emergentes como China o Rusia, el consumo en Europa está sufriendo un lento pero continuo retroceso, tanto en cantidad neta como en porcentaje, respecto al resto de continentes. Así, si a finales de los 80 Europa consumía cerca del 74% del vino producido en el mundo (240 millones de hectolitros), en menos de dos décadas (año 2005) decreció hasta el 67% (160 millones de hectolitros). Con respecto a las previsiones del 2007, en el 2008 se espera que el consumo neto en Europa haya seguido esta tendencia y haya bajado en torno a 2 millones de hectolitros (Castellucci, 2008).

La lenta pero constante pérdida de la posición preponderante de Europa frente al resto de zonas productoras, la no menos preocupante bajada del consumo de vino y los excedentes de producción continuos desde hace años son las principales causas de la crisis estructural que el sector vitivinícola sufre en este continente desde hace 30 años. Las primeras medidas serias por parte de la Comisión Europea (CE) para lograr un sector vitivinícola competitivo y sostenible dentro de la UE, se plasmaron en el Reglamento 1493/1999. Sin embargo, gran parte de las herramientas que dispuso resultaron no ser eficaces, hasta el punto de haber fomentado incluso los excedentes estructurales sin imponer mejoras estructurales. Ante estos resultados y con el fin de intentar reencauzar la situación, recientemente la propia CE decidió derogar el Reglamento 1493/1999 y sustituirlo por el Reglamento 479/2008, marcando como objetivos principales aumentar la competitividad de los productores vitivinícolas comunitarios frente al resto de zonas productoras, consolidar la fama de los vinos comunitarios como los mejores del mundo y, finalmente, recuperar antiguos mercados y conquistar otros nuevos, tanto en la UE como a escala mundial. Para ello, las principales medidas del reglamento van dirigidas al fomento de la exportación de los vinos comunitarios, así como a apoyar las inversiones dentro del sector encaminadas a mejorar el rendimiento económico de las propias empresas, con especial hincapié en el desarrollo tecnológico del sector.

■ TABLA II.2

Producción y consumo de vino en el año 2005 en los países de la Unión Europea. Datos expresados en millones de hectolitros. Fuente: Organización Internacional de la Viña y el Vino (OIV)

País	Producción	Consumo
Alemania	9,15	19,85
Austria	2,26	2,40
Bélgica	0,01	2,54
Bulgaria	1,71	1,35
Chipre	-	-
Dinamarca	-	1,56
Eslovaquia	0,30	0,60
Eslovenia	0,63	0,88
España	36,16	13,69
Estonia	0,02	0,10
Finlandia	-	0,49
Francia	52,11	33,53
Grecia	4,03	3,59
Hungría	3,57	3,50
Irlanda	-	0,68
Italia	54,02	27,02
Letonia	-	0,13
Lituania	0,08	0,19
Luxemburgo	0,16	0,25
Malta	0,07	0,04
Países Bajos	-	3,47
Polonia	-	0,61
Portugal	7,27	4,90
Reino Unido	0,17	12,00
República Checa	0,44	0,82
Rumanía	2,60	2,38
Suecia	-	1,53

Por lo tanto, la mejora de la situación coyuntural del sector vinícola europeo se basa en gran medida en la modernización de las bodegas, así como en la introducción en las mismas de técnicas enológicas innovadoras que permitan reducir costes de producción o mejorar la calidad de los vinos comunitarios.

II.2.3. SITUACIÓN DEL SECTOR VINÍCOLA ESPAÑOL

El sector vinícola español posee un protagonismo destacado en el mercado mundial del vino. Como ya se ha subrayado en el apartado anterior, España es el tercer país con mayor producción de vino, siendo sólo superada por los dos países que tradicionalmente han copado alternativamente la primera plaza en la producción mundial: Italia y Francia. De forma general, desde que España entró a formar parte de la Unión Europea, la producción ha ido creciendo paulatinamente hasta situarse en media en la actualidad en torno a los 40 millones de hectolitros. Sin embargo, al igual que ha sucedido a nivel europeo, el consumo interno ha disminuido gradualmente hasta alcanzar un mínimo en el año 2006 de 24,9 Litros

per cápita, menos de la mitad que en los años 80 del siglo XX (MARM, 2008). Este descenso es debido a la bajada en el consumo de vino de mesa, o vino de baja calidad, achacada fundamentalmente a los cambios en los hábitos de los españoles y al aumento del consumo de cerveza y de bebidas refrescantes. En cambio, fruto del desarrollo económico y social de España acontecido desde su integración en la UE, el consumo de los llamados vinos de calidad con Denominación de Origen ha aumentado progresivamente, aunque no lo suficiente para compensar la caída de los vinos de mesa.

Debido a esa bajada gradual del consumo, las bodegas españolas comenzaron a exportar sus excedentes a zonas como EE.UU., Reino Unido o Alemania, con baja producción pero con creciente demanda de vinos de calidad. De hecho, este mercado exterior ha superado en los últimos años al mercado interior, gracias en gran parte al bajo precio de nuestros vinos de gama media, en relación con los caldos italianos o franceses. Sin embargo, el desarrollo de las zonas emergentes de producción vinícola, como Australia o Chile, así como sus estrategias comerciales agresivas, abre un nuevo escenario de alta competencia, en la que la entrada y consolidación del vino español en nuevos mercados, como el ruso o el chino, se antoja fundamental para mantener la situación preponderante de nuestros vinos en el mundo.

II.2.4. SITUACIÓN DEL SECTOR VINÍCOLA ARAGONÉS

El sector vinícola aragonés constituye una de las actividades económicas más importantes de Aragón, ejerciendo también un papel fundamental en la vertebración del territorio, fijando industria y población en las zonas rurales.

Fruto a partes iguales de la tradición y del desarrollo tecnológico, hoy contamos con cuatro denominaciones de origen (Cariñena, Somontano, Borja y Calatayud) reconocidas por su calidad no sólo en España, si no también en otros países como EE.UU., Reino Unido o Canadá.

Hoy por hoy el sector vinícola aragonés se enfrenta a los mismos problemas que el sector vinícola nacional: la bajada paulatina del consumo de vino en el mercado nacional, y el aumento progresivo de producción de los países emergentes. Por ello, en los últimos años la búsqueda de nuevos mercados exteriores ha sido la clave para el mantenimiento del sector en esta época de crisis. Así, según datos de la Cámara de Comercio e Industria de Zaragoza, las exportaciones de vino aragonés en el año 2009 se cifraron en 60 millones de euros, siendo en la actual coyuntura de crisis económica, el único sector productivo en el que crecieron (un 1,2 %). Sin embargo, para poder seguir manteniendo esta tendencia y reforzar la presencia de los vinos aragoneses en los mercados nacionales e internacionales, es necesario mejorar su competitividad frente a los vinos de otras zonas productoras tanto nacionales como internacionales, mediante una estrategia de diferenciación basada en la calidad. Para ello, en los últimos años se ha realizado un importante esfuerzo inversor, tanto del sector privado para la mejora de la infraestructura y tecnología de las bodegas, como del sector público financiando programas de investigación científica y desarrollo tecnológico. Resultado de dicho interés tanto público como privado, surgió la elaboración de esta Tesis Doctoral.

II.3. Proceso de elaboración de vino tinto

El vino tinto se define tradicionalmente como el procedente del mosto de uva tinta que ha estado en maceración con las partes sólidas de la uva, habitualmente sólo los hollejos,

durante la fermentación alcohólica del mismo (Ribéreau-Gayon et al., 2006a). Será durante esta maceración cuando se produzca la extracción de los compuestos fenólicos, de los aromas y de todas las sustancias que caracterizarán química y organolépticamente al vino (Hidalgo-Togores, 2003b; Ribéreau-Gayon et al., 2006b). Actualmente, esta definición tradicional es algo inexacta, debido a la existencia de técnicas enológicas que, como sucede en la elaboración del vino rosado y el vino blanco, disocian la fase de maceración de la de fermentación.

A continuación, se detallarán las principales fases que acontecen durante la elaboración tradicional del vino tinto (Figura II.1).

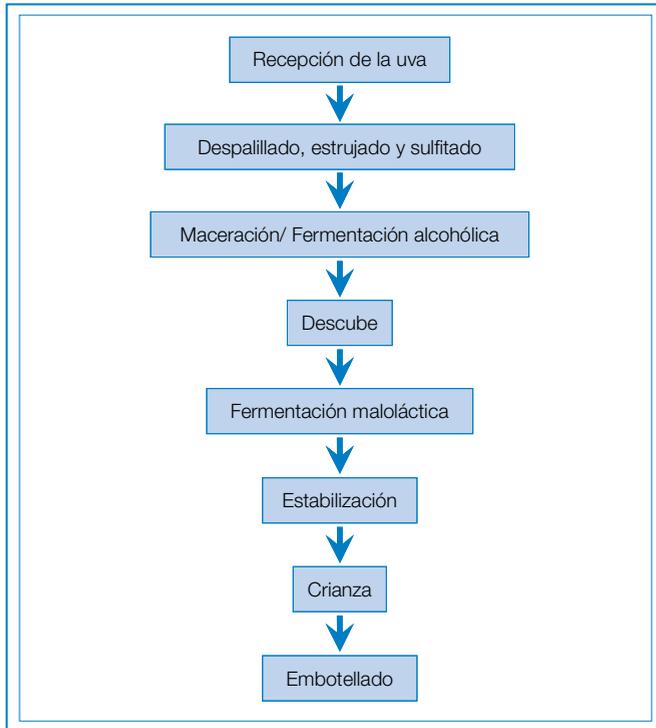
II.3.1. RECEPCIÓN DE LA UVA

El proceso de elaboración del vino no comienza propiamente con la recepción de la uva en la bodega, sino en la propia viña. Un correcto seguimiento de la maduración y desarrollo de la uva es fundamental para obtener un producto de calidad (Hidalgo-Togores, 2003a). La uva a utilizar en la vinificación debe poseer un adecuado estado sanitario así como un grado de madurez óptimo. Para ello, es de vital importancia controlar en la viña distintos parámetros relacionados con la madurez, como la concentración de azúcar, la acidez o el pH. Cuando se determina que la uva está en condiciones óptimas, se vendimia y se transporta a la bodega. Una vez recibida, ésta se pesa y se toman las muestras correspondientes con el fin de determinar la aptitud de la uva para la producción de vino tinto. Los parámetros habitualmente utilizados en la bodega son la acidez total, el pH, la densidad, los grados Brix, el nitrógeno fácilmente asimilable (FAN), el color, el contenido en polifenoles y el estado sanitario de la uva. Finalmente, en el momento de la recepción de la uva, también se analiza su estado sanitario. La presencia de mohos de géneros como *Mildium* y *Botrytis* afecta muy negativamente a la calidad del vino que se obtendrá a partir de esas uvas.

II.3.2. DESPALILLADO, ESTRUJADO Y SULFITADO

Tras la recepción de la uva, ésta se despallilla para eliminar el raspón, se estruja para extraer el mosto y se añade anhídrido sulfuroso (SO_2). El SO_2 inhibe el desarrollo de los microorganismos presentes en la uva, especialmente el de las bacterias lácticas, lo que facilita el desarrollo de los cultivos iniciadores (Fugelsang, 1989). Su efecto, aunque importante en el proceso de fermentación, es más importante si cabe durante la maduración del vino, ya que evitará o dificultará la turbidez causada por el crecimiento de levaduras o el desarrollo de otras alteraciones microbianas. Además de sus cualidades antisépticas, el anhídrido sulfuroso es un fuerte antioxidante y facilita la extracción de las sustancias fenólicas (Boulton et al., 1996; Fugelsang, 1989; Salaha et al., 2008). Todo ello, añadido a su facilidad de uso, ha hecho que la adición de SO_2 haya perdurado hasta nuestros días, siendo en la actualidad, la técnica de control microbiano más generalizada en las bodegas (Couto et al., 2005). Éste puede añadirse en diferentes formas a la vendimia: gas, gas licuado, en solución acuosa o en estado sólido cristalino. Debido a la naturaleza volátil del anhídrido sulfuroso, parte del que se encuentra libre en disolución en el vino, se pierde durante la fermentación alcohólica. Por ello, tras ella, a no ser que tenga lugar una segunda fermentación (la maloláctica), se debe reajustar su concentración.

■ FIGURA II.1

Principales etapas del proceso tradicional de elaboración de vino tinto**II.3.3. FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA**

Tras el sulfitado, se produce la etapa clave en la elaboración del vino: la fermentación alcohólica. En ella, los azúcares reductores del mosto son transformados parcial o totalmente en alcohol, mediante la acción de levaduras del género *Saccharomyces*, generalmente *Saccharomyces cerevisiae*, en condiciones de anaerobiosis. Estas levaduras pueden proceder de la superficie de las uvas, o bien pueden ser añadidas a la vendimia en forma de cultivos iniciadores comerciales, o en forma de cultivos aislados y seleccionados específicamente en la propia bodega. Hoy por hoy, la utilización de cultivos iniciadores comerciales está totalmente generalizada en las bodegas, debido a que permiten un arranque correcto y rápido de la fermentación, así como obtener un producto muy homogéneo (Pozo-Bayón et al., 2009).

La duración de la fermentación oscila normalmente entre 7 y 20 días, dependiendo de diversos factores como la temperatura ambiental, las características de las levaduras implicadas en el proceso o la cantidad de nutrientes presentes en el mosto de uva. A lo largo de este tiempo, es necesario proceder a la aireación del mosto. Este proceso, denominado remontaje o remontado, asegura una mejor fermentación, homogeneizando el material de la cuba, especialmente los azúcares, las levaduras y los hollejos, favoreciendo la extracción de los compuestos fenólicos y, finalmente, impidiendo que haya zonas de elevada temperatura.

En la fermentación alcohólica, el ácido pirúvico, generado por las levaduras a partir de los azúcares en la glicólisis, es transformado por la enzima piruvato descarboxilasa en CO_2 y acetaldehído. Esta última molécula es atacada por la enzima alcohol deshidrogenasa, produciéndose finalmente el etanol y el NAD^+ necesario para que continúe la glicólisis y la célula obtenga energía sin utilizar la vía respiratoria. Esta reacción se ve favorecida por la alta concentración de azúcares existentes en el medio y por una mínima presencia o ausencia de oxígeno. En el caso de una presencia excesiva de oxígeno, las levaduras, en vez de realizar la fermentación alcohólica, utilizarían la vía respiratoria (Ribéreau-Gayon et al., 2006a).

Para el buen desarrollo de la fermentación alcohólica, es fundamental realizar un correcto seguimiento de la misma. De este modo, en caso de la presencia de algún problema, por ejemplo una parada de la fermentación, es posible tomar las medidas correctoras oportunas. Existen dos parámetros esenciales a controlar: la temperatura y la densidad del mosto.

La temperatura de fermentación es un parámetro fundamental ya que va a determinar en gran medida las características del vino. Así, con objeto de favorecer la retención de los aromas, los vinos blancos y rosados generalmente se fermentan a temperaturas inferiores a 20°C (Hidalgo-Togores, 2003b; Ribéreau-Gayon et al., 2006b). Por el contrario, en el caso de los vinos tintos, en los cuales es necesaria una mayor extracción fenólica, se utilizan temperaturas en torno a los 25°C , superando en ocasiones incluso los 28°C (Gómez-Míguez et al., 2007; López et al., 2008a). Esta mayor temperatura conlleva a su vez, que la fermentación de los vinos tintos sea más rápida que la de los vinos blancos o rosados. Sin embargo, también implica la pérdida de mayor cantidad de aromas varietales y, lo que es más importante, un incremento del riesgo de “parada fermentativa”. Si la temperatura aumenta por encima de los 30°C , el crecimiento tumultuoso de las levaduras puede provocar que se alcancen temperaturas incluso superiores a los 35°C en determinadas zonas de los depósitos de fermentación. Temperaturas tan elevadas pueden provocar la detención de la actividad metabólica de las levaduras, parándose la fermentación y favoreciéndose el desarrollo de bacterias alterantes que crecerán a expensas de los restos de sacarosa presentes en el mosto.

Para poder estimar y finalmente saber cuándo ha concluido la fermentación, es fundamental realizar un seguimiento diario de la densidad del mosto. Ésta, tras el despalillado y estrujado, suele oscilar en torno a 1100 g/L . Una vez arranca la fermentación, la densidad disminuye debido a la desaparición del azúcar y a la consecuente aparición de etanol. Cuando durante dos días seguidos este valor se mantiene constante (en torno a 990 g/L), la fermentación se da por concluida.

II.3.4. MACERACIÓN

El color y el resto de los atributos responsables de la de calidad sensorial del vino tinto son en gran medida atribuibles a los compuestos fenólicos, a las moléculas aromáticas y a los precursores de aromas localizados en las células de los hollejos (Pinelo et al., 2006). Por ello, la maceración del mosto con los hollejos durante la etapa de fermentación es imprescindible para la elaboración de este tipo de vino. En este proceso, no sólo se busca la extracción de los antocianos, principales responsables del color del vino, sino que además es necesaria la extracción de otras sustancias fenólicas como los flavanoles. Estos flavanoles son imprescindibles para la elaboración de vinos de crianza o reserva, ya que proporcionarían cuerpo, astringencia y sabor amargo (Boulton, 2001; Fischer y Noble, 1994). Estas características, fundamentales para estos

vinos, también son necesarias para los vinos tintos jóvenes. Para conseguir una cantidad suficiente de compuestos fenólicos en el proceso de elaboración de vino tinto mediante el método tradicional, se promueven maceraciones de distinta duración en función del tipo de vino que se quiere elaborar (Bautista-Ortín et al., 2007; Budic-Leto et al., 2006).

Maceraciones cortas (de 3 a 5 días) solamente se realizan para obtener vinos jóvenes (Gil-Muñoz et al., 1999; Gómez-Plaza et al., 2000, 2001). Al finalizar la maceración, el mosto todavía contiene azúcares, por lo que la fermentación alcohólica termina en ausencia de los hollejos. Estas cortas maceraciones pueden causar que la intensidad de color no sea muy elevada, la concentración de taninos escasa y que se produzca una polimerización insuficiente de los compuestos fenólicos, que podría afectar a la estabilidad del vino (Ruiz-Hernández, 2004). En general, maceraciones algo más largas (de 6 a 10 días) permiten conseguir vinos tintos jóvenes mejor equilibrados, gracias a la mayor extracción de compuestos fenólicos de los hollejos de la uva.

Por otro lado, maceraciones largas, incluso de duración superior a la fermentación alcohólica (de 2 a 3 semanas), son destinadas a obtener vinos de crianza y reserva, ya que en esta clase de vinos es fundamental una alta extracción de fenoles, especialmente taninos, para que el color sea estable durante todo el proceso de envejecimiento (Hidalgo-Togores, 2003b). Sin embargo, este largo periodo de maceración provoca una serie de inconvenientes en las bodegas. Por un lado, dificulta la rotación en el uso de los depósitos de fermentación, produciéndose un peor aprovechamiento de su volumen útil, debido a que aproximadamente el 20% del volumen está ocupado por los hollejos. Por otro lado, la presencia de los hollejos dificulta en gran medida el control de la temperatura del mosto, con el consecuente riesgo de parada fermentativa. En cualquier caso, además de estos inconvenientes, no siempre maceraciones largas garantizan un color intenso y estable. Por ejemplo, Bautista-Ortín et al. (2004) observaron que tiempos por encima de los 15 días pueden dar lugar a vinos pobres y de características inestables.

II.3.5. DESCUBE

En el caso de los vinos tintos, la fase de maceración acontece simultáneamente a la fermentación alcohólica, con una duración variable en función de la riqueza fenólica de la uva de partida, así como del tipo de vino que se quiere obtener (Hidalgo-Togores, 2003b). El proceso en el cual se separa el vino de los hollejos se denomina descube. En una primera fase, se obtiene el llamado vino yema directamente por sangrado de los depósitos. Posteriormente, en una segunda fase, los hollejos resultantes se presan con mayor o menor intensidad, obteniendo el llamado vino prensa, de alta riqueza fenólica y con una graduación alcohólica algo inferior. En función del vino final a obtener, ese vino prensa se sumará al vino yema o bien se destinará a otros usos como la obtención de destilados.

II.3.6. FERMENTACIÓN MALOLÁCTICA

Tras el descube, se puede proceder a realizar una segunda fermentación, la maloláctica. Ésta está fundamentalmente indicada en los vinos destinados a un proceso de crianza en bodega. Consiste en la transformación del ácido málico contenido en el vino en ácido láctico por acción de las bacterias lácticas, especialmente de los géneros *Oenococcus*, *Pediococcus*

y *Lactobacillus* (Edwards y Beelman, 1989). Como en el caso de la fermentación alcohólica, tradicionalmente se produce espontáneamente debido al desarrollo, en este caso, de las bacterias lácticas presentes en la vendimia y en la bodega. En la actualidad, el uso de cultivos iniciadores, especialmente de la especie *Oenococcus oeni*, está empezando a generalizarse lo que está permitiendo un mejor control del proceso (Pozo-Bayón et al., 2009).

El principal objetivo de la fermentación maloláctica es disminuir la acidez total del vino y estabilizarlo microbiológicamente, ya que el ácido málico es fácilmente asimilable por multitud de microorganismos. La fermentación maloláctica es un proceso complicado de llevar a cabo debido a que las bacterias lácticas pueden no soportar las concentraciones elevadas de SO₂, la concentración de nutrientes en el medio puede ser escasa, o incluso la concentración de alcohol puede ser excesivamente elevada. Las mejores condiciones para el crecimiento de las bacterias lácticas son un pH cercano a 4, nunca inferior a 3, una temperatura entre 20 y 25°C, ya que dificulta el crecimiento de otras bacterias, un contenido alcohólico del vino inferior a 15° y una concentración de SO₂ total inferior a 30-40 mg/L. La duración de esta segunda etapa fermentativa es variable, alrededor de dos o tres semanas, en función de diferentes factores como el uso de cultivos iniciadores o la temperatura.

La fermentación maloláctica, además de la pérdida de acidez del vino y el consecuente aumento de la ligereza del mismo, produce cambios organolépticos apreciables que pueden resultar importantes. Por un lado, la fermentación maloláctica está asociada a la aparición de aromas que recuerdan a la mantequilla debido a la formación de diacetilo a partir del ácido cítrico. El diacetilo en baja concentración contribuye positivamente al aroma del vino, pero si ésta es demasiado alta se puede considerar alteración (Rankine et al., 1969). Por otro lado, la fermentación maloláctica provoca ciertos cambios en el color del vino. Debido al aumento del pH, el equilibrio de los antocianos entre sus diversas formas cambia, pasando parte de los antocianos de su forma catión flavilium a sus formas incoloras, lo que da lugar generalmente a una disminución de la intensidad de color (Llaudy, 2006).

Una vez concluida la fermentación maloláctica, se procede a trasladar el vino de un depósito a otro para eliminar todas las sustancias precipitadas, especialmente las levaduras y los restos de las mismas, que pueden conferir al vino aromas de reducción. Este proceso se denomina trasiego. Tras este primer trasiego, se realizarán al menos 2 más a lo largo del proceso de estabilización del vino con objeto de eliminar las dispersiones coloidales de pequeñas micelas, sales del ácido tartárico, proteínas, compuestos fenólicos polimerizados, polisacáridos, etc.

II.3.7. ESTABILIZACIÓN DEL VINO

Tras la fermentación maloláctica, con objeto de eliminar la turbidez del vino debido a la presencia de pequeñas partículas en suspensión, se procede a la estabilización del vino. La estabilización perfecta no puede lograrse en una sola operación. Dentro de los tratamientos de estabilización que más comúnmente se aplican en la bodega, destacan la clarificación natural, la clarificación por encolado, la estabilización por el frío, la filtración y la centrifugación (Boulet y Escudier, 2000a).

Mientras que la clarificación natural consiste en la eliminación de las sustancias en suspensión por decantación, la clarificación por encolado consiste en añadir al vino sustancias clarificantes o "colas" (bentonita, clara de huevo o gelatina) que son capaces de flocular y sedimentar arrastrando las partículas en suspensión del vino, acelerando el proceso. Simul-

táneamente a la clarificación, generalmente se realiza en la bodega la estabilización por frío. Este proceso pretende conseguir la precipitación de los tartratos de calcio y de potasio que, aunque su presencia no daña la calidad del vino, puede provocar el rechazo por parte del consumidor. El tiempo de estabilización por el frío del vino depende de la temperatura. Por ejemplo, a 4°C, el vino debe permanecer estabilizándose durante semanas. Actualmente, se suelen utilizar temperaturas por debajo de 0°C, acortándose el proceso a horas o días. Finalmente, previo al embotellado, el vino suele filtrarse o centrifugarse para eliminar cualquier microorganismo o impureza que pudiera estar todavía presente en el vino.

II.3.8. CRIANZA DEL VINO

De manera general, la crianza consiste en un proceso de envejecimiento de cierta duración, cuya finalidad principal es estabilizar las características del vino (Zamora, 2003). Los cambios que suceden durante este proceso dependen fundamentalmente de las características del envase. En función de su naturaleza, tradicionalmente existen dos tipos de crianza: la oxidativa y la reductora (Fernández de Simón et al., 2006).

En la crianza oxidativa, los vinos envejecen largo tiempo en condiciones de oxidación, generalmente dentro de barricas de madera. En cambio, en la crianza reductora, los vinos evolucionan en ausencia casi total del aire, siendo conservados en depósitos herméticos y, más tarde, en botellas bien cerradas y, por lo tanto, sus caracteres se desarrollan en un ambiente reductor. Actualmente, lo habitual en los vinos tintos es que haya una crianza mixta dividida en dos fases. La primera, ligeramente oxidativa en barricas de madera, y la segunda en ambiente reductor en botella donde los vinos terminan de alcanzar toda su plenitud. Normalmente, los vinos permanecen un periodo de entre 6 y 24 meses en barrica de madera seguido de una estancia en botella de entre 6 meses hasta un tiempo incluso superior a los 20 años, en el caso de vinos de alta calidad.

Durante la fase oxidativa en barrica, se produce una disminución de la aspereza y amargor del vino, mejorando su estructura. Además, la madera de la barrica aporta aromas y taninos (Garde-Cerdán y Ancín-Azpilicueta, 2006). Todos estos cambios que suceden en la barrica son gracias a los intercambios entre la madera, el vino y la atmósfera, los cuales permiten los procesos de oxidación de los fenoles, la hidrólisis de glucósidos, la condensación y polimerización de taninos y antocianos, la formación de acetaldehído, la esterificación e hidrólisis de ácidos orgánicos, la condensación y precipitación de antocianos, la precipitación de materia colorante, la desaparición de aromas varietales y, finalmente, la aparición de aromas terciarios (Glories, 1990, 1999; Puech et al., 2007). Todas estas modificaciones de las propiedades sensoriales del vino van a depender en gran medida de las características de la madera utilizada en las barricas. Las dos más empleadas son el roble francés y el americano. También, existen otros factores que van a influir en el desarrollo de la crianza en barrica, como es el grado de tostado o la edad de la misma (Hidalgo-Togores, 2003b).

Los vinos tintos que reciben un periodo de crianza o envejecimiento se denominan legalmente vino crianza, reserva o gran reserva, en función del tiempo de permanencia en barrica y botella. En España, los vinos de crianza tintos precisan un periodo mínimo de crianza de 24 meses, de los cuales al menos 6 deben ser en barrica de madera de roble. Por su parte, los vinos de reserva tintos tienen un periodo mínimo de crianza de 36 meses, en los que el vino debe permanecer en barrica al menos 12 meses. Finalmente, el vino gran reserva tinto precisa una crianza de 60 meses, 18 de ellos al menos en barrica de roble (Ley 24/2003).

Todos estos tiempos de permanencia dependen de la legislación en primera instancia y, en el caso de que el vino esté adscrito a una determinada denominación de origen (DO), de las normas establecidas por el consejo regulador de la misma.

II.4. Los compuestos fenólicos

Las sustancias fenólicas constituyen quizá la familia de compuestos químicos más importante de las presentes en el vino tinto, debido a su alta implicación en las propiedades sensoriales del mismo. Los fenoles, especialmente los antocianos, son los máximos responsables del color del vino tinto. La cantidad de los diversos fenoles presentes, así como las reacciones químicas en las que intervienen, son las dos piezas claves que van a fijar las características del color del vino tinto, así como la evolución y el envejecimiento del mismo. Estos compuestos no sólo determinan el color y su evolución sino también otras características sensoriales fundamentales, como el cuerpo o la estructura, el amargor, la aspereza, la dureza o la astringencia. Así mismo, su importancia ha aumentado más si cabe en los últimos años ya que las propiedades beneficiosas para la salud derivadas del consumo de vino tinto han sido atribuidas a estas sustancias.

II.4.1. PROPIEDADES GENERALES

Los compuestos fenólicos tienen una gran importancia en la bioquímica vegetal, donde poseen diversas funciones desde la coloración de las flores y frutos hasta la impregnación de las paredes pecto-celulósicas con lignina (Alcalde-Eon et al., 2006). En el caso de la uva, estas sustancias se encuentran fundamentalmente en las pieles y en las semillas, produciéndose su liberación durante el proceso de vinificación. La aparición de los compuestos fenólicos en el grano de la uva está ligada a la síntesis y acumulación de los azúcares, especialmente los procedentes de la función clorofílica realizada por el sistema foliar del viñedo (Ribéreau-Gayon, 1974). La cantidad de fenoles presente en la uva aumenta desde el envero hasta la cosecha, alcanzando su valor más alto cuando la relación azúcares/acidez en mosto es máxima (Hidalgo-Togores, 2003a).

En la actualidad, multitud de grupos de investigación estudian los compuestos fenólicos con el propósito de evaluar el potencial de las diferentes variedades de uva, optimizar el proceso de vinificación, mejorar la calidad de los vinos producidos y conocer más a fondo sus propiedades de interés nutricional y farmacológico. Gracias a este gran esfuerzo investigador, el papel clave que juegan estas sustancias en las características organolépticas del vino está ampliamente reconocido. De hecho, debido a esta implicación, en la ciencia del vino los compuestos fenólicos son considerados la familia de sustancias químicas más importante. Hoy, es bien conocido que estos compuestos no sólo determinan el color del vino tinto y su evolución durante su envejecimiento (Boulton, 2001; Hermosín-Gutiérrez et al., 2005; Revilla et al., 2005), sino también otras características sensoriales fundamentales como el cuerpo, la estructura, el amargor, la aspereza, la dureza o la astringencia, contribuyendo asimismo al perfil olfatorio del vino (Boulton, 2001; Fischer y Noble, 1994; Vidal et al., 2004a; Zoecklein et al., 2001). A pesar de su contribución positiva a las características del vino, es reseñable que también son responsables de defectos que deben ser evitados, como el amargor, la aspereza, la dureza o la astringencia excesiva.

Además de sus cualidades organolépticas, numerosos estudios *in vitro* han puesto de manifiesto que las sustancias fenólicas poseen actividad bactericida, antiviral, antiinflamatoria

toria, antialérgica y antioxidante, lo que puede tener importantes implicaciones positivas en la salud humana (Frankel et al., 1993; Lurton, 2003; Meyer et al., 1997; Teissedre et al., 1996). Es más, hoy en día se cree que estos compuestos son los principales responsables de los efectos beneficiosos para la salud atribuidos al consumo de vino tinto (Estruch, 2000; Nichenametla et al., 2006; Stoclet et al., 2004). Esta afirmación se basa en el aparente efecto protector de los fenoles frente a enfermedades degenerativas como la diabetes, el cáncer o la osteoporosis, en estudios llevados a cabo en animales. El mecanismo de acción que explica este efecto protector no se sabe con detalle. El más aceptado está basado en la actividad antioxidante de estos compuestos. Las enfermedades degenerativas están fuertemente asociadas al envejecimiento celular, causado por el daño oxidativo de los compuestos celulares como el ADN o las proteínas. Los compuestos fenólicos, debido a su actividad antioxidante, poseen la capacidad de atrapar radicales libres y, por tanto, impedirían ese daño oxidativo (Chen et al., 1996; Rice-Evans et al., 1996).

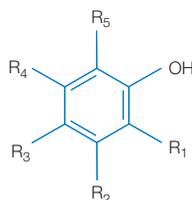
Si bien el efecto positivo de las sustancias fenólicas en la salud humana está bastante arraigado tanto en la comunidad científica como en la opinión pública, cabe destacar que este arraigo está basado fundamentalmente en los estudios *in vitro* y en la experimentación animal. Realmente, el número de estudios clínicos y epidemiológicos en humanos publicados hasta la fecha es limitado. Además, algunos de estos estudios han arrojado resultados contradictorios, aunque en general, se ha observado una relación positiva entre el consumo de vino u otras fuentes ricas en fenoles y la reducción del riesgo de padecer determinadas enfermedades degenerativas (Renaud y de Lorgeril, 1992; Scalbert et al., 2005; Stoclet et al., 2004). Cabe también destacar que no todos los fenoles tienen el mismo efecto y protegen por igual; es más, han sido publicados tanto efectos positivos como negativos de una misma sustancia fenólica. Por ejemplo, Wilson et al. (1996) publicaron que el resveratrol, prometedor anticancerígeno, incrementa el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares en conejos. Por todo ello, para obtener conclusiones sólidas del verdadero efecto de los diferentes compuestos fenólicos y su posible uso terapéutico en salud humana, es necesaria la realización de un mayor número de estudios, fundamentalmente en humanos.

II.4.2. CLASIFICACIÓN QUÍMICA

Los compuestos fenólicos se caracterizan por compartir una estructura o esqueleto común. Poseen uno o varios núcleos aromáticos, unidos a uno o varios grupos hidroxilo (Figura II.2).

■ FIGURA II.2

Estructura básica de los compuestos fenólicos



Químicamente, las sustancias fenólicas de la uva y el vino se clasifican en compuestos no flavonoides (ácidos fenólicos y estilbenos) y compuestos flavonoides (flavonoles, flavanoles y antocianos) (Noriega y Casp, 2003) (Figura II.3). Los compuestos no flavonoides se sitúan tanto en la uva (hollejo, pulpa y semillas) como en el raspón, mientras que los flavonoides se encuentran fundamentalmente en el hollejo, las semillas y el raspón, y apenas en la pulpa (Pinelo et al., 2006). La composición fenólica de los vinos esta condicionada por la variedad de uva utilizada, así como por otros factores como las características del suelo, la situación geográfica, las condiciones climáticas o las técnicas enológicas utilizadas (Cantos et al., 2002; Fernández-Navales et al., 2009; Monagas et al., 2005a; Sacchi et al., 2005). Tras su extracción durante el proceso de vinificación, la estructura de las sustancias fenólicas varía en gran medida debido a que están sometidas a multitud de reacciones de diverso tipo. Estas reacciones, fundamentalmente las de polimerización y copigmentación, tienen importantes implicaciones en la evolución sensorial del vino, especialmente en la estabilización del color y en la pérdida de astringencia del mismo (Boulton, 2001; Schwarz et al., 2005). A pesar de la importancia de estas reacciones, hoy por hoy no están totalmente explicadas debido a que las actuales técnicas de análisis, como la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) o la espectrometría de masas (MS), sólo permiten analizar sustancias simples o pequeños polímeros.

Los compuestos fenólicos más importantes, tanto por su cantidad como por sus implicaciones sensoriales, son los antocianos. Estas sustancias son las responsables del color rojo de la uva y, por ende, del color rojo de los vinos tintos. El resto de fenoles, a pesar de estar en menor concentración, tienen importantes implicaciones en las características del vino y son claves en la estabilización del color. Por ejemplo, los flavanoles, especialmente los llamados taninos condensados (flavanoles polimerizados), son los principales responsables de la astringencia del vino.

FIGURA II.3

Clasificación química de los compuestos fenólicos más importantes del vino



1.4.3. ESTABILIZACIÓN DEL COLOR EN LOS VINOS TINTOS

El color rojo intenso de los vinos tras la fermentación es debido fundamentalmente a la presencia de los antocianos en su forma libre. Debido a su elevada reactividad, durante

los primeros meses de crianza, las concentraciones de estos compuestos tienden a caer rápidamente. Esta caída se achaca fundamentalmente a las reacciones de degradación, principalmente oxidaciones, y a las reacciones que se producen con otros compuestos. De éstas, las más importantes son la polimerización de los antocianos, que dará lugar a formas antociánicas oligoméricas, los fenómenos de copigmentación y las reacciones de condensación (Figura II.4). Los compuestos originados en estas reacciones son los causantes de la estabilización de la intensidad de color de los vinos y del cambio de tonalidad de los mismos de rojo-azulada, característica de los vinos jóvenes, a la rojo-anaranjada de los vinos maduros (Atanasova et al., 2002; Jurd, 1969). La prevalencia de unas reacciones sobre otras va a depender de numerosos factores como las concentraciones de los distintos compuestos, la presencia o ausencia de oxígeno, o la producción de determinados metabolitos por parte de las levaduras durante la fermentación (Atanasova et al., 2002).

II.4.3.1. Antocianos oligoméricos

Los antocianos, si las circunstancias son adecuadas, pueden interaccionar entre ellos polimerizándose. Estos antocianos oligoméricos provienen en gran parte de las vacuolas celulares, aunque también pueden formarse durante la vinificación, e incluso durante el proceso de crianza o de almacenamiento en botella (Vidal et al., 2004b). Si bien su existencia no se pone en duda, los mecanismos que están relacionados con su formación no se conocen en profundidad, siendo similares a las reacciones que dan lugar a los taninos condensados. Poseen un color rojo estable y resistente a la decoloración, por lo que juegan un rol importante en la estabilización del color del vino durante la crianza y el envejecimiento, sobre todo cuando hay una alta concentración de antocianos (Luady, 2006; Monagas et al., 2005a).

■ FIGURA II.4

Principales reacciones antociánicas que intervienen en la estabilización del color de los vinos tintos. A: antociano. T: Tanino

Polimerización	Antocianos oligoméricos
	Antocianos poliméricos
Copigmentación	Copigmentación intramolecular (A-A)
	Copigmentación intermolecular (A-no A)
Condensación	Condensación directa (TA o AT)
	Condensación por puente de etilo (T-etil-A)
	Piranoantocianos

II.4.3.2. Fenómenos de copigmentación

La copigmentación consiste en la unión de los antocianos con otras moléculas, denominadas copigmentos o cofactores, mediante uniones no covalentes (Boulton, 2001). Estos copigmentos pueden ser antocianos (copigmentación intramolecular) u otras moléculas de naturaleza fenólica (flavanoles, flavonoles, ácidos cinámicos) e incluso aminoácidos o polisacáridos (copigmentación intermolecular) (Gómez-Míguez et al., 2006; Gris et al., 2007; Torkangerpoll y Andersen, 2005). De todas estas moléculas, las proantocianidinas son las que juegan un papel más importante. La copigmentación interviene en la estabilización de la intensidad de color y, en ocasiones, produce hasta un aumento de la misma (efecto hiper-crómico), acompañado generalmente de un cambio en la tonalidad (efecto batocrómico) (Vivar-Quintana et al., 2002).

II.4.3.3. Fenómenos de condensación

Durante el envejecimiento del vino, los antocianos también son capaces de combinarse mediante enlaces covalentes con otras sustancias fenólicas, fundamentalmente taninos (Alcalde-Eon et al., 2006; Atanasova et al., 2002). La formación de estas moléculas condensadas es otro de los factores fundamentales que intervienen en la estabilización del color del vino.

II.4.4. EXTRACCIÓN DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS

Los compuestos fenólicos son extraídos en el transcurso del proceso de maceración en el cual las partes sólidas de la uva están en contacto directo con el mosto. La eficacia de este fenómeno de transferencia de masa va a depender de la cantidad de compuestos fenólicos existente en la propia materia prima así como de una serie de factores ambientales que pueden o no favorecer el proceso extractivo; como el pH, el contenido etílico o la concentración de anhídrido sulfuroso, así como de las técnicas o tecnologías enológicas aplicadas a la uva antes o durante el proceso de maceración.

II.4.4.1. Potencial fenólico de la uva

El contenido fenólico de la uva oscila entre 12 y 45 mg/g. En la Tabla II.3, se detallan las concentraciones habituales de los compuestos fenólicos más importantes en las diferentes partes de la uva, independientemente de la variedad o de los factores anteriormente nombrados (Pinelo et al., 2006). Como se observa, hay compuestos cuya concentración varía enormemente. Por ejemplo, la cantidad de malvidina-3-glucósido puede oscilar de 4,12 a 10,19 mg/g, prácticamente tres veces el contenido mínimo. La mayor concentración de polifenoles se encuentra en el hollejo y en las semillas, siendo los de mayor relevancia para la industria enológica los primeros. En las semillas, únicamente se encuentran sustancias no antocianicas, con unas concentraciones relativamente altas de entre el 4 al 10%. Esta variación en las concentraciones es debida tanto a las características propias de cada variedad como a las condiciones edafoclimáticas y las prácticas culturales realizadas en el viñedo, así como al grado de madurez de la uva (Monagas et al., 2005a).

Cada variedad posee un máximo fenólico determinado genéticamente, del cual va a depender las características finales del vino (Arozarena et al., 2000; Von Baer et al., 2005). Por ejemplo, mientras que las variedades Cabernet Sauvignon o Mazuelo originan vinos con una elevada cantidad de compuestos fenólicos y gran intensidad de color, la variedad Garnacha, en general, da lugar a vinos de una coloración bastante pobre aunque con un perfil sensorial más apreciado que los vinos de Cabernet Sauvignon. Por todo ello, en función de las características que se desee que tenga el vino final, se elegirán unas variedades u otras para obtener finalmente un producto equilibrado.

La genética marca tanto la cantidad como la calidad de los fenoles. Si bien la cantidad total de fenoles depende en gran medida de la variedad y de multitud de factores externos como el clima, el perfil fenólico depende casi en exclusiva de las características genéticas (González-Neves et al., 2008; Hermosín-Gutiérrez et al., 2005; Pérez-Lamela et al., 2007). Así, el vino final podrá ser más o menos rico en determinadas especies fenólicas en función de las variedades de uva utilizadas en su vinificación.

Que las uvas de una determinada variedad alcancen durante su desarrollo su máximo genético, va a depender de las condiciones edafoclimáticas de la zona de producción y de las prácticas realizadas por el viticultor en el viñedo (Cacho et al., 1992; Hidalgo-Togores, 2003a; Monagas et al., 2005a). El grado de maduración de las uvas también se considera un factor clave que determina no sólo el contenido fenólico, sino también su calidad (Fernández-Navales et al., 2009; Pérez-Magariño y González-San José, 2004). Generalmente, se produce una acumulación lineal de fenoles en el grano de uva hasta alcanzar un máximo que corresponde con su madurez tecnológica. A partir de este punto, la concentración fenólica desciende progresivamente también de manera lineal. En condiciones normales, raramente se produce la vendimia en el punto exacto de la madurez tecnológica ya que, a pesar de que el contenido fenólico es mayor, la pared de la uva se encuentra en buen estado por lo que la extracción de la materia colorante se ve dificultada en gran medida, pudiendo alcanzarse en el vino niveles inferiores a los esperados.

II.4.4.2. Evolución general de la extracción fenólica

La Figura II.5 muestra la evolución de la intensidad de color, de la concentración de antocianos y de la concentración de fenoles no antocianicos en el mosto durante el proceso de maceración. Como se observa, los antocianos contenidos en los hollejos pasan rápidamente al mosto desde los primeros instantes de la maceración debido a su alta solubilidad en el agua (González-Neves et al., 2008). Los antocianos alcanzan su máxima concentración aproximadamente entre el tercer y el séptimo día de haber comenzado la maceración (Bautista-Ortín et al., 2005; Feuillat, 1987). Posteriormente, esta concentración desciende debido fundamentalmente a su oxidación, a la interacción de éstos con otros fenoles y a su polimerización. Estos dos últimos fenómenos pueden dar lugar a moléculas de alto peso molecular que tienden a precipitar, lo que produce un descenso en el color rojo del vino (Yokotsuka et al., 2000). También, se ha observado que una importante fracción de los antocianos se fija a las partes sólidas de la uva o es absorbida por las levaduras, precipitando posteriormente en las lías (Amrani-Joutei y Glories, 1995; Morata et al., 2003; Vasserot et al., 1997).

■ TABLA II.3

Concentraciones (mg/g) de los principales compuestos fenólicos presentes en la uva. Adaptado de Pinelo et al. (2006)

Compuestos	Uva	Hollejo	Semillas	Raspón
Ácido gálico	0,03-0,11 ^{ab}	0,03 ^b	0,10-0,11 ^a	-
Ácido cutárico	0,00-1,23 ^c	0,03-1,23 ^d	-	-
Ácido caftarico	0,00-6,97 ^c	0,11-6,97 ^{cd}	-	0,04 ^e
Ácidos fenólicos	0,03-8,31	0,17-8,23	0,10-0,11	0-0,04
Catequina	0,00-0,18 ^f	0,00-0,16 ^{hg}	2,14-2,15 ^h	0,06 ^e
Epicatequina	0,00-0,16 ^f	0,00-0,13 ^{hg}	0,88-0,91 ^h	0,29 ^e
Epigallocatequina 3-galato	0,00-0,07 ^h	-	0,06-0,07 ^h	-
Epicatequina 3-galato	0,00-0,03 ⁱ	0,04 ^g	0,25-0,31 ^h	0,07 ^e
Flavan-3-oles	0,34-4,25	0,12-3,38	3,56-6,15	0,22-0,89
Delfinidina 3-glu	0,44-1,11 ^d	0,44-1,11 ^d	-	-
Cianidina 3-glu	1,51-3,81 ^d	1,51-3,81 ^d	-	-
Petunidina 3-glu	0,53-1,34 ^d	0,53-1,34 ^d	-	-
Peonidina 3-glu	0,99-2,49 ^d	0,99-2,49 ^d	-	-
Malvidina 3-glu	4,12-10,19 ^d	4,12-10,19 ^d	-	-
Delfinidina 3-ac-glu	0,08-0,19 ^d	0,08-0,19 ^d	-	-
Petunidina 3-ac-glu	0,11-0,28 ^d	0,11-0,28 ^d	-	-
Peonidina 3-ac-glu	0,27-0,30 ^d	0,27-0,30 ^d	-	-
Malvidina 3-ac-glu	0,62-1,74 ^d	0,62-1,74 ^d	-	-
Cianidina 3-cu-glu	0,07-0,22 ^d	0,07-0,22 ^d	-	-
Petunidina 3-cu-glu	0,19-0,49 ^d	0,19-0,49 ^d	-	-
Peonidina 3-cu-glu	0,43-1,37 ^d	0,43-1,37 ^d	-	-
Malvidina 3-cu-glu	2,11-6,29 ^d	2,11-6,29 ^d	-	-
Antocianos	11,47-29,82	11,47-29,82	-	-
Quercitina 3-glucuronido	0,01-0,2 ^d	0,15-0,2 ^d	0,01-0,02 ^d	0,02 ^e
Miricitina 3-glu	Trazas ^e	-	-	Trazas ^e
Quercitina 3-glu	0,01-0,29 ^d	0,22-0,29 ^d	0,01-0,02 ^d	0,2 ^e
Kaempferol 3-glu	0,01-0,14 ^d	0,11-0,14 ^d	0,01 ^d	Trazas ^e
Miricitina 3-glucuronido	Trazas ^e	-	-	Trazas ^e
Flavonoles	0,03-0,63	0,48-0,63	0,02-0,05	0-0,22

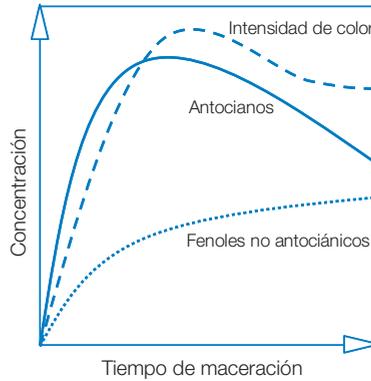
-: no detectado, glu: glucósido, ac: acetil, cu: cumaril.

a: Ozmiński et al. (1986); b: Yilmaz y Toledo (2004); c: Borbalán et al. (2003); d: Kammerer et al. (2004); e: Souquet et al. (1996); f: Arts et al. (2000); g: Freitas et al. (2000); h: Guendez et al. (2005); i: USDA. Base de datos para el contenido de flavonoides de alimentos seleccionados (2003); j: Mateus et al. (2001).

La cinética de extracción del resto de sustancias fenólicas es completamente diferente a la de los antocianos. Mientras que la extracción de éstos es máxima en los primeros días de fermentación, el resto de sustancias fenólicas, especialmente los flavanoles, comienzan a extraerse a medida que aumenta la concentración de etanol en el mosto, debido tanto a su baja solubilidad en el agua como a la degradación de la pared celular producida por el propio etanol (Klenar et al., 2004). Por ello, como se observa en la Figura, la velocidad de extracción en los primeros momentos es lenta, acelerándose poco a poco hasta el final de la fermentación. Al contrario que en los antocianos, los fenoles no antocianicos en general, no alcanzan nunca un máximo de extracción en las maceraciones habituales, aunque tras 10-15 días, su velocidad de extracción tiende a disminuir e incluso cesar (López, 2008b).

■ FIGURA II.5

Evolución de los antocianos, fenoles no antociánicos e intensidad de color a lo largo de la maceración en la vinificación del vino tinto



La intensidad de color del vino aumenta rápidamente en los primeros días de la maceración, hasta alcanzar un máximo generalmente uno o dos días tras haberse alcanzado la máxima concentración antociánica. Tras ello, la intensidad de color cae y finalmente se estabiliza. Posteriormente, durante la fase post-macerativa, vuelve a elevarse debido fundamentalmente a los mecanismos de estabilización del color. Aunque ésta es la evolución general de los compuestos fenólicos durante la maceración, el proceso está influenciado por numerosos factores. Los más importantes son el potencial fenólico de la uva, la concentración de etanol, la cantidad de sulfuroso añadido, la temperatura y, finalmente, el uso de técnicas o tecnologías enológicas que aumentan o favorecen la extracción fenólica.

II.4.4.3. Factores que afectan a la extracción fenólica

La extracción de las sustancias fenólicas no depende únicamente de la cantidad en la que éstas se encuentran en la uva. Al estar localizadas fundamentalmente en las vacuolas, las paredes y membranas celulares van a formar una barrera que dificulta su difusión al mosto o al vino (Kennedy et al., 2001; Sacchi et al., 2005). Por lo tanto, la degradación de ambas estructuras durante la maceración va a ser el factor clave que determine el fenómeno de extracción (Amrani-Joutei y Glories, 1994). Esta degradación depende de diversos factores ambientales como la concentración de etanol, la presencia de anhídrido sulfuroso o la temperatura, así como de las técnicas enológicas utilizadas en la vinificación (Sacchi et al., 2005).

II.4.4.3.1. Concentración de etanol

Los antocianos poseen una elevada solubilidad en el agua por lo que son extraídos en los primeros momentos de la maceración. En cambio, la extracción de los compuestos no antociánicos, especialmente los flavanoles, es más complicada ya que, además de ser poco solubles, gran cantidad de ellos se encuentran asociados a los polisacáridos de las paredes celulares (Pinelo et al., 2006). De manera tradicional, en la vinificación del vino tinto la fase macerativa tiene lugar simultáneamente al proceso de fermentación. Por lo tanto, mientras sucede la extracción

de los compuestos fenólicos, las levaduras consumen los azúcares del mosto produciendo CO₂ y etanol. Ese etanol generado actúa sobre los polisacáridos de las paredes, facilitando tanto la extracción de los compuestos no antocianos que se encuentran interaccionando con los mismos como la salida del resto de compuestos fenólicos (Ribéreau-Gayon et al., 2006a). Además, el etanol presente en el mosto facilita la solubilización del material fenólico. Por todo ello, cuanto mayor es la concentración de etanol y cuanto más rápida es su producción, más rápida es también la extracción fenólica. Se calcula que por cada grado que se incrementa la concentración alcohólica, las sustancias fenólicas en el mosto aumentan un 5% (Hidalgo-Togores, 2003b).

II.4.4.3.2. Concentración de anhídrido sulfuroso

El anhídrido sulfuroso (SO₂) añadido al vino fundamentalmente por sus propiedades antimicrobianas, también interviene en la degradación de la estructura de la piel de la uva, facilitando la salida al mosto de los antocianos y demás fenoles (Ribéreau-Gayon et al., 2006a). Asimismo, este compuesto, debido a su carácter antioxidante, protege a los propios componentes que se van disolviendo en el mosto de la degradación oxidativa. Este efecto protector se ve multiplicado en el caso de que la vendimia muestre signos de putrefacción ya que inhibe la actividad de las enzimas de oxidación, como la tirosinasa o la lacasa (Ribéreau-Gayon et al., 2006a). Aunque el uso de dosis elevadas de anhídrido sulfuroso incrementa enormemente la eficacia del proceso de extracción, puede comprometer la posterior fermentación maloláctica así como dar lugar a la generación de aromas extraños, por lo que se suelen evitar utilizarlas (Hidalgo-Togores, 2003a).

II.4.4.3.3. Temperatura de extracción

La temperatura es otro factor clave en la extracción de los compuestos fenólicos, ya que las altas temperaturas contribuyen a la degradación de las paredes celulares de los hollejos, lo que favorece los fenómenos de transferencia de masa y aumentan la solubilidad de las sustancias fenólicas extraídas, dificultando su pérdida por precipitación. En el proceso de vinificación, se trabaja en un rango estrecho de temperaturas: entre los 18 y los 30°C aproximadamente. Temperaturas excesivamente bajas (<18°C) impiden el crecimiento adecuado de las levaduras y originan vinos de color y aroma pobres (Gómez-Míguez et al., 2007). Por otro lado, temperaturas muy elevadas (>30°C) pueden provocar paradas en la fermentación y pérdida de aromas (Rosario-Salinas et al., 2003). Trabajos realizados con la variedad Pinot Noir muestran que el total de fenoles extraídos incrementa con la temperatura (Girard et al., 1997). Sin embargo, la diferencia en el contenido de antocianos en vinos fermentados entre 15 y 30°C es pequeña (Girard et al., 2001). Por ello, generalmente, mientras que en ese rango de temperaturas habituales (18-30°C) la extracción de antocianos no se ve muy modificada, la del resto de sustancias fenólicas mejora al elevarse la temperatura.

II.4.4.4. Tecnologías de mejora de la extracción fenólica

En el proceso tradicional de elaboración del vino tinto, solamente se extrae entre un 20 y un 40% de los fenoles presentes en la uva. Con objeto de mejorar ese rendimiento, o cuando menos acelerar su extracción, se han investigado y propuesto distintas técnicas enológicas como la vinificación en doble pasta, el sangrado, la criomaceración, la termovinificación o el uso de enzimas (Tabla II.4).

II.4.4.4.1. La vinificación en doble pasta y el sangrado

Tanto la técnica de vinificación en doble pasta como el sangrado se basan en aumentar la relación sólido/líquido durante la maceración y así favorecer el fenómeno de transferencia de masa (Hidalgo-Togores, 2003b; Sacchi et al., 2005). Por lo tanto, estas técnicas se utilizan para la producción de vinos, como los de crianza, en los que se desean obtener cantidades muy elevadas de polifenoles. La vinificación en doble pasta es una pequeña variación de la vinificación tradicional. La única diferencia de ésta frente al proceso de vinificación tradicional es que, además de los hollejos propios del mosto, se añaden otros hollejos de uvas utilizadas para elaborar vino rosado, o incluso hollejos eliminados de otros depósitos destinados a la elaboración de vinos tintos jóvenes. Los principales inconvenientes de esta técnica son la reducción del volumen útil de los depósitos y la mayor dificultad en el control de la temperatura durante la fermentación debido a la mayor cantidad de hollejos presentes en el tanque de fermentación. Por su parte, el sangrado o *saignée* consiste en eliminar parte del mosto previamente a la fermentación y continuar el proceso de vinificación con igual cantidad de hollejos. En principio, al aumentar la relación sólido/líquido se favorece la extracción de los compuestos fenólicos. Sin embargo, aunque este efecto es el normalmente observado, menos cantidad de fenoles podrán disolverse en el mismo al haber menos mosto. Diferentes trabajos han demostrado que en variedades como Malbec, Pinot Noir o Monastrell, un sangrado de aproximadamente el 10 o el 15% del mosto aumenta la riqueza fenólica de los vinos finales (Bautista-Ortín et al., 2004; Gerbaux, 1993; Zamora et al., 1994). El efecto de esta técnica depende de diferentes circunstancias, como el año de vendimia o la variedad de la uva, pudiendo modificarse o incluso desaparecer durante el envejecimiento del vino (Bautista-Ortín et al., 2007; Gawel et al., 2001).

■ TABLA II.4

Principales técnicas enológicas cuyo principal objetivo es mejorar el proceso de extracción de los compuestos fenólicos de la uva durante el proceso de vinificación

Técnica enológica	Acción	Efectos negativos
Vinificación en doble pasta	Mejora de la extracción al aumentar relación sólido/líquido	Reducción del volumen útil de los depósitos y mal control de la temperatura
Sangrado	Mejora de la extracción al aumentar relación sólido/líquido	Menor producción y efectos contradictorios
Criomaceración	Rotura envolturas celulares por acción del frío	Costes elevados y efectos contradictorios
Maceración sulfítica	Efecto antioxidante y mejora de la extracción	Reacciones de hipersensibilidad y dificultad fermentación maloláctica
Termovinificación	Rotura envolturas celulares por acción de la temperatura	Alteraciones sensoriales generalizadas
Flash-expansión	Rotura envolturas celulares por acción de la temperatura y la despresurización	Pérdida de aromas y costes elevados
Enzimas pectolíticas	Rotura de las paredes celulares	Efectos contradictorios

II.4.4.4.2. La criomaceración

La aplicación de frío a la vendimia con diferentes objetivos es una práctica cada vez más habitual. Por ejemplo, el uso de bajas temperaturas durante la maceración (maceración fría) es una técnica muy común en la elaboración de vinos blancos y, en algunos casos, de vinos

rosados. El proceso consiste en mantener la uva sin fermentar a temperaturas comprendidas entre 10-15°C de 3 a 6 días antes de comenzar la fermentación (Sacchi et al., 2005). Su función en este tipo de vinos es, principalmente, la de impedir la pérdida de los aromas extraídos durante la maceración. En el vino tinto, su utilización no está todavía muy extendida en las bodegas. Sin embargo, podría mejorar el contenido fenólico y, especialmente, las características aromáticas del vino tinto. Las bajas temperaturas de maceración impedirían la oxidación y pérdida de los compuestos fenólicos. Algunos autores consideran que los vinos elaborados mediante esta técnica tienen una mayor calidad (Karna et al., 2005).

Otra técnica basada en la aplicación de frío a la vendimia es la criomaceración. En este caso, las temperaturas utilizadas son menores, produciéndose la congelación de la uva, lo que provoca la rotura y desorganización de las células del hollejo, facilitando por tanto de una manera directa la salida de los compuestos aromáticos y fenólicos hacia el mosto (Asselin et al., 1999; Reynolds et al., 2001; Sacchi et al., 2005).

Los resultados obtenidos en estudios realizados con ambas técnicas son contradictorios. Heatherbell et al. (1996) observaron, en la variedad Pinot Noir y en sus condiciones experimentales, que la maceración fría por sí sola no tenía efecto en la composición fenólica. Otros autores consideran que la maceración fría permite aumentar la concentración de compuestos aromáticos del mosto y la cantidad y calidad de los compuestos fenólicos (Álvarez et al., 2006a; Gómez-Míguez et al., 2007). Por otro lado, Sánchez et al. (2006) obtuvieron resultados dispares. Comparando el efecto de la maceración fría y la criomaceración, observaron que ambos procesos no consiguen aumentos significativos en la extracción de polifenoles y, sin embargo, los antocianos extraídos eran más estables y la componente roja del color, mayor. En definitiva, tanto la maceración fría como la criomaceración pueden dar lugar a efectos más o menos marcados en función de diversos factores, especialmente el grado de madurez de la uva que se utiliza en la vinificación. Por ello, es necesario un mayor estudio de estas técnicas para determinar sus posibilidades y así poder establecer los casos en que pueden resultar útiles. Por otro lado, el mayor problema para su aplicación en las bodegas es su elevado coste, ya que la utilización del frío es uno de los procesos más caros de la industria alimentaria.

II.4.4.4.3. La maceración sulfúrica

Este proceso consiste en añadir a la vendimia una elevada cantidad de anhídrido sulfuroso, entre 200 y 300 mg/L, y posteriormente realizar una maceración prefermentativa durante varios días utilizando generalmente temperaturas similares a las utilizadas en la maceración fría (Hidalgo-Togores, 2003b). Mediante esta técnica, se consiguen vinos de mayor intensidad de color, con tonos violáceos, así como con una mayor cantidad de compuestos fenólicos. Por el contrario, la alta concentración de anhídrido sulfuroso que se suele utilizar puede entorpecer el desarrollo de la fermentación maloláctica así como incluso superar, si no se dosifica cuidadosamente, los límites establecidos por la legislación. Además, el anhídrido sulfuroso en elevada concentración es tóxico, pudiendo originar en individuos sensibles, reacciones de hipersensibilidad.

II.4.4.4.4. La termovinificación y la técnica Flash-expansión

La aplicación de altas temperaturas a la vendimia con objeto de aumentar la extracción fenólica ha sido estudiada desde el siglo XVIII. Sus dos máximos exponentes son la termovinificación y la técnica flash-expansión (Hidalgo-Togores, 2003b).

La técnica de la termovinificación consiste en el calentamiento de la vendimia, previamente a la fermentación, con el fin de destruir las células de los hollejos y extraer los componentes fenólicos rápidamente. Se suelen utilizar temperaturas entre los 60 y los 70°C, y tiempos inferiores a 3 horas (Pinelo et al., 2006; Sacchi et al., 2005). Tras el proceso, la uva se enfría y generalmente se prensa, continuando la fermentación sin las partes sólidas de la uva. Este sistema por lo tanto, permite ahorrar espacio en los depósitos de fermentación. Este hecho justifica por sí mismo el interés puesto en esta técnica. El calentamiento de la uva mejora el rendimiento del prensado y aumenta la extracción de compuestos fenólicos entre un 20 y un 40%, obteniéndose en un primer momento mostos con una elevada intensidad colorante y concentración de antocianos (Fischer et al., 2000). Además, se destruyen las levaduras salvajes, facilitando el desarrollo de los cultivos iniciadores, y las enzimas oxidativas, especialmente la lacasa producida por *Botrytis cinerea*. Por lo tanto, se pueden procesar mediante esta técnica vendimias alteradas por mohos, impidiendo su oxidación (Ribéreau-Gayon et al., 2006a). A pesar de sus ventajas, fundamentalmente operativas, esta técnica no está exenta de inconvenientes, pudiendo resumirse en uno sólo: la baja calidad del producto final. Los vinos obtenidos mediante termovinificación presentan problemas de tipo sensorial: pérdida de aromas primarios, aparición de aromas extraños, amilíticos y amargos y pérdida de frescor y astringencia (Coffelt y Berg, 1965). Si hay un exceso en la temperatura o en el tiempo de tratamiento, pueden formarse aromas procedentes de la reacción de Maillard (Hidalgo-Togores, 2003b). Además, se ha demostrado que aunque en un primer momento el color del mosto aumenta con respecto a la vinificación tradicional, éste no es estable desapareciendo las diferencias durante la fermentación o la maduración del vino (Ribéreau-Gayon et al., 1976). Todos estos problemas han provocado que en la actualidad este sistema apenas se utilice.

El interés que el calor presenta para la extracción sigue en plena vigencia, como lo demuestra la reciente técnica surgida en los años 90: la técnica flash-expansión o “*flash-détene*” (Boulet y Escudier, 2000b). Aunque también se aplican altas temperaturas a la vendimia, su mecanismo de acción es parcialmente distinto del de la termovinificación. En este caso, se produce un calentamiento muy rápido de la vendimia antes de la fermentación hasta alcanzar entre 70 y 95°C, e inmediatamente después se produce un enfriamiento instantáneo de la misma a vacío intenso, pasando de esos 70-95°C a 35°C en apenas segundos. Ese enfriamiento a vacío junto con la alta temperatura inicial provocan una destrucción parcial de las estructuras de los hollejos, facilitando la difusión de los componentes intracelulares al mosto (Ribéreau-Gayon et al., 2006a). Mediante esta técnica, al acortar el proceso de calentamiento y enfriamiento, la vendimia permanece a elevada temperatura durante muy poco tiempo, impidiendo en un principio gran parte de los inconvenientes que presenta la termovinificación, especialmente el desarrollo de aromas extraños o la reacción de Maillard. De acuerdo a Boulet y Escudier (2000b), desde el punto de vista organoléptico los vinos resultantes poseen más color y mejor estructura, aunque son más astringentes y con más sensación grasa, perdiéndose además gran parte de los aromas del vino, de manera que la calidad general de los mismos resulta inferior que la de los vinos obtenidos mediante el proceso tradicional.

II.4.4.4.5. Adición de enzimas pectolíticas

Las enzimas pectolíticas o pectinasas se caracterizan por hidrolizar las sustancias pécticas de la pared celular de las células vegetales. Por lo tanto, su acción facilita la difusión de los compuestos fenólicos, tanto los situados en el interior de la célula, como los que se encuentran en la pared celular (Bernard et al., 2005). Desde los años 70, se han estudiado y producido preparados enzimáticos enológicos con fines macerativos. Actualmente, a estos preparados, constituidos por un complejo de enzimas pectolíticas, las casas comerciales suelen adicionar pequeñas cantidades de celulasas y hemicelulasas para conseguir así una mayor desintegración de la pared celular (Canal-Llaubères y Pouns, 2002). Por ello, en vez de hablar de enzimas pectolíticas, se suele utilizar el nombre más general de enzimas de maceración. A pesar de ser caros, constituyen una práctica cada vez más utilizada en las bodegas, debido a que su uso es sencillo y no requiere de ningún tipo de equipamiento especial. Según la legislación europea, la máxima dosis a utilizar es de 40 g/hL (Reglamento (CE) N° 423/2008).

Aunque en un principio su efecto positivo en la extracción debería ser claro, actualmente la eficacia de las enzimas de maceración está sometida a gran controversia. Algunos autores han demostrado que su utilización consigue una mayor extracción de antocianos y taninos, así como un aumento de la extracción de aromas varietales (Gambutì et al., 2007; Kelebek et al., 2007; Servili et al., 1992). Sin embargo, otros investigadores no han encontrado mejora en el vino elaborado con estas enzimas, o ésta ha sido muy pequeña (Bautista-Ortín et al., 2005, 2007; Wightman y Wrolstrad, 1995). Esta diversidad de resultados puede ser achacada a las características de cada preparado enzimático y a otros factores como el grado de madurez de la uva, la variedad o el tiempo y la temperatura de maceración (Bautista-Ortín et al., 2007). En cualquier caso, es recomendable que previamente a su uso en la bodega se realicen ensayos para evaluar su efectividad.

II.5. Alteración microbiana del vino tinto

Desde el siglo XIX hasta nuestros días, el conocimiento de las transformaciones y alteraciones del vino ha evolucionado profundamente en función del desarrollo de las disciplinas científicas sobre las cuales se apoyan estos fenómenos. Esto ha dado como resultado un mejor control del proceso de elaboración y conservación del vino y, así mismo, una mejora de la calidad, tanto desde el punto de vista sanitario, como sensorial y nutricional. Por lo tanto, el progreso del sector vinícola exige una investigación constante que se vea reflejada en la introducción de nuevas tecnologías en las bodegas que resuelvan los problemas existentes en la elaboración de vinos de calidad. Uno de los más preocupantes en la actualidad, causante de grandes pérdidas económicas, es el desarrollo de alteraciones microbianas (Loureiro y Malfeito-Ferreira, 2003; Snowdon et al., 2006).

El vino durante su elaboración constituye un medio de cultivo muy apropiado para el crecimiento de un buen número de microorganismos alterantes, debido a su riqueza en ácidos orgánicos, aminoácidos, azúcares, factores de crecimiento y sales minerales. Sin embargo, existen tres factores fundamentales que van a limitar el desarrollo de los mismos: la alta concentración de etanol del vino, su bajo pH y la presencia de anhídrido sulfuroso. En

general, estas tres barreras son suficientes para garantizar la estabilidad microbiológica del vino tinto (Suárez-Lepe e Íñigo-Leal, 2004). Los problemas generalmente surgen asociados a la falta de higiene. Los microorganismos causantes de alteración, tanto bacterias como levaduras provienen de la piel de la uva. Generalmente se asientan en los equipos de la bodega, fundamentalmente en las barricas, cuando la limpieza es deficiente, siendo muy complicada su eliminación y pudiendo contaminar todo el vino que se produzca en la bodega (Couto et al., 2005).

La alteración microbiana es compleja siendo, en ocasiones, difícil asociar a un microorganismo con una sólo alteración y, a su vez, a una alteración con un sólo microorganismo (Loureiro y Malfeito-Ferreira, 2003). Además, en algunas ocasiones, el desarrollo de un determinado metabolito puede ser considerado positivo o negativo, en función de la concentración del mismo (Chatonnet et al., 1992). Estas dos afirmaciones hacen complicado el estudio profundo de las alteraciones del vino. De manera general y simplificada, atendiendo a su etiología fundamental, las alteraciones microbianas del vino, también denominadas enfermedades, se clasifican en alteraciones producidas por levaduras y alteraciones producidas por bacterias (Castelli, 1969). En la Tabla II.5, se exponen las principales alteraciones microbianas del vino, así como el microorganismo o microorganismos que más habitualmente las producen. Las alteraciones más importantes se comentan con más detalle a continuación.

II.5.1. ALTERACIÓN DEL VINO POR LEVADURAS

II.5.1.1. Alteraciones producidas por el género *Dekkera/Brettanomyces*

Las levaduras del género *Brettanomyces*, y su forma esporulada *Dekkera*, son reconocidas desde hace tiempo como microorganismos alterantes del vino (Heresztyn, 1986). Su resistencia a las altas concentraciones de alcohol posibilita que se hayan detectado especies de este género en diferentes clases de vinos, desde dulces hasta espumosos. Son levaduras de crecimiento lento, por lo que son fundamentalmente detectadas durante la crianza, especialmente en las barricas. Debido a la amplia gama de alteraciones que son capaces de producir y a su complicada eliminación de las bodegas, son probablemente la causa más importante de alteración del vino (Couto et al., 2005). Las especies de este género están implicadas en dos de las alteraciones más temidas por los enólogos: el desarrollo del llamado “gusto a ratón” o “moussy wine” debido a la producción de ciertos derivados de la tetrahidropiridina y acetil prolina (Heresztyn, 1986; Loureiro y Malfeito-Ferreira, 2003), y la aparición en el vino de olores que recuerdan a “cuero” y, en el peor de los casos, a “sudor de caballo”. Esta segunda alteración es debida a la producción de etil-4-fenol y etil-4-guayacol a partir de los ácidos hidroxycinámicos (Chatonnet et al., 1995; Heresztyn, 1986).

■ TABLA II.5

Principales alteraciones microbianas del vino tinto

Alteración microbiana	Agente causal	Efecto
Levaduras		
"Gusto a ratón"	<i>Dekkera/Brettanomyces</i>	Alteración del aroma y del sabor
"Olor a cuero"	<i>Dekkera/Brettanomyces</i>	Alteración del aroma
"Flores" del vino	<i>Pichia membranefaciens</i> , <i>Candida mycoderma</i> , <i>Hansenula anomala</i> y <i>Zygosaccharomyces acidifaciens</i>	Formación de velo superficial y caída del grado alcohólico y de la acidez total
Refermentaciones	<i>Saccharomyces</i>	Aumento del grado alcohólico, pérdida de azúcares y turbidez
Bacterias		
Picado láctico	Bacterias lácticas (<i>Lactobacillus</i>)	Aumento de la acidez, turbidez, color y aroma alterado y sabor ácido o agríndice
"El ahilado"	Bacterias lácticas	Aspecto filante o aceitoso
"La vuelta"	Bacterias lácticas	Turbidez y color alterado
Enfermedad del amargor	Bacterias lácticas	Turbidez, color alterado y sabor amargo
Picado acético	Bacterias acéticas (<i>Acetobacter</i> y <i>Gluconobacter</i>)	Aumento de acidez, disminución del grado alcohólico, avinagrado y formación de velo

Estas levaduras forman parte de la microbiota natural de la uva, aunque se encuentran en muy baja cantidad. El problema radica en que estas levaduras pueden desarrollarse en la bodega y contaminar de manera crónica los diferentes equipos y elementos existentes en las bodegas, sobre todo las barricas, siendo muy complicada su eliminación. De hecho, la causa más común del desarrollo de aromas extraños en el vino está asociada a la presencia de estas levaduras en las barricas debido a una limpieza deficiente de las mismas (Chatonnet et al., 1993; Suárez et al., 2007).

II.5.1.2. "Flores" del vino

La "flor" del vino es una alteración producida por diferentes levaduras, caracterizada visualmente por la formación de un velo superficial de color blanco, amarillento o rosado, más o menos rugoso en función del agente etiológico (Suárez-Lepe e Íñigo-Leal, 2004). Químicamente, provoca la bajada de la acidez total del vino así como la pérdida de extracto seco y la oxidación del alcohol, con la consecuente caída del grado alcohólico del vino. Esta alteración es más común en vinos jóvenes ya que son más ricos en nutrientes, especialmente en materias nitrogenadas.

Las especies involucradas más frecuentes son *Pichia membranefaciens*, *Candida mycoderma*, *Hansenula anomala* y *Zygosaccharomyces acidifaciens*. Todos los microorganismos causantes de esta alteración presentan dos características básicas en común: crecen en vinos de graduación alcohólica inferior a los 13° (v/v) y son muy poco fermentativos, debido a que son fundamentalmente aerobios (Suárez-Lepe e Íñigo-Leal, 2004).

II.5.1.3. Refermentaciones

Los fenómenos refermentativos se producen fundamentalmente en vinos almacenados en bodega o ya embotellados en los que no todo el azúcar ha sido consumido durante la

fermentación alcohólica (Minarik, 1983). El azúcar es metabolizado por levaduras anaerobias, especialmente especies del género *Saccharomyces*, dando lugar a un aumento del grado alcohólico, una reducción del azúcar que presenta el vino y a la formación de CO_2 que confiere turbidez al vino.

II.5.2. ALTERACIÓN DEL VINO POR BACTERIAS

II.5.2.1. Alteraciones producidas por bacterias lácticas

Las bacterias lácticas son microorganismos anaerobios facultativos que constituyen parte de la microbiota habitual de la uva. Éstas son responsables de la fermentación maloláctica del vino, pero también son agente etiológico de multitud de alteraciones. La más conocida e importante es el “picado láctico”.

El picado láctico o “piqûre lactique” se produce por el uso del azúcar del vino por todo tipo de bacterias lácticas, generando grandes cantidades de ácido láctico y ácido acético y, en consecuencia, un aumento de la acidez volátil (Lonvaud-Funel, 1999). En esta alteración, suelen estar implicadas fundamentalmente bacterias del género *Lactobacillus* siendo la más importante *Lactobacillus hilgardii* (Campos et al., 2003). Las bacterias lácticas tienen una temperatura óptima de crecimiento superior a los 28-30°C, por lo que el uso de altas temperaturas de fermentación, o la producción de fermentaciones tumultuosas propicia el desarrollo de esta clase de microorganismos. Los vinos en los que se detiene la fermentación o los que han recibido un inapropiado sulfitado son los más propensos a padecer esta alteración. Organolépticamente, los vinos que han sufrido el picado láctico se caracterizan por presentar un aspecto algo turbio, color y olor normales, y un sabor claramente ácido o agrídulce, en el caso de la existencia de restos de azúcares (Suárez-Lepe e Íñigo-Leal, 2004).

Las bacterias lácticas también están implicadas en el desarrollo de otras alteraciones diversas como “el ahilado” o “enfermedad de la grasa”, caracterizada por el aspecto filante o aceitoso del vino; “la vuelta” o “rebote”, definida por el enturbiamiento y el oscurecimiento del color; o la “enfermedad del amargor”, similar a “la vuelta”, pero con un marcado amargor del vino (Suárez-Lepe e Íñigo-Leal, 2004). Además, las bacterias lácticas también están implicadas junto con las levaduras en el desarrollo del “olor a ratón” ya comentado (Chatonnet et al., 1995; Heresztyn, 1986; Snowdon et al., 2006).

II.5.2.2. Picado acético y avinagrado del vino

El picado acético consiste en la oxidación del alcohol etílico del vino por bacterias acéticas. Su metabolismo da lugar fundamentalmente a gran cantidad de ácido acético, lo que incrementa la acidez volátil y otorga al vino un sabor marcadamente ácido (Bartowsky y Henschke, 2008). Las bacterias acéticas se encuentran en la uva formando parte de su microbiota natural, apareciendo recuentos anormalmente altos si ésta ha sido atacada por mohos (Lafon-Lafourcade y Joyeux, 1981). Básicamente, son dos los géneros que más problemas provocan: *Acetobacter* y *Gluconobacter* (Joyeux et al., 1984).

Las bacterias acéticas se caracterizan por necesitar oxígeno para su crecimiento, por lo que en un primer momento sólo se multiplican en la superficie del mosto. Una vez arranca la fermentación, el potencial redox cae por lo que su multiplicación durante la vinificación es

complicada. En cambio, durante la crianza o almacenamiento del vino es cuando más fácil es su desarrollo, por lo que el vino deberá estar protegido del aire para evitar esta clase de oxidaciones biológicas (Bartowsky y Henschke, 2008).

Generalmente, se utilizan dos términos diferentes para referirnos a esta alteración, en función de la fase en la que se encuentra: “picado” cuando la alteración esta en su fase inicial y sólo se ve afectada la superficie del vino; y “avinagramiento”, cuando ya la enfermedad afecta a todo el volumen, pudiéndose apreciar enturbamiento y formación de velo (Suárez-Lepe e Íñigo-Leal, 2004).

II.5.3. CONTROL DEL CRECIMIENTO MICROBIANO

Se han propuesto diferentes estrategias con el fin de controlar las distintas poblaciones microbianas y así evitar la alteración microbiana del vino. La más importante es, sin duda, la adición de anhídrido sulfuroso (SO_2). Este compuesto permite controlar el crecimiento de un gran número de microorganismos perjudiciales y como ya se ha indicado, favorece la extracción de los compuestos fenólicos y tiene cierta actividad antioxidante (Boulton et al., 1996; Fugelsang, 1989; Henick-Kling et al., 1998; Lustrato et al., 2003; Ribéreau-Gayon et al., 2006a; Salaha et al., 2008). Todo ello, añadido a su facilidad de uso, ha hecho que la adición de SO_2 haya perdurado hasta nuestros días siendo, en la actualidad, la técnica de control microbiano más generalizada en las bodegas (Couto et al., 2005; Ough y Cronwell, 1987).

A pesar de todos los efectos positivos del anhídrido sulfuroso, esta sustancia, en dosis elevadas, puede provocar la aparición de olores y sabores defectuosos y, lo que es más importante, en personas especialmente sensibles al mismo, ciertos efectos tóxicos (hipersensibilidad). Por ello, la propia Organización Mundial de la Salud (OMS) recomendó limitar su uso o sustituirlo por otra sustancia o técnica sin efectos perjudiciales en la salud humana (Usseglio-Thomasset, 1992). Además, a pesar de su uso generalizado, las alteraciones microbianas siguen generando grandes pérdidas económicas en las bodegas. Por todo ello, en los últimos años, se está realizando un gran esfuerzo con el fin de sustituir el uso del SO_2 por otras técnicas más efectivas o, cuando menos, desarrollar nuevas estrategias que permitan reducir las dosis utilizadas del mismo (Suárez et al., 2007).

Así, se ha propuesto el uso de diferentes técnicas, como la filtración o el uso de proteínas clarificantes, con el fin de reducir la carga microbiana inicial del mosto (Tabla II.6). Éstas permitirían por un lado disminuir la adición de SO_2 y favorecer el desarrollo de los fermentos iniciadores y, por otro lado, reducir el riesgo de contaminación de los equipos utilizados en las bodegas.

Por contra, como se resume en la Tabla II.6, muchas de las técnicas propuestas, sin llegar a ser totalmente efectivas, pueden modificar las propiedades sensoriales del vino, o bien son difícilmente aplicables en bodega. Por ejemplo, la filtración, que reduce notablemente el número de microorganismos alterantes, afecta a las estructuras coloidales del vino, lo que reduce la intensidad de color (Calderón et al., 2004). Por ello, se hace necesaria la búsqueda de otros sistemas alternativos que permitan eliminar o reducir el número de microorganismos alterantes sin modificar las características sensoriales del vino y sin afectar a la salud del consumidor.

■ TABLA II.6

Técnicas enológicas propuestas para sustituir el uso del anhídrido sulfuroso en las bodegas. Adaptado de Suárez et al. (2007)

Técnica enológica	Acción	Efecto adverso
<i>Proteínas clarificantes</i> (Murat y Dumeau, 2003)	Eliminación de los microorganismos por floculación	Pérdida de color y de aroma
<i>Filtración</i> (Calderón et al., 2004)	Eliminación física de los microorganismos	Pérdida de color, de aroma y de cuerpo
<i>Aditivos distintos al SO₂</i> (Delfini et al., 2002; Gómez-Rivas et al., 2004)	Control del crecimiento microbiano	Muchos de ellos no están autorizados, o pueden producir reacciones de hipersensibilidad
<i>Altas presiones hidrostáticas</i> (Mok et al., 2006; Puig et al., 2003)	Destrucción de los microorganismos	Alto coste de los equipos y dificultad de uso
<i>Pasteurización</i> (Couto et al., 2005)	Destrucción de los microorganismos	Alteración de las características organolépticas
<i>Bacteriocinas</i> (Du Toit y Pretorius, 2000)	Control del crecimiento microbiano	Uso experimental y no autorizado
<i>Lisozima</i> (Tirelli y De Noni, 2007)	Control del crecimiento microbiano	Sólo actúa frente a bacterias Gram positivas
<i>Uso de levaduras transgénicas</i> (Du Toit y Pretorius, 2000; Giudici et al., 2005)	Inhibición o inactivación de microorganismos alterantes (efecto killer)	Actúa sólo contra levaduras. No autorizado

III. Los pulsos eléctricos de alto voltaje

En las últimas décadas, la industria alimentaria ha sufrido una increíble explosión tecnológica, cuyos frutos son visibles día a día en el desarrollo de nuevas técnicas y procesos, y en la consecuente diversificación de la oferta de productos. Especialmente, han cobrado particular importancia, aquellas tecnologías que permiten procesar los alimentos sin alterar sus características organolépticas. Una de las tecnologías que pretende conseguir estos objetivos es la aplicación de pulsos eléctricos de alto voltaje (PEAV). Los tratamientos de PEAV consisten básicamente en la aplicación de campos eléctricos de alta intensidad y corta duración (microsegundos) a un producto colocado entre dos electrodos (Barbosa-Cánovas et al., 2001). Estos tratamientos provocan la permeabilización de las membranas celulares sin aumentar sustancialmente la temperatura del alimento. Cimentándose en este fenómeno denominado electroporación, la tecnología posee diversas potenciales aplicaciones en la industria alimentaria, como la inactivación microbiana o la mejora de los procesos de transferencia de masa.

Debido a los grandes avances técnicos de las dos últimas décadas, cabe destacar que la tecnología de los PEAV está cada vez más cerca de su aplicación cotidiana en multitud de procesos alimentarios, por lo que hoy en día está sometida a una intensa evaluación científica e industrial.

III.1. Mecanismo de acción

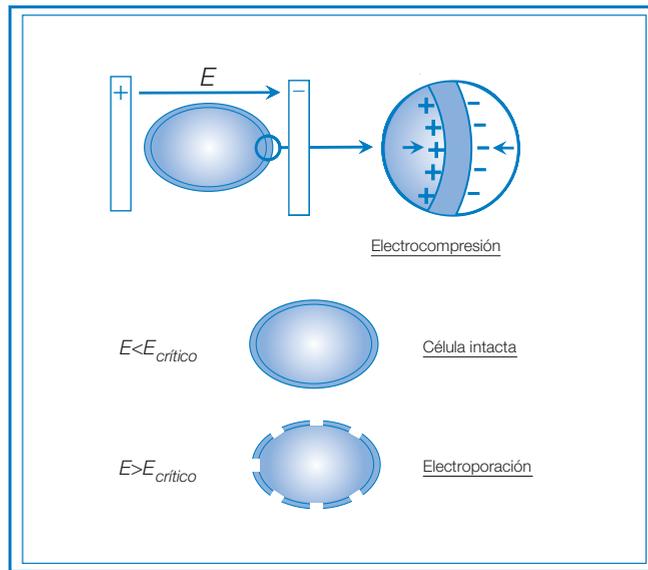
Hoy en día es aceptado que los campos eléctricos de alta intensidad provocan cambios estructurales en las membranas celulares, lo que origina un aumento de su permeabilidad (electroporación). Sin embargo, los mecanismos celulares que originan dichos cambios y dicha rotura siguen sin conocerse con absoluta precisión. Sale y Hamilton (1967a, 1967b, 1968) fueron los primeros que señalaron la membrana citoplasmática como la estructura diana de los PEAV. A partir de esos primeros estudios, diversos modelos teórico-matemáticos surgieron con ánimo de explicar las bases biológicas de la electroporación. Estos pueden dividirse en dos grupos, los modelos electromecánicos (Dimitrov, 1984; Riemann et al., 1975; Zimmermann et al., 1974) y los modelos basados en la formación de poros hidrofóbicos e hidrofílicos en la bicapa lipídica y/o en cambios de su fluidez (Abidor et al., 1979; Joshi et al., 2002; Powell y Weaver, 1986).

Los modelos electromecánicos consideran la membrana como un condensador de material dieléctrico elástico de baja conductancia. Según esta teoría, en condiciones de reposo se produce en la célula un acúmulo de componentes con cargas de distinto signo a ambos lados de la membrana, lo que provoca un potencial transmembrana de 10 mV aproximadamente. La exposición de la célula a un campo eléctrico externo produce una reorganización de las cargas, lo que provoca un aumento de ese potencial transmembrana, originando una deformación viscoelástica de la membrana como consecuencia de las fuerzas de atracción entre las cargas de signos opuestos. Si el potencial supera un determinado valor crítico, la atracción entre las cargas de ambos lados de la membrana citoplasmática produce fuerzas de electrocompresión suficientemente fuertes como para producir la ruptura dieléctrica de la membrana y el consecuente aumento de permeabilidad (Figura 2.1) (Neumann y Rosenheck, 1972; Zimmermann et al., 1974). Estos modelos predicen la existencia de un campo eléctrico crítico por encima del cual la membrana es inestable. A pesar de su antigüedad, las teorías electromecánicas se siguen utilizando todavía en la actualidad debido a su sencillez mate-

mática. Sin embargo, estos modelos no pueden explicar cuantitativamente la dependencia del voltaje transmembrana con la anchura del pulso aplicado, ni dilucidar estadísticamente porqué no todas las células de una misma población se electroporan a la vez (Kinosita y Tsong, 1977a, 1977b).

■ FIGURA III.1

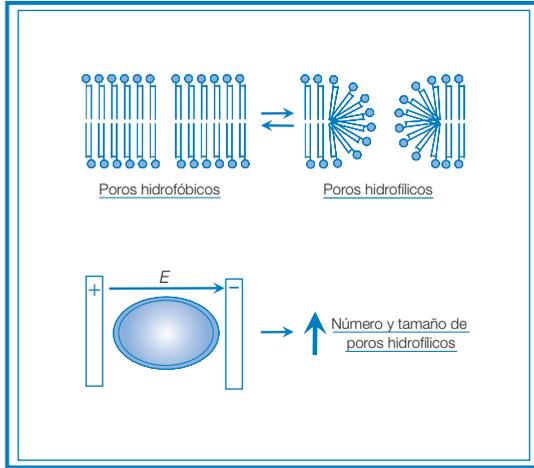
Esquema del mecanismo de permeabilización mediante PEAV según los modelos electromecánicos



Intentando completar las lagunas de los modelos electromecánicos, surgieron otras teorías, con una mayor base matemática-estadística, que explican el incremento de permeabilidad de las células sometidas a la acción de un campo eléctrico, en base a la formación de poros hidrofílicos. Según estas teorías, en la membrana lipídica se forman de manera normal y espontánea poros hidrofóbicos de distinto tamaño, debido a fluctuaciones térmicas laterales de las moléculas lipídicas (Figura III.2). Por encima de un tamaño crítico, los poros se transforman en hidrofílicos, reduciéndose la energía del sistema y aumentando, por tanto, su estabilidad. La duración de los poros formados es a su vez variable y se relaciona con su tamaño y la energía del sistema.

■ FIGURA III.2

Esquema del mecanismo de permeabilización mediante PEAV según los modelos basados en la formación de poros hidrofílicos en la membrana citoplasmática



El aumento del potencial transmembrana y/o el calentamiento de los lípidos de la membrana por efecto Joule durante la aplicación de un tratamiento de PEAV provocan una disminución de la energía necesaria para la formación de los poros y, por lo tanto, aumenta en gran medida su número y tamaño. Además, disminuye también el radio a partir del cual los poros se transforman en hidrofílicos. Según estas teorías, la acumulación de poros hidrofílicos y su expansión son los causantes de la electroporación (Joshi et al., 2002; Teissie y Tsong, 1981; Weaver y Chizmadzhev, 1996).

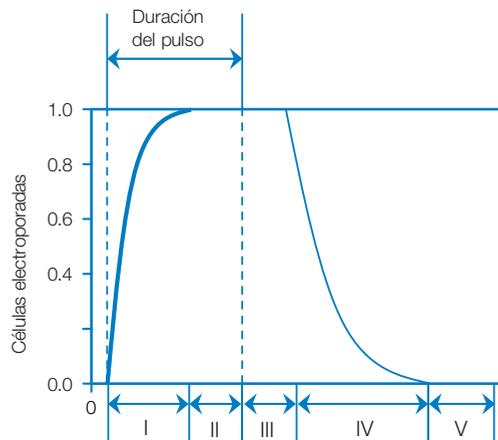
Dejando a un lado las bases moleculares del proceso, los mayores avances actuales en la comprensión de los fenómenos de electroporación son debidos al uso de esta tecnología en ingeniería genética y en biología molecular para transferir material genético u otras sustancias de diversa naturaleza al interior de las células. Así, en los últimos 15 años se han publicado diversos trabajos que han intentado aclarar estos fenómenos con mayor o menor éxito (Ho y Mittal, 1996; Pavlin et al., 2002; Prasanna y Panda, 1997; Tsong, 1991; Valic et al., 2003). Fruto de todos estos estudios, Teissie et al. (2005) propusieron que, a pesar del desconocimiento real de los fenómenos intrínsecos del proceso, la electroporación puede dividirse en 5 fases o pasos fundamentales: la fase de inducción, la fase de expansión, la fase de estabilización, la fase de oclusión o cerrado de los poros y, finalmente, la fase de memoria (Figura III.3).

En la fase de inducción, el campo eléctrico aplicado produce un aumento de potencial transmembrana. Si el campo eléctrico alcanza un determinado valor crítico, el potencial transmembrana supera los 200 mV, lo que provoca la permeabilización de la membrana. En la segunda fase, o fase de expansión, los efectos sobre la membrana se mantienen produciéndose la expansión de los poros formados, siempre que el campo eléctrico siga superando el valor crítico. En la fase de estabilización, el campo eléctrico se sitúa por debajo del valor crítico, produciéndose una reorganización rápida de la membrana y una estabilización de los

poros generados. En la cuarta etapa o fase de sellado, se produce un cerrado paulatino de los poros que puede durar desde segundos hasta minutos. Finalmente, en la última etapa o fase de memoria, algunos cambios en las propiedades de la membrana permanecen durante horas y, finalmente, desaparecen volviendo las células a la normalidad. En el caso de que el tratamiento aplicado sea lo suficientemente intenso, los poros no se cierran en la cuarta fase y se produce la muerte de la célula. Si bien los mecanismos reales y últimos que llevan a la muerte celular no se conocen con claridad, lo que parece un hecho es que deben estar relacionados con la formación de esos poros irreversibles (Pagán y Mañas, 2006).

■ FIGURA III.3

Representación esquemática de las fases fundamentales que acontecen durante la electroporación celular. I: Fase de Inducción. II: fase de expansión. III: fase de estabilización. IV: fase de oclusión. V: fase de memoria



La reversibilidad o irreversibilidad de los poros depende de diversos factores como el grosor de la membrana, la forma y el tamaño de las células o la intensidad del campo eléctrico aplicado. De manera general, los poros formados serán reversibles si son pequeños en comparación con el área de la membrana. Un aumento de la intensidad del tratamiento, bien sea un incremento del campo eléctrico o del número o anchura de los pulsos, puede dar lugar a la irreversibilidad de los poros formados y a la consecuente destrucción de la célula. En función del tamaño y la forma de la misma, el campo eléctrico crítico en el cual los poros formados pasan a ser irreversibles oscila entre 1 y 2 kV/cm para las células vegetales, y entre 10 y 14 kV/cm para los microorganismos (Toepfl et al., 2005a).

En definitiva, a pesar de los numerosos estudios que en los últimos años han abordado las bases moleculares de la electroporación, debido a que la mayoría de trabajos realizados han sido llevados a cabo en modelos simplificados, como vesículas fosfolipídicas o bicapas lipídicas planas, es prematuro extraer conclusiones definitivas aplicables a las células reales. Con objeto de superar estos límites actuales, se hace necesaria la realización de un mayor número de estudios básicos en células, tanto eucariotas como procariotas, para poder

obtener finalmente una conclusión real y establecer los principios moleculares básicos de la electroporación (Teissie et al., 2005).

III.2. Aspectos técnicos de los PEAV

Desde las primeras aproximaciones a la aplicación de los PEAV en alimentos realizadas por Doevenspeck (1960, 1961), el conocimiento de los parámetros de tratamiento más importantes de esta tecnología ha mejorado notablemente. Además de este hecho, en los últimos diez años, se ha producido una mejora considerable de los sistemas de procesado desarrollados, apoyada fundamentalmente en el aumento de potencia y capacidad de los equipos, así como en el diseño de cámaras de tratamiento de diversas configuraciones. Todo ello, ha desembocado a un acercamiento real de los PEAV a su aplicación en la industria alimentaria.

III.2.1. PARÁMETROS DEL PROCESO

Los parámetros más importantes que caracterizan el tratamiento por PEAV son la intensidad del campo eléctrico, la forma y la anchura de pulso, el tiempo de tratamiento, la energía específica, la frecuencia y la resistencia de la cámara de tratamiento.

III.2.1.1. Intensidad del campo eléctrico

La intensidad del campo eléctrico es sin duda alguna, el parámetro más importante que determina la eficacia del procesado mediante PEAV. Ésta se define como la diferencia de potencial existente entre los dos electrodos donde se coloca el alimento dividido por la distancia existente entre ellos. Como ya se ha mencionado con anterioridad, para que acontezca la electroporación es necesario superar un determinado campo eléctrico crítico (Toepfl et al., 2007a). Una vez superado ese valor crítico, el incremento del campo eléctrico se asocia generalmente a un aumento de la eficacia del proceso (Álvarez et al., 2003a, 2003b; Barssoti et al., 1999a; López et al., 2009a, 2009b). Sin embargo, se ha constatado en células eucariotas y procariotas que por encima de un determinado valor este aumento no provoca un incremento sustancial en la eficiencia del tratamiento (Álvarez et al., 2003b; Lopez et al., 2009b).

Además de conocer con exactitud el valor del campo eléctrico aplicado, es de vital importancia conocer la distribución del mismo en la cámara de tratamiento. La presencia de zonas en las que el campo eléctrico es especialmente intenso (> 60 kV/cm), los denominados “hot spots”, puede provocar aumentos localizados de temperatura y los problemas derivados de los mismos (Gerlach et al., 2008).

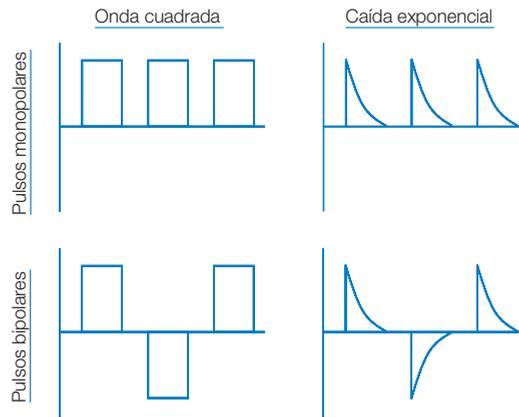
III.2.1.2. Forma del pulso, anchura del pulso y tiempo de tratamiento

En la actualidad, en los tratamientos de PEAV se utilizan esencialmente dos tipos de pulsos, pulsos de caída exponencial y pulsos de onda cuadrada (de Hann, 2007) (Figura III.4). Los pulsos de caída exponencial se basan en la descarga completa y no regulada de los condensadores, lo que provoca un rápido incremento del voltaje y su posterior disminución

exponencial a lo largo del tiempo. Por su parte, los pulsos de onda cuadrada se caracterizan porque tras el rápido incremento de voltaje, éste se mantiene constante y, finalmente, cae de nuevo rápidamente. Por lo tanto, en este caso la descarga de los condensadores está completamente regulada con el fin de mantener el voltaje seleccionado constante a lo largo de toda la duración del pulso.

■ FIGURA III.4

Formas del pulso más comunes utilizadas en los tratamientos de pulsos eléctricos de alto voltaje



Tanto los pulsos de caída exponencial como los de onda cuadrada pueden ser monopolares o bipolares. Los pulsos bipolares se caracterizan porque tras la aplicación de un pulso de una polaridad, se aplica otro de polaridad contraria. Se ha descrito que los pulsos bipolares producen una inactivación microbiana ligeramente mayor que los monopolares (de Hann, 2007). A pesar de ello, su uso no está generalizado debido a que necesitan generadores de pulsos más complejos y costosos (Zhang et al., 1995).

Una de las principales diferencias prácticas entre los pulsos de caída exponencial y los de onda cuadrada es el cálculo de su anchura, que determina a su vez el tiempo de tratamiento (número de pulsos multiplicado por la anchura de los mismos). Mientras que en el caso de los pulsos de onda cuadrada la anchura del pulso coincide con su duración, en el caso de los pulsos de caída exponencial, el cálculo no es tan evidente. A pesar de ello, la anchura de los pulsos de caída exponencial se define como el tiempo durante el cual el voltaje aplicado es superior al 37% del valor máximo alcanzado en la descarga (Zhang et al., 1995).

III.2.1.3. Energía por pulso

Cuando se aplica una diferencia de potencial entre los electrodos de la cámara de tratamiento, se genera una corriente eléctrica que circula a través del producto. La energía eléctrica necesaria para mantener esta diferencia de potencial entre los electrodos procede del condensador. La energía eléctrica almacenada en el condensador depende de su capa-

cidad y de la diferencia de potencial que existe entre sus armaduras. Matemáticamente, esta energía es igual a:

$$W = \frac{1}{2} \cdot C \cdot V^2$$

donde W es la energía almacenada en el condensador expresada en julios (J); C es la capacidad del condensador expresada en faradios (F); V la diferencia de potencial entre las armaduras expresada en voltios (V). Sin embargo, para conocer la energía realmente aplicada sobre el producto, es necesario conocer el rendimiento de la instalación. Otra forma de determinar esta energía eléctrica aplicada, es a partir de las siguientes ecuaciones:

$$W = \frac{1}{2} \cdot V \cdot I \cdot \tau \quad \text{Para pulsos de caída exponencial.}$$

$$W = V \cdot I \cdot \tau \quad \text{Para pulsos de onda cuadrada.}$$

donde V es la diferencia de potencial aplicada entre los electrodos de la cámara de tratamiento (V); τ es la anchura del pulso (s); I es la intensidad de la corriente (A). Utilizando estas ecuaciones, puede determinarse, con razonable exactitud, la energía realmente aplicada, siempre que las medidas de la diferencia de potencial, la intensidad de la corriente y la anchura del pulso se realicen directamente en la cámara de tratamiento. Muchos de los resultados existentes en la bibliografía con relación a la energía aplicada son inexactos, debido a que los cálculos se han basado en el voltaje de descarga seleccionado en el equipo y no en el realmente aplicado, que varía debido a las pérdidas producidas en los componentes del equipo por la configuración eléctrica del mismo. La energía eléctrica total aplicada durante un tratamiento de PEAV es igual a la energía por pulso (W) multiplicada por el número total de pulsos (n). La energía por unidad de masa o energía específica (W'), se calcula a partir de la energía total aplicada y de la masa de producto procesado (m), expresándose generalmente en kJ/kg:

$$W' = \frac{W \cdot n}{m}$$

Esta energía específica depende del voltaje y de la intensidad de la corriente, del número de pulsos y de su anchura, y de la conductividad y la masa del alimento. Toda la información aportada por este parámetro hace que el mismo junto con la intensidad del campo eléctrico y el tiempo de tratamiento sean los parámetros recomendados a indicar para caracterizar los tratamientos de PEAV.

III.2.1.4. Frecuencia

La frecuencia se corresponde con el número de pulsos aplicados por unidad de tiempo. La frecuencia utilizada por los equipos de generación de PEAV es muy variable, pudiendo oscilar entre 1 y 5.000 Hz. En las cámaras estáticas, una vez establecido el tiempo efectivo de tratamiento (número de pulsos por su anchura), la frecuencia de los pulsos determina el tiempo de permanencia del producto en la cámara, es decir, el tiempo de procesado. En los tratamientos aplicados en condiciones de flujo continuo, la frecuencia seleccionada junto con el caudal del alimento determinan el número de pulsos medio aplicado al alimento.

III.2.2. PRINCIPALES COMPONENTES DE UN EQUIPO DE PEAV

Para la aplicación de un tratamiento de PEAV, se precisa un sistema que permita la descarga intermitente de corriente eléctrica continua en una cámara de tratamiento, donde se genera un campo eléctrico de alta intensidad. Desde los inicios de la tecnología de los PEAV en los años 60, y gracias al desarrollo de la ingeniería eléctrica, estos sistemas son cada vez más potentes y compactos. A pesar de esta evolución, todo equipo posee un diseño o esquema básico similar: un generador de PEAV, una cámara de tratamiento y un sistema de control y toma de datos del proceso (Min et al., 2007) (Figura III.5).

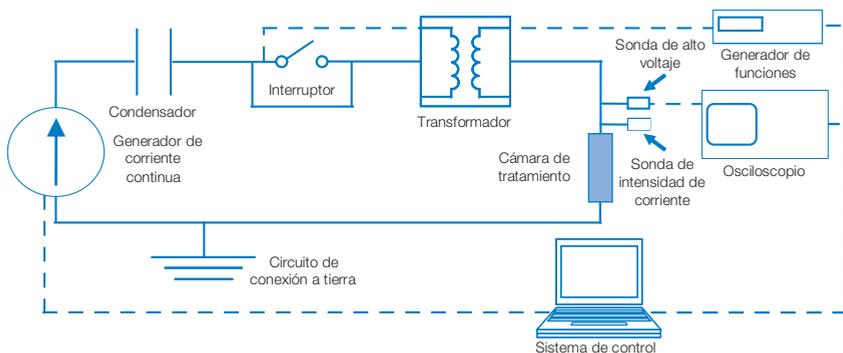
III.2.2.1. Generador de PEAV

El generador de PEAV está constituido básicamente por un generador de corriente eléctrica continua de alto voltaje, un condensador o condensadores, un interruptor y, en algunos casos, un transformador del voltaje del pulso (Figura III.5). El generador de corriente eléctrica continua transforma la corriente alterna de la red eléctrica en corriente continua. El condensador, o conjunto de condensadores, almacena dicha energía eléctrica que finalmente se descarga en la cámara de tratamiento a través del interruptor. El interruptor regula el paso de la corriente eléctrica desde el condensador a la cámara de tratamiento. En algunas ocasiones, el condensador o el conjunto de condensadores no son capaces de almacenar toda la energía eléctrica requerida. En estos casos, un transformador del pulso, situado tras el interruptor, aumenta el voltaje de la señal pulsante al voltaje seleccionado. Los generadores de última generación incluso no disponen de condensador ya que el transformador puede generar directamente la corriente eléctrica a los voltajes requeridos.

Las características técnicas del generador de PEAV, como el máximo voltaje y la intensidad de la corriente, la duración y la forma del pulso y la frecuencia máxima de trabajo, están determinadas a su vez por las características de cada uno de sus componentes.

FIGURA III.5

Esquema general de los principales componentes de un equipo de PEAV: un generador de PEAV (generador de corriente eléctrica continua de alto voltaje, condensador, interruptor, transformador del voltaje del pulso), una cámara de tratamiento y un sistema de control (sistema de control, generador de funciones) y toma de datos del proceso (osciloscopio, sondas de alto voltaje y de intensidad de la corriente)



III.2.2.2. Cámara de tratamiento

La cámara de tratamiento es el lugar donde se sitúa el producto para su tratamiento. Básicamente consta de dos electrodos, uno de ellos conectado al generador de PEAV y el otro a tierra, separados por un material aislante (Huang y Wang, 2009). Entre los dos, debido a la diferencia de potencial, es donde se va a generar el campo eléctrico. Los materiales con los que se fabrican las cámaras de tratamiento, tanto los electrodos como el aislante, no deben interactuar con los productos que se tratan y deben poderse limpiar con facilidad e incluso esterilizar (Zhang et al., 1995). Algunos de los materiales recomendados para la fabricación de los electrodos son el acero inoxidable o el grafito, mientras que para el aislante, cerámicas o polímeros plásticos como el Delrin o el Metacrilato.

El diseño de la cámara de tratamiento depende de diversos factores como el tipo de aplicación (inactivación microbiana o transferencia de masa), las características del equipo o las condiciones de tratamiento (estáticas o flujo continuo).

Hoy por hoy, el diseño de las cámaras, sobre todo en lo referente a su tamaño, está supeditado a las características del equipo generador de PEAV. De hecho, debido a las altas intensidades del campo eléctrico necesarias para la inactivación microbiana por PEAV, los investigadores han destinado gran cantidad de esfuerzo al diseño de cámaras que permitan la aplicación del mayor campo eléctrico posible a la mayor cantidad de producto, aprovechando al máximo las características de los equipos disponibles. Por ello, el mayor avance en el diseño y construcción de cámaras de tratamiento ha sido debido al uso de los PEAV en la inactivación microbiana. En cambio, para la aplicación de los PEAV en la mejora de la transferencia de masa, como no son necesarias intensidades del campo eléctrico tan elevadas, el factor equipo ha dejado de ser limitante, por lo que las cámaras de tratamiento para esta aplicación se acercan cada vez más a las necesidades industriales.

La geometría de los electrodos de la cámara es la característica fundamental para conseguir intensidades del campo eléctrico elevadas y lo más uniformes posibles (Alkhafaji y Farid, 2007). Si bien en algunas configuraciones es sencillo calcular la intensidad del campo eléctrico aplicada, en otras su geometría dificulta enormemente su determinación. En estos casos, se hace necesaria la utilización de complejas herramientas informáticas que permiten conocer la distribución del campo eléctrico con suficiente exactitud (Gerlach et al., 2008; Jaeger et al., 2009a; Lindgren, 2001,2002).

Independientemente de la geometría del electrodo o de la aplicación, las cámaras de tratamiento pueden dividirse en cámaras diseñadas para aplicar tratamientos estáticos y cámaras construidas para el tratamiento en flujo continuo. Las cámaras para tratamientos estáticos son más indicadas para equipos a escala de laboratorio. Éstas se utilizan para realizar investigaciones básicas sobre los factores más importantes que afectan al proceso, ya que permiten un perfecto control de los parámetros de los tratamientos. Las cámaras en flujo continuo se suelen utilizar en equipos a escala de planta piloto, donde se simulan tratamientos a escala semi-industrial a partir de los datos obtenidos en las cámaras estáticas. Por lo tanto, en una primera etapa de cualquier investigación sobre la aplicación de los PEAV, el uso de una cámara estática resulta necesario.

III.3. Aplicaciones de los PEAV

Debido al impacto de los PEAV sobre las membranas celulares, en las últimas décadas se han estudiado diferentes posibles aplicaciones de la tecnología, no sólo en el campo de la industria alimentaria, sino también en el campo de la biotecnología y la genética. Mientras la mayor parte de las aplicaciones biotecnológicas y genéticas están basadas en la electroporación reversible de las membranas, las aplicaciones en la tecnología alimentaria se sustentan fundamentalmente en la formación de poros irreversibles que originan la desintegración celular.

Las aplicaciones más importantes de esta tecnología en la industria alimentaria son la inducción de la producción de determinados metabolitos (respuesta al estrés), la inactivación microbiana y enzimática en alimentos líquidos y, finalmente, la permeabilización de células eucariotas con el propósito de mejorar los procesos de transferencia de masa. A pesar de que las bondades de esta tecnología se han demostrado tanto a escala de laboratorio como de planta piloto, por el momento, sólo ha habido una aplicación comercial de esta tecnología para la pasteurización de zumos de frutas (Clark, 2006). Sin embargo, cabe esperar que el esfuerzo que se está realizando, especialmente en el desarrollo de nuevos equipos, convierta la aplicación de PEAV en un tratamiento habitual en la industria alimentaria.

III.3.1. INDUCCIÓN DE REACCIONES DE RESPUESTA AL ESTRÉS

Como ya ha sido mencionado en esta Memoria, la aplicación de campos eléctricos inferiores a 2 kV/cm provoca la formación de poros reversibles en las membranas celulares de los tejidos vegetales (Angersbach et al., 2000). Por ejemplo, en células de patata si se consigue que el potencial transmembrana sea de 1,7 V durante 0,7 μ s, se produce la formación de poros reversibles, restaurándose la vitalidad y la actividad metabólica de la célula tras la aplicación del tratamiento (Angersbach et al., 2000). Este fenómeno de electroporación reversible induce un estrés celular que, en determinadas circunstancias, puede originar una reacción metabólica y el aumento en la producción de determinados metabolitos celulares de interés en la industria alimentaria. Además, los tratamientos de PEAV necesarios para esta aplicación apenas modifican la temperatura del producto. En consecuencia, estos tratamientos no dañan ni a las enzimas, ni a las proteínas, ni en general a las sustancias intracelulares de interés en la industria alimentaria. Por ejemplo, Guderjan et al. (2005) observaron que tratamientos de PEAV inferiores a 1,3 kV/cm provocan un incremento en la producción y posterior extracción de fitosterol y de isoflavonas de las semillas de maíz y de soja, respectivamente. Este efecto inductor de respuesta al estrés es similar al observado previamente tras la aplicación de otro tipo de tratamientos como las altas presiones hidrostáticas (Dörnenburg y Knorr, 1998).

Fruto de estas primeras investigaciones, recientemente se ha desarrollado un biorreactor acoplado a un sistema de PEAV con objeto de investigar la respuesta al estrés en un cultivo de células de *Vitis vinifera*. El fin de esta investigación es estudiar si es posible estimular y aumentar la producción de resveratrol en el cultivo celular (Toepfl et al., 2007a).

Es necesario remarcar que esta posible aplicación de la tecnología de los PEAV no ha recibido demasiado interés y sólo ha comenzado a estudiarse en profundidad en los últimos años. Por lo tanto, en el caso de que se observara algún efecto realmente interesante, sería necesario un mayor desarrollo en el diseño y la construcción de biorreactores y sistemas que

podieran aprovechar la potencial utilidad de esta aplicación en la industria alimentaria e incluso en la industria farmacéutica.

III.3.2. INACTIVACIÓN MICROBIANA EN ALIMENTOS LÍQUIDOS

Esta aplicación está basada en la capacidad de los tratamientos de PEAV de permeabilizar irreversiblemente las células, lo que da lugar a la muerte de las mismas (Barssoti y Chettle, 1999b; Saldaña et al., 2008). Para ello, es necesario aplicar campos eléctricos intensos, superiores a los 15 kV/cm. Aunque la aplicación de tratamientos térmicos es la tecnología de referencia en la inactivación microbiana, el estudio y desarrollo de métodos alternativos que permitan asegurar la estabilidad y seguridad de los alimentos, evitando las alteraciones sensoriales derivadas del calor, es uno de los grandes retos de la tecnología alimentaria desde hace 50 años. La tecnología de los PEAV, capaz de destruir células debido a la formación de poros irreversibles, posee potencial suficiente como para sustituir, o cuando menos complementar, el uso de los tratamientos térmicos. De hecho, esta es la aplicación de los PEAV que ha focalizado la mayor parte de las investigaciones, constituyendo la piedra angular sobre la que se ha edificado el conocimiento de esta tecnología alimentaria (Toepfl et al., 2007b).

III.3.2.1. Factores que afectan a la inactivación microbiana

Desde los primeros estudios de Sale y Hamilton en la década de los sesenta hasta la actualidad, el estudio de los factores más importantes que determinan la eficacia letal de los PEAV ha sido objeto de un gran esfuerzo investigador. La Tabla III.1 muestra los principales parámetros que determinan la inactivación microbiana mediante PEAV. Ésta depende de las características de los microorganismos, del medio de tratamiento y del propio tratamiento de PEAV.

■ TABLA III.1

Principales parámetros que determinan la resistencia microbiana a los pulsos eléctricos de alto voltaje. Adaptado de Wouters et al. (2001a)

Características microbianas	Características del medio de tratamiento	Parámetros del proceso
Tipo de microorganismo	Constitución	Intensidad del campo eléctrico
Tamaño	pH	Tiempo de tratamiento
Forma	Actividad de agua	Forma del pulso
Cepa microbiana	Conductividad eléctrica	Energía aplicada
Fase de crecimiento		Temperatura
Condiciones de cultivo		
Condiciones de recuperación		

III.3.2.1.1. Características de los microorganismos

Diversos autores han estudiado la influencia de distintas características de los microorganismos en la eficacia letal de los tratamientos de PEAV, como el tipo de microorganismo (esporos bacterianos, células bacterianas vegetativas, levaduras, mohos, virus), las características de sus envolturas celulares (bacterias Gram positivas o Gram negativas), su tamaño y forma,

su estado fisiológico (fase de crecimiento exponencial o estacionario), la cepa microbiana a la cual pertenece y las condiciones de cultivo y recuperación (Álvarez et al., 2006b; Khadre y Youseff, 2002; Wouters et al., 2001a).

Tipo, tamaño y forma del microorganismo

Originalmente, Sale y Hamilton (1967a, 1967b, 1968) observaron que las células vegetales eran más sensibles que las levaduras, y éstas a su vez, eran mucho más sensibles que las bacterias. Por su parte, Hülshager et al. (1983) observaron que había una gran variedad de resistencia entre los distintos microorganismos. Esta diferencia en la resistencia suele achacarse fundamentalmente a las diferencias en el tamaño y la forma celular (Fox, 2007).

La influencia del tamaño en el efecto letal de los PEAV se ha relacionado con el potencial transmembrana creado por un campo eléctrico externo. Cuanto menor es el tamaño celular, menor es el valor del potencial transmembrana inducido por la acción de un determinado campo eléctrico y mayor es la resistencia del microorganismo al tratamiento (Zimmermann et al., 1974). La forma también influye en el efecto del campo eléctrico sobre el potencial transmembrana. Heinz et al. (2001) establecieron matemáticamente que las células bacilares son más resistentes que las esféricas a la acción de un campo eléctrico. Sin embargo, el tamaño y la forma de las células no es el único factor que establece las diferencias existentes en la resistencia entre los diversos tipos de microorganismos. Álvarez et al. (2003a) demostraron que la sensibilidad a los PEAV de microorganismos de tamaño similar difería en gran medida.

Los PEAV son capaces de destruir células vegetativas, pero no esporos bacterianos (Knorr et al., 1994; Pagán et al., 1998). Debido al peculiar mecanismo de acción de esta tecnología, los esporos bacterianos, cuyas membranas están protegidas por el córtex, son resistentes a estos tratamientos. En consecuencia, esta tecnología puede utilizarse como alternativa a los tratamientos térmicos de pasteurización, pero no a los de esterilización (Pagán et al., 1998). Por otra parte, en relación a las formas esporuladas no bacterianas, algunos estudios indican que es posible la inactivación de conidiosporos de algunos mohos y de ascosporos de algunas levaduras por PEAV, si bien los ascosporos de *Neosartoria fischeri* fueron resistentes a estos tratamientos (Raso et al., 1998).

En cuanto a la sensibilidad o al posible efecto de los PEAV sobre los virus, apenas existen estudios en la literatura. Los datos publicados por Khadre y Youseff (2002) sugieren que los virus son particularmente resistentes a esta tecnología. Estos autores observaron que los rotavirus humanos eran resistentes a tratamientos de PEAV de campo eléctrico comprendido entre 20 y 29 kV/cm.

Dentro de las células vegetativas bacterianas, en general las Gram positivas muestran una mayor resistencia a los PEAV que las Gram negativas (Toepfl et al., 2007a), aunque, como se indicará a continuación, el pH del medio de tratamiento influye notablemente y de manera distinta, en la resistencia a los PEAV de las bacterias Gram positivas y negativas (Álvarez et al., 2006b; García et al., 2005a; Saldaña et al., 2009). De hecho, a pH ácido algunas bacterias Gram negativas poseen similar o incluso superior resistencia a los PEAV que algunas especies Gram positivas (García et al., 2005a; Saldaña et al., 2009).

Además de la variedad interespecífica en la resistencia a los PEAV, ha quedado de manifiesto la existencia de una gran variedad intraespecífica (Lado y Yousef, 2003; Saldaña et al., 2009). Por ejemplo, Lado y Yousef (2003), aplicando un mismo tratamiento de 25 kV/cm y 144 μ s a 9 cepas diferentes de *Listeria monocytogenes*, observaron que la inactivación

obtenida variaba de 1 a 3,5 ciclos logarítmicos. Esta gran variabilidad en función de la cepa microbiana enfatiza la necesidad de realizar estudios intraespecíficos para identificar las cepas más resistentes, y así diseñar los tratamientos a aplicar.

Fase de crecimiento

La fase de crecimiento también es un factor importante que influye en la inactivación microbiana. Así, durante la fase de división celular los microorganismos son más susceptibles a la electroporación (Wouters et al., 2001a). Por lo tanto, las células en la fase de crecimiento exponencial son más sensibles que las células en la fase de crecimiento estacionario. Estas diferencias parecen estar relacionadas con el mayor tamaño de las células durante la división del material genético (Álvarez et al., 2000).

Condiciones de cultivo y recuperación

Debido a su influencia en la fisiología microbiana, las condiciones de cultivo también pueden modificar la eficacia de los tratamientos de PEAV. La temperatura de crecimiento es una de las más estudiadas, aunque los resultados obtenidos son contradictorios. Algunos autores no han observado diferencias en la resistencia de las células crecidas a diferentes temperaturas (Álvarez et al., 2003b). Mientras, otros autores han detectado diferencias, aunque algunos han observado que los microorganismos crecidos a temperaturas bajas poseen menor resistencia frente a los PEAV (Álvarez, 2003c) y otros han observado todo lo contrario, un aumento de la misma (Cebrián, 2009). Finalmente, Ohshima et al. (2002) observaron un aumento de sensibilidad a los PEAV tanto por encima como por debajo de la temperatura óptima de crecimiento. Las diferencias encontradas en función de la temperatura de crecimiento, suelen ser explicadas en base a cambios en la composición lipídica de las membranas celulares, lo que afectaría a su fluidez, o en cualquier caso a las características de las mismas. Sin embargo, las divergencias en los resultados publicados podrían ser explicadas bien porque la fluidez de las membranas no poseyera gran importancia en la resistencia a los PEAV y estuvieran implicados otros factores, o porque a la temperatura a la que se aplicaron los tratamientos de PEAV en la gran mayoría de los estudios (temperatura ambiente) las diferencias en la fluidez de las membranas fueran pequeñas, incluso inexistentes, como ha sido observado recientemente por Cebrián (2009).

Uno de los factores más importantes para determinar la resistencia microbiana a un determinado agente inactivante es la cuantificación apropiada de los supervivientes. Las condiciones de recuperación como la temperatura, el tiempo de incubación o las características del medio pueden afectar notablemente a la supervivencia de los microorganismos. Estas condiciones son más importantes si cabe, debido a la presencia de daño subletal en la población microbiana tras el tratamiento de PEAV (Saldaña et al., 2009; Somolinos et al., 2007). Tras la aplicación de un tratamiento de PEAV, una parte de la población muere, otra sobrevive y algunas células sufren daños subletales lo que las hace especialmente sensibles a determinadas condiciones que las células no dañadas toleran (García et al., 2005b). Por lo tanto, si las condiciones de recuperación son óptimas (medio no selectivo), las células dañadas pueden reparar las lesiones, recuperarse y sobrevivir. Por el contrario, en condiciones desfavorables (medio selectivo), estas células dañadas mueren. La presencia de este daño subletal, abre un gran abanico de posibilidades a la hora de diseñar tratamientos combinados para aumentar la eficacia de los tratamientos (Somolinos et al., 2007).

III.3.2.1.2. Características del medio de tratamiento

De manera análoga a otras tecnologías de inactivación microbiana, la constitución del medio de tratamiento y sus características fisicoquímicas, como el pH, la actividad de agua o la conductividad eléctrica, se han revelado como factores clave que determinan la eficacia letal de los tratamientos de PEAV (Álvarez et al., 2006b; Wouters et al., 2001a).

Constitución del medio de tratamiento

La presencia de determinados componentes en el medio de tratamiento influye en gran medida en la eficacia letal de la tecnología de los PEAV. Por ejemplo, se ha descrito que la presencia de determinados compuestos incrementa en gran medida la inactivación microbiana, detectándose en algunos casos incluso efectos sinérgicos (Álvarez et al., 2006b). Por ello, el efecto combinado de los PEAV con diversas sustancias antimicrobianas, como la nisina o la lisozima, está sujeto a un profundo estudio en los últimos años (Gallo et al., 2007; Mosqueda-Melgar et al., 2008; Somolinos et al., 2007; Wu et al., 2005). Además, en el medio de tratamiento, no sólo puede haber sustancias que incrementan la letalidad del tratamiento de PEAV, sino también pueden estar presentes sustancias que ejercen cierto efecto protector sobre los microorganismos. Así, Hülshager et al. (1981) observaron un aumento de la resistencia de *Escherichia coli* en medios que contenían iones calcio o magnesio. Toko y Yamafuji (1981) dedujeron que este comportamiento era debido a que los cationes divalentes provocan cierto efecto estabilizador en las membranas celulares. Jaeger et al. (2009b) han observado recientemente un efecto protector de las proteínas de la leche, especialmente las caseínas micelares, en la inactivación mediante PEAV de *Lactobacillus rhamnosus*.

pH

El efecto del pH ha generado en la última década una importante controversia debido a que los resultados obtenidos son aparentemente contradictorios. Algunos autores han observado que los microorganismos son más sensibles a pH ácido (Álvarez et al., 2002; Aronsson et al., 2005; Wouters et al., 1999); otros han indicado una mayor sensibilidad a pH neutro (Álvarez et al., 2000; García et al., 2003); e incluso otros autores no han observado efecto del pH (Heinz y Knorr, 2000; Ravishankar et al., 2002).

García et al. (2005a) estudiaron la influencia del pH en la inactivación microbiana a los PEAV de 8 especies bacterianas, 6 Gram negativas y 2 Gram positivas. Mientras que a pH ácido aumentaba la resistencia de las Gram negativas y disminuía la de las Gram positivas, a pH neutro disminuía la resistencia de las Gram negativas y aumentaba la de las Gram positivas. Saldaña et al. (2009) constataron este comportamiento al estudiar la influencia del pH en 20 cepas distintas pertenecientes a 4 especies microbianas, 2 Gram positivas (*Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus*) y 2 Gram negativas (*Salmonella* Typhimurium y *Escherichia coli*). Por lo tanto, de manera general se puede concluir a partir de estos trabajos, que la flora Gram positiva es más resistente en medios de pH neutro y la flora Gram negativa en medios de pH ácido. Sin embargo, los mecanismos que explican este diferente comportamiento están todavía hoy por hoy por elucidar, si bien todo apunta a que la mayor resistencia de las bacterias Gram negativas en medios ácidos se debe a una gran capacidad de reparación de las células dañadas por los tratamientos de PEAV (García et al., 2005a).

Actividad de agua

La influencia de la actividad de agua del medio de tratamiento en la inactivación mediante PEAV ha sido también sometida a estudio. Se ha observado un aumento de la resistencia a los PEAV de diferentes bacterias y levaduras al disminuir la actividad de agua (Álvarez et al., 2000, 2002, 2003b). Cuando las células se encuentran en un medio de baja actividad de agua, se produce una salida de agua del interior de los microorganismos al exterior. Esa reducción de volumen y, por tanto de tamaño, puede explicar en gran parte ese aumento de la resistencia observada. Además, este fenómeno produce probablemente un estrechamiento de la membrana citoplasmática, seguido de una disminución de la permeabilidad y de la fluidez de la misma, lo que aumentaría también la resistencia de la célula a los PEAV (Álvarez et al., 2000). Es necesario puntualizar que el soluto o solutos implicados en la reducción de la actividad de agua pueden afectar a la resistencia microbiana, enmascarando los efectos debidos a la reducción de la actividad de agua. Álvarez (2003c) observó que una concentración de glicerol en el medio de tratamiento del 10% p/v, aumentaba la sensibilidad microbiana a los PEAV, a pesar de la disminución de la actividad de agua (0,93).

Conductividad eléctrica

La influencia de la conductividad eléctrica del medio de tratamiento en la inactivación microbiana por PEAV ha sido investigada por diversos autores (Álvarez et al., 2000, 2002, 2003b; Vega-Mercado et al., 1996a; Wouters et al., 1999, 2001a). La mayoría de los estudios concluyen que la conductividad eléctrica ejerce cierta influencia en la eficacia letal del tratamiento de PEAV. Lo que está por dilucidar es si es debido a que afecta a los parámetros físicos del tratamiento de PEAV, si es que ejerce cierto efecto sobre las membranas celulares, o si es debido a ambos efectos. En el caso de la aplicación de pulsos eléctricos de caída exponencial, la conductividad eléctrica del medio determina la forma del pulso y su duración. Wouters et al. (2001a) determinaron que para obtener el mismo nivel de inactivación en *Lactobacillus plantarum*, la energía necesaria es mayor si la conductividad es 16 mS/cm, que si es 4 mS/cm. Esto puede explicarse debido a la relación existente entre la resistencia del medio, el voltaje y la intensidad de corriente. Cuanto mayor es la conductividad del medio de tratamiento, menor es la resistencia, y por tanto, mayor es la intensidad de corriente necesaria para aplicar el mismo voltaje, y por ende, la energía aplicada también es mayor. Por lo tanto, la conductividad eléctrica es un parámetro cuyo efecto es difícil de determinar, porque no es posible analizarlo en iguales condiciones de tratamiento (intensidad del campo eléctrico, energía específica y tiempo de tratamiento). Álvarez (2003c) observó que tras la aplicación de tratamientos de PEAV de onda cuadrada de condiciones controladas de intensidad del campo eléctrico y tiempo de tratamiento, la conductividad en un rango de 1 a 4 mS/cm no influía en la eficacia de los tratamientos. Desde un punto de vista práctico, los productos con una elevada conductividad como los zumos de hortalizas, son menos adecuados para los tratamientos de PEAV, que los productos con una baja conductividad, como los zumos de frutas.

III.3.2.1.3. Condiciones de tratamiento

La intensidad del campo eléctrico, el tiempo de tratamiento, la energía total y la temperatura son factores importantes a tener en cuenta en la inactivación microbiana por PEAV.

Intensidad del campo eléctrico

La intensidad del campo eléctrico es uno de los principales parámetros que influyen en la inactivación microbiana por PEAV. Por encima de un valor umbral, denominado campo eléctrico crítico, la inactivación microbiana aumenta al hacerlo la intensidad del campo eléctrico (Wouters et al., 2001a) (Figura III.6). Este campo eléctrico crítico suele estar comprendido entre 2-14 kV/cm. Por encima de ese campo eléctrico crítico y para un tiempo de tratamiento o nivel energético constante, algunos autores han observado que la inactivación microbiana aumenta exponencialmente al aumentar la intensidad del campo eléctrico aplicado. Sin embargo, otros autores han observado que tratamientos por encima de un determinado valor del campo eléctrico, no producen un aumento significativo en la inactivación microbiana (Álvarez et al., 2003d; Wouters et al., 1999).

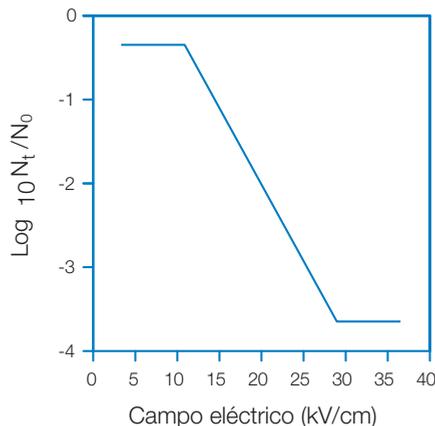
La distribución de la intensidad del campo eléctrico en la zona de tratamiento es otro factor que debe ser tomado en consideración. Ésta, a día de hoy, es posible determinarla mediante diversas aplicaciones informáticas basadas en la simulación numérica. Si ésta no se conoce con exactitud, parte de la población microbiana puede no recibir el tratamiento deseado, lo que origina problemas en la interpretación de los resultados (Donsi et al., 2007) e incluso, en el caso de la aplicación industrial, problemas sanitarios importantes (Puértolas et al., 2008a).

Tiempo de tratamiento

En el caso de la tecnología de los PEAV, el tiempo de tratamiento se define como el tiempo efectivo en el que los microorganismos están sometidos a la acción del campo eléctrico. Éste, junto con la intensidad del campo eléctrico, son los principales parámetros del tratamiento. Existen dos formas de incrementar el tiempo de tratamiento, aumentar el número de pulsos o su anchura. En un principio, cuanto más largo es el tratamiento, mayor porcentaje de células se permeabilizan y por ende, mayor inactivación se consigue (Wouters et al., 2001b).

■ FIGURA III.6

Influencia teórica de la intensidad del campo eléctrico en la inactivación microbiana por PEAV



Energía aplicada

Se ha observado que la inactivación microbiana aumenta con la energía aplicada (Heinz et al., 1999; Sato et al., 2001). Desde un punto de vista práctico, es interesante establecer la combinación de voltaje y anchura de pulso que permita obtener la máxima inactivación con el menor consumo energético. Schoenbach et al. (1997) observaron que para conseguir la misma inactivación microbiana en *Escherichia coli* era necesaria menor energía cuanto mayor era la intensidad del campo eléctrico y menor la anchura del pulso. Resultados similares sobre la inactivación de células vegetativas de *Bacillus subtilis* fueron obtenidos por Heinz et al. (1999) y por Heinz y Knorr (2000). Al igual que la intensidad del campo eléctrico y el tiempo de tratamiento, la energía específica también determina el grado de permeabilización de la membrana. El número de células permeabilizadas de *Lactobacillus plantarum* aumentó, a distintas intensidades del campo eléctrico, cuando se aplicaban mayores niveles energéticos (Wouters et al., 2001b).

Algunos autores han propuesto, junto con la intensidad del campo eléctrico, el uso de la energía específica aplicada en lugar del tiempo de tratamiento, como parámetros de control del proceso (Heinz et al., 1999; Heinz et al., 2001). Cuando la energía se utiliza con este propósito, es necesario calcularla integrando el área bajo la curva que define el pulso aplicado. Distintas razones justifican que el empleo de la energía sea más adecuado que el uso del tiempo de tratamiento, especialmente cuando se trabaja con pulsos de caída exponencial en los que la definición del tiempo de tratamiento no está clara. Por una parte, los PEAV provocan un calentamiento del medio de tratamiento que aumenta su temperatura y, en consecuencia, su conductividad. Este incremento de la conductividad produce la disminución de la intensidad del campo eléctrico obtenido en la cámara de tratamiento, pero sobre todo de la anchura del pulso y, por tanto, del tiempo efectivo de tratamiento. Por otra parte, la energía aplicada es un parámetro que incluye otros factores como la conductividad del medio, la anchura del pulso, el volumen de muestra tratada y la resistencia de la cámara de tratamiento, por lo que podría ser un parámetro más adecuado para comparar resultados obtenidos en distintas condiciones experimentales e instalaciones.

Temperatura

El último de los parámetros de tratamiento a considerar es la temperatura. Los PEAV son considerados tradicionalmente como una tecnología no térmica de procesado ya que son capaces de inactivar microorganismos sin provocar un aumento sustancial de la temperatura del medio. Sin embargo, se ha comprobado que el efecto letal de los PEAV aumenta al hacerlo la temperatura de tratamiento. Este efecto se ha observado tanto a temperaturas no letales (Cebrián, 2009; Smith et al., 2002) como a temperaturas letales (Sepulveda et al., 2005; Vega-Mercado et al., 1996b; Wouters et al., 1999). Este aumento del efecto letal podría ser debido a que al aumentar la temperatura, la membrana pasa a un estado sólido-cristalino, lo que favorecería la formación de poros (Ho y Mittal, 1996). Sin embargo éste es un aspecto que no está totalmente demostrado.

Desde un punto de vista práctico, el incremento de la temperatura que provocan los tratamientos por PEAV puede resultar beneficioso, siempre que no se alcancen temperaturas que alteren las propiedades del alimento. Este calentamiento podría permitir reducir la intensidad del tratamiento o aumentar el grado de inactivación conseguido para un mismo tratamiento.

III.3.3. INACTIVACIÓN ENZIMÁTICA EN ALIMENTOS LÍQUIDOS

Además de la inactivación microbiana, la reducción de la actividad enzimática es crítica en el procesado de los alimentos. Sin embargo, los estudios sobre la inactivación de enzimas de interés en la industria alimentaria mediante los PEAV son menos numerosos que los realizados sobre la inactivación microbiana. Por otra parte, los estudios realizados por distintos grupos de investigación arrojan resultados contradictorios y, por lo tanto, inconsistentes. De hecho, se han observado efectos de inactivación enzimática, de activación o ausencia de efecto (de Luis et al., 2009; Elez-Martínez et al., 2007a; Mañas y Vercet, 2006; Vega-Mercado et al., 2001).

En condiciones en las que se ha realizado un control adecuado de la temperatura y ésta no ha superado los 35°C, apenas se ha observado disminución de la actividad de algunas enzimas como la polifenoloxidasa, la pectinmetilesterasa, la fosfatasa alcalina o la lactoperoxidasa (de Luis et al., 2009; van Loey et al., 2001). En cambio, otros autores han obtenido niveles de inactivación de esas mismas enzimas de más del 80% (Elez-Martínez et al., 2007b; Marsellés-Fontanet y Martín-Belloso, 2007). Se ha concluido que estas diferencias entre las distintas publicaciones son debidas posiblemente al aumento de temperatura provocado por el tratamiento de PEAV en algunas instalaciones. Debido a las particulares distribuciones del campo eléctrico y del flujo del alimento a través de las cámaras de diseño colineal, se pueden producir ciertos aumentos puntuales de la temperatura ("hot spots"), difícilmente detectables sin herramientas de simulación numérica y que apenas modifican la temperatura final del producto (Gerlach et al., 2008). Estos "hot spots" podrían ser los causantes de las inactivaciones elevadas encontradas en algunas enzimas y en algunas instalaciones. Recientemente, Jaeger et al. (2009a) han demostrado la relación existente entre la presencia de esos picos de temperatura en las cámaras de tratamiento colineales y la pérdida de actividad enzimática de la fosfatasa alcalina. Sin embargo, esos aumentos de temperatura no dan respuesta por sí solos al aumento de inactivación observado por los diferentes autores. De hecho, parece ser que los PEAV y la temperatura poseen cierto efecto sinérgico. Schilling et al. (2008b) observaron una inactivación total de las enzimas peroxidasa y polifenoloxidasa en zumo de manzana a escala de laboratorio, tras la aplicación combinada de temperatura (60°C) y un tratamiento de PEAV (35 kV/cm, 65,5 kJ/kg). Por todo ello, es necesario profundizar en el mecanismo de acción de los PEAV sobre las enzimas y del posible efecto combinado del calor y los PEAV.

III.3.4. MEJORA DE LOS PROCESOS DE TRANSFERENCIA DE MASA

Muchas operaciones en la industria alimentaria, como los procesos extractivos o la deshidratación, requieren la aplicación de tratamientos térmicos, enzimáticos, o incluso del uso de fuerzas mecánicas para provocar la desintegración celular y facilitar la transferencia de masa (Aguilera, 2003). Los elevados costes energéticos junto con los efectos negativos sobre las características organolépticas y nutritivas del alimento de algunas de estas técnicas, han provocado la búsqueda, por parte del sector industrial, de nuevas tecnologías menos agresivas con el producto y que permitan reducir los costes de producción (López et al., 2008c). Una de las técnicas con mayor proyección son los PEAV.

Al contrario que en las aplicaciones que buscan la inactivación microbiana, los tratamientos necesarios para esta aplicación son mucho menos intensos, utilizándose en general campos eléctricos inferiores a 10 kV/cm. Estos tratamientos apenas generan calentamiento

del producto, son poco costosos energéticamente y, además, utilizando los equipos de PEAV actuales, hacen posible el tratamiento de grandes flujos de producto. A pesar de ello, la mayoría de los estudios realizados hasta la fecha se han llevado a cabo a escala de laboratorio, utilizando cámaras estáticas muy alejadas de los requerimientos industriales (Puértolas et al., 2008a). Por ello, una vez demostrada la viabilidad de la tecnología, la generalización en la industria alimentaria de los PEAV para favorecer los fenómenos de transferencia de masa exige el desarrollo de equipos de tratamiento continuo, más próximos a las necesidades industriales.

Debido a que la transferencia de masa es un proceso habitual en la industria alimentaria, las posibles aplicaciones concretas de la tecnología de los PEAV son múltiples y variadas. Por ello, es necesario su estudio individualizado para conocer en profundidad las posibles ventajas de la tecnología frente a los procesos tradicionales.

III.3.4.1. Extracción de componentes intracelulares

Muchos componentes de interés para la industria alimentaria, como colorantes o determinadas sustancias con efectos beneficiosos para la salud, se encuentran en el interior de células vegetales. La separación de estos componentes mediante el uso de disolventes específicos (medio de extracción) se conoce con el nombre de lixiviación o extracción sólido-líquido (Aguilera, 2003). En este tipo de procesos, las membranas celulares dificultan enormemente el paso de los componentes de interés al medio de extracción. Por ello, es normal emplear diversas técnicas, principalmente calor o prensado, para mejorar la transferencia de masa y acelerar el proceso. Una de estas técnicas podría ser la aplicación de PEAV debido a que su mecanismo de acción, la electroporación de las membranas celulares, podría acelerar e incluso mejorar la extracción de estas sustancias de interés (Puértolas et al., 2008b). Así, desde los primeros experimentos en los años 90, diversos estudios han comprobado que es posible mejorar los fenómenos de difusión de los componentes intracelulares mediante la aplicación de un tratamiento de PEAV (Fincan et al., 2004; Knorr et al., 1994).

Algunos procesos en los que se ha investigado la influencia de un pretratamiento de PEAV son la extracción de azúcar de remolacha, la obtención de colorantes naturales y la extracción de determinadas sustancias con efectos positivos en la salud humana.

III.3.4.2. Obtención de zumos de frutas y hortalizas

La desintegración del material celular es una etapa clave en la extracción de zumos de frutas y hortalizas (Bazhal y Vorobiev, 2000). En la industria alimentaria, son muchas las operaciones que se realizan con tal fin, como la aplicación de presión, la rotura mecánica de la matriz vegetal, la aplicación de tratamientos térmicos o incluso el uso de preparados enzimáticos. Una de las operaciones más utilizadas es la presurización de la matriz vegetal. Ésta provoca la rotura de las células facilitando la extracción de la fase líquida contenida en su interior (Bouzzara y Vorobiev, 2001). En ocasiones, para mejorar el rendimiento de este proceso, previamente al prensado la matriz vegetal se somete a un calentamiento o a un tratamiento enzimático. Todas estas técnicas o bien necesitan gran cantidad de energía, bien sea térmica o mecánica, o, como en el caso de los preparados enzimáticos, tiempos largos de aplicación (Toepfl et al., 2006). Además, estas operaciones pueden tener efectos

negativos, sobre todo relacionados con la pureza y la calidad del zumo extraído. Así, durante la obtención del zumo, se debe extraer la mayor cantidad posible de líquido intracelular y reducir al máximo la extracción de partículas sólidas y de otros componentes que contribuyen al amargor y al oscurecimiento de los zumos (López, 2008b).

La influencia de un tratamiento de PEAV en el rendimiento del proceso de extracción de zumo de zanahoria, uva y manzana mediante presión ha sido investigada por distintos autores (Bouzrara y Vorobiev, 2003; Knorr et al., 1994; Praporscic et al., 2007a, 2007b; Schilling et al., 2008a). Todos los resultados publicados indican que el pretratamiento por PEAV podría ser una alternativa ventajosa al tratamiento térmico o enzimático para mejorar el rendimiento del proceso de obtención de zumos de frutas mediante prensado, o, en cualquier caso, mejorar la calidad del extracto obtenido.

III.3.4.3. Extracción de aceites de origen vegetal

Al igual que en el caso de los zumos, la desintegración del material celular es una de las etapas claves en la extracción del aceite de semillas. Generalmente, el proceso de extracción implica el uso de presión, bien sea con prensas o centrifugadoras, y temperatura (Xu y Diosady, 2003). Si el tratamiento es demasiado intenso, el rendimiento aumenta pero la calidad del extracto baja y viceversa. El uso de nuevas tecnologías menos agresivas con la matriz vegetal que permitan mejorar la calidad del extracto y/o aumentar el rendimiento, como el uso de enzimas de maceración o de CO₂ supercrítico, está recibiendo actualmente una gran atención (Toepfl et al., 2006; Xu y Diosady, 2003).

Recientemente, se ha considerado la aplicación de los PEAV para mejorar la extracción del aceite de maíz, de oliva y de colza. Guderjan et al. (2005) estudiaron la influencia de un pretratamiento de 3 kV/cm y 120 pulsos en la extracción posterior del aceite de maíz mediante presión, CO₂ supercrítico o el uso de hexano. Gracias al tratamiento de PEAV, el rendimiento de extracción aumentó respectivamente un 25,2, un 14,9 y un 27,8%, en función del tipo de extracción posterior. Además de incrementar el rendimiento, los aceites obtenidos poseían una concentración de fitoesteroles hasta un 32,4% mayor que en los controles. En este mismo estudio, mediante un tratamiento de PEAV de 1,3 kV/cm y 100 pulsos, se incrementó el rendimiento de extracción del aceite de oliva en un 7,4%. En otro trabajo posterior del mismo grupo de investigación, se obtuvo un aumento del rendimiento en la extracción de aceite de colza de un 55%, tras la aplicación de un tratamiento de PEAV de 7 kV/cm y 120 pulsos (Guderjan et al., 2007). Asimismo, como ocurría en el aceite de maíz, mediante los PEAV se obtuvieron aceites de colza con mayor concentración de fitoesteroles, y además con una mayor cantidad de antioxidantes, polifenoles y tocoferoles.

III.3.4.4. Deshidratación

El proceso de deshidratación tiene como objetivo la eliminación del agua contenida en los alimentos, mayoritariamente por evaporación mediante una corriente de aire caliente. Con ello, se busca básicamente prolongar la vida útil de los alimentos al reducir su actividad de agua.

Los esfuerzos continuos de las industrias productoras de alimentos deshidratados se han centrado en aumentar la velocidad de deshidratación, reducir el elevado coste energé-

tico del proceso (4-6 MJ/kg) y minimizar la degradación de nutrientes y de las propiedades sensoriales del producto debidas a la aplicación del calor (Ade-Omowaye et al., 2001). Uno de los procesos surgidos de este interés es la deshidratación osmótica (Rastogi et al., 2002). Ésta consiste en introducir el alimento en una solución hipertónica de un determinado soluto. Como consecuencia, se produce una salida de agua del alimento a la solución y una difusión del soluto hacia el alimento. Este proceso está recibiendo cada vez más atención por parte de la industria, debido a su potencial uso en la deshidratación para mejorar la calidad de los productos y reducir el consumo energético (Nieto et al., 1998). Generalmente, la deshidratación osmótica es un proceso lento por lo que sería deseable mejorar las transferencias de masa que se producen durante el mismo proceso, sin afectar negativamente a la calidad del producto final.

Diferentes estudios han demostrado que la modificación de la permeabilidad de las células inducida por un tratamiento previo de PEAV ejerce efectos positivos tanto en la deshidratación tradicional como en la deshidratación osmótica. Así, se ha observado una reducción de entre un 20 y un 30% en el tiempo de deshidratación tradicional de distintos productos vegetales, como la patata o el pimiento, sin superar en ningún caso los 60°C (Ade-Omowaye et al., 2003a; Knorr y Angersbach, 1998). En el caso de la deshidratación osmótica, se ha investigado el efecto de un pretratamiento de PEAV en el procesado de diferentes vegetales como la zanahoria, la manzana o el pimiento (Ade-Omowaye et al., 2003b, 2003c; Amami et al., 2006; Rastogi et al., 1999). En general, se observa que en las muestras pretratadas se produce una salida de agua entre un 10 y un 30% superior a la que se obtiene con las muestras sin tratar, así como un aumento en la velocidad de deshidratación. Sin embargo, no se observa en general una variación apreciable en la cantidad de solutos que se incorporan a la matriz sólida.

III.3.4.5. Curado y marinado de carnes y pescados

La permeabilización de células de origen animal mediante un tratamiento de PEAV podría mejorar aquellos procesos en los que se requiere la incorporación y difusión de determinadas sustancias en el alimento, como el curado o el marinado de carnes y pescados (Toepfl et al., 2005b, 2007c). A diferencia de otras aplicaciones de los PEAV, el curado y marinado exige el tratamiento de estructuras sólidas de tamaño considerable como son las piezas de carne o de pescado. Hafsteinsson et al. (2000) estudiaron la ganancia de peso de filetes de bacalao durante el marinado, tras la aplicación de tratamientos de PEAV de 3 kV/cm y un número de pulsos variable. Estos autores observaron que mientras la ganancia de peso en el control fue de aproximadamente un 17%, al aplicar un tratamiento de PEAV de 100, 200 y 300 pulsos, ésta fue aproximadamente de un 19, un 20 y un 22%, respectivamente. Además, constataron un aumento de la transferencia de salmuera al pescado en las muestras tratadas.

III.4. Análisis económico del uso de los PEAV

Cuando la investigación de la aplicación de una nueva tecnología arroja buenos resultados, es necesario preguntarse si es realmente posible su aplicación en la industria alimentaria. Ante ello, son múltiples las cuestiones a abordar, como la aceptación de la tecnología por el consumidor, si el producto final posee la calidad suficiente o, la más importante desde el punto

de vista de su aplicabilidad real, cuál es la inversión inicial y el coste económico del proceso. Cualquier cálculo económico del desarrollo de una tecnología en la industria es sumamente complicado. Ello se debe fundamentalmente a que depende de las condiciones locales (coste de agua, luz, mano de obra, ingredientes, etc.) y que el coste de la inversión inicial, una vez que la tecnología comienza a aplicarse, cae vertiginosamente debido al desarrollo industrial de la propia tecnología (Toepfl, 2007d). Todo esto implica que cualquier cálculo que se realice es una estimación somera que puede quedarse desfasada en poco tiempo.

Como ya ha quedado claro en los apartados anteriores, las dos aplicaciones más importantes de los PEAV, la inactivación microbiana y la transferencia de masa, poseen costes energéticos bien diferentes. Así, para conseguir un nivel de inactivación suficiente que garantice la seguridad microbiológica de los alimentos, se requieren intensidades del campo eléctrico superiores a los 25 kV/cm, lo que encarece considerablemente los equipos y aumenta el gasto energético (Toepfl et al., 2006). En cambio, debido a que las células eucariotas tienen un mayor tamaño que las procariotas, la mejora de la transferencia de masa por PEAV requiere la aplicación de campos eléctricos inferiores a los 10 kV/cm, por lo que tanto el coste de los equipos como los requerimientos energéticos del proceso son mucho menores.

En la Tabla III.2 se comparan las características y los costes generales estimados de un equipo para la pasteurización de los alimentos, con las características y los costes de un equipo destinado a la permeabilización de las membranas celulares con objeto de mejorar la transferencia de masa (Loeffler, 2006; Toepfl et al., 2006).

III.4.1. ANÁLISIS DE COSTES: INACTIVACIÓN MICROBIANA

Como muestra la Tabla III.2, la pasteurización de alimentos líquidos mediante PEAV requiere la aplicación de campos eléctricos mucho más elevados que los necesarios para la transferencia de masa (25-35 kV/cm). Dependiendo del tipo de producto, de la geometría de la cámara de tratamiento y de los parámetros del proceso, la energía específica necesaria para obtener resultados positivos podría variar entre 50 y 700 kJ/kg.

■ TABLA III.2

Características y costes generales estimados del procesado mediante PEAV para la pasteurización de alimentos y para la permeabilización de las membranas celulares con objeto de mejorar la transferencia de masa. Adaptado de Toepfl et al. (2006)

	Pasteurización	Permeabilización
Requerimientos		
Campo eléctrico (kV/cm)	25-35	1-5
Flujo (ton/h)	10	10
Energía (kJ/kg)	50-700	10-20
Costes		
Equipo (€)	4.000.000-5.800.000	75.000-150.000
Procesado (€/ton)	1,4-19,4	0,33-1

En el mejor de los casos (energía específica de 50 kJ/kg), el consumo eléctrico se sitúa en torno a 13 kWh por tonelada de producto, lo que supone un coste económico de 1,4 € por

tonelada procesada (Heinz et al., 2003, Toepfl et al., 2006). En el caso de que el tratamiento requerido llegara a los 700 kJ/kg, el coste económico por tonelada de producto alcanzaría los 19,4 € (Evrendilek y Zhang, 2005, Toepfl et al., 2006). Teniendo en cuenta los sistemas de recuperación de energía, un tratamiento de pasteurización térmica de 85°C y 30 s, tiene un coste energético aproximado de 20 kJ/kg. Por lo tanto, los tratamientos de PEAV para la pasteurización microbiana requieren hasta 35 veces más energía que los tratamientos térmicos habituales, por lo que su coste económico también es mucho mayor. Además, la aplicación de campos eléctricos tan elevados, de 25 a 35 kV/cm, puede provocar aumentos de la temperatura del producto y fenómenos de ruptura dieléctrica (Puértolas et al., 2008a). Para evitar estos problemas a nivel industrial, sería necesario el uso de sistemas de refrigeración por lo que el coste energético y económico podría ser todavía mayor.

A los gastos energéticos del proceso, es necesario sumar la inversión inicial, derivada de la compra del equipo de PEAV. Debido a los elevados requerimientos energéticos, ésta podría alcanzar los 5,8 millones de euros (Toepfl et al., 2006). Estas estimaciones son similares a las obtenidas previamente por Braakman (2003), el cual publicó que los costes de los equipos de pasteurización mediante PEAV a nivel industrial podrían situarse entre los 2 y los 4 millones de euros, en función de su capacidad (5-10 ton/h).

El excesivo coste de los tratamientos de pasteurización mediante PEAV, especialmente si se requieren tratamientos muy intensos, es la principal razón que podría frenar el empleo en el futuro de esta tecnología en la industria alimentaria. La aplicación de los PEAV únicamente cobraría sentido si se demostrara fehacientemente que los productos tratados son de una calidad muy superior a los tratados térmicamente, y si el consumidor estuviera dispuesto a pagar ese plus de calidad.

III.4.2. ANÁLISIS DE COSTES: TRANSFERENCIA DE MASA

Cuando se realizan estudios sobre la viabilidad económica de la aplicación de nuevos tratamientos en la industria alimentaria, es necesario comparar los costes con los tratamientos habituales. Uno de los pocos estudios económicos del uso de los PEAV en la transferencia de masa, fue realizado por Toepfl et al. (2006). En él, los autores compararon el uso de los PEAV para la extracción de zumo de frutas con el uso de enzimas de maceración. Concluyeron que para procesar 10 toneladas/hora con un tratamiento de 1-2 kV/cm y 10 kJ/kg, el consumo eléctrico aproximado sería de alrededor de 3 kWh por tonelada de producto. Asumiendo un precio del kWh de 10 céntimos de euro, situaron el coste de electricidad para el tratamiento de PEAV en aproximadamente 0,3 € por tonelada. Considerando un 10% más de gastos indirectos, el consumo total podría encontrarse según los autores en alrededor de 0,33 €/ton. Por el contrario, el coste de una maceración enzimática para el mismo objetivo fue estimada en torno a los 7,5 €/ton.

La gran diferencia entre los costes de producción, alrededor de 7,2 €/ton, permitiría amortizar rápidamente los 75.000-150.000 € que se estima que costaría el equipo de PEAV necesario. Además de ser económicamente más rentable la aplicación de los PEAV que el uso de enzimas, los PEAV permitirían obtener zumos de mayor calidad, así como reducir el tiempo de procesado enormemente.

Basándonos en los datos publicados en la literatura para otras aplicaciones concretas, como el secado o la extracción de compuestos intracelulares de interés, podrían ser sufi-

cientos tratamientos inferiores a los 5 kV/cm y 20 kJ/kg, por lo que los costes del proceso podrían ser verdaderamente reducidos, e incluso inferiores a 1 €/ton. Esto, junto al relativo bajo coste inicial de inversión en el equipo (Tabla III.2), hace que el uso de los PEAV para la transferencia de masa pueda ser verdaderamente rentable ya en la actualidad, para cualquiera de sus aplicaciones.

IV. Inactivación de microorganismos alterantes del vino mediante pulsos eléctricos de alto voltaje

IV.1. Introducción y objetivos

En la industria enológica, uno de los problemas que produce mayores pérdidas económicas es el deterioro del vino debido al desarrollo de microorganismos alterantes. Estos microorganismos forman parte de la microbiota natural de la uva, pudiendo contaminar tanto el vino como todas aquellas superficies que contactan con la uva o el vino en el interior de la bodega, como los depósitos de fermentación, las conducciones o las barricas de envejecimiento (Couto et al., 2005).

Por otro lado, en los últimos años, se ha realizado un esfuerzo muy importante en la caracterización y desarrollo de cultivos iniciadores de levaduras para su utilización en la elaboración del vino (Esteve-Zarzoso et al., 2000). Su empleo tiene como objetivo asegurar la reproducibilidad de la fermentación, así como la calidad y homogeneidad del producto final. La inhibición o disminución de la actividad de las levaduras y bacterias salvajes presentes en el mosto previamente a su fermentación, sin afectar a sus propiedades sensoriales, podría facilitar la acción de los cultivos iniciadores y conseguir fermentaciones más reproducibles.

La estrategia de control microbiano más extendida en las bodegas es la adición de anhídrido sulfuroso (SO_2). Sin embargo, debido a los problemas derivados de su uso, como la toxicidad en personas especialmente sensibles a este compuesto, y a que no siempre se muestra eficaz para controlar el desarrollo de microorganismos alterantes, se están investigando diversas estrategias para sustituirlo o cuando menos reducir las concentraciones a las que se utiliza. La aplicación de los PEAV tanto al mosto previamente a la fermentación, como al vino propiamente una vez concluida la misma, podría ser una alternativa eficaz al uso del anhídrido sulfuroso.

La evaluación de la capacidad de los PEAV para inactivar levaduras y bacterias de interés enológico con objeto de eliminar o cuando menos reducir la flora alterante presente en el mosto y el vino, permitiendo una fermentación más reproducible y disminuyendo el riesgo de alteración microbiana, requirió la consecución de los siguientes objetivos parciales:

- Describir matemáticamente la resistencia a los PEAV de las principales bacterias y levaduras alterantes del mosto y del vino.
- Identificar las especies microbianas más resistentes a los tratamientos de PEAV, tanto en mosto como en vino.
- Establecer las condiciones de tratamiento necesarias (intensidad del campo eléctrico y energía específica) para conseguir los objetivos planteados.

IV.2. Material y métodos

IV.2.1. MICROORGANISMOS

Para esta parte de la Tesis Doctoral, se utilizaron cepas de las siguientes especies microbianas alterantes suministradas por la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT, Burjasot, España): *Dekkera anomala* (CECT 1008), *Dekkera bruxellensis* (CECT 11045), *Lactobacillus plantarum* (CECT 220) y *Lactobacillus hilgardii* (CECT 4786). Con objeto de comparar su resistencia con la de los microorganismos habitualmente utilizados como cultivos iniciadores en la industria vinícola, se trabajó también con *Saccharomyces bayanus* (CECT 1969). Todas las cepas fueron conservadas durante la investigación en crioviales (Maintenance Freeze Medium

064-TA0124, Scharlau Chemie, Sentmenat, España) a -80°C (Ultra Low Temperature Freezer MDF-U32865, SANYO Electric, Osaka, Japón).

IV.2.2. MEDIOS DE CULTIVO Y TRATAMIENTO

Todos los medios de cultivo utilizados fueron suministrados por la firma Biolife (Milán, Italia) y se prepararon siguiendo las instrucciones del fabricante. Éstos, una vez preparados, se esterilizaron durante 20 minutos a 120°C en autoclave (Certoclav CV 2000/I, Traun, Suiza) y se almacenaron a 4°C hasta su posterior uso.

Como medios de tratamiento para los estudios de resistencia frente a los PEAV, se utilizó mosto de uva tinta (Grepj, Vitoria, España) y vino tinto comercial (Monasterio de las Viñas 2005, Grandes Vinos y Viñedos, Cariñena, España), cuyas principales características se muestran en la Tabla IV.1.

■ TABLA IV.1

Principales características químicas de los medios de tratamiento utilizados

Medio de Tratamiento	Conductividad eléctrica (mS/cm)	pH	Contenido de azúcares (g/L)	Grado alcohólico (% v/v)
Mosto uva tinta	$1,97 \pm 0,23$	$3,17 \pm 0,1$	$165 \pm 2,5$	–
Vino tinto	$2,02 \pm 0,22$	$3,34 \pm 0,1$	$1,2 \pm 0,1$	13

IV.2.3. SUSPENSIONES Y CURVAS DE CRECIMIENTO

En la Tabla IV.2 se resumen los diferentes medios, temperaturas y tiempos de cultivo utilizados para cada uno de los microorganismos investigados. Todos los cultivos fueron suministrados en forma de liofilizado. Tras la revitalización se sembraron placas de agar por agotamiento en estría. A partir de colonias aisladas, se inocularon los correspondientes crioviales. A partir de ellos, se sembraron semanalmente placas de agar por agotamiento en estría durante todo el periodo de realización de la investigación, con objeto de disponer de cultivo fresco.

Para la obtención de las suspensiones, a partir de una colonia aislada de las placas almacenadas se sembraron frascos con 10 mL de caldo estéril. Estos precultivos, se incubaron en estufa (Hotcold UL, Selecta, Abrera, España) en agitación (agitador Vibramax 100, Heidolph Instruments, Acwabach, Alemania). Tras determinar la concentración celular de los precultivos mediante recuento microscópico (microscopio L-Kc, Nikkon, Tokio, Japón) en cámara de Thoma (ServiQuímica, Constantí, España), se inocularon, con una concentración inicial de 10^4 microorganismos/mL en el caso de las levaduras y de 10^6 microorganismos/mL en el caso de las bacterias, frascos con 50 mL de medio estéril y atemperado a la temperatura de incubación. El tiempo de incubación necesario para que las suspensiones alcanzaran la fase de crecimiento estacionario se estableció a partir de las curvas de crecimiento (Figura IV.1).

■ TABLA IV.2

Medios, temperaturas y tiempos de cultivo de las distintas etapas de preparación de las suspensiones microbianas

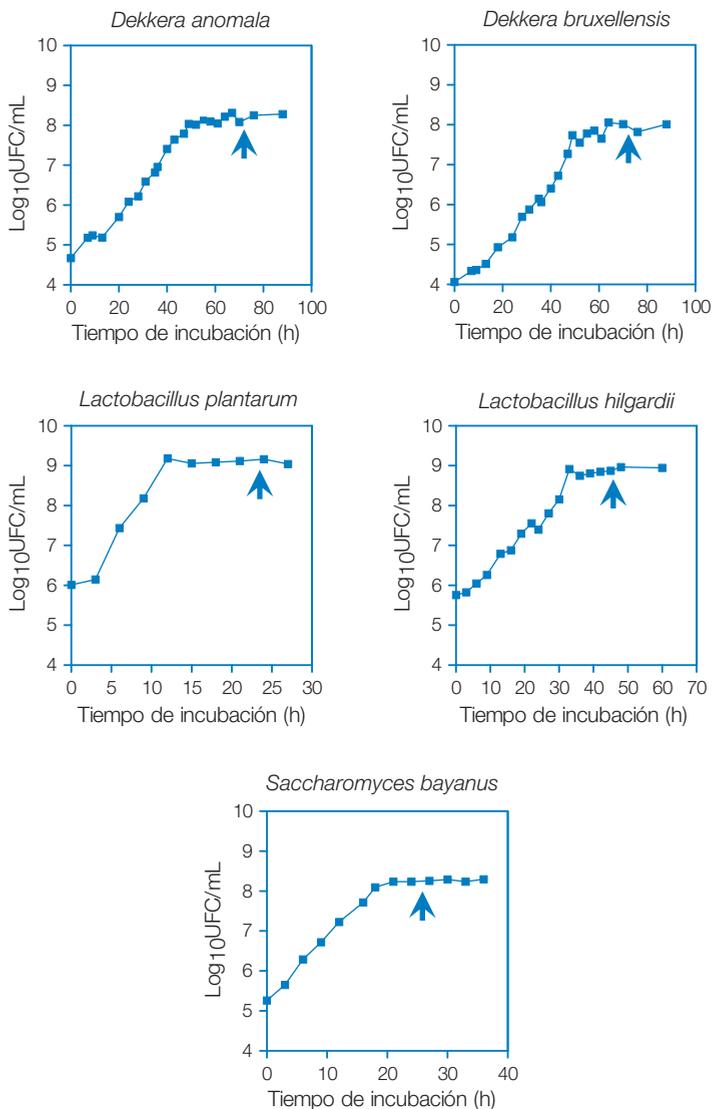
Microorganismo	Revitalización	Aislamiento	Precultivo	Cultivo
<i>D. anomala</i>	CS 25°C; 4 días	PDA 25°C; 4 días	CS 25°C; 24 h	CS 25°C; 72 h
<i>D. bruxellensis</i>	CS 25°C; 4 días	PDA 25°C; 4 días	CS 25°C; 24 h	CS 25°C; 72 h
<i>L. plantarum</i>	Caldo MRS 37°C; 24 h	Agar MRS 37°C; 24 h	Caldo MRS pH 6,2 37°C; 12 h	Caldo MRS pH 6,2 37°C; 24 h
<i>L. hilgardii</i>	Caldo MRS 30°C; 24 h	Agar MRS 30°C; 36 h	Caldo MRS 30°C; 24 h	Caldo MRS 30°C; 36 h
<i>S. bayanus</i>	CS 25°C; 24h	PDA 25°C; 48 h	CS 25°C; 12 h	CS 25°C; 36 h

CS: Caldo Sabouraud. PDA: Patata Dextrosa Agar. Caldo MRS: Caldo Mann Rogosa Sharpe Agar. MRS: Agar Mann Rogosa Sharpe.

Para elaborar las curvas de crecimiento, se tomaban, a intervalos predeterminados de tiempo, 0,1 mL de muestra a partir de los frascos de 50 mL en incubación. Tras realizar las correspondientes diluciones decimales en caldo estéril, se sembraban por duplicado placas de agar por homogeneización en masa. Los caldos y temperaturas de incubación, así como los medios, tiempos y temperaturas de recuperación utilizados fueron los mismos que los indicados en la Tabla IV.2. Las curvas de crecimiento se elaboraron representando el logaritmo del número de unidades formadoras de colonias (UFC) por mL frente al tiempo de incubación en horas (Figura IV.1). Para el recuento microbiano se utilizó un contador automático de colonias (Protos, Analytical Measuring Systems, Cambridge, Inglaterra).

■ FIGURA IV.1

Curvas de crecimiento de los diferentes microorganismos utilizados en esta Tesis Doctoral. Las flechas indican el momento en el que se tomaron las muestras para realizar los estudios de inactivación por PEAV. Las condiciones de cultivo para cada microorganismo se muestran en la Tabla IV.2



IV.2.4. TRATAMIENTOS DE PEAV

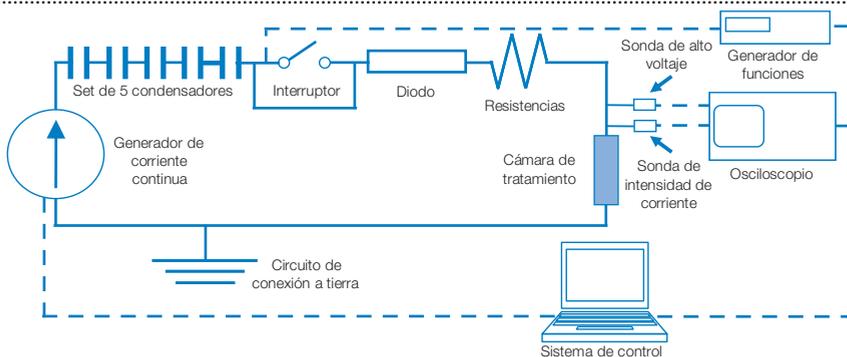
IV.2.4.1. Generador de PEAV

Debido a que los estudios de inactivación microbiana se realizaron previamente a la adquisición y puesta a punto del equipo de PEAV que se describirá posteriormente para la mejora de la extracción fenólica, en esta parte de la investigación se utilizó un equipo de pulsos de caída exponencial. Así, el generador de PEAV utilizado fue construido en colaboración con el *Department of Food Biotechnology and Food Process Engineering* de la Universidad Técnica de Berlín (Heinz et al., 2003).

En la Figura IV.2, se muestra la configuración eléctrica general del equipo. Éste consta de un generador de corriente continua (HCK 2500 M35000, F.u.G. Elektronik GmbH, Rosenheim, Alemania) que es capaz de transformar la corriente trifásica alterna (0,38 kV; 16 A) en continua de hasta una intensidad máxima de 140 mA y un voltaje máximo de 35 kV. Este generador carga un set de 5 condensadores (C-20C682, Behlke, Kronberg, Alemania) que poseen una capacidad individual de 6800 pF y que soportan un voltaje máximo de 20 kV. Finalmente, el sistema dispone de un interruptor tipo tristor (HTS 160-500 SCR, Behlke) que permite la descarga completa de la energía eléctrica almacenada en los condensadores en la cámara de tratamiento. Este interruptor posee un voltaje y un amperaje máximos de trabajo de 16 kV y 5kA. La apertura del interruptor está regulada por una señal eléctrica externa de 5 V suministrada por un generador de funciones (AGF 320, Tektronix). Una vez abierto, se produce la descarga completa y no regulada de la energía almacenada, por lo que se generan pulsos de caída exponencial. Como sistema de protección del interruptor, para impedir el reflujó de energía eléctrica al mismo, entre él y la cámara de tratamiento se sitúan un diodo (FDA 200-150, Behlke) y tres resistencias eléctricas de 15 Ω cada una (886AS150LDS, Cesiwid, Niagara Falls, EE.UU.). El sistema descrito permite la aplicación de pulsos de caída exponencial de aproximadamente 2 μ s de anchura de hasta 16 kV y 5 kA, a unas frecuencias de hasta 60 Hz.

FIGURA IV.2

Configuración eléctrica del equipo de PEAV utilizado en los experimentos de resistencia microbiana



Todo el equipo está controlado mediante un software diseñado en la Universidad Técnica de Berlín mediante la herramienta de programación TestPoint (Capital Equipment, Billerica, Massachusetts, EE.UU.).

Para determinar el voltaje y amperaje aplicados, el sistema se completa con una sonda de alto voltaje (P6015A, Tektronix) y una sonda de amperaje (Stangenes Industries) cuyas lecturas son registradas en un osciloscopio digital de dos canales (TDS 3012B, Tektronix) que, a su vez, dispone de una herramienta de integración que permite calcular la energía aplicada por pulso.

Con objeto de medir el aumento de la temperatura del medio debido a la aplicación de los tratamientos de PEAV, se utilizó una sonda termopar tipo K (Crison Instruments) accionada neumáticamente justo tras la aplicación de los tratamientos (Raso et al., 2000).

IV.2.4.2. Cámara de tratamiento

En esta investigación, se trabajó con una cámara de tratamiento estática de electrodos paralelos que ya ha sido descrita con anterioridad (Álvarez, 2003c). Sus principales características se resumen en la Tabla IV.3. Ésta consiste en un tubo de polietileno cerrado en sus extremos por dos cilindros de acero inoxidable de 16 mm de diámetro (Figura IV.3). Estas tres estructuras delimitan la zona de tratamiento (zona rallada horizontalmente en la Figura IV.3). El diseño de electrodos paralelos permite la aplicación de un campo eléctrico uniforme. Para mejorar más si cabe la misma y además evitar la posible presencia de aire ocluido, la superficie de los electrodos está pulida a espejo. Uno de los electrodos está conectado a tierra, mientras que el otro está conectado a alto voltaje generado por el equipo de PEAV. Para la realización de los experimentos, se ajustó la distancia de los electrodos a 2,5 mm por lo que el volumen de tratamiento fue de 0,5 mL. Con objeto de llenar y vaciar la cámara fácilmente, ésta dispone de un orificio practicado en el tubo de polietileno de 1,2 mm de diámetro. Durante el tratamiento, el orificio se mantiene cerrado mediante cinta adhesiva tipo cello.

■ TABLA IV.3

Características principales de la cámara estática de electrodos paralelos utilizada en los experimentos de inactivación microbiana por PEAV

	Cámara estática
Distancia entre los electrodos	2,5 mm
Diámetro zona de tratamiento	16 mm
Volumen total de tratamiento	0,5 mL
Campo eléctrico máximo	35 kV/cm

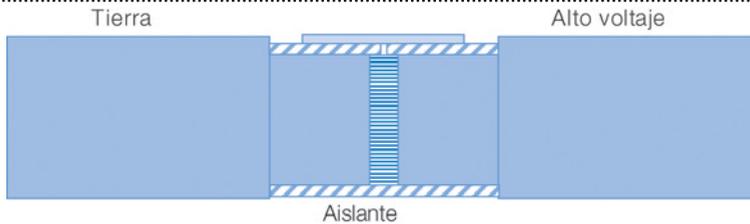
IV.2.4.3. Condiciones de tratamiento

Previamente al tratamiento de PEAV, las suspensiones microbianas obtenidas fueron centrifugadas durante 5 minutos a 10000Xg (Minispin®plus, Eppendorf) y resuspendidas en el correspondiente medio de tratamiento, mosto o vino de uva tinta, cuyas características se muestran en la Tabla IV.1. Las muestras resuspendidas se introducían en la cámara mediante

una jeringuilla hipodérmica estéril de 1 mL (TERUMO, Lovaina, Bélgica) donde recibían los correspondientes tratamientos de PEAV. Éstos consistieron en la aplicación de hasta 100 pulsos (1 Hz) de intensidades del campo eléctrico entre 16 y 31 kV/cm, correspondientes a energías específicas por pulso de entre 1,02 y 3,77 kJ/kg. Tras la aplicación de los tratamientos, la temperatura del medio se determinó utilizando el dispositivo desarrollado por Raso et al. (2000). En todos los casos, la temperatura al finalizar los tratamientos nunca superó los 30°C.

■ FIGURA IV.3

Esquema de la cámara de tratamiento estática de electrodos paralelos utilizada en los experimentos de resistencia microbiana a los PEAV. La zona rallada horizontalmente delimita la zona de tratamiento



Tras la finalización de los tratamientos, las muestras se extraían y se realizaban las correspondientes diluciones decimales y siembras por homogeneización en masa, necesarias para el recuento de los supervivientes. Las condiciones de recuperación dependieron del microorganismo y coinciden con las indicadas en la Tabla IV.2 para su aislamiento.

Las correspondientes gráficas de supervivencia para cada microorganismo, medio de tratamiento y campo eléctrico estudiado se obtuvieron representando el logaritmo decimal de la fracción de supervivientes frente a la energía específica aplicada (kJ/kg).

IV.2.5. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

IV.2.5.1. Modelización de las curvas de supervivencia

Con objeto de estudiar la cinética de inactivación de los microorganismos estudiados en función de las condiciones de tratamiento, las curvas de supervivencia obtenidas fueron descritas matemáticamente mediante el modelo de Mafart (Mafart et al., 2002). Este modelo está basado en la asunción de la existencia de una distribución de resistencias en la población microbiana (modelo primario). En este caso, se considera que la resistencia sigue una distribución de probabilidad de Weibull (Weibull, 1951). Las gráficas de supervivencia ajustadas con dicho modelo se describen mediante la siguiente ecuación matemática:

$$\text{Log}_{10}S_w = -\left(\frac{w}{\delta}\right)^p$$

donde S_w es la fracción de supervivientes obtenida tras la aplicación de una energía específica w expresada en kJ/kg; δ y p son los parámetros del modelo. El parámetro δ , llamado pará-

metro de escala, es la energía necesaria para inactivar el primer ciclo logarítmico decimal de la población microbiana. Por su parte, el parámetro p , o parámetro de forma, hace referencia al perfil que presenta la gráfica de supervivencia. Si p es igual a 1, la gráfica de supervivencia es lineal; si es mayor a 1, convexa; y si es menor a 1, se considera cóncava.

Con objeto de estudiar la relación existente entre los parámetros del modelo y la intensidad del campo eléctrico para cada microorganismo y medio de tratamiento estudiado, se utilizó como modelo secundario la siguiente ecuación matemática basada en la función de Gompertz (Gompertz, 1825):

$$X = a - (b \cdot e^{-e^{c \cdot (E-d)}})$$

donde X es el valor δ o p ; E es la intensidad del campo eléctrico expresado en kV/cm; a , b , c y d son parámetros del modelo.

Finalmente, incluyendo los modelos secundarios en los modelos primarios, se obtuvieron los correspondientes modelos terciarios o finales para cada microorganismo y medio de tratamiento estudiados.

Para determinar la calidad de los ajustes, se calculó el coeficiente de determinación (R^2) y la raíz del error cuadrático medio (RECM), así como el factor de sesgo (B_f) y de exactitud (A_f) (Baranyi et al., 1999). Mientras que el R^2 informa sobre la proporción de la variabilidad total que explica el modelo elegido, el RECM puede considerarse como el promedio de la discrepancia entre los valores observados y los estimados por el modelo. El factor de sesgo (B_f) indica el grado en el que el modelo sobreestima ($B_f > 1$) o subestima ($B_f < 1$) los datos observados. El factor de precisión (A_f) indica la exactitud media de los valores estimados. Un valor A_f igual a 1 indica que existe un perfecto acuerdo entre los valores predichos y los obtenidos experimentalmente. Cuanto mayor es su valor, peor es la precisión del modelo. Así, un valor A_f de 2 indica que la estimación es, de media, dos veces diferente a los valores observados, ya sea la mitad o el doble.

IV.2.5.2. Análisis estadístico

Los análisis estadísticos, así como los ajustes de los modelos, fueron llevados a cabo con los programas informáticos Excel XP (Microsoft Corporation, Seattle, Washington DF, EE.UU.) y GraphPad PRISM® (GraphPad Software, San Diego, California, EE.UU.).

IV.3. Resultados y discusión

Los resultados más importantes obtenidos en lo referente a la aplicación de los PEAV para eliminar la flora alterante del vino han originado la publicación de un artículo en una revista internacional (Puértolas et al., 2009a), cuya transcripción íntegra puede encontrarse en el CD adjunto a este manuscrito. En este apartado únicamente se tratarán dichos resultados en conjunto, con el fin de obtener las conclusiones generales de los mismos.

En esta Tesis Doctoral, se ha estudiado la resistencia a los PEAV de cuatro especies microbianas alterantes (*Dekkera anomala*, *Dekkera bruxellensis*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus hilgardii*) y una levadura utilizada como cultivo iniciador para la fermentación del vino (*Saccharomyces bayanus*) tanto en mosto como en vino de uva tinta. Los experimentos

se realizaron en condiciones estáticas, utilizando una cámara de tratamiento de electrodos paralelos.

En la Figura IV.4 se muestran las curvas de supervivencia obtenidas para cada microorganismo estudiado, tanto en mosto (A) como en vino (B), en función del campo eléctrico y la energía específica aplicada. Como se observa, en general la inactivación aumentó progresivamente con la energía específica y el campo eléctrico aplicados, independientemente del microorganismo.

La modelización de los datos de resistencia de las distintas especies permitió obtener, matemáticamente, las distintas condiciones de tratamiento, campo eléctrico y energía específica necesarias para conseguir 3 ciclos logarítmicos de inactivación de los diferentes microorganismos estudiados, tanto en mosto como en vino (Figura IV.5). Estos 3 ciclos de inactivación, se corresponden con la eliminación del 99,9 % de los microorganismos presentes en el medio de tratamiento.

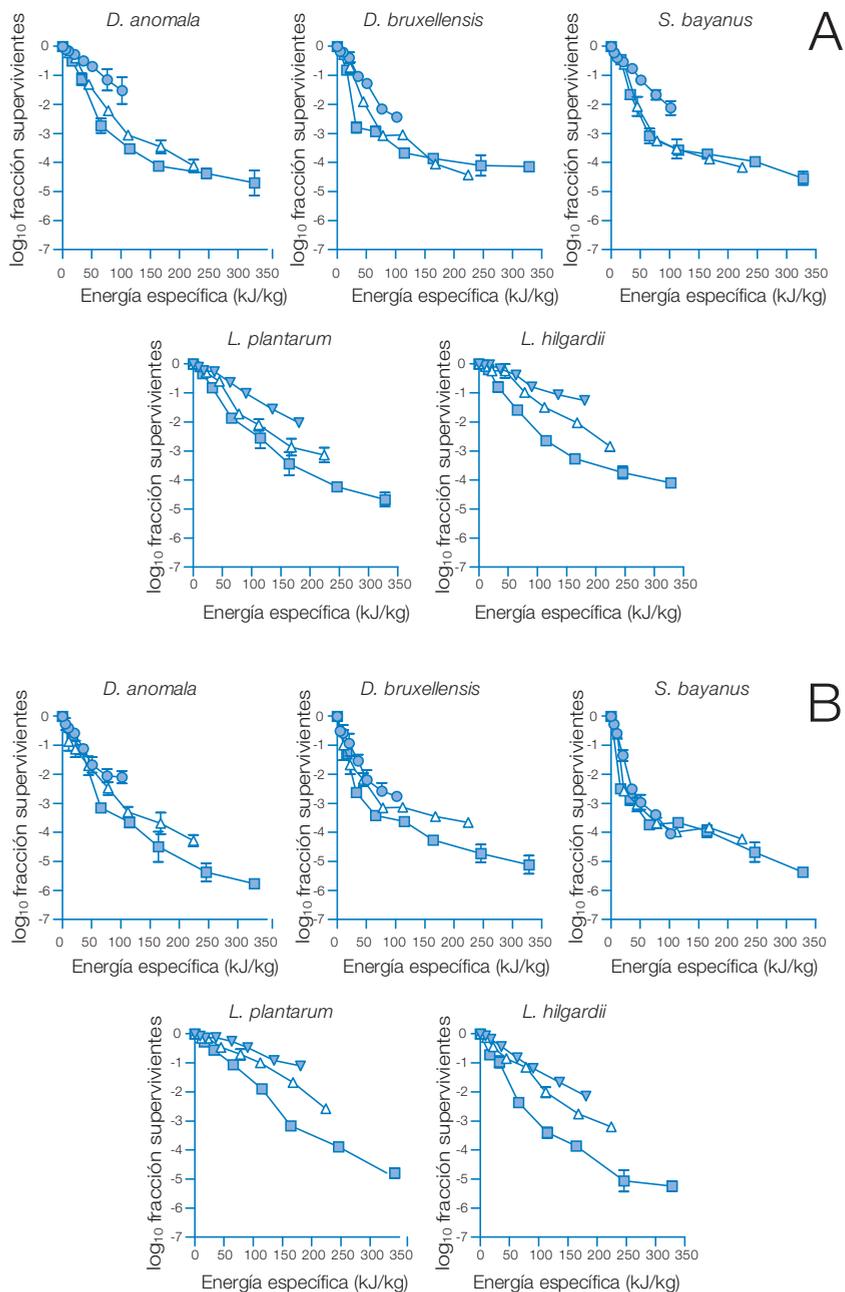
Como se observa, las levaduras se mostraron mucho más sensibles a los PEAV que las bacterias. Dentro de las levaduras, independientemente del medio de tratamiento, *D. anomala* fue la más resistente. Por el contrario, el medio de tratamiento utilizado determinó la bacteria, y por ende, el microorganismo más resistente. Mientras que *L. hilgardii* fue el microorganismo más resistente en el mosto, *L. plantarum* lo fue en el vino. Tanto en mosto como en vino, un tratamiento de PEAV de 29 kV/cm y 186 kJ/kg permitiría eliminar el 99,9 % de la flora alterante presente. Esta reducción podría ser suficiente para disminuir la incidencia de las alteraciones producidas por estos microorganismos y para facilitar el desarrollo de los cultivos iniciadores utilizados en las bodegas. Similares conclusiones fueron obtenidas por Garde-Cerdán et al. (2007a, 2007b, 2008a, 2008b). Estos autores demostraron la posibilidad de elaborar vino blanco mediante PEAV y sin utilizar SO₂. Además, observaron que los PEAV no afectan al contenido de diversos compuestos de gran importancia en el vino, como los aminoácidos, los ácidos grasos o los compuestos volátiles.

IV.4. Análisis de costes: inactivación microbiana

Como ya se ha comentado en esta Memoria, la pasteurización de alimentos líquidos mediante PEAV requiere conseguir un nivel de inactivación de, al menos, 5 ciclos logarítmicos de la especie microbiana más resistente presente en el alimento. Para conseguir este objetivo, es necesaria la aplicación de campos eléctricos de elevada intensidad (25-35 kV/cm) y energía específica (50-700 kJ/kg).

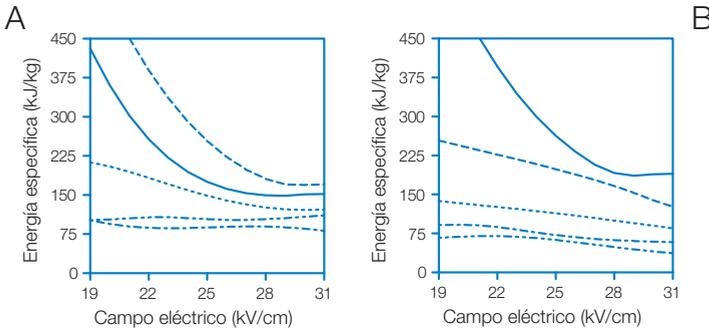
FIGURA IV.4

Influencia del campo eléctrico y la energía específica en la inactivación de las especies microbianas estudiadas. Campo eléctrico: 16 kV/cm (●), 22 kV/cm (▼), 25 kV/cm (△), 31 kV/cm (■). Condiciones de tratamiento: mosto (A) y vino (B) de uva tinta



■ FIGURA IV.5

Condiciones de tratamiento necesarias, campo eléctrico y energía específica, para conseguir 3 ciclos logarítmicos de inactivación de los diferentes microorganismos estudiados, en mosto (A) y en vino (B). *D. anomala* (.....), *D. bruxellensis* (----), *S. bayanus* (----), *L. plantarum* (—), *L. hilgardii* (---)



En el caso del vino, un nivel de inactivación de tan sólo 3-4 ciclos logarítmicos podría ser suficiente para evitar su alteración, por lo que los requerimientos energéticos serían menores. Según los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral, para obtener dicha inactivación es necesaria la aplicación de un campo eléctrico de 29 kV/cm y de energías específicas de entre 150 y 300 kJ/kg. De acuerdo con los cálculos realizados por Toepfl et al. (2006), teniendo en cuenta un precio del kWh de 10 céntimos de euro, estas energías podrían traducirse a un coste aproximado de entre 4,2 y 8,4 € por tonelada. Estos costes, ya de por sí elevados, aumentarían en gran medida al tener en cuenta el coste inicial necesario para la compra e instalación de un equipo de PEAV lo suficientemente potente.

Los sistemas de PEAV actuales únicamente permiten la aplicación de tratamientos de pasteurización a escala de planta piloto (<1 ton/h). El coste de estos equipos es cada vez menor gracias al gran desarrollo de la ingeniería eléctrica acaecido en los últimos años, situándose en la actualidad alrededor de los 150.000 € (Loeffler, 2006). Diversos autores han apuntado la posibilidad real del desarrollo de equipos mucho más potentes que permitan la aplicación de tratamientos de pasteurización a escala industrial (Braakman, 2003; Evrendilek y Zhang, 2005; Toepfl et al., 2006). El coste de la construcción e instalación de los mismos podría situarse, en función de su capacidad de producción, entre los 2 y los 6 millones de euros. Según Hoogland y Hann (2007), asumiendo un periodo de amortización de 5 años y 5.000 horas de producción al año, una instalación de PEAV con una capacidad de 5 ton/h supondría un incremento aproximado en el coste de los tratamientos de 8 € por cada tonelada producida.

En las bodegas, a pesar de que los gastos de equipo podrían abarataarse debido al tratamiento poco intenso necesario, los costes de amortización del equipo de PEAV por tonelada de vino producida podrían dispararse ya que la producción de una bodega de tamaño medio no suele superar el millón de litros al año. Por ello, en la actualidad, la aplicación de los PEAV en la industria del vino con este fin es poco viable económicamente. Es de esperar que en los próximos años, al igual que está sucediendo hoy en día con los equipos de escala planta

piloto, el desarrollo constante de nuevos sistemas de PEAV a escala industrial permita abaratar en gran medida su coste. Si esto no sucede, la aplicación de los PEAV únicamente cobraría sentido si se demuestra que el vino tratado por PEAV posee una calidad muy superior al vino obtenido mediante técnicas tradicionales (SO₂).

V. Mejora de la extracción fenólica en la elaboración de vino tinto mediante pulsos eléctricos de alto voltaje

V.1. Introducción y objetivos

El contenido en compuestos fenólicos constituye uno de los parámetros de calidad del vino tinto más importantes, debido a que estas sustancias contribuyen activamente en las propiedades sensoriales del mismo, tales como el color, el amargor, la astringencia o el aroma (Boulton, 2001; Noble, 1990; Vidal et al., 2004a; Zoecklein et al., 2001). Además, diversos estudios han mostrado que los compuestos fenólicos poseen actividad antioxidante siendo capaces de eliminar radicales libres (Scalbert et al., 2005), por lo que los compuestos fenólicos podrían tener una particular importancia en la salud humana, reduciendo el riesgo de padecer diversas enfermedades degenerativas, como enfermedades cardiovasculares, osteoporosis o cáncer (Renaud y de Lorgeril, 1992; Scalbert et al., 2005; Stoclet et al., 2004).

El contenido fenólico del vino depende principalmente de la concentración de polifenoles presente en la variedad o variedades de uva utilizadas en la vinificación. A su vez, ésta está determinada por las características genéticas de cada variedad, su localización geográfica, las condiciones edafoclimáticas de la zona de producción y las técnicas de cultivo empleadas (Cacho et al., 1992; Cantos et al., 2002). Finalmente, que el vino posea o no el máximo contenido fenólico marcado por las características de la uva, depende de las técnicas enológicas utilizadas durante su elaboración.

Con objeto de extraer los compuestos fenólicos, en el proceso tradicional de elaboración de vino tinto la fermentación del mosto se realiza en presencia de las partes sólidas de la uva. La duración de esta fase de maceración está determinada por los objetivos fenólicos marcados, pudiendo durar menos, igual o incluso más tiempo que la fermentación del mosto.

En los últimos años, para mejorar la extracción fenólica obtenida mediante los métodos tradicionales, se han desarrollado y propuesto diferentes técnicas como el aumento de la temperatura de fermentación, la termovinificación, la criomaceración, la vinificación en doble pasta, el sangrado o el uso de enzimas pectolíticas (Bautista Ortín et al., 2007; Sacchi et al., 2005). Como la mayor parte de los compuestos fenólicos se encuentran en las células de los hollejos de la uva, estas técnicas actúan, generalmente, incrementando la permeabilidad de las mismas, facilitando la salida de los compuestos de interés (Amrani-Joutei y Glories, 1995). Aunque estas técnicas se han mostrado eficientes en general, se han identificado diversos problemas asociados a su uso. Por ejemplo, la utilización de altas temperaturas de fermentación puede causar paradas fermentativas y pérdida de compuestos volátiles de interés (Spranger et al., 2004). Por otro lado, se ha demostrado que tanto la termovinificación como la criomaceración pueden afectar negativamente a la calidad de los vinos tintos (Brown, 1975; Coffelt y Berg, 1965). Finalmente, en lo que respecta al uso de enzimas pectolíticas se han publicado efectos contradictorios, por lo que sus potenciales efectos positivos están en entredicho, si bien su uso está generalizado (Bautista-Ortín et al., 2005).

Por todo ello, la búsqueda de herramientas alternativas que permitan mejorar la extracción fenólica sin afectar negativamente a la calidad del vino es uno de los puntos claves del desarrollo tecnológico en las bodegas. Una de las posibles técnicas alternativas para mejorar la extracción fenólica, debido a su capacidad de permeabilizar células eucariotas sin modificar la temperatura del producto, es la aplicación de un tratamiento de PEAV. Recientemente, se ha demostrado a escala de laboratorio que la aplicación de los PEAV sobre los hollejos de la uva acelera e incluso incrementa la extracción fenólica durante la maceración (López et al., 2008a, 2008d, 2009c). Para evaluar la potencial aplicación de esta tecnología en las bodegas,

es necesario el desarrollo de sistemas que permitan trabajar en flujo continuo y evaluar si las diferencias observadas al final de la fermentación se mantienen durante el envejecimiento del vino en botella y bodega.

Por todo ello, la evaluación de la aplicación de los PEAV en flujo continuo para la mejora de la extracción de los compuestos fenólicos en la elaboración de vino tinto a escala planta piloto y bodega, requirió la consecución de los siguientes objetivos parciales:

- Diseñar, construir y poner a punto un equipo que permitiera la aplicación de los tratamientos de PEAV en condiciones de flujo continuo.
- Estudiar la influencia de los tratamientos de PEAV en la cinética de extracción de los compuestos fenólicos para determinar las condiciones de tratamiento óptimas según la variedad de uva estudiada.
- Elaborar vino tinto joven y crianza a partir de uva tratada por PEAV con objeto de:
 - i. Estudiar la evolución del color y los compuestos fenólicos del vino tinto durante el envejecimiento en bodega y en botella.
 - ii. Evaluar y comparar sensorialmente los vinos obtenidos con y sin la tecnología de los PEAV.
 - iii. Comparar la tecnología de los PEAV con el uso de enzimas para acelerar la extracción de compuestos fenólicos.
- Identificar las ventajas de la aplicación de un tratamiento de PEAV en la mejora de la extracción fenólica en términos de rendimiento del proceso, tiempo de procesado y costes energéticos.

V.2. Material y métodos

V.2.1. UVA

Para la realización de esta Tesis Doctoral, se utilizó uva tinta (*Vitis vinifera* L.) de las variedades Cabernet Sauvignon, Merlot, Syrah y Tempranillo, cultivadas en regadío y sistema de espaldera, procedentes de parcelas situadas en las Denominaciones de Origen (DO) Somontano (“Bodega Pirineos”), Cariñena (“Grandes Vinos y Viñedos” y “Señorío de Aylés”) y Campo de Borja (“Bodegas Aragonesas”), durante las añadas comprendidas entre 2007 y 2009.

V.2.2. VINIFICACIONES

V.2.2.1. Diseño de las vinificaciones

En esta Tesis Doctoral, se realizaron experimentos a escala planta piloto y a escala bodega utilizando flujos de procesado de 118 kg/h y 1600 kg/h, respectivamente. En el primero de los casos, se desarrollaron dos diseños básicos de vinificación. En una primera etapa, y con el fin de identificar las condiciones óptimas de tratamiento de PEAV para cada variedad y valorar la aplicabilidad de la tecnología en flujo continuo, se realizaron microvinificaciones de 10 kg conducidas únicamente hasta el final de la fermentación alcohólica. En estos estudios, los hollejos estuvieron durante toda la fermentación en contacto con el mosto. En una segunda fase, una vez determinadas dichas condiciones óptimas de tratamiento, se llevaron a cabo vinificaciones de 100 kg con objeto de estudiar la evolución de las características cromáticas

y las sustancias fenólicas del vino tinto, tanto durante el proceso de fermentación alcohólica, como durante la maduración y el envejecimiento en bodega y en botella. En este caso, los tiempos de maceración se decidieron en función de la extracción fenólica verificada a lo largo de la fermentación. Generalmente, los hollejos se separaron del mosto cuando el Índice de Polifenoles Totales (IPT) permaneció constante durante dos días consecutivos.

En el estudio comparativo de la tecnología de los PEAV con el uso de enzimas de maceración, se elaboraron microvinificaciones de 10 kg con un tiempo de maceración fijo de 4 días en todos los casos. Se testaron dos preparados enzimáticos comerciales distintos, Lallzyme EX y Lallzyme OE (Lallemand, Ontario, Canadá) descritos respectivamente como de media y alta concentración de pectinasas. La adición de estas enzimas se realizó al comienzo de la maceración, utilizando las dosis máximas recomendadas por el fabricante (3 y 1,5 g/hL, respectivamente).

En último lugar, una vez efectuados los estudios a escala planta piloto, con objeto de conocer la potencial aplicabilidad de los PEAV en bodega para mejorar el proceso de extracción fenólica, se reescaló la cámara de tratamiento de PEAV para utilizar flujos de 1600 kg/h. En este caso, se realizaron vinificaciones de 100 kg y los hollejos estuvieron durante toda la fermentación en contacto con el mosto.

V.2.2.2. Proceso de elaboración de vino tinto

V.2.2.2.1. Vinificaciones a escala planta piloto

Independientemente del diseño y las condiciones de tratamiento, todas las vinificaciones a escala planta piloto realizadas en esta Tesis Doctoral fueron llevadas a cabo por duplicado, siguiendo un protocolo de elaboración similar (Figura V.1). La uva fue vendimiada manualmente e inmediatamente transportada a la Planta Piloto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos de la Universidad de Zaragoza, donde se almacenó en refrigeración a 4°C hasta su uso. En esta fase, se obtuvieron muestras representativas de la uva destinada a cada experimento para realizar los análisis iniciales de las características de la materia prima. Previamente a la vinificación, la uva se despalilló sin estrujar en una despalilladora/estrujadora (Modelo Cantinetta, Zambelli Enotech, Vanzo Nuovo, Italia). A continuación, la uva fue impulsada con una bomba de tornillo provista de una tolva de alimentación (Rotor-MT, Bominox, Gerona, España) a la cámara de tratamiento de PEAV a través de un tubo de 3 cm de diámetro interno reforzado con espiral de acero (Mèrlett Plastics, Bristol, Inglaterra), utilizando una velocidad de flujo de 118 kg/h. Esta bomba de impulsión permite obtener un flujo homogéneo y constante sin incorporar burbujas de aire al producto. Para que los resultados fueran comparables, en todas las ocasiones, la uva que se utilizó para realizar las vinificaciones control pasó por el mismo circuito que la uva tratada por PEAV.

Tras la aplicación de los tratamientos, la uva se distribuyó en los correspondientes depósitos cuya capacidad varió en función del experimento (Enomundi, María de Huerva, España). En todos los casos, al comienzo del proceso de maceración-fermentación se añadió 30 mg/kg de metabisulfito potásico (Panreac, Castellar del Vallès, España) y un cultivo iniciador comercial de levaduras vínicas, *Saccharomyces bayanus* EC1118 (Lalvin, Ontario, Canadá), a una concentración de 10⁶ UFC/mL. Siempre que fue necesario, se corrigió la concentración de Nitrógeno Fácilmente Asimilable (FAN) y la acidez total del mosto hasta 200 mg/L de Nitró-

geno y 5,5 g/L de ácido tartárico, mediante la adición de sulfato amónico (Panreac) y ácido tartárico (Panreac) respectivamente. Durante toda la fermentación, los depósitos se mantuvieron en una cámara atemperada a $25\pm 1^\circ\text{C}$. Con objeto de monitorizar el desarrollo de la fermentación alcohólica, se tomaron diariamente lecturas de la temperatura (Sonda Termopar K de inmersión, Crison Instruments, Alella, España) y de la densidad del mosto (Densímetro calibrado a 20°C , Verexa, Barcelona, España). Durante toda la fase de maceración, se realizaron dos remontes diarios para favorecer la extracción de los compuestos fenólicos.

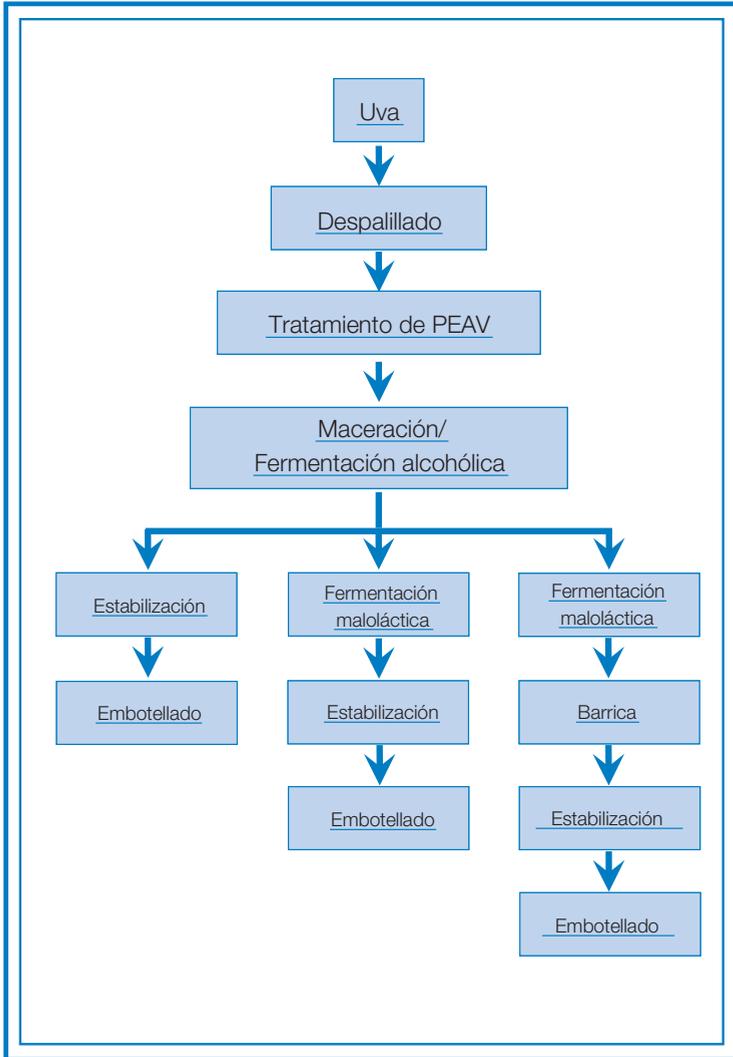
Transcurrido el tiempo de maceración, se procedió al descube y prensado de los hollejos. El prensado se realizó con una prensa hidráulica vertical (Casals, Reus, España) hasta una presión máxima de 2 kg/cm^2 . Finalmente, el vino flor y el vino prensa se mezcló y, cuando fue necesario, se continuó el proceso de fermentación hasta que la cantidad de azúcares residuales fue menor a 3 g/L .

Una vez concluida la fermentación alcohólica, se añadió un cultivo iniciador de *Oenococcus oeni* (Enoferm® Beta, Lallemand) a la dosis recomendada por el fabricante (10 mg/L) en aquellos vinos en los que se realizó la fermentación maloláctica. Se dió por concluida la misma cuando la concentración de ácido málico en los depósitos fue inferior a $0,2\text{ g/L}$ (aproximadamente 2 semanas).

Posteriormente a los procesos fermentativos, los vinos se trasegaron y se procedió a su estabilización a -2°C durante 1 mes. Finalmente, los vinos se trasegaron de nuevo, se embotellaron y se conservaron a $18\pm 1^\circ\text{C}$ hasta su análisis.

En los experimentos de crianza en barrica, tras la fermentación maloláctica, los vinos se trasegaron e introdujeron en barricas de roble americano de aproximadamente 20 L de capacidad (Enomundi), en las que el vino permaneció 6 meses a una temperatura de $18\pm 1^\circ\text{C}$. Posteriormente, los vinos se trasegaron de nuevo, se embotellaron y se conservaron a $18\pm 1^\circ\text{C}$ hasta su análisis.

■ FIGURA V.1

Protocolo general del proceso de elaboración de vino tinto utilizado en esta Tesis Doctoral**V.2.2.2.2. Vinificaciones a escala bodega**

Las vinificaciones fueron conducidas por duplicado siguiendo el protocolo anteriormente expuesto para las vinificaciones a escala planta piloto (Figura V.1). En este caso, tras el despalillado la uva fue conducida a la cámara de tratamiento a través de un tubo de 6 cm de diámetro interno (Mèrlett Plastics) mediante una bomba peristáltica especialmente diseñada

para la impulsión de uva en bodega (Bomba Rotho MS1, Ragazzini, Faenza, Italia). Esta bomba permite utilizar grandes flujos de producto, sin estropear la integridad de los hollejos de la uva. Así, en este segundo caso, la velocidad de flujo utilizada fue de 1600 kg/h. Como en el caso anterior, para evitar posibles efectos de la bomba o de la velocidad de flujo, se decidió transitar por el circuito en iguales condiciones la uva destinada a los controles.

Tras la aplicación de los tratamientos de PEAV, la uva finalmente se distribuyó en los correspondientes depósitos de acero inoxidable. La fermentación se desarrolló a una temperatura controlada de $20\pm 1^\circ\text{C}$, midiéndose diariamente la densidad del mosto para controlar el desarrollo de la misma (Densímetro calibrado a 20°C , Verexa, Barcelona, España). Tras la fermentación, se procedió al descube y al prensado de los hollejos en una prensa hidráulica (Casals). Posteriormente, se procedió a la estabilización del vino a -2°C durante 1 mes y, finalmente, se trasegó y embotelló.

V.2.3. TRATAMIENTOS DE PEAV

V.2.3.1. Generador de PEAV

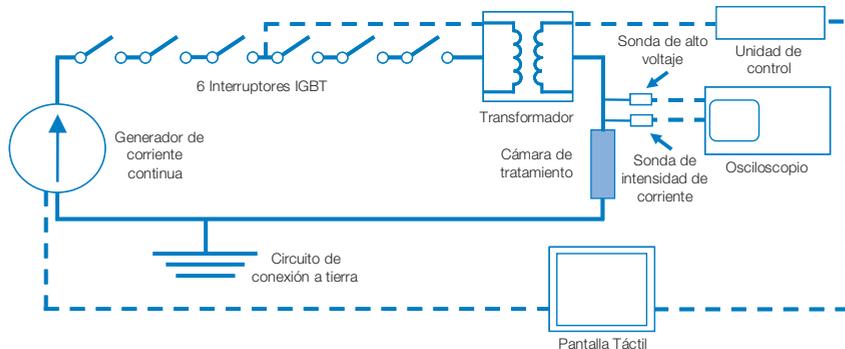
Para la aplicación de los tratamientos de PEAV a la uva tras el despalillado, se utilizó un generador suministrado por la empresa ScandiNova (Modulator PG, ScandiNova, Uppsala, Suecia), cuyo esquema eléctrico se muestra en la Figura V.2. Éste consta básicamente de un transformador (DCPS D10-400, ScandiNova) que convierte la corriente trifásica alterna (380 V, 16 A) en corriente continua de 1 kV, la cual es transferida a 6 interruptores IGBT conectados en serie (Switch rack SR-6, ScandiNova). Una señal eléctrica externa (TTL, 5 V) controla la apertura y cierre de los módulos IGBT, provocando la descarga de la corriente de 1 kV en una primera señal pulsante de onda cuadrada. Finalmente, un transformador de pulsos (Pulse transformer, ScandiNova) convierte esa primera señal pulsante en la señal de alto voltaje deseada. Con este circuito, el equipo es capaz de generar pulsos de onda cuadrada de $3\ \mu\text{s}$ de duración y de hasta 30 kV de voltaje y 200 A de intensidad, a una frecuencia de hasta 300 Hz.

El equipo está diseñado para trabajar con una cámara de tratamiento con una resistencia eléctrica óptima entre 100 y $170\ \Omega$. En estas condiciones, se consigue un pulso totalmente cuadrado, en el que el voltaje aumenta hasta el valor establecido a una velocidad de $47\ \text{kV}/\mu\text{s}$ y, una vez terminado el pulso, la velocidad de descenso es de $56\ \text{kV}/\mu\text{s}$. A lo largo de toda la duración del pulso, el voltaje alcanzado oscila menos de un 2%.

Durante la aplicación de los tratamientos, parte de la energía eléctrica generada se disipa en forma de calor (hasta 1 kW). Para evitar el sobrecalentamiento del sistema, el equipo posee un sistema de refrigeración mediante aceite dieléctrico de baja conductividad eléctrica. Dicho aceite es enfriado mediante un intercambiador de calor en el que el fluido refrigerante es agua. Ésta debe circular a un flujo mínimo de 9 L/min, a una presión de entre 3 y 8 bares, y su temperatura debe estar comprendida entre los 10 y los 40°C . Para que las condiciones de trabajo del equipo sean estables, la temperatura del agua durante la aplicación de los tratamientos debe ser igual a su temperatura inicial $\pm 2,5^\circ\text{C}$.

■ FIGURA V.2

Configuración eléctrica del equipo de PEAV utilizado en los experimentos de extracción fenólica



El control del equipo se realiza mediante un software específico diseñado por la empresa fabricante (K1-15m, ScandiNova) manejable mediante una pantalla táctil de cristal líquido (Simatic panel, Siemens, Munich, Alemania). Debido a que el equipo aplica altos voltajes e intensidades de corriente, se integró un sistema de seguridad que permite la desconexión manual del circuito eléctrico en caso de emergencia. Éste consta de un pulsador externo de fácil accionamiento (RS Amidata, Pozuelo de Alarcón, España), conectado al equipo mediante una clavija tipo RS-232 (RS Amidata). Al accionar el pulsador, el circuito se cierra impidiendo el paso de corriente a través de él, de modo que la manipulación de sus componentes externos es segura.

Para determinar el voltaje y amperaje realmente aplicados y así conocer las condiciones efectivas de tratamiento, el sistema se completa con una sonda de alto voltaje (P6015A, Tektronix, Wilsonville, Oregon, EE.UU.) y una sonda de amperaje (Stangenes Industries, Palo Alto, California, EE.UU.) conectadas a la salida del equipo, cuyas lecturas son registradas en un osciloscopio digital de dos canales (TDS 220, Tektronix).

Con objeto de comprobar el incremento de temperatura del producto debido al tratamiento de PEAV, se situaron a la entrada y a la salida de la cámara de tratamiento sondas termopares tipo K (Crison Instruments).

V.2.3.2. Cámaras de tratamiento

V.2.3.2.1. Características de las cámaras de tratamiento

Para la realización de los experimentos de transferencia de masa, se diseñaron y construyeron dos cámaras de tratamiento colineales de flujo continuo, una para llevar a cabo los estudios a escala planta piloto y otra para realizar el ensayo a escala bodega. La Tabla V.1 resume las principales características de las mismas. Ambas cámaras están basadas en un diseño previo de Toepfl et al. (2007b) para la aplicación de tratamientos de pasteurización en alimentos líquidos.

La Figura V.3 muestra el esquema básico de las dos cámaras de tratamiento. Éste consta de tres electrodos cilíndricos de acero inoxidable separados por dos piezas aislantes de meta-

crilato. El electrodo central está conectado a la señal pulsante de alto voltaje generada por el equipo anteriormente descrito, mientras que los dos laterales están conectados a tierra. Por lo tanto, el campo eléctrico se crea entre el electrodo de alto voltaje y los dos conectados a tierra. Esta particular configuración define dos zonas de tratamiento (zonas rayadas horizontalmente en la Figura V.3) de 2 cm de diámetro y 2 cm de largo en el caso de la primera de las cámaras, y de 3 cm de diámetro y 3 cm de largo en el caso de la cámara para la realización de las pruebas en bodega. Así, el volumen total de tratamiento, teniendo en cuenta las dos zonas de tratamiento, es de 12,5 mL en la primera cámara y de 42,4 mL en el caso de la segunda. Utilizando los flujos de producto anteriormente descritos, 118 kg/h en el caso de la cámara de escala planta piloto y 1600 kg/h en la de escala bodega, el tiempo de residencia medio del producto en las zonas de tratamiento es de 0,41 y 0,09 s, respectivamente. Bajo estas condiciones y teniendo en cuenta la frecuencia máxima de trabajo del generador de PEAV (300 Hz), el número máximo de pulsos que es posible aplicar es de 123 en el caso de la cámara de escala planta piloto y de 27 en el caso de la cámara de escala bodega.

■ TABLA V.1

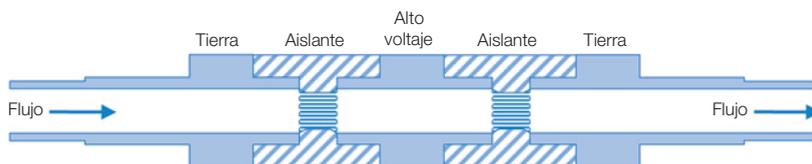
Características principales de las cámaras colineales diseñadas y construidas en esta Tesis Doctoral

	Cámara escala planta piloto	Cámara escala bodega
Distancia entre los electrodos	2 cm	3 cm
Diámetro zona de tratamiento	2 cm	3 cm
Volumen total de tratamiento	12,5 mL	42,4 mL
Flujo de producto	118 kg/h	1600 kg/h
Tiempo de residencia	0,41 s	0,09 s
Número de pulsos máximo	123 pulsos	27 pulsos
Campo eléctrico máximo	7 kV/cm	4,3 kV/cm

Según los límites máximos de voltaje y de intensidad de corriente del generador de PEAV (30 kV y 200 A), el campo eléctrico máximo que es posible aplicar es de aproximadamente 7 kV/cm en la cámara de escala planta piloto y de 4,3 kV/cm en la cámara de escala bodega. La resistencia eléctrica del material tratado y, por lo tanto, su conductividad eléctrica, determina en última instancia el voltaje y amperaje necesarios para aplicar los tratamientos de PEAV y, por lo tanto, el valor real del campo eléctrico máximo que es posible aplicar con las cámaras. En este caso, los campos eléctricos máximos mencionados fueron calculados para una conductividad teórica de 2 mS/cm.

■ FIGURA V.3

Esquema básico de las cámaras colineales construidas en esta Tesis Doctoral. Las zonas rayadas horizontalmente delimitan las zonas de tratamiento



V.2.3.2.2. Diseño de las cámaras de tratamiento

El diseño y evaluación de las cámaras de tratamiento de PEAV, especialmente el de las cámaras de flujo continuo, requiere el desarrollo y utilización de complejos modelos matemáticos. Éstos se basan en la resolución de distintos sistemas de ecuaciones que permiten estimar la distribución del campo eléctrico, el calentamiento óhmico causado por el mismo, el flujo del producto y, finalmente, la distribución de la temperatura dentro de la cámara.

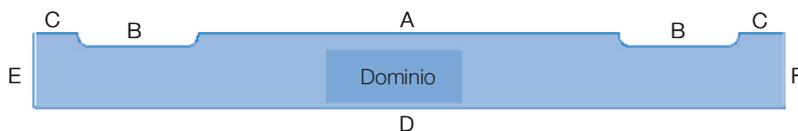
Para tal fin, en esta Tesis Doctoral se utilizó el software Comsol Multiphysics® (Comsol, Estocolmo, Suecia) que permite realizar cálculos de simulación numérica mediante el método de elementos finitos (MEF). Ésta es una herramienta ampliamente utilizada para conocer los valores de determinadas variables físicas en sistemas en los cuales es imposible una medida real de las mismas o ésta es cara o complicada, así como en el estudio y optimización de diseños a nivel industrial (Gerlach et al., 2008). Este método matemático se basa en dividir el cuerpo o estructura (denominada “dominio”) en una serie de subdominios no intersecantes entre sí denominados “elementos finitos”. Dentro de cada elemento, se distinguen una serie de puntos denominados “nodos” que unidos entre sí forman una malla. Una serie de ecuaciones integrales, las denominadas “ecuaciones de gobierno”, definen el dominio. Éstas se resuelven en cada uno de los nodos, interpolándose el resultado al resto de la estructura. El sistema queda finalmente completado por una serie de condiciones de contorno en cada uno de los límites del dominio (Ferziger y Peric, 2002).

En la Figura V.4 se muestra el dominio y los límites definidos en la simulación numérica realizada en la cámara de escala planta piloto. Por razones de simetría axial, únicamente se simuló media cámara de tratamiento, con el consecuente ahorro computacional. En todas las simulaciones realizadas, el número de elementos finitos fue siempre superior a 25000.

Con objeto de realizar las simulaciones, fue necesario definir una serie de constantes físicas características del producto a tratar: densidad, viscosidad, conductividad eléctrica, conductividad térmica, capacidad calorífica y temperatura inicial. Los valores utilizados se muestran en la Tabla V.2. Éstos fueron obtenidos de la literatura y, en el caso de la conductividad eléctrica y de la temperatura, de las medidas experimentales tomadas en nuestro laboratorio. Así mismo, en cada simulación llevada a cabo se especificó el voltaje aplicado en la cámara de tratamiento (V) (V_0) y la velocidad de flujo media inicial (m/s) (u_0).

■ FIGURA V.4

Dominio y límites definidos en la simulación numérica mediante MEF del campo eléctrico, de la velocidad de flujo y de la temperatura en el interior de las cámaras de tratamiento. A: electrodo de alto voltaje. B: Aislante eléctrico. C: electrodo de tierra. D: eje de simetría axial. E: Entrada. F: Salida



En la Tabla V.3, se muestran las ecuaciones de gobierno utilizadas en la simulación numérica del campo eléctrico, del calentamiento óhmico, por conducción y convección, y de la velocidad de flujo en el interior de las cámaras de tratamiento. Estas ecuaciones fueron las generales de los respectivos módulos integrados en el software utilizado en las simulaciones (Comsol Multiphysics®, Comsol).

■ TABLA V.2

Constantes físicas definidas para la realización de las simulaciones numéricas mediante MEF

Constante física	Valor	Fuente bibliográfica
Conductividad eléctrica (σ)	2 mS/cm	-
Densidad (ρ)	1105 Kg/m ³	Esmaili et al., 2007
Conductividad térmica (k)	0,37 W/m °C	Vagenas et al., 1990
Capacidad calorífica (C_p)	3525 J/kg °C	Esmaili et al., 2007
Temperatura inicial (T_0)	10 °C	-
Viscosidad dinámica (η)	2 Pa s	Zuritz et al., 2005

Una vez establecidas las ecuaciones, se procedió a establecer las condiciones en los diferentes límites del dominio para cada uno de los módulos. Así, la Tabla V.4 resume las condiciones de contorno para la resolución de las ecuaciones de gobierno definidas en la Tabla V.3. Éstas se fijaron en función de las características de los materiales que conformaban los límites del dominio y las condiciones iniciales del sistema.

Simulación numérica del campo eléctrico

La simulación numérica del campo eléctrico permitió optimizar el diseño de las cámaras con objeto de obtener un campo eléctrico lo más homogéneo posible dentro de las zonas de tratamiento. El aspecto clave que determina dicha homogeneidad es la particular configuración de las piezas aislantes situadas entre los electrodos. En la Figura V.5A se muestra el campo eléctrico en una de las zonas de tratamiento en el diseño inicial de la cámara de escala planta piloto, durante la aplicación de un pulso eléctrico cuadrado de 3 μ s de anchura y de 19,6 kV de amplitud. Como se observa, la distribución del campo eléctrico no fue homogénea. Mientras que en la zona central se alcanzaban los valores más bajos de campo eléctrico,

en este caso 6,7 kV/cm en el punto central del eje axial, en las esquinas de los aislantes se acumulaba el voltaje y, por lo tanto, el valor de campo eléctrico ascendía hasta los 25,3 kV/cm. Este alto valor de campo eléctrico era debido a la presencia de esquinas en ángulo recto en las piezas aislantes.

■ TABLA V.3

Ecuaciones de gobierno definidas para la simulación del campo eléctrico, del calentamiento óhmico y de la velocidad de flujo en el interior de las cámaras colineales diseñadas en esta Tesis Doctoral. σ : conductividad eléctrica (S/m). V : voltaje seleccionado (V). J^e : densidad de corriente (A/m²). k : conductividad térmica (W/m K). T : temperatura (K). Q : calor generado por la aplicación de los pulsos eléctricos de alto voltaje (W/m³). ρ : densidad (kg/m³). C_p : capacidad calorífica (J/kg K). u : velocidad de flujo (m/s). η : viscosidad dinámica (Pa s)

Módulos	Ecuaciones de gobierno
<i>Campo eléctrico</i>	$-\nabla \cdot (\sigma \nabla V - J^e) = 0$
<i>Calentamiento óhmico</i>	$\nabla \cdot (-k \nabla T) = Q - \rho C_p u \cdot \nabla T$
<i>Velocidad de flujo</i>	$\rho u \cdot \nabla u = \nabla \cdot (-\rho I + \eta (\nabla u)^T)$ $\nabla u = 0$

Diferentes autores han propuesto el uso de algoritmos matemáticos para optimizar las dimensiones de las cámaras de tratamiento de PEAV de diversas configuraciones y evitar la presencia de dichos aumentos puntuales del campo eléctrico (Gerlach et al., 2008; Lindgren et al., 2002; Misaki et al., 1982; Qin et al., 1995). Lindgren et al. (2002) aplicaron simulación numérica para optimizar el campo eléctrico en la configuración colineal. Para ello, los autores propusieron redondear las esquinas de los aislantes eléctricos minimizando la desviación estándar relativa del campo eléctrico en el interior de la zona de tratamiento. Recientemente, Gerlach et al. (2008) mejoraron este sistema de optimización para calcular no sólo el radio de curvatura y la distancia entre los electrodos, si no también el resto de dimensiones características de la cámara de tratamiento colineal.

■ TABLA V.4

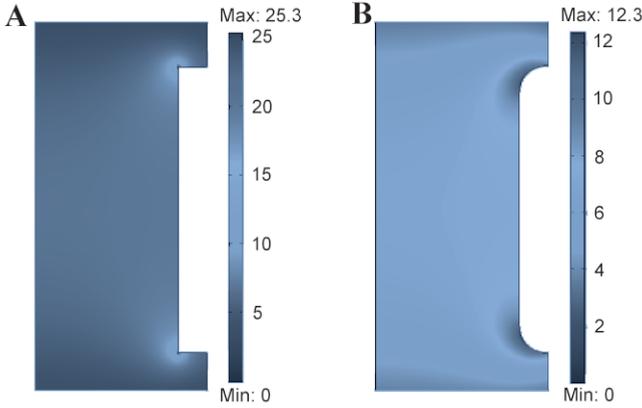
Condiciones de contorno utilizadas en las simulaciones numéricas. Las letras hacen referencia a la Figura V.4. V : voltaje (V). V_0 : voltaje inicial (V). σ : conductividad eléctrica (S/m). r : radio. T : temperatura (K). T_0 : temperatura inicial (K). q : flujo de calor (W/m^2). k : conductividad térmica ($W/m K$). ρ : densidad (kg/m^3). C_p : capacidad calorífica ($J/kg K$). u : velocidad de flujo (m/s). u_0 : velocidad de flujo media inicial. η : viscosidad dinámica (Pa s)

Módulos	Límite	Condiciones de contorno
Campo eléctrico	Electrodo de alto voltaje (A)	$V = V_0$
	Electrodo de tierra (C)	$V = 0$
	Aislante eléctrico (B,E,F)	$n \cdot \sigma \cdot \nabla V = 0$
	Eje axial (D)	$r = 0$
Calentamiento óhmico	Entrada (E)	$T = T_0$
	Aislante térmico (A,B,C,D,F)	$n \cdot q = 0$ $q = -k \nabla T + \rho \cdot C_p \cdot T \cdot u$
	Eje axial (D)	$r = 0$
Velocidad de flujo	Entrada (E)	$u = u_0$
	Salida (F)	$u = 0$ $-n \cdot \rho \cdot l + n \cdot \eta (\nabla u + (\nabla u)^T) = 0$
	Paredes (A,B,C)	$u = 0$
	Eje axial (D)	$r = 0$

En esta Tesis Doctoral, con objeto de optimizar y conseguir la mejor distribución del campo eléctrico posible, se utilizaron las relaciones matemáticas que se muestran en la Figura V.6. Estas se basan en los estudios de Lindgren y de Gerlach. Siguiendo dichas ecuaciones, los valores L , L_1 , R , R_1 y r utilizados en la construcción de las cámaras fueron de 2, 1,6, 1,2, 1 y 0,2 cm en la cámara de escala planta piloto y de 3, 2,4, 1,8, 1,5 y 0,3 en la cámara de escala bodega. En la Figura V.5B se muestra, a modo de ejemplo, la distribución del campo eléctrico en la cámara de escala planta piloto, optimizada según el procedimiento antes descrito, durante la aplicación de un pulso eléctrico cuadrado de 3 μs de anchura y de 19,6 kV de intensidad. Como se observa, el valor alcanzado en el punto central del eje axial fue de 7 kV/cm, mientras que en las esquinas redondeadas fue de 12,3 kV/cm; 13 kV/cm más bajo que en el caso de la simulación inicial (Figura V.5A). Esto, además de suponer una importante mejora en la distribución del campo eléctrico, evitó la presencia zonas de elevado campo eléctrico que podrían suponer problemas prácticos de incremento puntual de temperatura y la formación de arcos eléctricos.

■ FIGURA V.5

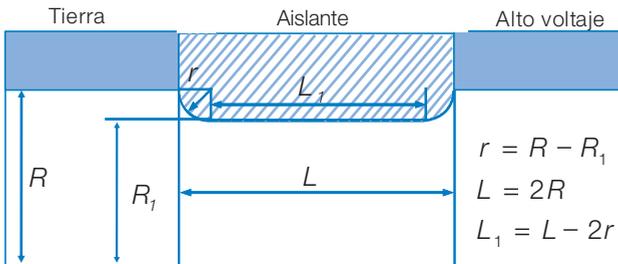
Distribución del campo eléctrico (kV/cm) en el diseño inicial (A) y en el diseño final tras la optimización (B) de la cámara de escala planta piloto durante la aplicación de un pulso de 3 μs de anchura y de 19,6 kV de amplitud



En la Figura V.7 se muestra la distribución del campo eléctrico en la cámara de escala bodega tras la optimización de sus dimensiones, durante la aplicación de un pulso eléctrico cuadrado de 3 μs de anchura y de 18 kV de amplitud. Como se observa, gracias al procedimiento presentado anteriormente, la distribución del campo eléctrico fue mucho mejor. En este caso, el valor alcanzado en el punto central fue de 4,3 kV/cm mientras que en las esquinas fue de 7,6 kV/cm.

■ FIGURA V.6

Dimensiones y ecuaciones utilizadas para la optimización de las cámaras colineales. Adaptado de Gerlach et al. (2008)



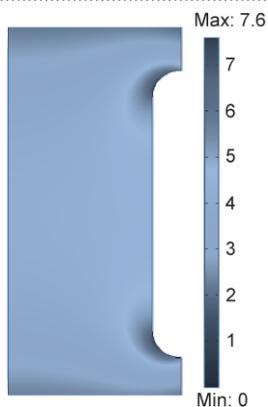
Simulación numérica de la velocidad de flujo

Con objeto de conocer las características del flujo en el interior de la cámara de tratamiento, se decidió también simularlo numéricamente mediante MEF. En este caso, el producto a tratar contenía sólidos en suspensión, lo que complica su simulación numérica.

Con objeto de simplificar matemáticamente el sistema, se decidió utilizar como producto un líquido homogéneo de características físicas similares a los granos de uva. Para realizar los cálculos, se indicó una velocidad de flujo media inicial del producto de 0,097 m/s en la cámara de escala planta piloto y de 0,66 m/s en la de escala bodega. En la Figura V.8 se muestra la velocidad en m/s en el interior de las dos cámaras de tratamiento. Como se observa, en ambas cámaras de tratamiento se produce una distribución de velocidades laminar. El número de Reynolds alcanzado no sobrepasó en ningún momento el valor de 2000-2300 necesario para considerar el flujo como turbulento (Jaeger et al., 2009a). Cabe destacar que, debido al estrechamiento producido en las zonas de tratamiento, la velocidad en el eje central de las mismas ascendió hasta los 0,255 y los 1,711 m/s en las cámaras de escala planta piloto y escala bodega, respectivamente

FIGURA V.7

Distribución del campo eléctrico (kV/cm) en el diseño final tras la optimización de la cámara de escala bodega durante la aplicación de un pulso de 3 μ s de anchura y de 18 kV de amplitud



Generalmente, en las zonas de unión de los electrodos con los aislantes, especialmente en aquellas situadas más cerca de la salida de la cámara de tratamiento, suelen detectarse recirculaciones importantes del producto. Así, diversos autores han detectado la presencia de las mismas y, como consecuencia, incrementos puntuales de la temperatura (Gerlach et al., 2008, Jaeger et al., 2009a). En las simulaciones numéricas realizadas en esta Tesis Doctoral, las recirculaciones detectadas fueron extremadamente pequeñas y sin implicaciones importantes. Esto podría explicarse debido a la alta viscosidad dinámica de la uva, 2 Pa, en comparación con la del agua, inferior a 0.001 Pa s, que es la utilizada en los trabajos publicados anteriormente.

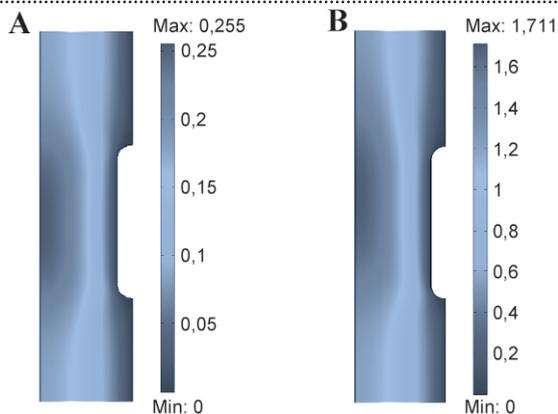
Simulación numérica de la temperatura

Finalmente, para completar la caracterización de las cámaras de tratamiento, se determinó la distribución de la temperatura en su interior. Para ello, se tuvo en cuenta la velocidad

de flujo del producto, la energía liberada debido a los tratamientos de PEAV y la temperatura inicial del producto (10°C).

■ FIGURA V.8

Distribución de la velocidad de flujo (m/s) en el interior de una de las zonas de tratamiento de la cámara de escala planta piloto (A) y de la cámara de escala bodega (B)



Como ya se ha comentado anteriormente, conocer la temperatura en el interior de la cámara se antoja capital dada la posibilidad de aumentos puntuales de la misma debido a la particular distribución del voltaje y del campo eléctrico en los diseños colineales. Estos aumentos, si son suficientemente grandes, pueden interferir en la eficacia de los PEAV e incluso favorecer la formación de arcos eléctricos. En la Figura V.9 se muestra la distribución de la temperatura en la segunda zona de tratamiento de la cámara de escala planta piloto y de la cámara de escala bodega, tras la aplicación respectivamente de un tratamiento de PEAV de 50 pulsos de 19,6 kV y de 20 pulsos de 18 kV. Estas fueron las condiciones de tratamiento más intensas que se utilizaron en esta Tesis Doctoral para cada una de las cámaras diseñadas. Como se observa, el incremento máximo de temperatura se determinó en la zona de unión entre el aislante y el electrodo más cercana a la salida de las cámaras. Estos aumentos de temperatura se produjeron debidos fundamentalmente a las pequeñas recirculaciones de producto descritas en el apartado anterior. En el caso de la cámara de escala planta piloto, el incremento fue de 28°C, mientras que en la cámara de escala bodega, debido al menor voltaje aplicado y a las mayores dimensiones de la misma, el incremento estimado fue de tan sólo 4°C.

La temperatura media teórica a la salida de la cámara de tratamiento fue de 12,07°C en la cámara de escala planta piloto y de 10,09°C en al cámara de escala bodega. Posteriormente, estas estimaciones fueron refrendadas mediante la medida real de las mismas, 11,9 y 10,2°C respectivamente.

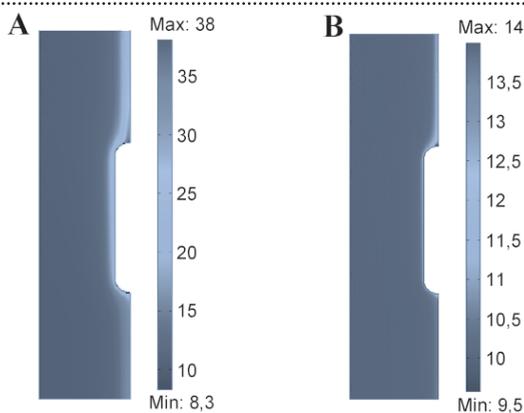
V.2.3.2.3. Cálculo del campo eléctrico de tratamiento

Una de las características que definen el diseño colineal es la falta de uniformidad del campo eléctrico. De esta manera, en un punto determinado de la zona de tratamiento el valor

del campo eléctrico es función de su posición dentro de la misma. Además, dada la imposibilidad de realizar una medida real del campo eléctrico aplicado, todo cálculo del mismo en esta clase de cámaras se basa en métodos matemáticos como la simulación numérica mediante MEF. Por todo ello, es complicado definir el tratamiento de PEAV aplicado cuando se utilizan diseños colineales. En esta Tesis Doctoral, de acuerdo a las directrices marcadas por Toepfl et al. (2007b), se decidió utilizar el campo eléctrico estimado en el punto central de la zona de tratamiento como el valor de campo eléctrico a utilizar para definir los tratamientos.

■ FIGURA V.9

Distribución de la temperatura (°C) en la segunda zona de tratamiento de la cámara de escala planta piloto (A) y de la cámara de escala bodega (B) tras la aplicación de un tratamiento de PEAV de 50 pulsos de 19,6 kV y de 20 pulsos de 18 kV, respectivamente. Temperatura inicial: 10°C. Anchura de pulso: 3µs



V.2.3.3. Condiciones de tratamiento

En las microvinificaciones de 10 kg realizadas para determinar las condiciones óptimas de tratamiento para las diferentes variedades de uva, se aplicaron 50 pulsos (tiempo de tratamiento: 150 µs) de una intensidad del campo eléctrico de 2, 5 y 7 kV/cm y a una frecuencia de 122 Hz (caudal 118 kg/h). Estos campos eléctricos se obtuvieron mediante la aplicación de voltajes de 5,5, 14,2 y 19,6 kV, respectivamente. Experimentos previos realizados en nuestro grupo de investigación demostraron que, a estas intensidades del campo eléctrico, un mayor número de pulsos no incrementaba sustancialmente la extracción de los compuestos fenólicos (López et al., 2008a). La energía específica total aplicada en los diferentes tratamientos a 2, 5 y 7 kV/cm fue, respectivamente, de 0,56, 3,67 y 6,76 kJ/kg. Para comprobar que los tratamientos aplicados no aumentaban la temperatura de la uva, ésta fue medida mediante sondas termopares tipo K (Crison Instruments) localizadas a la entrada y a la salida de la cámara de tratamiento. En todos los casos, el incremento de temperatura fue inferior a 2°C.

En las vinificaciones de 100 kg, las condiciones de tratamiento para cada variedad estudiada se fijaron en función de los resultados obtenidos en las microvinificaciones de 10 kg

y de los resultados presentes en la bibliografía (López et al., 2008a, 2008d, 2009c). Así, se aplicaron tratamientos de 50 pulsos de 5 kV/cm en las variedades Cabernet, Tempranillo, Syrah y Garnacha, y de 7 kV/cm en la variedad Merlot.

En lo que respecta al ensayo a escala bodega, el tratamiento aplicado fue de 20 pulsos a 4,3 kV/cm (voltaje seleccionado: 18 kV; tiempo de tratamiento: 60 μ s; energía específica: 4,86 kJ/kg) utilizando para ello una frecuencia de 209 Hz. Estas condiciones fueron las más cercanas al tratamiento óptimo de la variedad que se pudieron aplicar, en función de los límites físicos del equipo y de las características de la uva a tratar y, más específicamente, de su conductividad eléctrica (1,8 mS/cm).

V.2.4. ANÁLISIS DEL VINO

En esta sección, se detallan los análisis fisicoquímicos realizados a las uvas, mostos y vinos durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral (Tabla V.5). Todos los reactivos químicos utilizados para su realización fueron suministrados por Panreac, salvo cuando se indique expresamente lo contrario.

V.2.4.1. Determinaciones generales

V.2.4.1.1. Peso de 100 bayas, relación mosto/sólidos y diámetro medio de baya

Con objeto de caracterizar la uva, de las muestras iniciales se separaron 100 bayas de diferentes racimos y de diferentes posiciones dentro de los mismos. Éstas se pesaron (Balanza de precisión TE3102S, Sartorius, Sentmenat, España) y se midió el diámetro medio de 50 de ellas (Calibre digital, RS Amidata, Pozuelo de Alarcón, España). Finalmente, para determinar la relación mosto/sólidos, las uvas se estrujaron mediante una estrujadora manual.

V.2.4.1.2. Grados Brix y grado alcohólico probable

Siguiendo el protocolo de la Organización Internacional de la Viña y el Vino (OIV) (2000), los °Brix de los mostos, cantidad de sólidos solubles expresada en g/100mL, se determinaron mediante un refractómetro calibrado a una temperatura de 20°C (Digital refractometer PR-101 Palette, Atago, Tokio, Japón) utilizando agua destilada como blanco. A partir de los valores obtenidos, se calculó el grado alcohólico probable mediante una tabla de conversión (ICT, Lardero, España).

V.2.4.1.3. Densidad

La densidad de los mostos y vinos (g/L) se estableció utilizando un densímetro calibrado a 20°C (Verexa), siguiendo la metodología propuesta por la OIV (2000).

■ TABLA V.5

Análisis fisicoquímicos realizados a la uva, mostos y vinos en función de la vinificación y de la fase de procesado

	Análisis de la materia prima	Maceración/ Fermentación	Envejecimiento
Microvinificaciones de 10 kg	Peso de 100 bayas mosto/sólidos Diámetro de baya °Brix Grado alcohólico Densidad y pH Acidez total FAN Color (Glories) Antocianos totales IPT	Densidad Azúcares reductores Color (Glories) Antocianos totales IPT	
Vinificaciones de 100 kg	Peso de 100 bayas mosto/sólidos Diámetro de baya °Brix Grado alcohólico Densidad y pH Acidez total FAN Color (Glories) Antocianos totales IPT	Densidad Azúcares reductores Color (Glories) Antocianos totales Ácido L-málico IPT	pH Acidez total Acidez volátil Grado alcohólico Color (Glories) CIELAB Antocianos totales IPT IFC Taninos totales Fenoles por HPLC Análisis sensorial
Escala bodega	Peso de 100 bayas mosto/sólidos Diámetro de baya °Brix Grado alcohólico Densidad y pH Acidez total FAN Color (Glories) Antocianos totales IPT	Densidad Azúcares reductores Color (Glories) Antocianos totales IPT	

FAN: Nitrógeno fácilmente asimilable. IPT: Índice de polifenoles totales. IFC: Índice de Folin-Ciocalteu

V.2.4.1.4. pH

El valor de pH de los mostos y vinos se determinó según las indicaciones de la OIV (2000), mediante medida directa utilizando un pH-metro (modelo Basic 20+, Crison Instruments).

V.2.4.1.5. Acidez total

La acidez total, o también denominada acidez titulable, se obtuvo por valoración volumétrica con hidróxido sódico 0,1 M (OIV, 2000), expresándose los resultados en g/L de ácido tartárico.

V.2.4.1.6. Acidez volátil

La acidez volátil se determinó mediante el método propuesto por García-Tena (García-Barceló, 1976). Éste se basa en la separación diferencial de los ácidos volátiles del vino durante su ebullición mediante arrastre con vapor de agua. Estos se condensan posteriormente en un serpentín y se valoran con hidróxido sódico 0,02 M en presencia de fenoftaleina como indicador. Para realizar la determinación, se parte de 11 mL de vino, se desechan los 5,1 mL eluidos inicialmente y se valoran únicamente los 3,2 mL siguientes. Para determinar la acidez volátil de las muestras, se utiliza la siguiente expresión matemática:

$$g/L = V \cdot 0,366$$

donde g/L son los gramos de ácido acético por litro de vino; V es el volumen de hidróxido sódico 0,02 M utilizado en la valoración; 0,366 es un factor de corrección. Este factor tiene en cuenta las interferencias en la medida causadas por el SO_2 y el ácido láctico presente en el vino.

V.2.4.1.7. Ácido L-málico

En los vinos sometidos a fermentación maloláctica, se comprobó el fin de la misma mediante la determinación del ácido L-málico mediante un test enzimático comercial (L-Malic acid UV-method, r-biopharm, Dramstadt, Alemania) basado en la acción de la enzima L-malato deshidrogenasa.

V.2.4.1.8. Azúcares reductores

El contenido en azúcares reductores de los vinos, expresado en g/L , se determinó mediante el método de Rebelein (Rebelein, 1973) utilizando un kit comercial (VINIKIT). Este método se basa en las propiedades reductoras de la glucosa y la fructosa sobre una solución cupro-alcalina. En presencia de estos azúcares, el Cu^{2+} se reduce a Cu^+ en medio alcalino y en ebullición, valorándose posteriormente los iones Cu^{2+} en exceso. Con objeto de eliminar las posibles interferencias de los fenoles del vino, estos fueron eliminados previamente al análisis mediante una columna de 4 cm de polivinipirrolidona (Polygel W, AEB Group, San Paolo, Italia).

V.2.4.1.9. Nitrógeno fácilmente asimilable (FAN)

El protocolo utilizado para la determinación del nitrógeno fácilmente asimilable de los mostos fue descrito con anterioridad por Sanhueza (1999). Para llevar a cabo el análisis, se preparan 50 mL de vino y 20 mL de formaldehído al 40%, ajustando el pH de ambos a 8,5 con hidróxido sódico 1 N. Posteriormente, ambas soluciones se mezclan observándose una disminución del pH. Finalmente, la mezcla es valorada con hidróxido sódico 0,1 N hasta alcanzar nuevamente un pH de 8,5. Como indica la siguiente ecuación, la concentración de FAN se calcula multiplicando el volumen de hidróxido sódico gastado por 28:

$$mg/L = V \cdot 28$$

donde mg/L son los mg de nitrógeno por litro de mosto; V los mL de NaOH 0,1 N gastados en la valoración.

V.2.4.1.10. Grado alcohólico

El grado alcohólico (% v/v) son los litros de etanol y de sus homólogos (metanol, alcoholes superiores, etc.) contenidos en 100 L de vino, medidos ambos volúmenes a 20°C. En esta Tesis Doctoral, éste valor se determinó mediante la destilación del vino alcalinizado y la posterior medida de la densidad del destilado por aerometría (OIV, 2000). A 200 mL de vino se le añaden 10 mL de una solución de hidróxido cálcico a una concentración de 2 moles/L (VINIKIT). De la mezcla se destilan aproximadamente las $\frac{3}{4}$ partes de su volumen, el cual se completa con agua destilada hasta alcanzar los 200 mL iniciales. Finalmente, la mezcla se homogeniza y se mide su grado alcohólico mediante un alcoholímetro (Verexa).

V.2.4.2. Determinaciones espectrofotométricas

En los mostos y vinos, se analizaron los diversos índices espectrofotométricos que se detallan a continuación. Previamente a su análisis, las muestras fueron centrifugadas (6000 x g/10 min, Minispin®plus, Eppendorf, Hamburgo, Alemania) para eliminar los sólidos en suspensión y el CO₂ disuelto que pudiera estar presente. Las medidas se realizaron en un espectrofotómetro Unicam UV500 (Unicam, Cambridge, Inglaterra), utilizando cubetas de cuarzo (Hellma, Müllheim, Alemania) o de plástico (Sarstedt, Nümbrecht, Alemania) de 1, 2 y 10 mm de paso óptico.

V.2.4.2.1. Características cromáticas

Intensidad de color, tono y componente amarilla, roja y azul

La intensidad de color (IC) se determinó según el método de Glories (1984a, 1984b) a partir de la suma de las absorbancias a 420 nm (componente amarilla), 520 nm (componente roja) y 620 nm (componente azul) del mosto o del vino sin diluir, según se indica en la siguiente ecuación:

$$IC = (A_{420} + A_{520} + A_{620})$$

donde IC es la intensidad de color; A es la absorbancia a 420 nm, 520 nm y 620 nm, referidas a cubetas de 1 cm y utilizando agua destilada como blanco.

El tono (T) de las muestras (Sudraud, 1958) se calculó mediante el cociente entre las absorbancias (A) a 420 y 520 nm:

$$T = \frac{A_{420}}{A_{520}}$$

A partir de las tres absorbancias obtenidas se calculó también el porcentaje de componente amarilla, roja y azul en base a las siguientes ecuaciones:

$$\%Am = \frac{A_{420}}{IC} \cdot 100$$

$$\%R = \frac{A_{520}}{IC} \cdot 100$$

$$\%Az = \frac{A_{620}}{IC} \cdot 100$$

donde A es la absorbancia a 420 nm, 520 nm, o 620 nm según el subíndice; % A_m es el % de componente amarilla; % R es el porcentaje de componente roja; % A_z es el porcentaje de componente azul; IC es la intensidad de color.

CIELAB

Los parámetros CIELAB (a^* , b^* , L^* , C^* y h^*) fueron calculados a partir de las absorbancias determinadas a 450, 520, 570 y 630 nm, utilizando el programa MSCV desarrollado por las Universidades de La Rioja y Zaragoza (Pérez-Caballero et al., 2003). Las coordenadas obtenidas gracias al programa están referidas a un observador de 10° , un iluminante D65 y a cubetas de 2 mm. L^* (claridad o luminosidad) representa la coordenada cromática del espacio CIELAB que oscila del blanco al negro; a^* representa la coordenada que varía desde magenta a verde; b^* , la de amarillo a azul. A partir de estos valores, se obtienen los parámetros C^* (croma o saturación) y h^* (tono).

V.2.4.2.2. Compuestos fenólicos

Antocianos totales

El contenido en antocianos totales se determinó por el método de Puissant-León (Ruiz-Hernández, 2004). Para ello, se mezcla el vino o el mosto diluido en agua destilada (1/10) en una proporción 1/10 con ácido clorhídrico al 1%. A continuación, se mide la absorbancia a 520 nm de dicha mezcla en una cubeta de 1 cm de paso óptico, tras realizar un blanco con ácido clorhídrico al 1%. A partir de la absorbancia de la muestra se calcula el contenido en antocianos utilizando la siguiente ecuación:

$$mg/L = A_{520} \cdot 22,76 \cdot f$$

donde mg/L son los miligramos de antocianos expresados como malvidina-3-glucósido por litro de solución; A_{520} es la absorbancia obtenida a 520 nm; 22,76 es el factor de corrección aplicado para expresar los resultados como mg de malvidina-3-glucósido; f el factor de dilución (100).

Índice de polifenoles totales (IPT)

Este índice se basa en la lectura de la absorbancia a 280 nm del mosto o del vino diluido 100 veces con agua destilada, utilizando una cubeta de cuarzo de 1 cm de paso óptico (Ribéreau-Gayon et al., 2006b). El valor IPT se obtiene multiplicando la absorbancia obtenida (A_{280}) por el factor de dilución (f):

$$IPT = A_{280} \cdot f$$

Debido a su sencillez, este método es el utilizado normalmente en bodega para el seguimiento de la extracción fenólica durante la maceración-fermentación.

Índice de Folin-Ciocalteu (IFC)

El índice de Folin-Ciocalteu (Singleton y Rossi, 1965) es un método para determinar los polifenoles totales presentes en el vino o el mosto más preciso que el anterior. Éste se basa en la oxidación de los fenoles por acción del reactivo de Folin-Ciocalteu (mezcla de ácido fosfotúngstico y fosfomolibdico) que en medio alcalino produce una coloración azul directa-

mente proporcional al contenido fenólico, fácilmente medible a 750 nm. Para obtener el valor del índice, este valor de absorbancia (A_{750}) se multiplica por un factor de corrección, que en el caso del vino tinto posee un valor de 100:

$$IFC = A_{750} \cdot 100$$

Taninos totales

Los taninos totales se determinaron espectrofotométricamente (Ribéreau-Gayon, 2006b). Para realizar el análisis, en dos tubos de ensayo se adicionan 2 mL de vino diluido 1:50 con agua destilada, 1 mL de agua destilada y 6 mL de ácido clorhídrico 12 N. Uno de los tubos se protege de la luz y se calienta al baño María durante 30 minutos, mientras que el otro se mantiene a temperatura ambiente. Pasados los 30 minutos, se añade a ambos tubos 1 mL de etanol, se agitan y se determina su absorbancia a 550 nm en una cubeta de plástico de 1 cm de paso óptico, tras realizar un blanco con agua destilada. La concentración de taninos totales, expresada en g/L, se obtiene a partir de la siguiente ecuación:

$$T = (A_1 - A_2) \cdot 19,33$$

donde T corresponde a los taninos totales; A_1 y A_2 son los valores de absorbancia de los dos tubos. El coeficiente 19,33, correspondiente al coeficiente de extinción molar de una solución estandarizada de procianidinas oligoméricas, permite expresar el resultado en g/L del estándar.

V.2.4.3. Determinación de compuestos fenólicos por HPLC

La separación cromatográfica de los fenoles de los vinos y los mostos se llevó a cabo en un cromatógrafo líquido de alta eficacia Varian ProStar (Varian, Walnut Creek, California, EE.UU.) equipado con una bomba ternaria de impulsión ProStar 240, un inyector automático ProStar 410 y un detector de red de fotodiodos ProStar 335. El sistema está controlado mediante un programa informático (Star chromatography Workstation v.6.41, Varian). Para realizar los análisis, se utilizó una columna Microsorb-MV 100-5 C18 (25 cm x 0,46 cm x 5 μm de tamaño de partícula, Varian) con una precolumna del mismo material (5 cm x 0,46 cm x 5 μm de tamaño de partícula, Varian). La temperatura tanto de la columna como de la precolumna se mantuvo a 40°C durante la realización de los análisis gracias al horno que incorpora el inyector automático.

Se utilizó un gradiente de elución (Tabla V.6) consistente en ácido fórmico al 5% (A) y acetonitrilo (B), a un flujo de 1 mL/min. Previamente a su análisis, las muestras fueron filtradas utilizando filtros de jeringuilla estériles de acetato de celulosa de 0,2 μm de tamaño de poro (VWR, West Chester, Pensilvania, EE.UU.). El volumen de inyección fue de 10 μL . Cada muestra se inyectó por duplicado.

Se registraron los cromatogramas obtenidos a 280, 320, 360 y 520 nm, con objeto de cuantificar respectivamente los flavan-3-oles y el ácido gálico, los ácidos hidroxicinámicos y sus derivados, los flavonoles y finalmente los antocianos monómeros.

■ TABLA V.6

Condiciones cromatográficas. A: ácido fórmico al 5%. B: acetonitrilo

Tiempo (min)	% A	% B
0	98	2
25	94	6
40	85	15
52	80	20
70	60	40
80	0	100
83	98	2
103	98	2

Cuando fue posible, la identificación de los distintos fenoles se estableció de acuerdo al tiempo de retención y al espectro UV-visible de los estándares comerciales (quercetina-3-glucósido, miricetina, quercetina, kamferol e isorhamnetina (Fluka, Buchs, Suiza); ácido gálico, ácido cafeico, ácido *p*-cumárico, (+)-catequina y (-)-epicatequina (Sigma-Aldrich, San Luis, Misuri, EE.UU.); kamferol-3-glucósido y isorhamnetina-3-glucósido (Extrasynthèse, Genay, Francia). En el caso de que no se dispusiera de los estándares, la identificación se realizó tentativamente en función del orden de elución y de las características espectrales publicadas en la literatura (Alcalde-Eon et al., 2006; de Villiers et al., 2004; Gómez-Alonso et al., 2007; Hermosín-Gutiérrez et al., 2005; Lamuela-Raventós y Warehouse, 1994; Monagas et al., 2005b).

La cuantificación de los compuestos de los cuales se disponía estándar se llevó a cabo mediante las respectivas curvas de calibración. Éstas se obtuvieron utilizando las concentraciones habituales presentes en el vino. En el caso de los compuestos de los cuales no se disponía estándar, la cuantificación se realizó mediante las curvas de calibración del estándar más similar: el cloruro de malvidina (Sigma-Aldrich) para los antocianos monómeros, la quercetina-3-glucósido para la miricetina-3-glucósido, el ácido cafeico para el ácido *t*-caftárico, y el ácido *p*-cumárico para el ácido *t*-cutárico. Todas las concentraciones se expresaron en mg/L.

V.2.4.4. Análisis sensorial

En esta Tesis Doctoral, se realizaron análisis sensoriales del vino joven de la variedad Cabernet tras 4 meses en botella y del vino crianza (6 meses) de la misma variedad tras 8 meses en botella. En ambos casos, los vinos fueron evaluados siguiendo un diseño completamente aleatorio. Las sesiones de cata se realizaron en boxes individuales en la sala de catas de la Planta Piloto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos de la Universidad de Zaragoza. En todos los casos, a partir de los resultados se realizó el estudio estadístico apropiado para determinar el grado de significancia de las diferencias (Minitab®, Minitab, State Collage, Pensilvania, EE.UU.).

De los vinos jóvenes, se realizó un análisis descriptivo general (intensidad de color, astringencia, bouquet, flavor y evaluación global). Los vinos fueron evaluados por un panel de 18 catadores, compuesto por estudiantes de Enología de la Licenciatura de Ciencia y Tecnología de los Alimentos de la Universidad de Zaragoza, y por miembros del Área de Tecnología de

los Alimentos de la misma Universidad. Los catadores cuantificaron la magnitud de cada uno de los descriptores de 0 (muy bajo) a 5 (muy alto). En la Figura V.10 se muestra un ejemplo de las hojas de catas utilizadas.

En la evaluación sensorial de los vinos tintos de crianza, se realizaron pruebas triangulares. El análisis triangular consiste en presentar al catador tres muestras codificadas, dos de las cuales son iguales. El catador debe indicar cuál de las tres es diferente. En este caso, el panel de catadores estuvo compuesto por miembros del grupo de investigación "Laboratorio de Análisis de Aroma y Enología" del Departamento de Química Analítica de la Universidad de Zaragoza.

FIGURA V.10

Ejemplo de ficha de cata descriptiva utilizada en el análisis sensorial de los vinos jóvenes



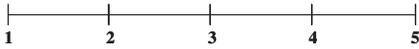
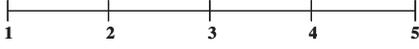
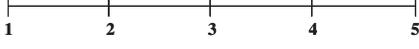
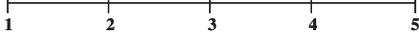
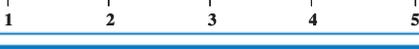
Universidad de Zaragoza

Planta Piloto de Ciencia y Tecnología
de los Alimentos



Nombre y Apellidos.....
Sexo.....Edad.....Fecha.....

Deguste la muestra 559 y evalúe de 1 (muy bajo) a 5 (muy alto) su intensidad de color, astringencia, bouquet y flavor. Finalmente, indique el grado de satisfacción global que le produce. Marque con una X.

Intensidad de Color	Comentarios:
	
Astringencia	Comentarios:
	
Bouquet	Comentarios:
	
Flavor	Comentarios:
	
Evaluación global	Comentarios:
	

V.2.5. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

V.2.5.1. Modelización de las curvas de extracción

Las curvas de extracción de las sustancias fenólicas totales y de los antocianos totales obtenidas en las vinificaciones de 10 kg fueron descritas matemáticamente con el fin de determinar las condiciones óptimas de tratamiento. Para ello, se utilizó la siguiente ecuación matemática utilizada habitualmente para describir la extracción de diversos compuestos intracelulares de interés (López et al., 2009a, 2009b; Spigno et al., 2007; Vorobiev y Lebovka, 2006):

$$Y_t = Y_{max} \cdot (1 - e^{-kt})$$

donde Y_t es la extracción a tiempo t (min); Y_{max} es la concentración en equilibrio ($t=\infty$); k (min^{-1}) es un parámetro relacionado con la velocidad de extracción. Con objeto de determinar la calidad de los ajustes, se calculó el coeficiente de determinación (R^2) y la raíz del error cuadrático medio (RECM) (Baranyi et al., 1999). Mientras que el R^2 informa sobre la proporción de la variabilidad total que explica el modelo elegido, el RECM puede considerarse como el promedio de la discrepancia entre los valores observados y los estimados por el modelo.

V.2.5.2. Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos fue realizado mediante análisis de varianza (ANOVA). El grado de significación de las diferencias de cada factor estudiado fue calculado para un nivel de significación (α) de 0,05 mediante el test de Tukey. Los análisis estadísticos, así como los ajustes del modelo a las curvas de extracción, fueron llevados a cabo con los programas informáticos Excel XP (Microsoft Corporation, Seattle, Washington DF, EE.UU.), GraphPad PRISM® (GraphPad Software, San Diego, California, EE.UU.) y Minitab® (Minitab, State Collage, Pensilvania, EE.UU.).

V.3. Resultados y discusión

V.3.1. ANTECEDENTES: APLICACIÓN DE LOS PEAV A ESCALA DE LABORATORIO

El uso de los PEAV para acelerar e incrementar la extracción fenólica en la elaboración de vino tinto ha sido previamente estudiado en nuestro grupo de investigación (López et al., 2008a, 2008d, 2009c). Estos estudios iniciales fueron conducidos a escala de laboratorio, utilizando para ello una cámara de tratamiento de electrodos paralelos que permitía la aplicación de los tratamientos de PEAV en condiciones estáticas. Esta cámara constaba de dos electrodos cilíndricos de acero inoxidable de 19,64 cm^2 de superficie, separados 1 cm mediante un cuerpo de metacrilato. Con estas dimensiones, la cámara utilizada permitía el tratamiento de alrededor de 20 g de uva, previamente despalillada y estrujada (López, 2008b). Para la aplicación de los tratamientos, se utilizó un generador de pulsos eléctricos de caída exponencial.

Mediante este sistema, se demostró que la tecnología de los PEAV permite obtener vinos recién fermentados con una mayor intensidad de color (IC), contenido antocianico (CA) e índice de polifenoles totales (IPT) (López et al., 2008a, 2008d, 2009c). A modo de resumen,

en la Tabla V.7 se muestra el efecto de la aplicación de distintos tratamientos de PEAV sobre los hollejos de la uva en la IC, el CA y el IPT de vinos tintos de diferentes variedades obtenidos mediante este sistema de escala de laboratorio.

■ TABLA V.7

Mejoras obtenidas en la intensidad de color (ΔCI), contenido antocianico (ΔAC) e índice de polifenoles totales (ΔTPI) en los vinos obtenidos mediante la aplicación de PEAV de caída expoencial con un equipo de escala laboratorio

Variedad	Condiciones de tratamiento	ΔCI (%)	ΔAC (%)	ΔTPI (%)
<i>Cabernet Sauvignon</i> ¹	5 kV/cm; 50 pulsos; 2,1 kJ/kg	48	43	45
	10 kV/cm; 50 pulsos; 6,7 kJ/kg	23	26	24
<i>Tempranillo</i> ²	5 kV/cm; 50 pulsos; 1,8 kJ/kg	13	15	18
	2 kV/cm; 50 pulsos; 0,4 kJ/kg	26	11	18
<i>Garnacha</i> ³	5 kV/cm; 50 pulsos; 1,8 kJ/kg	21	32	14
	10 kV/cm; 50 pulsos; 6,7 kJ/kg	29	24	16
<i>Graciano</i> ³	2 kV/cm; 50 pulsos; 0,4 kJ/kg	19	18	14
	5 kV/cm; 50 pulsos; 1,8 kJ/kg	12	14	13
	10 kV/cm; 50 pulsos; 6,7 kJ/kg	6	7	12
<i>Mazuelo</i> ³	2 kV/cm; 50 pulsos; 0,4 kJ/kg	29	16	14
	5 kV/cm; 50 pulsos; 1,8 kJ/kg	51	36	31
	10 kV/cm; 50 pulsos; 6,7 kJ/kg	61	38	36

1: López et al. (2009c). 2: López et al. (2008a). 3: López et al. (2008d)

Como se observa, en todos los casos se aplicaron 50 pulsos, variando únicamente la intensidad del campo eléctrico de 2 a 10 kV/cm y, por lo tanto, la energía específica de los tratamientos de 0,4 a 6,7 kJ/kg. Resultados previos demostraron que un mayor número de pulsos no mejoraba sustancialmente la extracción fenólica (López, 2008b). De manera general, se determinó que la aplicación de los PEAV es más efectiva cuanto mayor es la intensidad del campo eléctrico aplicada, excepto en la variedad Graciano, en la que los mejores resultados se obtuvieron aplicando el tratamiento menos intenso (2 kV/cm y 0,4 kJ/kg). Además, se observó que el efecto de los PEAV es dependiente en gran medida de la variedad. Así, los mejores resultados se obtuvieron en las vinificaciones de las variedades Cabernet Sauvignon y Mazuelo. De manera general, considerando el tratamiento de PEAV óptimo para cada variedad, la aplicación de los PEAV permitió aumentar la IC entre un 19 y un 61%, el CA entre un 18 y un 43%, y el IPT entre un 14 y un 45%. Fruto de estas investigaciones, se constató el importante potencial de la tecnología de los PEAV para obtener vinos con elevado contenido fenólico o para acortar el tiempo de maceración necesario para obtener un nivel fenólico determinado. Si bien los resultados obtenidos en estas investigaciones fueron altamente prometedores, el equipo utilizado distaba en gran medida de las condiciones necesarias para plantear la posible aplicación de la tecnología en las bodegas. Además, los datos fueron obtenidos en microvinificaciones de 200 mL y era necesario comprobar que los efectos observados justo tras la fermentación se mantenían durante el envejecimiento del vino.

V.3.2. APLICACIÓN DE LOS PEAV A ESCALA PLANTA PILOTO

V.3.2.1. Evaluación de la aplicación de los PEAV a escala planta piloto

Con el fin de estudiar la viabilidad de la aplicación de los PEAV en continuo para mejorar la extracción fenólica en la elaboración del vino tinto, en esta Tesis Doctoral se desarrolló un sistema a escala planta piloto que permite la aplicación de tratamientos de PEAV de una intensidad del campo eléctrico de hasta 7 kV/cm, utilizando una velocidad de flujo de 118 kg/h. Para ello, se diseñó y construyó una cámara de tratamiento colineal basada en un diseño previo de Toepfl et al. (2007b). Las principales características de la misma, así como las del generador de PEAV de onda cuadrada utilizado, se muestran en la sección de Material y Métodos de este Capítulo.

En un primer momento, para establecer las condiciones de tratamiento por PEAV en flujo continuo con el equipo desarrollado, se decidió estudiar la cinética de extracción de sustancias antociánicas y de fenoles totales, realizando vinificaciones de 10 kg de tres variedades de uva, Cabernet Sauvignon, Merlot y Syrah (Puértolas et al, 2010a). Con objeto de poder comparar los resultados con aquellos obtenidos a escala de laboratorio (López et al., 2008a, 2008d, 2009c), los hollejos estuvieron en contacto con el mosto durante toda la fermentación. En la Figura V.11, se muestran, a modo de ejemplo, las curvas de extracción de antocianos y de fenoles totales durante el proceso de maceración-fermentación del vino procedente de uvas de la variedad Cabernet Sauvignon tratadas y sin tratar por PEAV. En general, la evolución de ambos parámetros fue similar en el control y en las muestras tratadas. En todos los casos, se constató un incremento rápido de los índices analizados hasta alcanzar un valor máximo tras el cual se mantuvieron más o menos constantes. Como se observa, todos los tratamientos de PEAV aplicados (2, 5 y 7 kV/cm; 50 pulsos) permitieron mejorar la extracción de antocianos y de fenoles totales. Sin embargo, de manera similar a lo observado con la variedad Graciano en los tratamientos en estático, la mejora no aumentó con la intensidad del tratamiento, siendo el tratamiento óptimo el de 5 kV/cm y 50 pulsos.

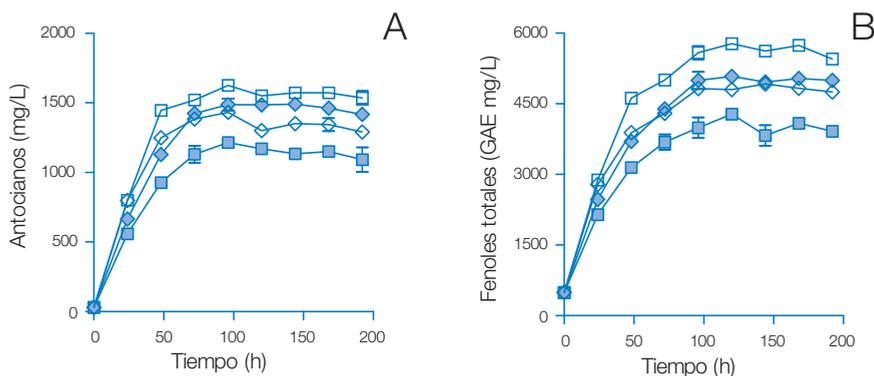
A modo de resumen, en la Tabla V.8 se muestra, de manera análoga a la Tabla V.7, la mejora en la IC, el CA y el IPT de los vinos tintos obtenidos mediante el equipo de PEAV de escala planta piloto desarrollado en esta Tesis Doctoral. Como se puede observar, en la variedad Cabernet Sauvignon la aplicación de un tratamiento de PEAV de 5 kV/cm y 50 pulsos permitió obtener una mejora en la IC, el CA y el IPT de un 32, un 34 y un 40%, respectivamente. Estos valores son algo más bajos que los obtenidos previamente en condiciones estáticas a escala de laboratorio en la misma variedad. Las diferencias observadas pueden ser achacadas a la distinta procedencia de la uva, a las diferencias existentes entre las distintas añadas y a los distintos equipos generadores de PEAV utilizados.

Con objeto de completar el estudio varietal inicialmente desarrollado por López et al. (2008a, 2008d, 2009c), se decidió estudiar dos variedades de importante y consolidado arraigo en las zonas productoras de Aragón, como son las variedades Merlot y Syrah. Mientras que en el caso de la variedad Merlot las condiciones óptimas de tratamiento fueron las más intensas ensayadas (7 kV/cm; 50 pulsos), en Syrah, al igual que en Cabernet Sauvignon, el tratamiento que mejores resultados arrojó fue el de 50 pulsos de 5 kV/cm, aunque la diferencia con el tratamiento de 2 kV/cm fue escasa. En ambos casos, en las condiciones óptimas de tratamiento, las mejoras obtenidas en la IC, el CA y en el IPT se situaron, en valor medio, alrededor del 9%. Estas mejoras distan en gran medida de las obtenidas para otras

variedades estudiadas, enfatizando más si cabe la importancia de la variedad en el efecto de los PEAV.

■ FIGURA V.11

Evolución de la extracción de los antocianos (A) y de los fenoles totales (B) durante la maceración-fermentación de los vinos tintos de la variedad Cabernet Sauvignon controles (■) y de los obtenidos mediante diferentes tratamientos de PEAV: 2 kV/cm; 50 pulsos (♦), 5 kV/cm; 50 pulsos (□) y 7 kV/cm; 50 pulsos (◇)



V.3.2.2. Efecto de los PEAV en la evolución cromática y fenólica del vino tinto

Una vez demostrada la posibilidad del tratamiento de PEAV a la uva en flujo continuo, el siguiente paso acometido en esta Tesis Doctoral fue estudiar si las mejoras obtenidas tras la fermentación se mantenían durante el resto del proceso de elaboración del vino hasta su consumo (Puértolas et al., 2010b, 2010c, 2010d). En este caso, se realizaron vinificaciones de 100 kg de uva de la variedad Cabernet Sauvignon, aplicando el tratamiento óptimo determinado en el Manuscrito I, 50 pulsos de 5 kV/cm.

En esta parte de la Tesis Doctoral, la duración de la maceración se estableció en función de la extracción fenólica verificada durante la maceración. Así, mientras que en los vinos control la duración de la maceración fue de 144 horas, la de los vinos tratados por PEAV fue de 96 horas. Por lo tanto, ésta se acortó en 48 horas. Además, los vinos obtenidos mediante PEAV mostraron al final de la fermentación mayor contenido fenólico que los controles (Puértolas et al., 2010b). Estos resultados confirman los obtenidos por Lopez et al. (2009c) a escala de laboratorio. La utilización de maceraciones más cortas podría facilitar la rotación de depósitos de fermentación en las bodegas, mejorando el aprovechamiento del volumen útil de los depósitos y el control de la temperatura de fermentación, disminuyendo el riesgo de parada fermentativa.

■ TABLA V.8

Mejoras obtenidas en la intensidad de color (ΔCI), contenido antociánico (ΔAC) e índice de polifenoles totales (ΔTPI) en los vinos obtenidos mediante la aplicación de PEAV de onda cuadrada con un equipo de escala planta piloto. (Puértolas et al., 2010a)

Variedad	Condiciones de tratamiento	ΔCI (%)*	ΔAC (%)	ΔTPI (%)
<i>Cabernet Sauvignon</i>	2 kV/cm; 50 pulsos; 0,6 kJ/kg	19	29	26
	5 kV/cm; 50 pulsos; 3,7 kJ/kg	32	34	40
	7 kV/cm; 50 pulsos; 6,8 kJ/kg	18	16	19
<i>Merlot</i>	2 kV/cm; 50 pulsos; 0,6 kJ/kg	0	0	7
	5 kV/cm; 50 pulsos; 3,7 kJ/kg	2	0	6
	7 kV/cm; 50 pulsos; 6,8 kJ/kg	8	7	13
<i>Syrah</i>	2 kV/cm; 50 pulsos; 0,6 kJ/kg	5	8	9
	5 kV/cm; 50 pulsos; 3,7 kJ/kg	6	8	10
	7 kV/cm; 50 pulsos; 6,8 kJ/kg	2	3	5

*Datos no publicados

En un primer momento, se estudió la evolución del contenido antociánico y del IPT desde el fin de la fermentación hasta los 4 meses de almacenamiento en botella (Figura V.12), así como de los principales parámetros cromáticos (Tabla V.9). Como se observa, las mejoras obtenidas debido al tratamiento de PEAV se mantuvieron, en general, durante la fermentación maloláctica, tras el embotellado y tras los 4 meses de almacenamiento en botella. Con objeto de caracterizar los vinos, tras los 4 meses de almacenamiento se realizó un análisis físico-químico general, incluyendo grado alcohólico, pH, acidez total y volátil, azúcares reductores, TPI, antocianos totales, taninos y polifenoles individuales mediante HPLC (Tabla V.10 y Tabla V.11). Aunque existieron diferencias en el grado alcohólico, pH, acidez total, acidez volátil y concentración de azúcares reductores entre los vinos, éstas no poseían significado enológico importante. Tras los 4 meses de almacenamiento, el vino obtenido mediante PEAV presentó una IC, TPI, contenido antociánico y una concentración de taninos un 27, un 18, un 10 y un 23% mayor que el vino control. Por su parte, el análisis HPLC de las sustancias fenólicas desveló que los perfiles fenólicos del vino tratado por PEAV y el control fueron similares, por lo que se puede deducir que los tratamientos de PEAV no afectan de manera específica a una determinada familia de sustancias fenólicas, aumentando la concentración de todas ellas de una manera similar. López et al. (2009c) obtuvieron resultados similares en el estudio del perfil antociánico de los vinos de Cabernet Sauvignon tratados mediante PEAV a escala de laboratorio.

■ TABLA V.9

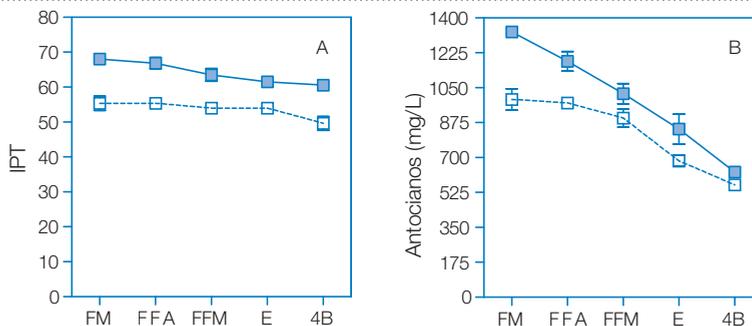
Parámetros cromáticos de los vinos controles y los tratados por PEAV registrados al final de la fermentación alcohólica (FFA), al final de la fermentación maloláctica (FFM), en el embotellado (E) y tras 4 meses de almacenamiento en botella (4B)

	FFA		FFM		E		4B	
	Control	PEAV	Control	PEAV	Control	PEAV	Control	PEAV
<i>Cl</i>	21.84 ^a	29.17 ^b	19.98 ^c	27.12 ^d	18.21 ^{cd}	25.28 ^e	17.82 ^f	24.61 ^e
<i>Tint</i>	0.42 ^a	0.39 ^b	0.52 ^c	0.46 ^d	0.57 ^e	0.51 ^c	0.59 ^e	0.52 ^c
<i>%Ye</i>	26.84 ^a	25.49 ^b	30.01 ^c	27.90 ^d	31.73 ^e	29.77 ^c	32.11 ^e	29.73 ^c
<i>%Rd</i>	63.58 ^a	65.10 ^b	57.93 ^{cd}	60.83 ^d	55.91 ^e	58.30 ^c	54.66 ^e	57.40 ^f
<i>%Bl</i>	9.58 ^a	9.41 ^a	12.07 ^{bd}	11.27 ^c	12.36 ^b	11.93 ^d	13.23 ^b	12.87 ^f
<i>a*</i>	61.43 ^a	58.33 ^b	57.58 ^c	55.99 ^d	55.81 ^d	54.90 ^e	54.54 ^f	54.15 ^f
<i>b*</i>	15.55 ^a	23.60 ^b	6.50 ^c	19.85 ^d	11.78 ^e	18.88 ^f	10.52 ^g	16.34 ^h
<i>L*</i>	33.35 ^a	27.45 ^b	36.65 ^c	25.95 ^d	34.70 ^e	26.50 ^d	34.30 ^e	25.95 ^d
<i>C*</i>	63.37 ^a	62.93 ^a	57.95 ^b	59.40 ^c	57.05 ^d	58.06 ^b	55.54 ^e	56.57 ^f
<i>h*</i>	14.21 ^a	22.03 ^b	6.44 ^c	19.52 ^d	11.84 ^e	18.98 ^d	10.92 ^f	16.79 ^g

Diferentes letras en la misma fila indican diferencias significativas ($p < 0.05$)

■ FIGURA V.12

Evolución del índice de polifenoles totales (IPT) (A) y del contenido antocianico (B) durante la vinificación y la maduración de los vinos obtenidos de uva sin tratar (□) y de uva tratada por PEAV (■). FM: fin de la maceración; FFA: fin de la fermentación alcohólica; FFM: fin de la fermentación maloláctica; E: embotellado; 4B: 4 meses de almacenamiento en botella



Posteriormente, debido a la importancia del proceso de envejecimiento del vino en la estabilización del color y en la producción de vinos de calidad, se decidió estudiar la evolución del color y de los principales compuestos fenólicos, antocianos monómeros, flavan-3-oles, ácidos hidroxicinámicos y flavonoles, durante el envejecimiento en botella, así como durante el envejecimiento en bodega de roble (Puértolas et al., 2010c, 2010d).

■ TABLA V.10

Características químicas de los vinos tras 4 meses de almacenamiento en botella

	Control	PEAV
<i>Etanol (% v/v)</i>	12.90 ^a	12.80 ^b
<i>pH</i>	3.37 ^a	3.27 ^b
<i>Acidez total (g AT/L)¹</i>	4.84 ^a	5.14 ^b
<i>Acidez volátil (g AA/L)²</i>	0.29 ^a	0.30 ^a
<i>Azúcares reductores (g/L)</i>	1.60 ^a	1.80 ^b
<i>IPT (OD 280 nm)</i>	49.61 ^a	60.57 ^b
<i>Índice de Folin-Ciocalteu</i>	47.62 ^a	56.73 ^b
<i>Antocianos (OD 520 nm)</i>	562.49 ^a	626.62 ^b
<i>Antocianos (Método sulfito)</i>	550.42 ^a	598.33 ^b
<i>Taninos (g/L)</i>	1.88 ^a	2.44 ^b

¹ Expresado como ácido tartárico (AT)² Expresado como ácido acético (AA)

Diferentes letras en la misma fila indican diferencias significativas (p<0.05)

Como se observa en la Figura V.13, las diferencias en la IC entre el vino control y el elaborado mediante PEAV obtenidas tras el embotellado permanecieron constantes durante 12 meses de envejecimiento en botella. Tanto en el vino control como el obtenido mediante PEAV, los antocianos fueron la familia de compuestos predominante, representando en el momento del embotellado alrededor del 77% de la concentración fenólica total. Todas las sustancias fenólicas investigadas siguieron un patrón de evolución similar (Figura V.14). La concentración total de antocianos, flavan-3-oles, ácidos hidroxicinámicos y flavonoles decreció a lo largo de los 12 meses de envejecimiento. Tras finalizar los 12 meses en botella, mientras que la concentración de antocianos monómeros fue similar en ambos vinos, la concentración de flavan-3-oles, flavonoles y ácidos hidroxicinámicos fue mayor en los vinos obtenidos mediante PEAV. Similares resultados se obtuvieron cuando se estudió la evolución de las características cromáticas y fenólicas del vino control y el obtenido mediante PEAV tras 6 meses de envejecimiento en bodega y 8 meses de posterior almacenamiento en botella (Puértolas et al., 2010d). De acuerdo a estos estudios, la tecnología de los PEAV es una prometedora técnica enológica para conseguir el alto contenido fenólico necesario en la producción de vinos envejecidos de alta calidad.

■ TABLA V.11

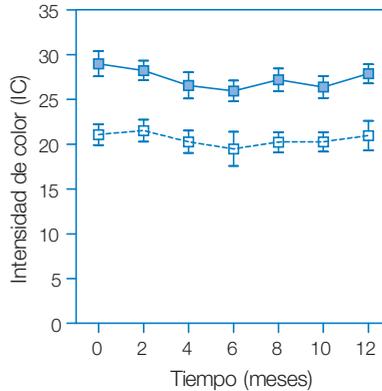
Concentraciones en mg/L de los distintos compuestos fenólicos detectados en los vinos tras 4 meses de almacenamiento en botella

	Control	PEAV	
<i>Antocianos</i>	Delphinidin-3-glucoside	7.87 ^a	7.94 ^a
	Cyanidin-3-glucoside	0.87 ^a	0.97 ^b
	Petunidin-3-glucoside	9.11 ^a	11.13 ^b
	Peonidin-3-glucoside	4.19 ^a	4.16 ^a
	Malvidin-3-glucoside	107.26 ^a	133.31 ^b
	Delphinidin-3-acetylglucoside	2.49 ^a	2.53 ^a
	Cyanidin-3-acetylglucoside	1.17 ^a	1.21 ^a
	Petunidin-3-acetylglucoside	3.08 ^a	3.56 ^a
	Peonidin-3-acetylglucoside	2.35 ^a	3.15 ^b
	Malvidin-3-acetylglucoside + Delphinidin-3-p-coumaroylglucoside	53.64 ^a	62.77 ^b
	Cyanidin-3-p-coumaroylglucoside	0.79 ^a	0.83 ^a
	Petunidin-3-p-coumaroylglucoside	0.95 ^a	0.99 ^a
	Peonidin-3-p-coumaroylglucoside	0.96 ^a	1.05 ^a
Malvidin-3-p-coumaroylglucoside	8.59 ^a	10.97 ^b	
<i>Flavan-3-oles</i>	(+)-Catechin	23.08 ^a	32.64 ^b
	(-)-Epicatechin	19.56 ^a	21.73 ^b
<i>Flavonoles</i>	Myricetin-3-glucoside	7.13 ^a	8.25 ^b
	Quercetin-3-glucoside	10.10 ^a	13.38 ^b
	Isorhamnetin-3-glucoside	2.34 ^a	3.11 ^b
	Kaempferol-3-glucoside	nc	nc
	Myricetin	0.84 ^a	1.04 ^b
	Quercetin	nc	nc
	Isorhamnetin	nd	nd
<i>Ácidos</i>	Kaempferol	nd	nd
	Gallic acid	25.56 ^a	30.93 ^b
	t-Caftaric acid	18.59 ^a	23.64 ^b
	t-Coutaric acid	6.45 ^a	6.77 ^b
	Caffeic acid	0.45 ^a	1.18 ^b
	p-Coumaric acid	0.38 ^a	0.48 ^b

nd: nod electado. nc: no cuantificado. Different letters in the same row indicate significant differences (p<0.05)

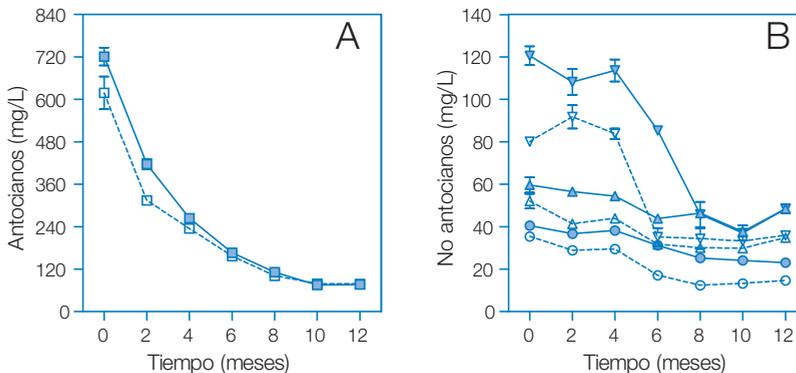
■ FIGURA V.13

Evolución de la intensidad de color (IC) del vino control (□) y del vino obtenido a partir de uva tratada por PEAV (■) durante 12 meses de almacenamiento en botella



■ FIGURA V.14

Evolución del contenido antocianico (■, □) (A), y de la concentración de flavan-3-oles (▼, ▽), ácidos hidroxicinámicos (●, ○) y flavonoles (▲, △) (B) durante 12 meses de almacenamiento en botella. Los símbolos huecos y rellenos se corresponden respectivamente con vino control y con el vino obtenido a partir de uva tratada por PEAV



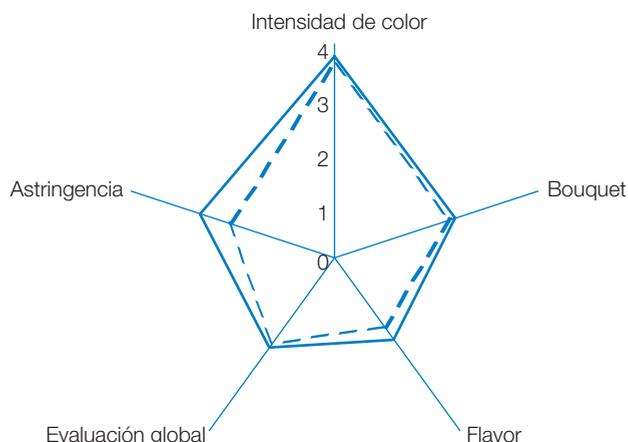
V.3.2.3. Efecto de los PEAV en las características sensoriales del vino tinto

En los estudios preliminares de la aplicación de los PEAV realizados a escala de laboratorio, López et al. (2009c) no observaron cambios apreciables en las características sensoriales de los vinos tintos tras la fermentación. Con objeto de completar estos resultados, se decidió evaluar sensorialmente los vinos tintos Cabernet Sauvignon tras 4 meses de almacenamiento en botella (Figura V.15) (Puértolas et al., 2010b). Los descriptores utilizados fueron intensidad

de color, astringencia, bouquet, flavor y evaluación global. No se determinaron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre los vinos. Sin embargo, el vino obtenido mediante PEAV mostró mayor astringencia y flavor. Esto podría ser explicado debido a la mayor cantidad de compuestos fenólicos presentes en el vino PEAV. Los vinos envejecidos en barrica de roble también fueron sometidos a análisis sensorial tras 8 meses de almacenamiento en botella, no detectándose diferencias entre ellos (Puértolas et al., 2010d). Como resultado de estos análisis, también cabe destacar que los catadores no detectaron ningún aroma o sabor extraño asociado al tratamiento de PEAV.

FIGURA V.15

Valores obtenidos en el análisis sensorial de los vinos elaborados a partir de uva tratada por PEAV (—) y sin tratar (---), tras 4 meses de almacenamiento en botella. Descriptores: intensidad de color, astringencia, bouquet, flavor y evaluación global



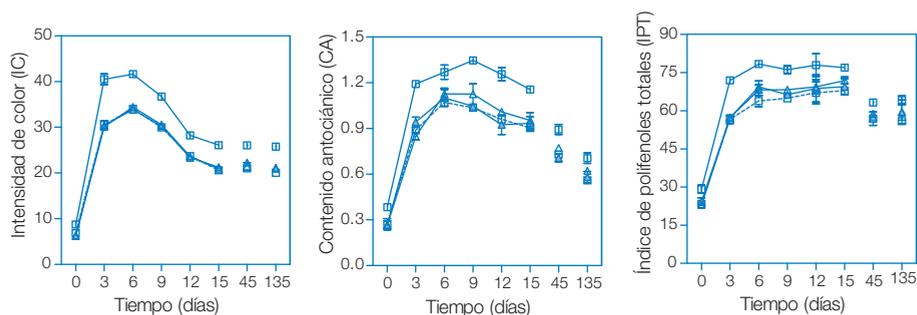
V.3.2.4. Comparación de los PEAV con el uso de enzimas pectolíticas

En esta Tesis Doctoral, la aplicación de los PEAV para mejorar la extracción fenólica se comparó con una de las técnicas enológicas más extendidas en las bodegas para conseguir este fin: el uso de enzimas pectolíticas (Puértolas et al., 2009b). Para ello, se estudió el efecto de la adición de 2 preparados enzimáticos comerciales y del tratamiento de PEAV óptimo (5 kV/cm; 50 pulsos) para la variedad utilizada, Cabernet Sauvignon, en el contenido fenólico y el color de los vinos tintos resultantes. Todos los tratamientos mejoraron la extracción fenólica durante la maceración con respecto al control. Tras 3 meses de almacenamiento en botella, el vino obtenido mediante PEAV mostró una IC, un CA y un IPT un 28, un 26 y un 11% mayores, respectivamente, que el vino control (Figura V.16). Por el contrario, mientras que ambos preparados enzimáticos aumentaron la IC alrededor de un 5%, sólo uno de ellos aumentó el CA y el IPT, y tan sólo en un 11 y un 3%, respectivamente. Esta variabilidad de efectos en función del preparado enzimático, concuerda con los resultados obtenidos por otros investigadores (Bautista-Ortín et al., 2005, 2007; Kelebek et al.,

2007). En definitiva, bajo las mismas condiciones experimentales, el tratamiento de PEAV para mejorar la extracción de sustancias fenólicas se mostró más efectivo que la adición de enzimas pectolíticas.

■ FIGURA V.16

Evolución de la intensidad de color (IC), contenido antociánico (CA) e índice de polifenoles totales (IPT) de los vinos, desde el inicio de la fermentación hasta los 3 meses de almacenamiento en botella. PEAV (■), Enzima₁ (▲), Enzima₂ (△), control (□)



V.3.3. APLICACIÓN DE LOS PEAV A ESCALA BODEGA

En el último año de realización de esta Tesis Doctoral, se dedicó un gran esfuerzo en reescalar el sistema de procesado por PEAV para poder aplicar tratamientos a flujos próximos a los requerimientos de una bodega media. Para ello, fue necesario adquirir una nueva bomba de impulsión, modificar las conducciones y construir una nueva cámara de tratamiento.

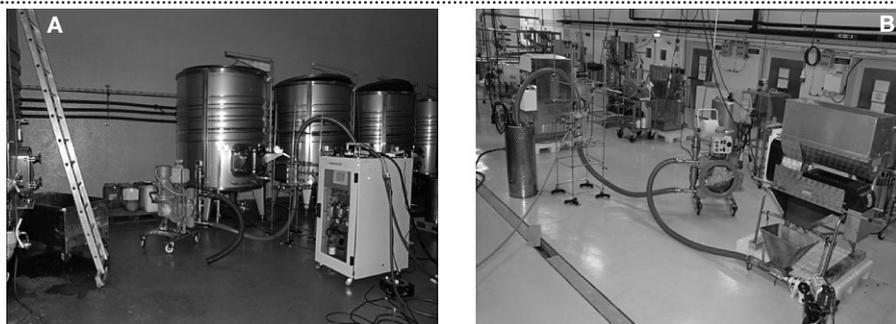
La bomba de impulsión de tornillo utilizada en los tratamientos a escala planta piloto (Rotor-MT, Bominox, Gerona, España) no poseía potencia suficiente para impulsar la uva a las velocidades de flujo necesarias. Por ello, se reemplazó por una bomba peristáltica, construida específicamente para la impulsión de uva, que es capaz de trabajar a flujos de hasta 5000 kg/h (Bomba Rotho MS1, Ragazzini, Faenza, Italia). A su vez, debido a los altos flujos de producto a utilizar, se sustituyeron las conducciones iniciales del sistema de 3 cm de diámetro (Mèrlett Plastics, Bristol, Inglaterra) por otras de 6 cm (Mèrlett Plastics). Finalmente, se reescaló la cámara de tratamiento, aumentando su diámetro en la zona de tratamiento de 2 a 3 cm. Con ello, se consiguió aumentar prácticamente por cuatro el volumen efectivo de tratamiento (de 12,5 a 42,4 mL). El aumento de las dimensiones de la cámara de tratamiento tuvo como consecuencia que se redujera la intensidad del campo eléctrico máximo a aplicar con nuestro generador (de 7 kV/cm a 4,3 kV/cm).

Para estimar la intensidad del campo eléctrico, temperatura y velocidad de flujo en las cámaras de tratamiento, se utilizó el programa Comsol Multiphysics®. Estas estimaciones permiten evaluar el comportamiento de las cámaras de tratamiento previamente a su construcción, descartando aquellos diseños que den peores resultados, con el consecuente ahorro de tiempo y dinero.

Para comprobar el funcionamiento del sistema de PEAV desarrollado, se llegó a un acuerdo con la bodega “Bodegas Añadas”, perteneciente a la Denominación de Origen Cariñena, para realizar las pruebas en sus propias instalaciones en la vendimia del año 2009 (Figura V.17A). La idea inicial era llevar a cabo, en una primera prueba, la instalación del sistema en la bodega, comprobar su correcto funcionamiento y, en un día posterior, realizar dos vinificaciones de 3000 kg, una tratada por PEAV y otra control. Sin embargo, debido a las especiales condiciones climáticas del año 2009, la vendimia se adelantó considerablemente y tuvo que realizarse en unas pocas semanas. Estos imprevistos provocaron que sólo se pudiera realizar la prueba el último día de la vendimia. Al poder disponer de un solo día para los tratamientos, no se pudieron solucionar algunos problemas técnicos que surgieron durante la instalación del equipo, lo que impidió la realización de la prueba en bodega. Una vez solventados estos problemas, se decidió comprobar el funcionamiento de la instalación en la Planta Piloto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos de la Universidad de Zaragoza (Figura V.17B). Estas pruebas se realizaron con uva de la variedad Tempranillo cedida amablemente por la Bodega “Señorío de Aylés”. Sin embargo, esta uva, que pertenece a una de las primeras variedades que se vendimian, no se encontraba en su momento óptimo de madurez ya que, en condiciones normales, debería de haber sido vendimiada unas semanas antes.

■ FIGURA V.17

Instalación del sistema de PEAV desarrollado en esta Tesis Doctoral para la aplicación de tratamientos a la uva a un flujo de 1600 kg/h en la bodega “Bodegas Añadas” (A) y en la Planta Piloto de la Universidad de Zaragoza (B)



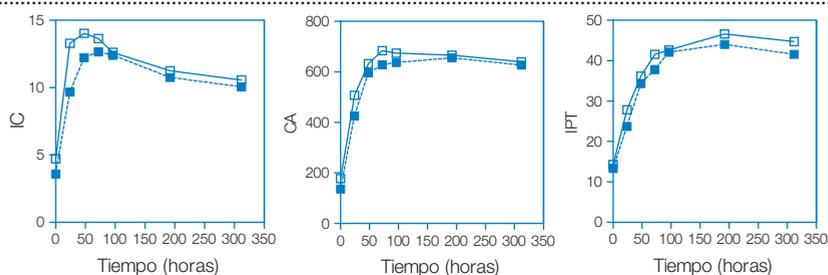
La evaluación inicial de la instalación nos permitió comprobar que con el equipo desarrollado se podía trabajar con un flujo de hasta 1600 kg/h, aplicando un tratamiento de 20 pulsos de $3 \mu\text{s}$ a una intensidad máxima de 4,3 kV/cm. En estas condiciones se trató la uva, realizándose dos vinificaciones de 100 kg que se compararon con dos controles. Cabe destacar que, una vez solventados los problemas surgidos en la bodega, el comportamiento de la instalación fue óptimo, consiguiéndose una buena homogeneidad de flujo de producto y forma de pulso.

En estos experimentos, los hollejos se mantuvieron en contacto con el mosto durante toda la fermentación. En la Figura V.18 se muestra la evolución de la IC, el CA y el IPT del vino control y el obtenido a partir de uva tratada por PEAV a lo largo de la fermentación. Como se

observa, el tratamiento de PEAV permitió acelerar la extracción de los tres índices estudiados. Sin embargo, las diferencias obtenidas en los primeros momentos disminuyeron a lo largo de la fermentación. Así, al concluir la misma, el vino obtenido mediante PEAV poseía una IC, un CA y un IPT, un 5, un 2 y un 8% superiores al control, respectivamente. Actualmente, estos vinos están en proceso de envejecimiento en botella. Los resultados obtenidos hasta el momento distan en gran medida a los publicados para la variedad Tempranillo (López et al., 2008a). Estas diferencias podrían ser debidas a la baja intensidad del campo eléctrico aplicado (4,3 kV/cm), al bajo número de pulsos (20) y, fundamentalmente, al grado de madurez de la uva utilizada. En experimentos previos realizados en nuestro laboratorio, hemos observado que los peores resultados se han obtenido normalmente cuando se ha utilizado uva “sobremadurada”.

■ FIGURA V.18

Evolución de la intensidad de color (IC), contenido antocianico (mg/L) (CA) e índice de polifenoles totales (IPT) durante el proceso de maceración-fermentación del vino tinto control de la variedad Tempranillo (■) y del vino tinto obtenido mediante PEAV (4,3 kV/cm; 20 pulsos) (□)



V.4. Análisis de costes

La aplicación de los PEAV para mejorar la extracción fenólica requiere la aplicación de tratamientos menos intensos que para conseguir la inactivación microbiana. Así, de acuerdo con los resultados presentados en esta Tesis Doctoral, para conseguir dicha mejora se requieren campos eléctricos de entre 2 y 7 kV/cm y energías específicas de entre 0,56 y 6,76 kJ/kg. Estos tratamientos, en base a un precio del kWh de 10 céntimos de euro, se traducen en un coste aproximado de entre 0,01 y 0,2 €/ton (Puértolas et al., 2010e). Estos costes son mucho menores a los de los tratamientos necesarios para la inactivación de los microorganismos y, por tanto, más fáciles de asumir por las bodegas.

En cuanto a los sistemas de PEAV para la mejora de la transferencia de masa, la mayor parte de las barreras existentes para la construcción de equipos de escala industrial han sido salvadas. Los equipos existentes en la actualidad son día a día más potentes, acercándose cada vez más a esas necesidades industriales. Así, utilizando un generador que permite la aplicación de pulsos de onda cuadrada de un voltaje máximo de 30 kV y una cámara de tratamiento colineal de 3 cm de diámetro, en esta Tesis Doctoral se ha logrado la aplicación

de un tratamiento de 4,3 kV/cm y 20 pulsos, utilizando un flujo de producto de 1,6 ton/h, cercano a las necesidades de una bodega pequeña. El bajo coste de este sistema de PEAV, 100.000 €, permitiría teóricamente su rápida amortización. De ello se puede concluir que, al contrario que lo que ocurre con la inactivación microbiana, el uso de los PEAV en las bodegas para mejorar la extracción fenólica es, hoy por hoy, económicamente viable. Eso sí, para la aplicación real de la tecnología en la industria enológica, es necesario realizar vinificaciones mediante esta tecnología en las propias bodegas para verificar los buenos resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral, así como solventar los posibles problemas que pueden acontecer al trasladar la tecnología a la industria alimentaria.

VI. Conclusiones

- I. La aplicación de un tratamiento de PEAV de 29 kV/cm y 186 kJ/kg permitió reducir al menos 3 ciclos logarítmicos las poblaciones de *Dekkera anomala*, *Dekkera bruxellensis*, *Saccharomyces bayanus*, *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus hilgardii* tanto en mosto como en vino. Este tratamiento podría ser suficiente para facilitar el desarrollo de los cultivos iniciadores, permitiendo una fermentación más reproducible, así como para evitar la contaminación de los diferentes equipos de las bodegas y el riesgo de alteración de estos productos.
- II. El sistema de PEAV desarrollado en esta investigación para mejorar la extracción de compuestos fenólicos permitió la aplicación de tratamientos en flujo continuo a escala de planta piloto (118 kg/h) a una intensidad del campo eléctrico máxima de 7 kV/cm, y a escala bodega (1600 kg/h) a una intensidad del campo eléctrico máxima de 4,3 kV/cm.
- III. La capacidad de los tratamientos de PEAV en flujo continuo para permeabilizar los hollejos dependió de la variedad de uva investigada. Mientras que en las variedades Cabernet Sauvignon y Syrah el campo eléctrico óptimo de tratamiento fue de 5 kV/cm, en la variedad Merlot fue de 7 kV/cm. En las condiciones óptimas de tratamiento siempre se obtuvo una mayor extracción de compuestos fenólicos en la variedad Cabernet Sauvignon.
- IV. Un tratamiento de PEAV de 5 kV/cm y 50 pulsos permitió acortar 48 h el tiempo de maceración en la elaboración de vino tinto de la variedad Cabernet Sauvignon. Tras 4 meses de almacenamiento en botella, el vino elaborado con uva tratada por PEAV presentó una intensidad de color, un índice de polifenoles totales y un contenido antocianico un 38, un 22 y un 11% superior a las muestras control. El estudio mediante HPLC permitió determinar que el tratamiento de PEAV no tiene un efecto selectivo sobre una determinada familia de compuestos fenólicos, incrementando el contenido de todas ellas de manera inespecífica.
- V. El envejecimiento del vino de la variedad Cabernet Sauvignon en botella durante 12 meses y en bodega de roble durante 6 meses y su posterior almacenamiento en botella durante 8 meses afectó de manera similar a las características cromáticas y fenólicas de los vinos obtenidos a partir de uva tratada y sin tratar por PEAV, manteniéndose en general las diferencias obtenidas al final de la fermentación.
- VI. Los análisis sensoriales de los vinos tintos de la variedad Cabernet Sauvignon realizados tras 4 meses de almacenamiento en botella, así como los realizados tras 6 meses de envejecimiento en bodega de roble y 8 meses de almacenamiento en botella, no permitieron detectar la existencia de diferencias sensoriales entre los vinos tratados por PEAV y los controles. Por lo tanto, el tratamiento de PEAV no generó aromas o sabores extraños en el vino tinto.
- VII. La aplicación de los PEAV permitió obtener vinos de la variedad Cabernet Sauvignon con mejores características cromáticas y fenólicas que el uso de enzimas pectolíticas. Tras 3 meses de almacenamiento en botella, los vinos obtenidos a partir de uva tratada por PEAV mostraron una intensidad de color, un índice de polifenoles totales y un contenido antocianico un 28, un 11 y un 26% superior a los controles, mientras que, en el mejor de los casos, los vinos obtenidos mediante el uso de enzimas pectolíticas aumentaron la intensidad de color, el índice de polifenoles totales y el contenido antocianico en tan sólo un 5, un 3 y un 11%, respectivamente.

VII. Bibliografía

- ABIDOR IG, ARAKELYAN LV, CHERNOMORDIK LV, CHIZMADZHEV Y, PASTUSHENKO VF, TARASEVICH MR, 1979. Electric breakdown of bilayer lipid membrane. I. The main experimental facts and their qualitative discussion. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* 6, 37-52.
- ADE-OMOWAYE BIO, ANGERSBACH A, TAIWO KA, KNORR D, 2001. Use of pulsed electric field pre-treatment to improve dehydration characteristics of plant based foods. *Trends in Food Science and Technology* 12, 285-295.
- ADE-OMOWAYE BIO, TAIWO KA, ESHTIAGHI NM, ANGERSBACH A, KNORR D, 2003a. Comparative evaluation of the effects of pulsed electric field and freezing on cell membrane permeabilisation and mass transfer during dehydration of red bell peppers. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 4, 177-188.
- ADE-OMOWAYE BIO, RASTOGI NK, ANGERSBACH A, KNORR D, 2003b. Combined effects of pulsed electric field pre-treatment and partial osmotic dehydration on air drying behaviour of red bell pepper. *Journal of Food Engineering* 60, 89-98.
- ADE-OMOWAYE BIO, TALENS P, ANGERSBACH A, KNORR D, 2003c. Kinetics of osmotic dehydration of red bell peppers as influenced by pulsed electric field pretreatment. *Food Research International* 36, 475-483.
- AGUILERA JM, 2003. Solid-Liquid Extraction. En C Tzia, G Liadakis (Eds.), *Extraction Optimization in Food Engineering* (pp. 35-55). Marcel Dekker: Nueva York.
- ALCALDE-EON C, ESCRIBANO-BAILÓN MT, SANTOS-BUELGA C, RIVAS-GONZALO JC, 2006. Changes in the detailed pigment composition of red wine during maturity and ageing: A comprehensive study. *Analytica Chimica Acta* 563, 238-254.
- ALKHAFAJI SR, FARID M, 2007. An investigation on pulsed electric fields technology using new treatment chamber design. *Innovative Food Science and Emerging technologies* 8, 205-212.
- ÁLVAREZ I, RASO J, PALOP A, SALA FJ, 2000. Influence of factors on the inactivation of *Salmonella Senftenberg* by pulsed electric fields. *International Journal of Food Microbiology* 55, 143-146.
- ÁLVAREZ I, PAGÁN R, RASO J, CONDÓN S, 2002. Environmental factors influencing the inactivation of *Listeria monocytogenes* by pulsed electric fields. *Letters in Applied Microbiology* 35, 489-493.
- ÁLVAREZ I, MAÑAS P, CONDÓN S, RASO J, 2003a. Resistance variation of *Salmonella enterica* serovars to pulsed electric fields treatments. *Journal of Food Science* 68, 2316-2320.
- ÁLVAREZ I, RASO J, SALA FJ, CONDÓN S, 2003b. Inactivation of *Yersinia enterocolitica* by pulsed electric fields. *Food Microbiology* 20, 691-700.
- ÁLVAREZ I, 2003c. *Inactivación microbiana por pulsos eléctricos de alto voltaje*. Tesis Doctoral. Universidad de Zaragoza, España.
- ÁLVAREZ I, PAGÁN R, CONDÓN S, RASO J, 2003d. The influence of process parameters for the inactivation of *Listeria monocytogenes* by pulsed electric fields. *International Journal of Food Microbiology* 87, 87-95.
- ÁLVAREZ I, ALEXANDRE, J.L., GARCÍA, M.J., LIZAMA, V. 2006a. "Impact of prefermentative maceration on the phenolic and volatile compounds in Monastrell red wines". *Analytica Chimica Acta* 563, 109-115.

- ÁLVAREZ I, CONDÓN S, RASO J, 2006b. Microbial Inactivation by Pulsed Electric Fields. En J Raso, V Heinz (Eds.), *Pulsed Electric Fields Technology for the Food Industry. Fundamentals and Applications* (pp. 97-129). Springer: Nueva York.
- AMAMI E, VOROBIEV E, KECHAOU N. 2006. Modelling of mass transfer during osmotic dehydration of apple tissue pre-treated by pulsed electric field. *LWT-Food Science and Technology* 39, 1014-1021.
- AMRANI-JOUTE K, GLORIES Y, 1995. Tannins and anthocyanins of grape berries: localization and extraction technique. *Revue Française d'Oenologie* 153, 28-31.
- ANGERSBACH A, HEINZ V, KNORR D, 2000. Effects of pulsed electric fields on cell membranes in real food systems. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 1, 135-149.
- ARONSSON K, RÖNNER U, BORCH E, 2005. Inactivation of *Escherichia coli*, *Listeria innocua* and *Saccharomyces cerevisiae* in relation to membrane permeabilization and subsequent leakage of intracellular compounds due to pulsed electric field processing. *International Journal of Food Microbiology* 99, 19-32.
- AROZARENA I, CASP A, MARÍN R, NAVARRO M, 2000. Differentiation of some Spanish wines according to variety and region base on their anthocyanin composition. *European Food Research and Technology* 212, 108-112.
- ARTS ICW, PUTTE B, HOLLMAN PCH, 2000. Catechin contents of foods commonly consumed in The Netherlands. 1. Fruits, Vegetables, Staple Foods, and processed foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48, 1746-1751.
- ASSELIN C, BROSSAUD F, CHEYNIER V, MOUTOUNET M, 1999. Influence of temperature and time maceration on flavonoid composition and incidence on sensory characteristics of wines of cabernet franc of different terroirs in Val de Loire. Contribution for an objective definition of typicity. *Bulletin de l'OIV* 821-822, 517-532.
- ATANASOVA V, FULCRAND H, CHEYNIER V, MOUTOUNET M, 2002. Effect of oxygenation on polyphenol changes occurring in the course of wine-making. *Analytica Chimica Acta* 458, 15-27.
- BARANYI J, PIN C, ROSS T, 1999. Validating and comparing predictive models. *International Journal of Food Microbiology* 48, 159-166.
- BARBOSA-CÁNOVAS GV, FERNÁNDEZ-MOLINA JJ, SWANSON BG, 2001. Pulsed electric fields: A novel technology for food preservation. *Agro Food Industry Hi-Tech* 12, 9-14.
- BARSSOTI L, MERLE P, CHEFTEL JC, 1999a. Food processing by pulsed electric fields. I. Physical aspects. *Food Reviews international* 15, 163-180.
- BARSSOTI L, CHEFTEL JC, 1999b. Food processing by pulsed electric fields. II. Biological aspects. *Food Reviews international* 15, 181-213.
- BARTOWSKY EJ, HENSCHKE PA, 2008. Acetic acid bacteria spoilage of bottle red wine-A review. *International Journal of Food Microbiology* 125, 60-70.
- BAUTISTA-ORTÍN AB, FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ JJ, LÓPEZ-ROCA JM, GÓMEZ-PLAZA E, 2004. Wine-making of high coloured wines: extended pomace contact and run-off of juice prior to fermentation. *Food Science and Technology International* 10, 287-295.
- BAUTISTA-ORTIN AB, MARTÍNEZ-CUTILLAS A, ROS-GARCÍA JM, LÓPEZ-ROCA JM, GÓMEZ-PLAZA E, 2005. Improving colour extraction and stability in red wines: the use of maceration enzymes and enological tannins. *International Journal of Food Science and Technology* 40, 867-878.

- BAUTISTA-ORTÍN AB, FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ JI, LÓPEZ-ROCA JM, GÓMEZ-PLAZA E, 2007. The effects of enological practices in anthocyanins, phenolics compounds and wine colour and their dependence on grape characteristics. *Journal of Food Composition and Analysis* 20, 546-552.
- BAZHAL M, VOROBIEV E, 2000. Electrical treatment of apple cossettes for intensifying juice pressing. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80, 1668-1674.
- BERNARD N, ZEBIC O, SIECKOWSKI N, 2005. Raisonnement de l'utilisation des encimes et des tanins oenologiques en fonction du stress hydrique de la vigne. *Revue Française d'Oenologie* 215, 16-20.
- BORBALÁN AMA, ZORRO L, GUILLÉN DA, BARROSO CG, 2003. Study of the polyphenol content of red and white grape varieties by liquid chromatography mass spectrometry and its relationship to antioxidant power. *Journal of Chromatography A* 1012, 31-38.
- BOULET JC, ESCUDIER JL, 2000a. Clarificación de los vinos por procedimientos físicos. En C Flanzy (Ed.), *Enología: Fundamentos Científicos Tecnológicos* (pp. 470-480). AMV: Madrid.
- BOULET JC, ESCUDIER JL, 2000b. Flash-Expansión. En C Flanzy (Ed.), *Enología: Fundamentos Científicos Tecnológicos* (pp. 489-490). AMV: Madrid.
- BOULTON RB, SINGLETON VL, BISSON LF, KUNKEE RE, 1996. The role of sulphur dioxide in wine. En RB Boulton, VL Singleton, LF Bisson, RE Kunkee (Eds.), *Principles and practices of winemaking* (pp. 448-473). Chapman & Hall: Nueva York.
- BOULTON RB, 2001. The copigmentation of anthocyanins and its role in the colour of red wine: A critical review. *American Journal of Enology and Viticulture* 55, 67-87.
- BOUZRARA H, VOROBIEV E, 2001. Non-thermal pressing and washing of fresh sugarbeet cossettes combined with a pulsed electrical field. *Zuckerindustrie* 126, 463-466.
- BOUZRARA H, VOROBIEV E, 2003. Solid-liquid expression of cellular materials enhanced by pulsed electric fields. *Chemical Engineering and Processing* 42, 249-257.
- BRAAKMAN L, 2003. Breakthrough in pasteurisation-pulsed electric fields. *Food Engineering and Ingredients* 28, 34-38.
- BROWN MS, 1975. Wine from frozen grapes. *American Journal of Enology and Viticulture* 26, 103-104.
- BUDIC-LETO I, LOVRIC T, KLJUSURIC JG, PEZO I, VRHOVSEK U, 2006. Anthocyanin composition of the red wine Babic affected by maceration treatment. *European Food Research and Technology* 222, 397-402.
- CACHO J, FERNÁNDEZ P, FERREIRA V, CASTELLS JE, 1992. Evolution of five anthocyanidin-3-glucosides in the skin of the Tempranillo, Moristel and Garnacha grape varieties and influence of climatological variables. *American Journal of Enology and Viticulture* 43, 244-248.
- CALDERÓN F, MORATA A, UTHURRY C, SUÁREZ JA, 2004. Aplicaciones de la ultrafiltración en la industria enológica. Últimos avances tecnológicos. *Tecnología del Vino* 16, 49-54.
- CAMPOS FM, COUTO JA, HOGG TA, 2003. Influence of phenolic acids on growth and inactivation of *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus hilgardii*. *Journal of Applied Microbiology* 94, 167-174.
- CANAL-LLAUBÈRES RM, POUNS JP, 2002. Les enzymes de maceration en vinification en rouge. Influence d'une nouvelle preparation sur la composition des vins. *Revue des Oenologues* 104, 29-31.

- CANTOS E, ESPÍN JC, TOMÁS-BARBERÁN FA, 2002. Varietal differences among the polyphenol profiles of seven table grape cultivars studied by LC-DAD-MS-MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 5691-5696.
- CASTELLI T, 1969. *Il vino al microscopio*. Luigi Scialpi Editore: Roma.
- CASTELLUCCI F, 2008. Informe sobre la situación de la viticultura mundial en 2007. En XXXI Congreso Mundial de la Viña y el Vino. Verona, Italia.
- CEBRIÁN, G, 2009. *Mecanismos de inactivación y resistencia de Staphylococcus aureus a diferentes procesos de conservación de los alimentos*. Tesis Doctoral. Universidad de Zaragoza, España.
- CHATONNET P, DUBOURDIEU D, BOIDRON JN, PONS M, 1992. The origin of ethylphenols in wines. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 60, 165-178.
- CHATONNET P, BOIDRON JN, DUBOURDIEU D, 1993. Influence des conditions d'élevage et de sulfitage des vins rouges en barriques sur leur teneur en acide acétique et en ethylphenols. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin* 27, 277-298.
- CHATONNET P, DUBOURDIEU D, BOIDRON JN, 1995. The influence of *Brettanomyces/Dekkera* sp. and lactic acid bacteria on the ethylphenol content of red wines. *American Journal of Enology and Viticulture* 46, 463-467.
- CHEN ZY, CHAN PT, HO KY, FUNG KP, WANG J, 1996. Antioxidant activity of natural flavonoids is governed by number and location of their aromatic hydroxyl groups. *Chemistry and Physics of Lipids* 79, 157-163.
- CLARK P, 2006. Pulsed Electric Field Processing. *Food Technology* 60, 66-67.
- COFFELT RJ, BERG HW, 1965. Color extraction by heating whole grapes. *American Journal of Enology and Viticulture* 16, 117-128.
- COUTO, JA, NEVES F, CAMPOS F, HOGG T, 2005. Thermal inactivation of the wine spoilage yeasts *Dekkera/Brettanomyces*. *International Journal of Food Microbiology* 104, 337-344.
- DE HAAN, SWH, 2007. Circuitry and pulse shapes in pulsed electric field treatment of food. En HLM Lelieveld, S Notermans, SWH de Haan (Eds.), *Food preservation by pulsed electric fields* (pp. 43-69). Woodhead Publishing: Cambridge.
- DE LUIS R, ARIAS O, PUÉRTOLAS E, BENEDÉ S, SÁNCHEZ L, CALVO M, PÉREZ MD, 2009. Effect of high-intensity pulsed electric fields on denaturation of bovine whey proteins. *Milchwissenschaft* 64, 422-426.
- DE VILLIERS A, VANHOENACKER G, MAJEK P, SANDRA P, 2004. Determination of anthocyanins in wine by direct injection liquid chromatography-diode array detection-mass spectrometry and classification of wines using discriminant analysis. *Journal of Chromatography A* 1054, 195-204.
- DELFINI C, GAIA P, SCHELLINO R, STRANO M, PAGLIARIA A, AMBRO S, 2002. Fermentability of grape must after inhibition with dimethyl dicarbonate (DMDC). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 5605-5611.
- DIMITROV DS, 1984. Electric field induced breakdown of lipid bilayers and cells membranes: A thin viscoelastic model. *Journal of Membrane Biology* 78, 53-60.
- DOEVENSPECK H, 1960. *Verfahren und Vorrichtung zur Gewinnung der einzelnen Phasen aus dispersen Systemen*. Patente N° DE 1237541, Alemania.
- DOEVENSPECK H, 1961. Influencing cells and cell walls by electrostatic impulses. *Fleischwirtschaft* 13, 968-987.

- DONSI G, FERRARI G, PATARO G, 2007. Inactivation kinetics of *Saccharomyces cerevisiae* by pulsed electric fields in a batch treatment chamber. The effect of the electric field unevenness and initial cell concentration. *Journal of Food Engineering* 78, 784-792.
- DÖRNENBURG H, KNORR D, 1998. Monitoring the impact of high-pressure processing on the biosynthesis of plant metabolites using plant cell cultures. *Trends in Food Science and Technology* 9, 355-361.
- DU TOIT M, PRETORIUS IS, 2000. Microbial spoilage and preservation of wine: using weapons from nature's own arsenal-a review. *South African Journal for Enology and Viticulture* 21, 74-92.
- EDWARDS CG, BEELMAN RB, 1989. Inducing malolactic fermentation in wines. *Biotechnology Advances* 7, 333-360.
- ELEZ-MARTÍNEZ P, MARTÍN-BELLOSO O, RODRIGO D, SAMPEDRO F, 2007a. Impact of pulsed electric fields on food enzymes and shelf-life. En HLM Lelieveld, S Notermans, SWH de Haan (Eds.), *Food preservation by pulsed electric fields* (pp. 212-246). Woodhead Publishing: Cambridge.
- ELEZ-MARTÍNEZ P, SUÁREZ-RECIO M, MARTÍN-BELLOSO O, 2007b. Modeling the reduction of pectin methyl esterase activity in orange juice by high intensity pulsed electric fields. *Journal of Food Engineering* 78, 184-193.
- ESTEVE-ZARZOSO B, GOSTINCAR A, BOBET R, URUBURU F, QUEROL A, 2000. Selection and molecular characterisation of wine yeasts isolated from the "El Penedés" area (Spain). *Food Microbiology* 17, 553-562.
- ESTRUCH R, 2000. Wine and cardiovascular disease. *Food Research International* 33, 219-226.
- EVRENDILEK GA, ZHANG QH, 2005. Effect of pulse polarity and pulse delaying time on pulsed electric fields-induced pasteurization of *E. coli* O157:H7. *Journal of Food Engineering* 68, 271-276.
- FERNÁNDEZ DE SIMÓN B, CADAHÍA E, HERNÁNDEZ T, ESTRELLA I, 2006. Evolution of oak-related volatile compounds in a Spanish red wine during 2 years bottled, after aging in barrels made of Spanish, French and American oak wood. *Analytica Chimica Acta* 563, 198-203.
- FERNÁNDEZ-NOVALES J, LÓPEZ MI, SÁNCHEZ MT, GARCÍA-MESA JA, GONZÁLEZ-CABALLERO V, 2009. Assessment of quality parameters in grapes during ripening using miniature fiber-optic near-infrared spectrometer. *International Journal of Food Science and Nutrition* 60, 265-277.
- FERZIGER JH, PERIC M, 2002. *Computational methods for fluid dynamics*. Springer: Berlín.
- FEUILLAT M, 1987. Exposé sur la vinification en rouge en Bourgogne. *Le Vigneron Champenois* 6, 340-352.
- FINCAN M, DEVITO F, DEJMEK P, 2004. Pulsed electric field treatment for solid-liquid extraction of red beetroot pigment. *Journal of Food Engineering* 64, 381-388.
- FISCHER U, NOBLE AC, 1994. The effect of ethanol, catechin concentration and pH on sourness and bitterness of wine. *American Journal of Enology and Viticulture* 45, 6-10.
- FISCHER U, STRASSER M, GUTZLER K, 2000. Impact of fermentation technology on phenolic and volatile composition of German red wine. *International Journal of Food Science and Technology* 35, 81-94.

- FOX MB, 2007. Microbial inactivation kinetics of pulsed electric field treatment. En HLM Lelieveld, S Notermans, SWH de Haan (Eds.), *Food preservation by pulsed electric fields* (pp. 127-137). Woodhead Publishing: Cambridge.
- FRANKEL EN, KANNER J, GERMAN JB, PARKS E, KINSELLA, JE, 1993. Inhibition of oxidation of human low-density-lipoprotein by phenolic substances in red wine. *Lancet* 341, 454-7.
- FREITAS VAP, GLORIES Y, MONIQUE A, 2000. Developmental changes of procyanidins in grapes of red *Vitis vinifera* varieties and their composition in respective wines. *American Journal of Enology and Viticulture* 51, 397-403.
- FUGELSANG KC, 1989. Recent research on SO₂ (sulphur dioxide). *Wines and Vines*, August 1.
- GALLO LI, PILOSOF AMR, JAGUS RJ, 2007. Effect of the sequence of nisin and pulsed electric fields treatments and mechanisms involved in the inactivation of *Listeria innocua* in whey. *Journal of Food Engineering* 79, 188-193.
- GAMBUTI A, STROLLO D, ERBAGGIO A, LECCE L, MOIO L, 2007. Effect of winemaking practices on color indexes and selected bioactive phenolics of Aglianico wine. *Journal of Food Science* 72, 623-628.
- GARCÍA D, GÓMEZ N, CONDÓN S, RASO J, PAGÁN R, 2003. Pulsed electric fields cause sublethal injury in *Escherichia coli*. *Letters in Applied Microbiology* 36, 140-144.
- GARCÍA D, GÓMEZ N, MAÑAS P, CONDÓN S, RASO J, PAGÁN R, 2005a. Occurrence of sublethal injury after pulsed electric fields depending on the microorganism, the treatment medium pH and the intensity of the treatment investigated. *Journal of Applied Microbiology* 99, 94-104.
- GARCÍA D, HASSANI M, MAÑAS P, CONDÓN S, PAGÁN R, 2005b. Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 during storage under refrigeration of apple juice treated by pulsed electric fields. *Journal of Food Safety* 25, 30-42.
- GARCÍA-BARCELÓ J, 1976. *Metodología de análisis de vinos y derivados*. Sepsa: Villafranca del Penedés.
- GARDE-CERDÁN T, ANCÍN-AZPILICUETA C, 2006. Review of quality factors on wine ageing in oak barrels. *Trends in Food Science and Technology* 17, 438-447.
- GARDE-CERDÁN T, ARIAS-GIL M, MARSELLÉS-FONTANET AR, ANCÍN-AZPILICUETA C, MARTÍN-BELLOSO O, 2007a. Effects of thermal and non-thermal processing treatments on fatty acids and free amino acids of grape juice. *Food Control* 18, 473-479.
- GARDE-CERDÁN T, MARSELLÉS-FONTANET AR, ARIAS-GIL M, MARTÍN-BELLOSO O, ANCÍN-AZPILICUETA C, 2007b. Influence of SO₂ on the consumption of nitrogen compounds through alcoholic fermentation of must sterilized by pulsed electric fields. *Food Chemistry* 103, 771-777.
- GARDE-CERDÁN T, MARSELLÉS-FONTANET AR, ARIAS-GIL M, ANCÍN-AZPILICUETA C, MARTÍN-BELLOSO O, 2008a. Effect of storage conditions on the volatile composition of wines obtained from must stabilized by PEF during ageing without SO₂. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 9, 469-476.
- GARDE-CERDÁN T, MARSELLÉS-FONTANET AR, ARIAS-GIL M, ANCÍN-AZPILICUETA C, MARTÍN-BELLOSO O, 2008b. Influence of SO₂ on the evolution of volatile compounds through alcoholic fermentation of must stabilized by pulsed electric fields. *European Food Research and Technology* 227, 401-408.

- GAWEL R, ILAND PG, LESKE PA, DUNN CG, 2001. Compositional and sensory differences in Syrah wines following juice run-off prior to fermentation. *Journal of Wine Research* 12, 5-18.
- GERBAUX V, 1993. Etude de quelques conditions de cuvaison susceptibles d'augmenter la composition polyphénolique des vins Pinot noir. *Revue des Oenologues* 69, 15-18.
- GERLACH D, ALLEBORN N, BAARS A, DELGADO A, MORITZ J, KNORR D, 2008. Numerical simulations of pulsed electric fields for food preservation: A review. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 9, 408-417.
- GIL-MUÑOZ R, GÓMEZ-PLAZA E, MARTÍNEZ A, LÓPEZ-ROCA JM, 1999. Evolution of phenolic compounds during wine fermentation and post-fermentation. Influence of grape temperature. *Journal of Food Composition and Analysis* 12, 259-272.
- GIRARD B, KOPP TG, REYNOLDS AG, CLIFF MA, 1997. Influence of vinification treatments on aroma constituents and sensory descriptors of Pinot noir wines. *American Journal of Enology and Viticulture* 48, 198-206.
- GIUDICI P, SOLIERI L, PULVIRENTI AM, CASSANELLI S, 2005. Strategies and preservatives for genetic improvement of wine yeast. *Applied Microbiology and Biotechnology* 66, 622-628.
- GLORIES Y, 1984a. La couleur des vins rouges. I. Les équilibres des anthocyanes et des tanins. *Connaissance de la Vigne et du Vin* 18, 195-217.
- GLORIES Y, 1984b. La couleur des vins rouges. II. Mesure, origine et interprétation. *Connaissance de la Vigne et du Vin* 18, 253-271.
- GLORIES, Y, 1990. Oxygène et élevage en barriques. *Revue Française d'Oenologie* 124, 91-96.
- GLORIES Y, 1999. Substances responsible for astringency, bitterness and wine colour. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin* 33, 107-110.
- 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.
- GÓMEZ-MÍGUEZ M, GONZÁLEZ-MANZANO S, ESCRIBANO-BAILON M, HEREDIA FJ, SANTOS-BUELGA C, 2006. Influence of different phenolic copigments on the color of malvidin 3-glucoside. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54, 5422-5429.
- GÓMEZ-MÍGUEZ M, GONZÁLEZ-MIRET ML, HEREDIA FJ, 2007. Evolution of colour and anthocyanin composition of Syrah wines elaborated with pre-fermentative cold maceration. *Journal of Food Engineering* 79, 271-278.
- GÓMEZ-PLAZA E, GIL-MUÑOZ R, LÓPEZ-ROCA JM, MARTÍNEZ A, 2000. Color and phenolic compounds of a young red wine. Influence of winemaking techniques, storage temperature and length of storage time. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48, 736-741.
- GÓMEZ-PLAZA E, GIL-MUÑOZ R, LÓPEZ-ROCA JM, MARTÍNEZ-CUTILLAS A, FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ JI, 2001. Phenolic compounds and color stability of red wines. Effect of skin maceration time. *American Journal of Enology and Viticulture* 52, 271-275.
- GÓMEZ-RIVAS L, ESCUDERO-ABARCA BI, AGUILAR-USCANGA MG, HAYWARD-JONES PM, MENDOZA P, RAMÍREZ M, 2004. Selective antimicrobial action of chitosan against spoilage yeast in mixed culture fermentations. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 31, 16-22.

- GOMPERTZ B, 1825. On the nature of the function expressive of the Law of human mortality. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* 115, 513-583.
- GONZÁLEZ-NEVES G, GIL G, BARREIRO L, 2008. Influence of grape variety on the extraction of anthocyanins during the fermentation on skins. *European Food Research and Technology* 226, 1349-1355.
- GRIS E, FERREIRA E, FALCAO L, BORDIGNON-LUIZ MT, 2007. Caffeic acid copigmentation of anthocyanins from Cabernet Sauvignon grape extracts in model systems. *Food Chemistry* 100, 1289-1296.
- GUDERJAN M, TOEPFL S, ANGERSBACH A, KNORR D, 2005. Impact of pulsed electric field treatment on the recovery and quality of plant oils. *Journal of Food Engineering* 67, 281-287.
- GUDERJAN M, ELEZ-MARTÍNEZ P, KNORR D, 2007. Application of pulsed electric fields at oil yield and content of functional food ingredients at the production of rapeseed oil. *Innovative Food Science and Emerging Technology* 8, 55-62.
- GUENDEZ R, KALLITHRAKA S, MAKRIS D P, KEFALAS P, 2005. Determination of low molecular weight polyphenolic constituents in grape (*Vitis vinifera* sp.) seed extracts: Correlation with antiradical activity. *Food Chemistry* 89, 1-9.
- HAFSTEINSSON H, GUDMUNDSSON M, ARNARSON GÖ, JÓNSSON Á, SIGUROARDOT-TIR MS, 2000. *High Electric Field Pulses: Food Safety; Quality; and Critical Parameters*. Technological Institute of Iceland (IceTec): Reikiavik.
- HEATHERBELL D, DICEY M, GOLDSWORTHY S, VANHANEN L, 1996. Effect of cold maceration on the composition, color, and flavour of Pinot noir wine. En T Henick-Kling (Ed.), *Proceedings of the fourth international symposium on cool climate enology and viticulture VI* (pp. 10-17). New York State Agricultural Experimental Station: Geneva.
- HEINZ V, PHILLIPS ST, ZENKER M, KNORR D, 1999. Inactivation of *Bacillus subtilis* by high intensity pulsed electric fields under close to isothermal conditions. *Food Biotechnology* 13, 155-168.
- HEINZ V, KNORR D, 2000. Effect of pH, ethanol addition, and high hydrostatic pressure on the inactivation of *Bacillus subtilis* by pulsed electric fields. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 1, 151-159.
- HEINZ V, ÁLVAREZ I, ANGERSBACH A, KNORR D, 2001. Preservation of liquid foods by high intensity pulsed electric fields-basic concepts for process design. *Trends in Food Science and Technology* 12, 103-111.
- HEINZ V, TOEPFL S, KNORR D, 2003. Impact of temperature on lethality and energy efficiency of apple juice pasteurization by pulsed electric fields treatment. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 4, 167-175.
- HENICK-KLING T, EDINGER W, DANIEL P, MONK P, 1998. Selective effects of sulphur dioxide and yeast starter culture addition on indigenous yeast populations and sensory characteristics of wine. *Journal of Applied Microbiology* 84, 865-876.
- HERESZTYN T, 1986. Formation of substituted tetrahydropyridines by species of *Brettanomyces* and *Lactobacillus* isolated from mousy wines. *American Journal of Enology and Viticulture* 37, 127-132.
- HERMOSÍN-GUTIÉRREZ I, SÁNCHEZ-PALOMO E, VICARIO-ESPINOSA A, 2005. Phenolic composition and magnitude of copigmentation in young and shortly aged red wines made from the cultivars, Cabernet Sauvignon, Cencibel, and Syrah. *Food Chemistry* 92, 269-283.

- HIDALGO-TOGORES J, 2003a. *Tratado de Enología. Tomo I*. Mundi-Prensa: Madrid.
- HIDALGO-TOGORES J. 2003b. *Tratado de Enología. Tomo II*. Mundi-Prensa: Madrid.
- HO SY, MITTAL GS, 1996. Electroporation of cell membranes: A review. *Critical Reviews in Biotechnology* 16, 349-362.
- HOOGLAND H, DE HANN W, 2007. Economic aspects of pulsed electric field treatment of food. En HLM Lelieveld, S Notermans, SWH de Haan (Eds.), *Food preservation by pulsed electric fields* (pp. 257-265). Woodhead Publishing: Cambridge.
- HUANG K, WANG J, 2009. Designs of pulsed electric fields treatment chambers for liquid foods pasteurization process: A review. *Journal of Food Engineering* 95, 227-239.
- HÜLSHEGER H, POTEL J, NIEMANN EG, 1981. Killing bacteria with electric pulses of high field strength. *Radiation and Environmental Biophysics* 20, 53-65.
- HÜLSHEGER H, POTEL J, NIEMANN EG, 1983. Electric field effects on bacteria and yeast cells. *Radiation and Environmental Biophysics* 22, 149-162.
- JAEGER H, MENESES N, KNORR D, 2009a. Impact of PEF treatment inhomogeneity such as electric field distribution, flow characteristics and temperature effects on the inactivation of *E. coli* and milk alkaline phosphatase. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 10, 470-480.
- JAEGER H, SCHULZ N, KARAPETKOV N, KNORR D, 2009b. Protective effect of milk constituents and sublethal injuries limiting process effectiveness during PEF inactivation of *Lb. rhamnosus*. *International Journal of Food Microbiology* 134, 154-161.
- JOSHI RP, HU Q, SCHOENBACH KH, HJALMARSON HP, 2002. Improved energy model for membrane electroporation in biological cells subjected to electrical pulses. *Physical Reviews E, Statistical, Nonlinear and Soft Matter Physics* 65, 041920.
- JOYEUX A, LAFON-LAFOURCADE S, RIBÉREAU-GAYON P, 1984. Evolution of acetic acid bacteria during fermentation and storage of wine. *Applied and Environmental Microbiology* 48, 153-156.
- JURD L, 1969. Review of polyphenol condensation reactions and their possible occurrence in the aging of wines. *American Journal of Enology and Viticulture* 20, 191-195.
- KAMMERER D, CLAUS A, CARLE R, SCHIEBER A, 2004. Polyphenol screening of pomace from red and white grape varieties (*Vitis vinifera* L.) by HPLC-DAD-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52, 4360-4367.
- KARNA L, BISSON LF, ADAMS DO, 2005. A review of the effect of winemaking techniques on phenolic extraction in red wines. *American Journal of Enology and Viticulture* 56, 197-205.
- KELEBEK H, CANBAS A, CABAROGLU T, SELLI S, 2007. Improvement of anthocyanin content in the cv. Öküzgözü wines by using pectolytic enzymes. *Food Chemistry* 105, 334-339.
- KENNEDY JA, HAYASAKA Y, VIDAL S, WATERS EJ, JONES GP, 2001. Composition of grape skin proanthocyanidins at different stages of berry development. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49, 5348-5355.
- KHADRE MA, YOUSEF AE, 2002. Susceptibility of human rotavirus to ozone, high pressure and pulsed electric field. *Journal of Food Protection* 65, 1441-1446.
- KINOSITA K, TSONG TY, 1977a. Formation and resealing of pores of controlled sizes in human erythrocyte membrane, *Nature* 268, 438-441.
- KINOSITA K, TSONG TY, 1977b. Voltage-induced pore formation and hemolysis of human erythrocytes. *Biochimica et Biophysica Acta* 471, 227-242.

- KLENAR I, BEROVIC M, WONDRA M, 2004. Phenolic compounds from the fermentation of cultivars Cabernet sauvignon and Merlot from the Slovenian Coastal region. *Food Technology and Biotechnology* 42, 11-17.
- KNORR D, GEULEN M, GRAHL T, SITZMANN W, 1994. Food application of high electric field pulses. *Trends in Food Science and Technology* 5, 71-75.
- KNORR D, ANGERSBACH A, 1998. Impact of high-intensity electric field pulses on plant membrane permeabilization. *Trends in Food Science and Technology* 9, 185-191.
- LADO BH, YOUSEF AE, 2003. Selection and identification of a *Listeria monocytogenes* target strain for pulsed electric field process optimization. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 2223-2229.
- LAFON-LAFOURCADE S, JOYEUX A, 1981. Les bacteries acetiques du vin. *Bulletin de l'OIV* 54, 803-829.
- LAMUELA-RAVENTÓS RM, WATERHOUSE AL, 1994. A direct HPLC separation of wine phenolics. *American Journal of Enology and Viticulture* 45, 1-5.
- LEY Nº 24/2003, de 10 de julio de 2003, de la Viña y del Vino. *BOE núm.165 de 11.7.2003*.
- LINDGREN M, 2001. *Pulsed Electric Field Food Treatment and Low Frequency Bioelectromagnetics*. Tesis Doctoral. Chalmers University of Technology, Suecia.
- LINDGREN M, ARONSSON K, GALT S, OHLSSON T, 2002. Simulation of the temperature increase in pulsed electric field (PEF) continuous flow treatment chambers. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 3, 233-245.
- LLAUDY MC, 2006. *Contribución al estudio de los factores que afectan la astringencia del vino tinto*. Tesis Doctoral. Universitat Rovira i Virgili, España.
- LOEFFLER MJ, 2006. Generation and Application of High Intensity Pulsed Electric Fields. En J Raso, V Heinz (Eds.), *Pulsed Electric Fields Technology for the Food Industry. Fundamentals and Applications* (pp. 27-72). Springer: Nueva York.
- LONVAUD-FUNEL A, 1999. Lactic acid bacteria in the quality improvement and depreciation of wine. *Antonie van Leeuwenhoek* 76, 317-331.
- LÓPEZ N, PUÉRTOLAS E, CONDÓN S, ÁLVAREZ I, RASO J, 2008a. Effects of pulsed electric fields on the extraction of phenolic compounds during the fermentation of must of Tempranillo grapes. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 9, 477-482.
- LÓPEZ N, 2008b. *Mejora de la transferencia de masa mediante Pulsos Eléctricos de Alto Voltaje: aplicación a la extracción de sacarosa, betaninas y al proceso de elaboración de vino*. Tesis Doctoral. Universidad de Zaragoza, España.
- LÓPEZ N, PUÉRTOLAS E, ÁLVAREZ I, RASO J, 2008c. Aplicaciones de los pulsos eléctricos de alto voltaje a la mejora de la transferencia de masa en la industria alimentaria. *Alimentaria Extra* 1, 147-153.
- LÓPEZ N, PUÉRTOLAS E, CONDÓN S, ÁLVAREZ I, RASO J, 2008d. Application of pulsed electric fields for improving the maceration process during vinification of red wine: influence of grape variety. *European Food Research and Technology* 227, 1099-1107.
- LÓPEZ N, PUÉRTOLAS E, CONDÓN S, RASO J, ÁLVAREZ I, 2009a. Enhancement of the extraction of betanine from red beetroot by pulsed electric fields. *Journal of Food Engineering* 90, 60-66.
- LÓPEZ N, PUÉRTOLAS E, CONDÓN S, RASO J, ÁLVAREZ I, 2009b. Enhancement of the solid-liquid extraction of sucrose from sugar beet (*Beta vulgaris*) by pulsed electric fields. *LWT-Food Science and Technology* 42, 1674-1680.

- LÓPEZ N, PUÉRTOLAS E, HERNÁNDEZ-ORTE P, ÁLVAREZ I, RASO J, 2009c. Effect of a pulsed electric field treatment on the anthocyanins composition and other quality parameters of Cabernet Sauvignon freshly fermented model wines obtained after different maceration times. *LWT-Food Science and Technology* 42, 1225-1231.
- LOUREIRO V, MALFEITO-FERREIRA M, 2003. Spoilage yeast in the wine industry. *International Journal of Food Microbiology* 86, 23-50.
- LURTON L, 2003. Grape polyphenols: New powerful health ingredients. *Innovations in Food Technology and Emerging Technologies* 18, 28-30.
- LUSTRATO G, ALFANO G, BELLI C, GRAZIA L, LORIZZO M, MAIURO L, MASSARELLA F, ZANARDINI E, RANALLI G, 2003. Controlling grape must fermentation in early winemaking phases: The role of electrochemical treatment. *Journal of Applied Microbiology* 95, 1087-1095.
- MAFART P, COUVERT O, GAILLARD S, LEGUERINEL I, 2002. On calculating sterility in thermal preservation methods: application of the Weibull frequency distribution model. *International Journal of Food Microbiology* 72, 107-113.
- MAÑAS P, VERCET A, 2006. Effect of Pulsed Electric Fields on Enzymes and Food Constituents. En J Raso, V Heinz (Eds.), *Pulsed Electric Fields Technology for the Food Industry. Fundamentals and Applications* (pp. 131-151). Springer: Nueva York.
- MARM, 2008. Ministerio de Medio Ambiente, y Medio Rural y Marino. *Observatorio del Consumo y la Distribución Alimentaria*.
- MARSELLÉS-FONTANET AR, MARTÍN-BELLOSO O, 2007. Optimization and validation of PEF processing conditions to inactivate oxidative enzymes of grape juice. *Journal of Food Engineering* 83, 452-462.ç
- MATEUS N, MARQUES S, GONÇALVES AC, MACHADO JM, FREITAS V, 2001. Proanthocyanidin composition of red *Vitis vinifera* varieties from the Douro valley during ripening: influence of cultivation altitude. *American Journal of Enology and Viticulture* 52, 115-121.
- MCGOVERN PE, 2003. *Ancient wine: The search for origins of viticulture*. Princeton University Press: Nueva Jersey.
- MEYER AS, YI OS, PEARSON DA, WATERHOUSE AL, FRANKEL EN, 1997. Inhibition of low-density lipoprotein oxidation in relation to composition of phenolic antioxidants in grapes (*Vitis vinifera*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45, 1638-1643.
- MIN S, EVRENDILEK GA, ZHANG QH, 2007. Pulsed electric fields: processing system, microbial and enzyme inhibition, and shelf life extension of foods. *IEEE Transactions on Plasma Science* 35, 59-73.
- MINARIK E, 1983. Levure de contamination des vines embouteillées. *Bulletin de l'OIV* 56, 414-419.
- MISAKI T, TSUBOI H, ITAKA K, HARA T, 1982. Computational of three-dimensional electric field problems by a surface charge method and its application to optimum insulator design. *IEEE transactions on Power Apparatus and System* 101, 627-634.
- MOK C, SONG KT, PARK YS, LIM S, RUAN R, CHEN P, 2006. High hydrostatic pressure pasteurization of red wine. *Journal of Food Science* 71, 265-269.
- MONAGAS M, BARTOLOMÉ B, GÓMEZ-CORDOVÉS C, 2005a. Update knowledge about the presence of phenolic compounds in wine. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 45, 85-118.

- MONAGAS M, SUÁREZ R, GÓMEZ-CORDOVÉS C, BARTOLOMÉ B, 2005b. Simultaneous determination of nonanthocyanin phenolic compounds in red wines by HPLC-DAD/ESI-MS. *American Journal of Enology and Viticulture* 56, 139-147.
- MORATA A, GÓMEZ-CORDOVÉS MC, SUBERVIOLA J, BARTOLOMÉ B, COLOMBO B, SUÁREZ J, 2003. Adsorption of anthocyanins by yeast cell walls during the fermentation of red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51, 4084-4088.
- MOSQUEDA-MELGAR J, RAYBAUDI-MASSILIA RM, MARTÍN-BELLOSO O, 2008. Non-thermal pasteurization of fruit juices by combining high-intensity pulsed electric fields with natural antimicrobials. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 9, 328-340.
- MURAT ML, DUMEAU F, 2003. Impact of fining on population levels of certain spoilage microorganisms in red wines. *Australian and New Zealand Grapegrower and Winemaker* 478, 92-94.
- NEUMANN E, ROSENHECK K, 1972. Permeability changes induced by electric impulses in vesicular membranes. *Journal of Membrane Biology* 10, 279-290.
- NICHENAMETLA SN, TARUSICIO TG, BARNEY DL, EXON JH, 2006. A review of the effects and mechanisms of polyphenolics in cancer. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 46, 161-83.
- NIETO A, SALVATORI D, CASTRO MA, ALZAMORA SM, 1998. Air drying behaviour of apple as affected by blanching and glucose impregnation. *Journal of Food Engineering* 36, 63-79.
- NOBLE AC, 1990. Bitterness and astringency in wine. En R.L Roussef (Ed.), *Bitterness in Foods and Beverages* (pp. 145-158). Elsevier: Amsterdam.
- NORIEGA MJ, CASP A, 2003. Caracterización polifenólica y cromática de vinos tintos jóvenes vr. Tempranillo de la D.O. Navarra. *Viticultura/Enología Profesional* 88, 47-54.
- OHSHIMA T, AKUYAMA K, SATO M, 2002. Effect of culture temperature on high-voltage pulsed sterilization of *Escherichia coli*. *Journal of Electrostatics* 55, 227-235.
- OIV (ORGANIZACIÓN INTERNACIONAL DE LA VIÑA Y EL VINO), 2000. *Compendio de los métodos internacionales de análisis de los vinos y de los mostos*. OIV : París.
- OIV (ORGANIZACIÓN INTERNACIONAL DE LA VIÑA Y EL VINO), 2005. *Situación del sector vitivinícola mundial en 2005*. OIV: París.
- OUGH CS, CRONWELL EA, 1987. Use of sulphur dioxide in winemaking. *Journal of Food Science* 52, 386-389.
- OZMIANSKI J, ROMEYER, FM, SAPIS JC, MACHEIX JJ, 1986. Grape seed phenolics: extraction as affected by some conditions occurring during vine processing. *American Journal of Enology and Viticulture* 37, 7-12.
- PAGÁN R, ESPLUGAS S, GÓNGORA-NIETO MM, BARBOSA-CÁNOVAS GV, SWANSON BG, 1998. Inactivación de *Bacillus subtilis* spores using high intensity pulsed electric fields in combination with other food conservation technologies. *Food Science and Technology International* 4, 33-44.
- PAGÁN R, MAÑAS P, 2006. Fundamental Aspects of Microbial Membrane Electroporation. En J Raso, V Heinz (Eds.), *Pulsed Electric Fields Technology for the Food Industry. Fundamentals and Applications* (pp. 73-94). Springer: Nueva York.
- PAVLIN M, PAVSELJ N, MIKLAVCIC D, 2002. Dependence of induced transmembrane potential on cell density, arrangement and cell position inside a cell system, *IEEE Transactions on Biomedical Engineering* 49, 605-612.

- PÉREZ-CABALLERO V, AYALA F, ECHAVÁRRI JF, NEGUERUELA AI, 2003. Proposal for a new standard OIV method for determination of chromatic characteristics of wine. *American Journal of Enology and Viticulture* 54, 59-62.
- PÉREZ-LAMELA C, GARCÍA-FALCÓN MS, SIMAL-GANDARA J, ORRIOLS-FERNÁNDEZ I, 2007. Influence of grape variety, vine system and enological treatments on the colour stability of young red wines. *Food Chemistry* 101, 601-606.
- PÉREZ-MARGARIÑO S, GONZÁLEZ-SAN JOSÉ ML, 2004. Evolution of flavanols, anthocyanins, and their derivatives during the aging of red wines elaborated from grapes harvested at different stages of ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52, 1181-1189.
- PINELO M, ARNOUS A, MEYER AS, 2006. Upgrading of grape skins: significance of plant cell-wall structural components and extraction techniques for phenol release. *Trends in Food Science and Technology* 17, 579-590.
- POWELL KT, WEAVER JC, 1986. Transients aqueous pores in bilayer membranes: A statistical theory. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* 15, 211-227.
- POWERS JR, SHIVELY A, NEGEL CW, 1980. Effect of Ethephon on the colour of Pinot Noir fruit and wine. *American Journal of Enology and Viticulture* 31, 203-205.
- POZO-BAYÓN MA, ANDÚJAR-ORTIZ I, MORENO-ARRIBAS MV, 2009. Scientific evidences beyond the application of inactive dry yeast preparations in winemaking. *Food Research International* 42, 754-761.
- PRAPORSCIC I, SHYNKARYK MV, LEOVKA NI, VOROBIEV E, 2007a. Analysis of juice colour and dry matter content during pulsed electric field enhanced expression of soft plant tissues. *Journal of Food Engineering* 79, 662-670.
- PRAPORSCIC I, LEOVKA N, VOROBIEV E, MIETTON-PEUCHOT M, 2007b. Pulsed electric field enhanced expression and juice quality of white grapes. *Separation and Purification Technology* 52, 520-526.
- PRASANNA GL, PANDA T, 1997. Electroporation: Basic principles, practical considerations and applications in molecular biology. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* 16, 261-264.
- PUECH JL, FEUILLAT M, BOULET JC, KELLER R, MASSON G, MOUTOUNET M, NAUDIN R, PEYRON D, 2007. Crianza de los vinos. En C Flanz (Ed.), *Enología: Fundamentos Científicos Tecnológicos* (pp. 608-641). AMV: Madrid.
- PUÉRTOLAS E, SALDAÑA G, CONDÓN S, RASO J, ÁLVAREZ I, 2008a. Evaluación de un equipo de pulsos eléctricos de alto voltaje para la inactivación microbiana y la extracción de compuestos intracelulares. En M Raventós y J Salazar (Eds.), *CESIA-CIBSA 2008*. ISBN: 9788496736573. CIME: Barcelona.
- PUÉRTOLAS E, SALDAÑA G, LÓPEZ N, CONDÓN S, ÁLVAREZ I, RASO J, 2008b. Pulsed electric fields: a new technology for improving extraction process in food industry. En *Symposium on Veterinary Sciences*. Zaragoza, España.
- PUÉRTOLAS E, LÓPEZ N, CONDÓN S, ÁLVAREZ I, RASO J, 2009a. Pulsed electric fields inactivation of wine spoilage yeast and bacteria. *International Journal of Food Microbiology* 130, 49-55.
- PUÉRTOLAS E, SALDAÑA G, CONDÓN S, ÁLVAREZ I, RASO J, 2009b. A comparison of the effect of macerating enzymes and pulsed electric fields technology on phenolic content and color of red wine. *Journal of Food Science* 74, 647-652.

- PUÉRTOLAS E, LÓPEZ N, SALDAÑA G, ÁLVAREZ I, RASO J, 2010a. Evaluation of phenolic extraction during fermentation of red grapes treated by a continuous pulsed electric fields process at pilot-plant scale. *Journal of Food Engineering* 98, 120-125.
- PUÉRTOLAS E, HERNÁNDEZ-ORTE P, SALDAÑA G, ÁLVAREZ I, RASO J, 2010b. Improvement of winemaking process using pulsed electric fields at pilot-plant scale. Evolution of chromatic parameters and phenolic content of Cabernet Sauvignon red wines. *Food Research International* 43, 761-766.
- PUÉRTOLAS E, SALDAÑA G, CONDÓN S, ÁLVAREZ I, RASO J, 2010c. Evolution of polyphenolic compounds in red wine from Cabernet Sauvignon grapes processed by pulsed electric fields during aging in bottle. *Food Chemistry* 119, 1063-1070.
- PUÉRTOLAS E, SALDAÑA G, ÁLVAREZ I, RASO J, 2010d. Effect of pulsed electric fields processing of red grapes on wine chromatic and phenolic characteristics during aging in oak barrels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58, 2351-2357.
- PUÉRTOLAS E, LÓPEZ, N, ÁLVAREZ I, RASO J, 2010e. Potential applications of PEF to improve red wine quality. *Trends in Food Science and Technology* 21, 247-255.
- PUIG A, VILAVELLA M, DAOUDI L, GUAMIS B, MINGUEZ, S, 2003. Microbiological and biochemical stabilization of wines by application of high pressure processing. *Bulletin de l'OIV* 76, 596-617.
- QIN BL, ZHANG Q, BARBOSA-CÁNOVAS GV, SWANSON BG, PEDROW PD, 1995. Pulsed electric field treatment chamber design for liquid food pasteurization using finite element method. *Transactions of the American Society of Agricultural Engineers* 38, 557-565.
- RANKINE BC, FORNACHON JCM, BUDSON DA, 1969. Diacetyl in Australian dry red table wine and its significance in wine quality. *Vitis* 8, 129-134.
- RASO J, CALDERÓN ML, GÓNGORA M, BARBOSA-CÁNOVAS GV, SWANSON BG, 1998. Inactivation of mold ascospores and conidiospores suspended in fruit juices by pulsed electric fields. *LWT-Food Science and Technology* 31, 668-672.
- RASO J, ÁLVAREZ I, CONDÓN S, SALA-TREPAT FJ, 2000. Predicting inactivation of *Salmonella senftenberg* by pulsed electric fields. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 1, 21-29.
- RASTOGI NK, ESHTIAGHI MN, KNORR D, 1999. Accelerated mass transfer during osmotic dehydration of high intensity electrical field pulse pre-treated carrots. *Journal of Food Science* 64, 1020-1023.
- RASTOGI NK, RAGHAVARAO KSMS, NIRANJAN K, KNORR D, 2002. Recent developments in osmotic dehydration: methods to enhance mass transfer. *Trends in Food Science and Technology* 13, 48-59.
- RAVISHANKAR S, FLEISCHMAN GJ, BALASUBRAMANIAM VM, 2002. The inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 during pulsed electric field (PEF) treatment in a static chamber. *Food Microbiology* 19, 351-361.
- REBELEIN H, 1973. Rapid method for the determination of the alcohol, sugar, and total sulfur dioxide contents (by distillation) in wine and fruit juices and also for determining the blood alcohol. *Chemie, Mikrobiologie, Technologie der Lebensmittel* 2, 112-121.
- REGLAMENTO (CE) N° 1493/1999 del Consejo, de 17 de Mayo de 1999, por el que se establece la organización común del mercado vitivinícola. *DO L179 de 14.7.1999*.

- REGLAMENTO (CE) N° 318/2006 del Consejo, de 20 de Febrero de 2006, por el que se establece la organización común de mercados en el sector del azúcar. *DO L58 de 28.2.2006*.
- REGLAMENTO (CE) N° 423/2008 de la Comisión, de 8 de Mayo de 2008, por el que se establecen determinadas disposiciones de aplicación del Reglamento (CE) N° 1493/1999 del Consejo y se introduce un código comunitario de prácticas y tratamientos enológicos. *DO L127 de 15.5.2008*.
- REGLAMENTO (CE) N° 479/2008 del Consejo, de 29 de Abril de 2008, por el que se establece la organización común del mercado vitivinícola. *DO L148 de 6.6.2008*.
- RENAUD S, DE LORGERIL M, 1992. Wine, alcohol, platelets and the French paradox on coronary heart disease. *Lancet* 339, 1523-1526.
- REVILLA E, LÓPEZ JF, RYAN JM, 2005. Anthocyanin pattern of Tempranillo wines during ageing in oak barrels and storage in stainless-steel tank. *European Food Research and Technology* 220, 592-596.
- REYNOLDS A, CLIFF M, GIRARD B, KOPP TG, 2001. Influence of fermentation temperature on composition and sensory properties of Semillon and Shiraz wines. *American Journal of Enology and Viticulture* 52, 235-240.
- RIBÉREAU-GAYON P, 1974. The chemistry of red wine color. En AD Webb (Ed.), *The Chemistry of Wine* (pp.50-87). American Chemical Society: Washington.
- RIBÉREAU-GAYON J, PEYNAUD E, RIBÉREAU-GAYON P, SUDRAUD P, 1976. *Sciences et techniques du vin. Tome III. Vinification*. Dunod: París.
- RIBÉREAU-GAYON P, DUBOURDIEU D, DONÈCHE B, LONVAUD A, 2006a. *Handbook of Enology. Volume 1. The microbiology of Wine and Vinification. 2nd Edition*. John Wiley & Sons: Chichester.
- RIBÉREAU-GAYON P, GLORIES Y, MAUJEAN A, DUBOURDIEU D, 2006b. *Handbook of Enology. Volume 2. The Chemistry of Wine, Stabilization and Treatments. 2nd Edition*. John Wiley & Sons: Chichester.
- RICE-EVANS CA, MILLER NJ, PAGANGA G, 1996. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine* 20, 933-956.
- RIEMANN F, ZIMMERMANN U, PILWAT G, 1975. Release and uptake of haemoglobin and ions in red blood cells induced by dielectric breakdown. *Biochimica et Biophysica Acta* 394, 449-462.
- ROSARIO-SALINAS M, GARIJO J, PARDO F, ZALACÁIN A, ALONSO GL, 2003. Color, polyphenol and aroma compounds in rosé wines after prefermentative maceration and enzymatic treatments. *American Journal of Enology and Viticulture* 54, 195-202.
- RUIZ-HERNÁNDEZ M, 2004. *Tratado de Vinificación en tinto*. Mundi-Prensa. Madrid.
- SACCHI KL, BISSON LF, ADAMS D, 2005. A review of the effect of winemaking techniques on phenolic extraction in red wines. *American Journal of Enology and Viticulture* 56, 197-206.
- SALAH, MI, KALLITHRAKA S, MARMARAS I, KOUSSISSI E, TZOUROU T, 2008. A natural alternative to sulphur dioxide for red wine production: Influence on colour, antioxidant activity and anthocyanin content. *Journal of Food Composition and Analysis* 21, 660-666.
- SALDAÑA G, PUÉRTOLAS E, LÓPEZ N, CONDÓN S, ÁLVAREZ I, RASO J, 2008. Pulsed electric fields: a new technology for improving food safety. En *II Symposium on Veterinary Sciences*. Zaragoza, España.

- SALDAÑA G, PUÉRTOLAS E, LÓPEZ N, GARCÍA D, ÁLVAREZ I, RASO J, 2009. Comparing the PEF resistance and occurrence of sublethal injury on different strains of *Escherichia coli*, *Salmonella* Typhimurium, *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in media of pH 4 and 7. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 10, 160-165.
- SALE AJH, HAMILTON WA, 1967a. Effect of high electric field on microorganisms. I. Killing of bacteria and yeast. *Biochimica et Biophysica Acta* 148, 781-788.
- SALE AJH, HAMILTON WA, 1967b. Effect of high electric field on microorganisms. II. Mechanism of action of the lethal effect. *Biochimica et Biophysica Acta* 148, 789-800.
- SALE AJH, HAMILTON WA, 1968. Effect of high electric field on microorganisms. III. Lysis of erythrocytes and protoplasts. *Biochimica et Biophysica Acta* 163, 37-43.
- SÁNCHEZ V, PUERTAS B, CANTOS E, GUERRERO RF, JURADO MS, 2006. Estudio del efecto de las técnicas de criomaceración y maceración prefermentativa en frío sobre la calidad de vinos tintos. En *Actas del XXIX Congreso Mundial de la Viña y el Vino*. NIPO: 251060275. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación: Madrid.
- SANHUEZA A. 1999. *Métodos para la determinación de nitrógeno fácilmente asimilable para las levaduras del mosto*. Tesis Doctoral. Pontificia Universidad Católica de Chile, Chile.
- SATO M, ISHIDA NM, SUGIARATO AT, OHSHIMA T, TANIGUCHI H, 2001. High-efficiency sterilizer by high-voltage pulse using concentrated-field electrode system. *IEEE Transactions on Industry Applications* 37, 1646-1650.
- SCALBERT A, MANACH C, MORAND C, REMESY C, JIMÉNEZ L, 2005. Dietary Polyphenols and the Prevention of Diseases. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 45, 287-306.
- SCHILLING S, TOEPFL S, LUDWIG M, DIETRICH H, KNORR D, NEIDHART S, SCHIEBER A, CARLE R, 2008a. Comparative study of juice production by pulsed electric field treatment and enzymatic maceration of apple mash. *European Food Research and Technology* 226, 1389-1398.
- SCHILLING S, SCHMID S, JAEGER H, LUDWIG M, DIETRICH H, TOEPFL S, KNORR D, NEIDHART S, SCHIEBER A, CARLE R, 2008b. Comparative study of pulsed electric field and thermal processing of apple juice with particular consideration of juice quality and enzyme. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56, 4545-4554.
- SCHOENBACH KH, PETERKIN FE, ALDEN RW, BEEBE SJ, 1997. The effect of pulsed electric fields on biological cells: experiments and applications. *IEEE Transactions on Plasma Science* 25, 284-292.
- SCHWARZ M, PICAZO-BACETE JJ, WINTERHALTER P, HERMOSÍN-GUTIÉRREZ I, 2005. Effect of copigments and grape cultivar on the colour of red wines fermented after the addition of copigments. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 8372-8381.
- SEPULVEDA DR, GÓNGORA-NIETO MM, SAN-MARTÍN MF, BARBOSA-CÁNOVAS GV, 2005. Influence of treatment temperature on the inactivation of *Listeria innocua* by pulsed electric fields. *LWT-Food Science and Technology* 38, 167-172.
- SERVILI M, BEGLIOMINI AL, MONTEDORO G, 1992. Utilisation of yeast pectinase in olive oil extraction and red wine making processes. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 58, 253-260.
- SINGLETON VL, ROSSI JA, 1965. Colorimetric of total phenolics with phosphomolibdicphosphotungstic acid reagent. *American Journal of Enology and Viticulture* 16, 144-158.

- SMITH K, MITTAL GS, GRIFFITHS MW, 2002. Pasteurization of milk using pulsed electric field and antimicrobials. *Journal of Food Science* 67, 2304-2308.
- SNOWDON EM, BOWYER MC, GRBIN PR, BOWYER PK, 2006. Mousy off-flavour: A review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54, 6465-6474.
- SOMOLINOS M, GARCÍA D, CONDÓN S, MAÑAS P, PAGÁN R, 2007. Relationship between sublethal injury and inactivation of yeast cells by the combination of sorbic acid and pulsed electric fields. *Applied and Environmental Microbiology* 73, 3814-3821.
- SOUQUET JM, CHEYNIER V, BROSSAUD F, MOUTOUNET M, 1996. Polymeric proanthocyanidins from grape skins. *Phytochemistry* 43, 509-512.
- SPIGNO G, TRAMELLI L, DE FAVERI DM, 2007. Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. *Journal of Food Engineering* 81, 200-208.
- SPRANGER MI, CLÍMACO MC, SUN B, ERITZ N, FORTUNATO C, NUNES A, CONCEIÇÃO-LEANDRO M, AVELAR ML, BELCHIOR AP, 2004. Differentiation of red winemaking technologies by phenolic and volatile composition. *Analytica Chimica Acta* 513, 151-161.
- STOCLET JC, CHATAIGNEAU T, NDIAYE M, OAK MH, EL BEDOUI J, CHATAIGNEAU M, SCHINI-KERTH VB, 2004. Vascular protection by dietary polyphenols. *European Journal of Pharmacology* 500, 299-313.
- SUÁREZ-LEPE JA, ÍÑIGO-LEAL B, 2004. *Microbiología enológica. Fundamentos de vinificación*. Mundi-Prensa: Madrid.
- SUÁREZ R, SUÁREZ-LEPE JA, MORATA A, CALDERÓN F, 2007. The production of ethylphenols in wine by yeast of the genera *Brettanomyces* and *Dekkera*: A review. *Food Chemistry* 102, 10-21.
- SUDRAUD P, 1958. Interpretation des courbes d'absorption des vins rouges. *Annals de Technologie Agricole* 7, 203-208.
- TEISSEDE PL, FRANKEL EN, WATERHOUSE A, PELEG H, GERMAN JB, 1996. Inhibition of in vitro human LDL oxidation by phenolic antioxidants from grapes and wines. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 70, 55-61.
- TEISSIE J, TSONG TY, 1981. Electric field induced transient pores in phospholipids bilayer vesicles. *Biochemistry* 20, 1548-1554.
- TEISSIE J, GOLZIO M, ROLS MP, 2005. Mechanisms of cell membrane electroporation: A minireview of our present (lack of?) knowledge. *Biochimica et Biophysica Acta* 1724, 270-280.
- TIRELLI A, DE NONI I, 2007. Evaluation of lysozyme stability in young red wine and model systems by a validated HPLC method. *Food Chemistry* 105, 1564-1570.
- TOEPFL S, HEINZ V, KNORR D, 2005a. Overview of Pulsed Electric Field Processing for Food. En DW Sun (Ed.), *Emerging Technologies for Food Processing* (pp. 69-97). Academic Press: Londres.
- TOEPFL S, RUEHLE C, HEINZ V, 2005b. PEF fish and meat processing. En *Workshop of IFT Nonthermal Processing Division 2005*. Philadelphia, EE.UU.
- TOEPFL S, HEINZ V, KNORR D, 2006. Applications of Pulsed Electric Fields Technology for the Food Industry. En J Raso, V Heinz (Eds.), *Pulsed Electric Fields Technology for the Food Industry. Fundamentals and Applications* (pp. 197-221). Springer: Nueva York.

- TOEPFL S, HEINZ V, KNORR D, 2007a. High intensity pulsed electric fields applied for food preservation. *Chemical Engineering and Processing* 46, 537-546.
- TOEPFL S, HEINZ V, KNORR D, 2007b. History of pulsed electric field treatment. En HLM Lelieveld, S Notermans, SWH de Haan (Eds.), *Food preservation by pulsed electric fields* (pp. 9-39). Woodhead Publishing: Cambridge.
- TOEPFL S, HEINZ V, 2007c. Application of pulsed electric fields to improve mass transfer in dry cured meat products. *Fleischwirtschaft International* 1, 62-64.
- TOEPFL S, 2007d. *Pulsed Electric Fields (PEF) for Permeabilization of Cell Membranes in Food-and Bioprocessing-Applications, Process and Equipment Design and Cost Analysis*. Tesis Doctoral. TU Berlín, Alemania.
- TOKO K, YAMAFUJI K, 1981. Stabilization effect of protons and divalent cations on membrane structures of lipids. *Biophysical Chemistry* 14, 11-23.
- TORKANGER POLL K, ANDERSEN Ø, 2005. Colour stability of anthocyanins in aqueous solution at various pH. *Food Chemistry* 89, 427-440.
- TSONG TY, 1991. Electroporation of cell membranes. *Biophysical Journal* 60, 297-306.
- USDA (UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE), 2003. *Database for the Flavonoid Content of Selected Foods*. USDA: Washington.
- USSEGLIO-THOMASSET L, 1992. Properties and use of sulphur dioxide. *Food Additives and Contaminants* 9, 399-404.
- VALIC B, GOLZIO M, PAVLIN M, SCHATZ A, FAURIE C, GABRIEL B, TEISSIE J, ROLS MP, MIKLAVCIC D, 2003. Effect of electric field induced transmembrane potential on spheroidal cells: Theory and experiment. *European Biophysics Journal* 32, 519-528.
- VAN LOEY A, VERACHTERT B, HENDRICKX M, 2001. Effects of high electric field pulses on enzymes. *Trends in Food Science and Technology* 12, 94-102.
- VASSEROT Y, CAILLET S, MAUJEAN A, 1997. Study of anthocyanin adsorption by yeast lees. Effect of some physicochemical parameters. *American Journal of Enology and Viticulture* 48, 433-437.
- VEGA-MERCADO H, POTHAKAMURY UR, CHANG FJ, BARBOSA-CÁNOVAS GV, SWANSON BG, 1996a. Inactivation of *Escherichia coli* combining pH, ionic strength and pulsed electric fields hurdles. *Food Research International* 29, 117-121.
- VEGA-MERCADO H, MARTÍN-BELOSO O, CHANG FJ, BARBOSA-CÁNOVAS GV, SWANSON BG, 1996b. Inactivation of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* in pea soup using pulsing electric fields. *Journal Food Processing and Preservation* 20, 501-510.
- VIDAL S, FRANCIS L, NOBLE A, KWIATKOWSKI M, CHEYNIER V, WATERS E, 2004a. Taste and mouth-feel properties of different types of tannin-like polyphenolic compounds and anthocyanins in wine. *Analytica Chimica Acta* 513, 57-65.
- VIDAL S, MEUDEC E, CHEYNIER V, SKOUROUMOUNIS G, HAYASAKA Y, 2004b. Mass spectrometric evidence for existence of oligomeric anthocyanins in grape skin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52, 7144-7151.
- VIVAR-QUINTANA AM, SANTOS-BUELGA C, RIVAS-GONZALO C, 2002. Anthocyanin-derived pigments and colour of red wines. *Analytica Chimica Acta* 458, 147-155.
- VON BAER D, MARADONES C, GUTIÉRREZ L, HOFMAN G, BACERRA J, HITSCHFELD A, VERGARA C, 2005. Varietal authenticity verification of Cabernet sauvignon, Merlot and Carmenère wine produced in Chile by their anthocyanin, flavonol and schikinic acid. *Bulletin de l'OIV* 78, 45-57.

- VOROBIEV E, LEOVKA NI, 2006. Extraction of Intracellular Components by Pulsed Electric Fields. En J Raso, V Heinz (Eds.), *Pulsed Electric Fields Technology for the Food Industry. Fundamentals and Applications* (pp. 153-193). Springer: Nueva York.
- WEAVER JC, CHIZMADZHEV YA, 1996. Theory of electroporation: a review. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* 41, 135-160.
- WEIBULL W, 1951. A Statistical Distribution Function of Wide Applicability. *Journal of Applied Mechanics-Transactions of the ASME* 18, 293-297.
- WIGHTMAN JD, WROLSTRAD RE, 1995. Anthocyanin analysis as a measure of glycosidase activity in enzymes for juice processing. *Journal of Food Science* 60, 862-867.
- WILSON T, KNIGHT TJ, BEITZ DC, LEWIS DS, ENGEN RL, 1996. Resveratrol promotes atherosclerosis in hypercholesterolemic rabbits. *Life Science* 59, 15-21.
- WOUTERS PC, DUTREUX N, SMELT JPPM, LELIEVELD HLM, 1999. Effects of pulsed electric fields on inactivation kinetics of *Listeria innocua*. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 5364-5371.
- WOUTERS PC, ÁLVAREZ I, RASO J, 2001a. Critical factors determining inactivation kinetics by pulsed electric field food processing. *Trends in Food Science and Technology* 12, 112-121.
- WOUTERS PC, BOS AP, UECKERT J, 2001b. Membrane permeabilization in relation to inactivation kinetics of *Lactobacillus* species due to pulsed electric fields. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 3092-3101.
- WU Y, MITTAL GS, GRIFFITHS MW, 2005. Effect of pulsed electric field on the inactivation of microorganisms in grape juices with and without antimicrobials. *Biosystems Engineering* 90, 1-7.
- XU L, DIOSADY LL, 2003. Fat and Oils from Plant Materials. En C Tzia, G Liadakis (Eds.), *Extraction Optimization in Food Engineering* (pp. 35-55). Marcel Dekker: Nueva York.
- YILMAZ Y, TOLEDO RT, 2004. Major flavonoids in grape seeds and skins: Antioxidant capacity of catechin, epicatechin, and gallic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52, 255-260.
- Yokotsuka K, Sato M, Ueno N, Singleton V, 2000. Colour and Sensory Characteristics of Merlot Red wines Caused by Prolonged Pomace Contact. *Journal of Wine Research* 11, 7-18.
- ZAMORA F, LUENGO G, MARGALEF P, MAGRIÑA M, AROLA L, 1994. Efecto del sangrado sobre el color y la composición en compuestos fenólicos del vino tinto. *Revista Española de Ciencia y Tecnología de Alimentos* 34, 663-671.
- ZAMORA F, 2003. *Elaboración y crianza del vino tinto: Aspectos científicos y prácticos*. AMV: Madrid.
- ZHANG Q, BARBOSA-CÁNOVAS GV, SWANSON BG, 1995. Engineering aspects of pulsed electric field pasteurization. *Journal of Food Engineering* 25, 261-281.
- ZIMMERMANN U, PILWAT G, RIEMANN F, 1974. Dielectric breakdown of cell membranes. *Biophysics Journal* 14, 881-899.
- ZOECKLEIN BW, FUGELSANG KC, GUMP BH, NURY FS, 2001. *Análisis y Producción de Vino*. Acribia: Zaragoza.

Consejo Económico y Social de Aragón

Composición del Pleno (a 26/4/2012)

En representación del Gobierno de Aragón

Titulares

D. Mariano Alierta Izuel
 D. Ignacio Alvo Rituerto
 D. Jesús Arbiol Tena
 D. Enrique Barbero Lahoz
 D^a. Natividad Blasco de las Heras (*Presidenta*)
 D. José M^a García López
 D^a. Inmaculada García Mainar
 D. José Alberto Molina Chueca
 D^a. Laura Moreno Casado

Suplentes

D^a. Cristina Asensio Grijalba
 D^a. Isabel Cebrián Alós
 D^a. Elena García-Lechuz Moya
 D^a. María Lacasa Mateo
 D^a. M^a Ángeles López Artal
 D. Juan Carlos Martín Mallén
 D. Víctor Montuenga Gómez
 D. Ignacio Moralejo Menéndez
 D. Javier Villanueva Sánchez

En representación de las Organizaciones Sindicales

Designados por la Unión General de Trabajadores (UGT Aragón)

Titulares

D. Jorge Abarca Viñas
 D. José Juan Arceiz Villacampa
 D^a. Ana Fuertes Cruz
 D. Julián Lóriz Palacio
 D^a. Carmen Melendo Vera (*Vicepresidenta*)

Suplentes

D. Javier Asensio Galdiano
 D. José Antonio Cid Felipe
 D^a. Carmen García Nasarre
 D. Raúl Machín Lapeña
 D. Ricardo Rodrigo Martínez

Designados por la Unión Sindical de Comisiones Obreras (CCOO Aragón)

Titulares

D^a. Marta Arjol Martínez
 D. Julián Buey Suñén
 D. Manuel Martínez Morales
 D. José Manuel Penella Cambra

Suplentes

D^a. Sofía Bergasa Pérez
 D^a. Rosina Lanzuela Iranzo
 D^a. Margarita Lasmarías Bustín
 D. Pablo Martínez Soriano

En representación de las Organizaciones Empresariales

Designados por la Confederación Regional de Empresarios de Aragón (CREA)

Titulares

D^a. Beatriz Callén Escartín
 D. Fernando Callizo Oliván (*Vicepresidente*)
 D. Carlos Mor Sanz
 D. Jesús Morte Bonafonte
 D. José Enrique Ocejo Rodríguez

Suplentes

D^a. Marta Alonso Casamajó
 D. Jorge Alonso Vallejo
 D. Sergio Calvo Bertolín
 D. Juan Carlos Dehesa Conde
 D^a. Rosa García Torres

Designados por la Confederación de la Pequeña y Mediana Empresa (CEPYME Aragón)

Titulares

D. Enrique Bayona Rico
 D. Salvador Cored Bergua
 D. Aurelio López de Hita
 D. Carmelo Pérez Serrano

Suplentes

D. Guillermo Arrizabalaga Lizarraga
 D^a. Pilar Gómez López
 D. Antonio Hinojal Zubiaurre
 D. Rafael Zapatero González

Publicaciones del Consejo Económico y Social de Aragón

ÚLTIMAS PUBLICACIONES

Informes anuales

- Informe sobre la situación económica y social de Aragón 2010.

Memorias de actividades

- Memoria de actividades 2011.

Colección Estudios

- Análisis para la mejora de la productividad.
- Tipos de jornada y productividad del trabajo.
- Organización del trabajo, conciliación y absentismo.
- La actividad cultural y su repercusión social en Aragón.
- Las familias monoparentales en Aragón.
- Posibilidades y viabilidad para la reapertura del Canfranc.

Colección Tesis Doctorales

- Evaluación del potencial energético de los bosques de Teruel mediante teledetección y SIG.

Colección Proyectos de Investigación

- El capital humano en la empresa aragonesa.

Colección Dictámenes*

- Dictamen 1/2012 sobre el Proyecto de modificación del Decreto 32/2007, por el que se regula la admisión de alumnos en los centros públicos y privados concertados.

ESTUDIOS EN CURSO

- Situación socioeconómica de Teruel: presente y futuro.
- Informe socioeconómico de la Década en Aragón 2001-2010**.

* Desde 2011 los Dictámenes se editan en formato electrónico.

** Actualmente en proceso de publicación.

