



UNIVERSIDAD DE MURCIA
ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO
TESIS DOCTORAL

Aplicación de tecnologías no térmicas
(ultrasonidos y microondas) en Enología

D.^a Paula Pérez Porras
2023



UNIVERSIDAD DE MURCIA
ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO
TESIS DOCTORAL

**Aplicación de tecnologías no térmicas (ultrasonidos y
microondas) en Enología**

Autor: **D.^a Paula Pérez Porras**

Director/es: **D.^a Encarna Gómez Plaza, D.^a Ana Belén Bautista
Ortín**



DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD

**DE LA TESIS PRESENTADA EN MODALIDAD DE COMPENDIO O ARTÍCULOS
PARA OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR**

Aprobado por la Comisión General de Doctorado el 19-10-2022

D./Dña. Paula Pérez Porras

doctorando del Programa de Doctorado en

Tecnología de los Alimentos, Nutrición y Bromatología

de la Escuela Internacional de Doctorado de la Universidad Murcia, como autor/a de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor y titulada:

Aplicación de tecnologías no térmicas (ultrasonidos y microondas) en Enología

y dirigida por,

D./Dña. Encarna Gómez Plaza

D./Dña. Ana Belén Bautista Ortín

DECLARO QUE:

La tesis es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, de acuerdo con el ordenamiento jurídico vigente, en particular, la Ley de Propiedad Intelectual (R.D. legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), en particular, las disposiciones referidas al derecho de cita, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Además, al haber sido autorizada como compendio de publicaciones o, tal y como prevé el artículo 29.8 del reglamento, cuenta con:

- *La aceptación por escrito de los coautores de las publicaciones de que el doctorando las presente como parte de la tesis.*
- *En su caso, la renuncia por escrito de los coautores no doctores de dichos trabajos a presentarlos como parte de otras tesis doctorales en la Universidad de Murcia o en cualquier otra universidad.*

Del mismo modo, asumo ante la Universidad cualquier responsabilidad que pudiera derivarse de la autoría o falta de originalidad del contenido de la tesis presentada, en caso de plagio, de conformidad con el ordenamiento jurídico vigente.

En Murcia, a 27 de septiembre de 2023

Fdo.: Paula Pérez Porras

Todas las imágenes presentes en este trabajo son originales, a excepción de la dispuesta en *Agradecimientos*, cedida por la autora, María Victoria Porras Martínez, para su reproducción en la presente tesis.

La realización de esta Tesis Doctoral ha sido posible gracias al Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades (Gobierno de España) mediante la concesión del Proyecto de Investigación “RTI2018-093869-B-C21”.

Agradecimientos

Agradecer tanto como debo en un par de páginas me resulta misión imposible. Tendré que cortarme en lo que a chistes malos y aclaraciones etimológicas se refiere, pero me tenéis que permitir empezar con una generalidad tal vez algo manida:

Agradezco a la vida, porque ha puesto en mi camino a enormes personas que me han enseñado a recorrerlo. Esto es parte de ese camino, así que a todas ellas les dedico este trabajo.

Quiero empezar agradeciendo todo esto a mis directoras, Encarna y Belén. Esencia de este trabajo y del grupo de investigación, su capacidad de esfuerzo, voluntad, empatía y humanidad (y sus toques de atención, a veces tan necesarios), las hacen ser mi referencia absoluta en lo laboral, pero también referencia personal. No puedo estar más agradecida por la oportunidad que me brindasteis (determinante en la dirección que tomó mi vida), por vuestra confianza en estos años y por haber cimentado y levantado **ese** grupo de trabajo del que cualquiera desearía formar parte.

A mis chicas. Jo, esto es vuestro. A Pili, por abrirme las puertas de tu despacho y de tu casa. A Andrea, por levantarme en peso el alma conversando sobre la vida. A Sonia, porque me insuflaste energía en mis peores momentos. A Lu, porque la vida nos hizo encontrarnos dos veces por una razón. A Leti (¿qué ven mis ojitos?), porque venir a España fue lo mejor que pudiste hacer por nosotras. A MJ, por aguantar mi pesadez siempre con una sonrisa. A Alejandro, por tus tan convincentes palabras de ánimo. A Rafa, porque por lejos que te vayas, siempre estarás aquí. A Juanda, esta historia enológica empezó contigo, creo que eso dice todo. A ti y a Diego, gracias por enseñarme a caminar (y hasta a correr) en el laboratorio. A toda la gente de la Estación Enológica, a María José, y en especial a Rocío, gracias. También agradecer a todo el personal laboral del departamento de CyTA y Vitalis, y a todos los alumnos internos, de TFG y TFM, que han aportado su granito de arena mostrando interés y nos han recordado por qué estamos aquí.

Gracias al grupo de Belén Ayestarán, Zenaida y Leti de la Universidad de La Rioja, y al grupo de Marisol y Silvia, de la Universidad de Castilla La Mancha, por hacer tan fácil el trabajo conjunto y permitirme aprender tanto de vosotras; ha sido una experiencia muy enriquecedora. Gracias por todo.

A todo el grupo de investigación del profesor David Contreras, que me acogió con los brazos abiertos y el EPR encendido. A toda la gente con la que compartí durante la estancia en Chile, tanto en Concepción como en Talca. Ojalá volver a vernos pronto y disfrutar de una rica calafate, una gloriosa piscola, o un juguito. Hago mención especial a Liudis, Yunier, Olguita, Liz y Luna, por acogerme y tratarme con un cariño que no merezco. Gracias por tanta generosidad.

A mis amigos de Alquerías, el Llano, Murcia, Pacheco, Lorca, La Costera... Por animarme cada día a continuar, por su apoyo incondicional. Desi, Inma: gracias.

A mi familia, porque no puedo vivir sin vuestros consejos, palabras de amor puro:

A mi abuelo Juan, que no os imagináis lo orgulloso que está. Y a mis abuelos Lola, Mariano y Mami, que sé que lo estarían.

A **Irene**, por enseñarme tantísimo de la vida. Te quiero.

A **mis padres**, por darme la vida. Todos los días.

A **Antonio**, por hacerme el mejor regalo posible en esta vida: poder ser parte de la tuya.

Y, por último, agradezco al vino. Todo esto es culpa suya.



ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. EL VINO Y LAS FORMAS DE PRODUCCIÓN: UNA HISTORIA DE EVOLUCIÓN.....	3
1.2. EL COLOR EN EL VINO: COMPUESTOS FENÓLICOS RESPONSABLES	5
1.2.1. Fenoles no flavonoides	6
1.2.1.1. Ácidos fenólicos.....	6
1.2.1.2. Estilbenos	7
1.2.2. Fenoles flavonoides	8
1.2.2.1. Flavonoles	8
1.2.2.2. Taninos	9
1.2.2.3. Antocianos	11
1.2.3. Estabilización del color	12
1.2.3.1. Fenómenos de copigmentación	13
1.2.3.2. Condensaciones antocianos-taninos	13
1.2.3.3. Polimerización de taninos.....	15
1.2.3.4. Formación de nuevos pigmentos derivados de antocianos ..	15
1.3. EL AROMA EN EL VINO.....	16
1.4. EXTRACCIÓN DE LOS COMPUESTOS DE INTERÉS DURANTE LA ETAPA DE MACERACIÓN. DEGRADACIÓN DE LA PARED CELULAR ...	19
1.4.1. Estructura y composición de la pared celular	19
1.4.2. Extracción de compuestos de interés durante la maceración....	22
1.5. APLICACIÓN DE TÉCNICAS ENOLÓGICAS PARA FAVORECER LA EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS DE INTERÉS EN EL VINO	24
1.5.1. Técnicas tradicionales	25
1.5.2. Tecnologías emergentes.....	29
1.5.2.1. Tecnologías con incremento de temperatura: Microondas .	29

1.5.2.2. Tecnologías sin incremento de temperatura	31
1.5.2.2.1. Altas presiones hidrostáticas (APH)	32
1.5.2.2.2. Campos eléctricos pulsados (CEP)	33
1.5.2.2.3. Ultrasonidos de alta potencia (US)	35
2. OBJETIVOS.....	63
3. RESULTADOS.....	67
3.1. Publicación: Using high-power ultrasounds in red winemaking: Effect of operating conditions on wine physico-chemical and chromatic characteristics.....	71
3.2. Publicación: The effect of ultrasound on Syrah wine composition as affected by the ripening or sanitary status of the grapes	75
3.3. Publicación: Combining high-power ultrasound and enological enzymes during winemaking to improve the chromatic characteristics of red wine	79
3.4. Publicación: High-power ultrasound in Enology: Is the outcome of this technique dependent on grape variety?	83
3.5. Publicación: The technology of high-power ultrasound and its effect on the color and aroma of rosé wines	87
3.6. Publicación: Prefermentative grape microwave treatment as a tool for increasing red wine phenolic content and reduce maceration time	91
4. DISCUSIÓN GENERAL.....	95
5. RESUMEN	107
6. ABSTRACT.....	113
7. CONCLUSIONES	119
8. CONCLUSIONS.....	123

1. INTRODUCCIÓN

1.1. EL VINO Y LAS FORMAS DE PRODUCCIÓN: UNA HISTORIA DE EVOLUCIÓN

Desde la Revolución Industrial hasta nuestros días, la aparición de nuevas tecnologías que permiten un incremento de la productividad y eficiencia de los procesos industriales vertebró uno de los pilares fundamentales de la investigación. Así, durante las últimas décadas, el uso de tecnologías innovadoras para la optimización de los procesos en la industria alimentaria ha sido objeto de interés para investigadores y empresas. Tecnologías que conllevan incrementos de temperatura (óhmicas o no óhmicas como radiofrecuencia, microondas o infrarrojos) han sido desplazadas por tecnologías menos agresivas que, evitando el sobrecalentamiento de los productos, reducen el impacto sobre la calidad organoléptica de los mismos. Entre ellas: altas presiones hidrostáticas, irradiación, campos eléctricos pulsados, luz pulsada, ozonización, plasma frío o ultrasonidos.

Estas tecnologías, cuyos principios físicos varían, son empleadas en gran variedad de procesos industriales: homogeneización, limpieza, desgasificación, despumación, emulsión, extracción o cristalización, entre otros, y dicha gran versatilidad permite su aplicación no sólo sobre materiales inorgánicos como superficies a higienizar para el tratamiento de alimentos sino también sobre distintos tipos de matriz orgánica, como productos lácteos, frutas, carnes, pescados o vino (Kumar et al., 2023; Morata et al., 2021; Knorr et al., 2011; Chemat y Khan, 2011).

No obstante, un nuevo factor ecológico, social y económico viene determinando el camino de la investigación y la producción industrial en todos sus campos en los últimos años: el cambio climático (Martínez-Pérez et al., 2020).

Desde los cultivos alimentarios en regiones productoras, hasta la afluencia de visitantes a regiones con economías sustentadas en el turismo, el cambio climático afecta a todos los sectores de la sociedad.

Uno de los cultivos más afectados es el de *Vitis vinifera*. Centrándose su cultivo en latitudes de 30-50° norte y 30-40° sur, el descontrol climático y el aumento de las temperaturas ha afectado de forma directa al ciclo de la vida (Biasi

et al., 2019). Ello desemboca en la asincronía de la maduración de la uva: el adelanto de la madurez tecnológica -momento óptimo de composición de azúcares-, con respecto a la madurez fenólica y aromática, lleva a tener que realizar la vendimia de la uva en momento no óptimo, ya sea por escasez de compuestos que aporten calidad organoléptica o por exceso de azúcares y, por tanto, por un alto alcohol probable en vino. Otro de los efectos observados es que no todas las variedades de *Vitis vinifera* ven afectado su ciclo de la misma forma, lo que conlleva alteraciones en la logística de las bodegas, que pueden ver insuficiente su capacidad productiva ante un excedente de uva a procesar. Esto puede traducirse en toneladas de uva descartadas y sus consecuentes pérdidas económicas, o bien, en la reducción de los tiempos de procesamiento de la uva con el fin de aumentar la capacidad productiva, si bien ello puede resultar en detrimento de la calidad organoléptica de los vinos obtenidos.

Por otro lado, la evolución de las preferencias de los consumidores hace ineludible el estudio de los intereses y nuevos retos a plantear en las formas productivas del vino y es que, a diferencia de otras ramas de la industria alimentaria, la venta del vino depende, entre otros factores, de la venta del proceso con el que se desarrolla. El uso de una u otra técnica durante la elaboración del vino puede afectar directamente al interés del consumidor. En este sentido, uno de los grandes intereses de los consumidores que ha aumentado en los últimos años es la progresiva reducción del uso de aditivos, como conservantes.

En este sentido, las tecnologías emergentes disponibles se plantean como herramientas útiles con el objeto de desarrollar modelos productivos que permitan adecuarse a los nuevos intereses generales, presentándose como aplicaciones fundamentales de estas tecnologías sobre la uva la eliminación de microorganismos con el fin de reducir el aporte de conservantes y la extracción de compuestos de interés que resulte en una mayor calidad organoléptica de los vinos producidos, mejorando así su aroma y su color, factores fundamentales en el análisis, la apreciación y el disfrute de vinos de calidad.

1.2. EL COLOR EN EL VINO: COMPUESTOS FENÓLICOS RESPONSABLES

El color de un vino es uno de los aspectos determinantes de su calidad y depende, en gran medida, de su contenido y composición en compuestos fenólicos, siendo estos también determinantes de características organolépticas como el cuerpo, estructura, astringencia y amargor (Bautista Ortín, 2005).

En el vino se pueden encontrar diferentes tipos de compuestos fenólicos, que se agrupan en dos categorías: flavonoides y no flavonoides. Entre los no flavonoides, se encuentran los ácidos fenólicos (ácidos benzoicos y ácidos cinámicos) y los estilbenos. Entre los flavonoides, los más comunes son: flavonoles, antocianos, flavan-3-oles monoméricos y los taninos condensados (Figura 1).

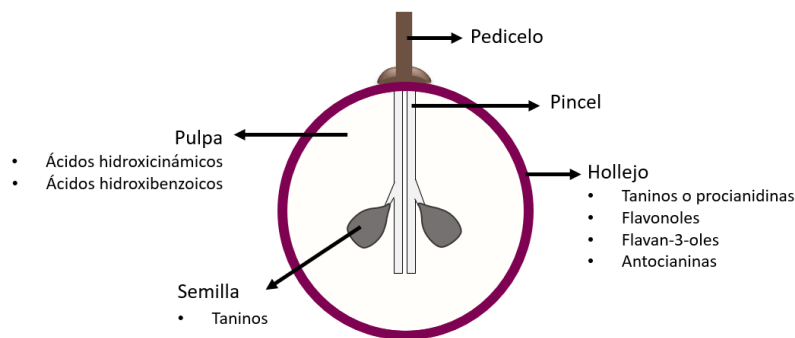


Figura 1: Esquema de baya de uva tinta

La síntesis de estos compuestos se debe a la convergencia de varias rutas metabólicas (Castro-López et al., 2015): por un lado, la transformación de azúcares (hexosas) en eritrosa-4-fosfato a través del ciclo pentosas-fosfato, en combinación con la vía del ácido shiquímico, da lugar a los ácidos fenólicos. Por otro lado, tiene lugar una ruta combinada que comienza con la glucólisis, transformando los azúcares en ácido pirúvico, y prosigue con su oxidación a acetil-coA, transformado en malonil-coA gracias al complejo enzimático acetil-CoA carboxilasa. En este punto, es gracias a la entrada del ácido fenólico p-cumárico y la presencia de la enzima chalcona sintasa (CHS) que se genera la estructura chalcona que da lugar al resto de compuestos flavonoides.

Si bien los fenoles no flavonoides son importantes en términos de actividad antioxidante, son los flavonoides y, especialmente, antocianos y taninos los más determinantes en el color del vino tinto (Bautista Ortín, 2005).

1.2.1. Fenoles no flavonoides

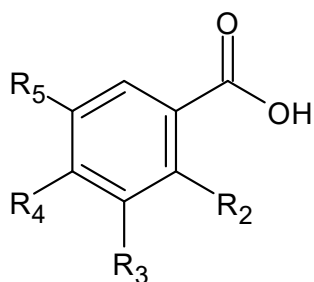
En este grupo se engloban los ácidos fenólicos (ácidos benzoicos y ácidos cinámicos) y estilbenos.

1.2.1.1. Ácidos fenólicos

Se trata de compuestos incoloros encontrados en el vino por su extracción a partir de la piel de la uva. Estos se clasifican a su vez en ácidos hidroxibenzoicos y ácidos hidroxicinámicos.

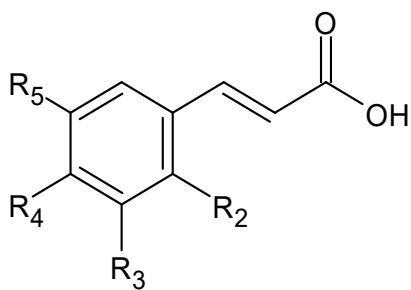
Los ácidos hidroxibenzoicos (Figura 2) pueden encontrarse en la uva en forma glucosilada o como esterificación de ácido gálico o elágico, principalmente (Ribéreau-Gayon et al., 2006), si bien por hidrólisis ácida o básica, respectivamente, pueden presentarse en sus formas libres.

Los ácidos hidroxicinámicos (Figura 3) pueden encontrarse en su forma libre en pequeñas cantidades, aunque suelen presentarse esterificados con ácido tartárico, lo que los hace especialmente oxidables (Cheynier et al., 1995) siendo sustrato de interés de la enzima polifenol oxidasa (PPO) (Gunata et al., 1987) pudiendo llevarlos hacia tonalidades amarillas propias de los procesos oxidativos, algo especialmente notable en mostos de uva blanca. No obstante, los ácidos fenólicos son encontrados en mayor cantidad en uva y vino tintos (100-200 mg/L) frente a uva y vino blancos (10-20 mg/L) (Ribéreau-Gayon et al., 2006). En este sentido, son fundamentales en la estabilización del color, por estabilización de los antocianos a partir de la esterificación de su azúcar con los ácidos cafeoil tartárico o caftárico, p-cumaroil tartárico o cutárico y feruloil tartárico o fertárico (Rebolo López, 2007), además de su participación en la formación de pigmentos derivados de antocianos (piranoantocianos), como son la pinotina o la portosina (Bloomfield et al., 2003; He et al., 2012).



Ácidos hidroxibenzoicos	R2	R3	R4	R5
<i>p</i> -hidroxibenzoico	H	H	OH	H
Protocatéquico	H	OH	OH	H
Vanílico	H	O	OH	H
Gálico	H	OH	OH	OH
Siríngico	H	OCH ₃	OH	OCH ₃
Salicílico	OH	H	H	H
Gentísico	OH	H	H	OH

Figura 2: Estructura de ácidos hidroxibenzoicos



Ácidos hidroxicinámicos	R2	R3	R4	R5
<i>p</i> -cumárico	H	H	OH	H
Cafeico	H	OH	OH	H
Ferúlico	H	OCH ₃	OH	H
Sinápico	H	OCH ₃	OH	OCH ₃

Figura 3: Estructura de ácidos hidroxicinámicos

1.2.1.2. Estilbenos

Los estilbenos, presentes en el hollejo de la uva, son los compuestos fenólicos más asociados a la capacidad antioxidante. Presentan radicales OH en posiciones 3 y 5 de un anillo bencénico y en posición 4', en otro anillo bencénico. Estos anillos se vinculan por una cadena de etano o etileno, con doble enlace entre carbonos, lo que les confiere isomería, de forma similar a los ácidos cinámicos. Estos compuestos destacan por sus propiedades antifúngicas en vid (Langcake, 1981), siendo el más conocido el *trans*-resveratrol (Figura 4). No obstante, se han identificado distintos derivados de este compuesto, como la viniferina (dímero de resveratrol) o el piceido (derivado glucosilado del resveratrol).

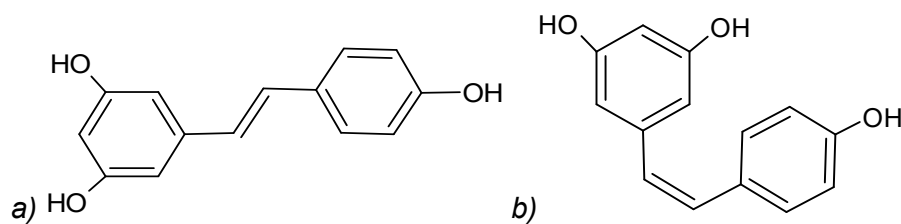


Figura 4: a) *trans-resveratrol*; b) *cis-resveratrol*

1.2.2. Fenoles flavonoides

Presentan un esqueleto común de dos anillos de benceno unidos por un anillo pirano heterocíclico, difiriendo las distintas subfamilias en las sustituciones en el anillo B.

1.2.2.1. Flavonoles

Los flavonoles, pigmentos de tonalidad amarilla, están presentes en la uva en forma de estructura glucosilada, aunque también se han encontrado galactosa, xilosa y arabinosa como azúcares de esterificación en menor abundancia. Tras la vinificación, la estructura esterificada es hidrolizada a su forma aglicona, encontrada en vinos blancos y tintos, siendo su concentración más alta en éstos últimos debido al proceso de maceración. Destacan el kaempferol y la quercetina, encontrados en vino blanco y tinto, y la miricetina, característica del vino tinto (Vergara Rosales, 2010) (Figura 5).

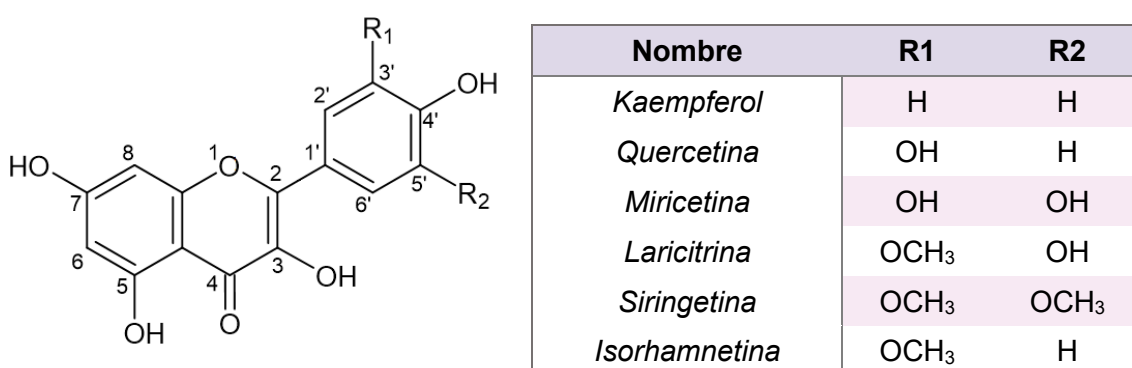


Figura 5: Estructura de flavonoles

Además de estos compuestos, existen otros flavonoides similares a considerar como las flavonas, las flavanonas y los flavanonoles (Figura 6). En vino destaca la presencia del flavanonol conocido como taxifolin (dihidroquercetina; $R_1=OH$, $R_2=H$) (Ribéreau-Gayon et al., 2006).

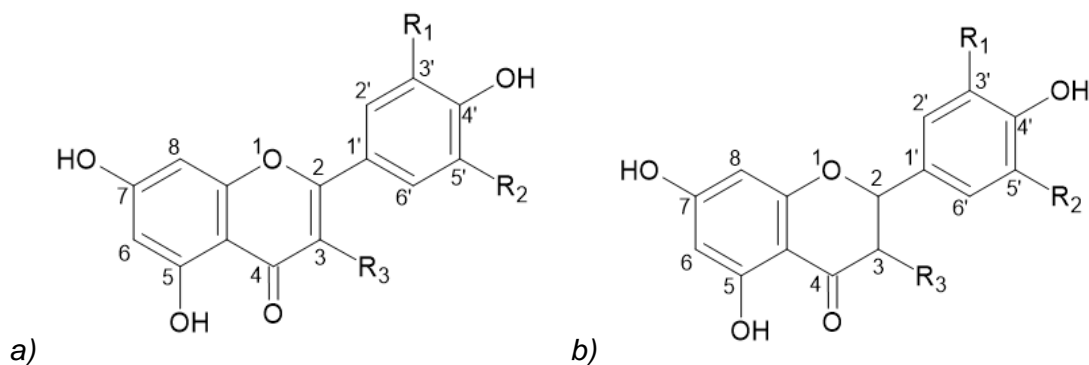


Figura 6: a) flavona ($R_3=H$), flavonol ($R_3=OH$); b) flavanona ($R_3=H$), flavanonol ($R_3=OH$)

1.2.2.2. Taninos

Si bien numerosas estructuras son recogidas bajo el nombre de “tanino”, son los taninos hidrolizables y condensados (estos últimos también conocidos como “proantocianidinas”) los que pueden encontrarse en el vino.

Los taninos hidrolizables no se encuentran de forma natural en uva y vino, si bien su importancia recae en el proceso de crianza en bodega de madera. Incluyen galotaninos y elagitaninos que, tras un proceso de hidrólisis ácida, liberan al medio ácido gálico y elágico (Ribéreau-Gayon et al., 2006).

Los taninos condensados, naturales de la uva y encontrados en hollejo y semilla, son polímeros formados por la unión de flavan-3-oles, moléculas que poseen un heterociclo saturado y oxigenado con dos carbonos asimétricos que le otorgan la propiedad de formar isómeros estructurales, entre los que destacan (+)-catequina, (-)-epicatequina y (+)-epicatequina, (-)-epigallocatequina y (-)-epicatequina-galato (Figura 7).

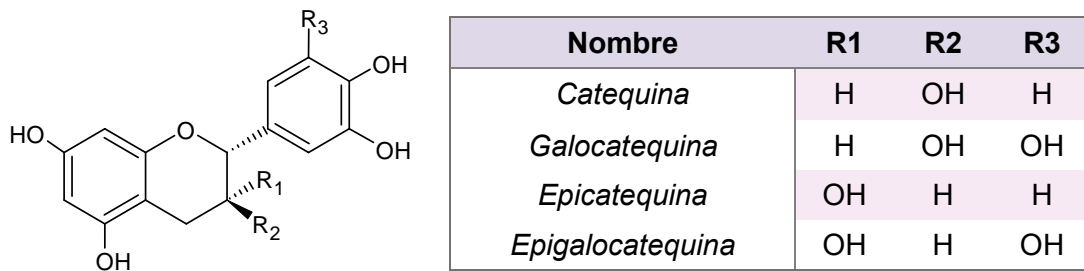


Figura 7: Estructura catequinas

Las uniones de estas moléculas en uva y vino, que se dan generalmente con enlaces interflavano C4-C6 (Vivas y Glories, 1993), C4-C8 y C-O-C (de Freitas, 1995; Cheynier et al., 2006; Hanlin et al., 2010), pueden conformar desde oligómeros, con un grado de polimerización medio (GPm) de entre 2 y 10 unidades de flavanoles, hasta polímeros (GPm>10) (Figura 8). Los taninos de semilla presentan un GPm cercano a 10, a diferencia de los taninos de hollejo, más condensados, que pueden presentar un GPm cercano a 30 (Prieur et al., 1994; Souquet et al., 1996). Además, los taninos de hollejo presentan subunidades de (-)-epigalocatequina, frente a los de semilla que poseen un mayor porcentaje de galoilación. El grado de polimerización y el porcentaje de galoilación de los taninos es considerado un factor determinante en las interacciones de estos compuestos con las proteínas salivares (García-Estévez et al., 2018), afectando de forma diferente a las sensaciones de astringencia y amargor del vino (Ma et al., 2014).

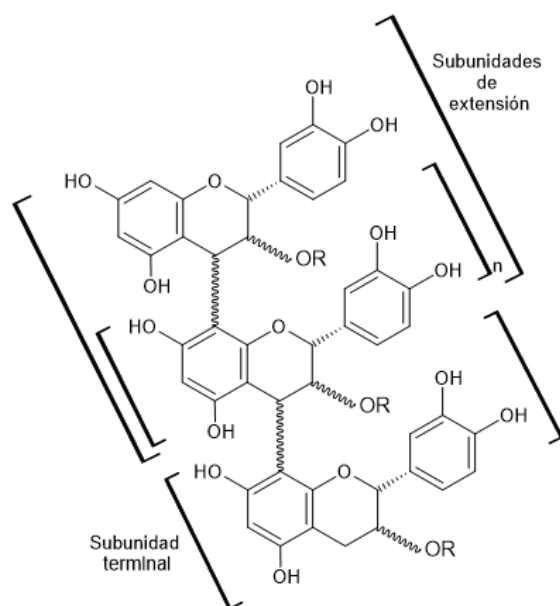


Figura 8: Uniones interflavano C4-C8

1.2.2.3. Antocianos

Los antocianos son los pigmentos responsables de forma directa del color rojo de los vinos rosados y tintos. Se encuentran en vesículas esféricas denominadas “antocianoplastos” o “inclusiones antociánicas vacuolares” (Mizuno et al., 2006; Markham et al., 2000) en el interior de las vacuolas intracelulares de las primeras capas celulares de la hipodermis del hollejo de uva, a excepción de las variedades tintoreras en las que se encuentran también en las células de la pulpa.

Estos compuestos presentan una estructura heterocíclica que cuenta con dos anillos bencénicos unidos por un heterociclo insaturado y oxigenado con carga positiva a pH ácido (Figura 9). El grupo que constituyen el primer anillo bencénico y el grupo pirilo (estructura pirano con un oxígeno cargado positivamente) es denominado “catión flavilio”, y suele presentarse esterificado en posición 3 con un azúcar (Figura 10) que le confiere estabilidad a la estructura y que puede estar en estado glucosídico o acilado por esterificaciones con ácido acético, p-cumárico o cafeico.

Dependiendo de las hidroxilaciones (-OH) y metilaciones (-OCH₃) presentes en las posiciones 3' y 5' de su anillo B se pueden encontrar en la uva y el vino la delfinidina, la cianidina, la petunidina, la peonidina y la malvidina (Figura 9), destacando ésta última por su alto contenido. Debido a su escasa alteración, el perfil de concentración de estos compuestos en uva y vino se emplea como un factor discriminante de variedades de uva (Cosme et al., 2021).

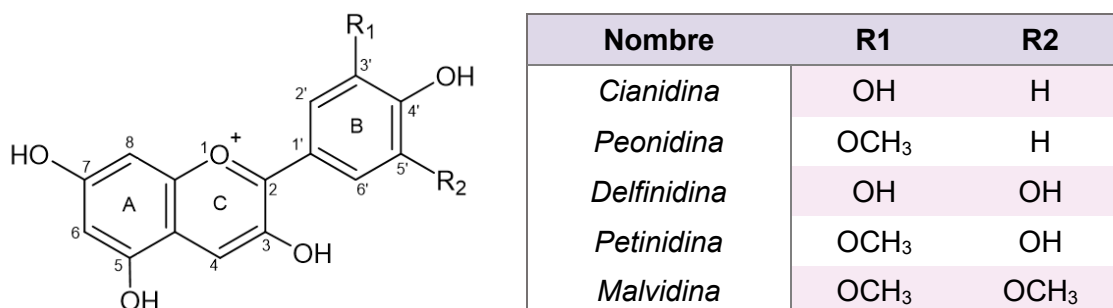


Figura 9: Estructura antocianidina

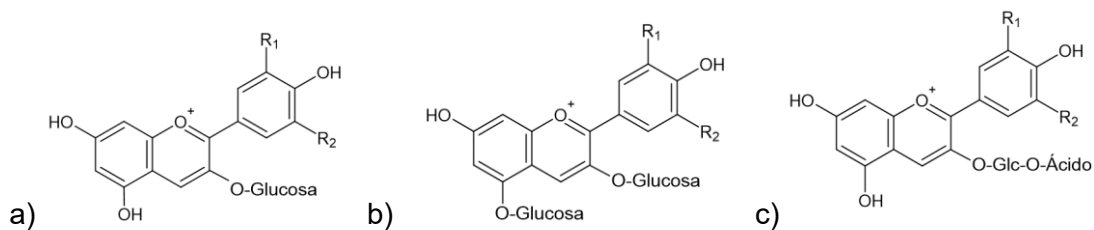


Figura 10: a) Antociano monoglucósido; b) Antociano diglucósido; c) Antociano monoglucósido acilado

En cuanto a la estructura de estos compuestos, varía en función de la composición del medio. Bajo pH ácido, los antocianos se disponen en su conformación de catión flavilio, que confiere al vino su característica tonalidad roja, mientras que un incremento del pH produce la desprotonación de la molécula, transformándola en base quinoidal y modificando su coloración desde una tonalidad malva hacia tonalidades azuladas e incluso amarillentas (pH>7).

Se distinguen, así, tres tipos de equilibrios: ácido-base o transferencia de protones, hidratación y tautomería de ciclo-cadena, siendo todas las reacciones de carácter reversible (Brouillard, 1982; Blanco Vega, 2013). Al pH del vino (3-4) en medio acuoso, tienen lugar reacciones de hidratación y transferencia de protones, manteniendo en equilibrio antocianos en forma de catión flavilio (AH⁺) y hemiacetal (forma incolora, AOH), con su isómero cis-chalcona transformable de forma irreversible, por oxidación, en ácido fenólico (incoloro). Bajo estas condiciones y en ausencia de reacciones de estabilización, un 80% de los antocianos se encontrarían en forma hidratada incolora (Bautista-Ortín, 2005). Cabe indicar también que la unión del catión flavilio a determinados compuestos, como el anhídrido sulfuroso libre (SO₃H⁻, en forma aniónica), provoca complejos incoloros mediante una reacción reversible. Con el tiempo, la cantidad de anhídrido sulfuroso libre del medio va descendiendo y los complejos tienden a romperse, devolviendo al antociano a su estructura coloreada.

1.2.3. Estabilización del color

Existen diferentes reacciones que favorecen la estabilidad del color basadas en la protección de la estructura de catión flavilio: fenómenos de copigmentación, así como reacciones químicas de condensación y polimerización.

1.2.3.1. Fenómenos de copigmentación

Los fenómenos de copigmentación tienen lugar cuando los antocianos se unen mediante enlaces no covalentes a otros compuestos fenólicos, denominados copigmentos.

Según la naturaleza del copigmento, existen dos tipos de copigmentación de naturaleza intermolecular (Blanco Vega, 2013):

- Heteromolecular: El copigmento es una molécula distinta al antociano monomérico (flavanoles, flavonoles o derivados hidroxicinámicos, principalmente).
- Homomolecular o autoasociación: El copigmento es otra molécula de antociano monomérico.

Por otro lado, la denominada copigmentación intramolecular, ausente de copigmento, es referida a la asociación dada entre el antociano y una porción de su propia molécula, como puede ser el caso del sustituyente cumarilo de un antociano cumarílico. Este tipo de copigmentación se da en estructuras especialmente complejas y se considera la más estable (Figueiredo et al., 1999).

En el proceso de copigmentación, las moléculas involucradas forman una estructura en capas (de entre 2 y 10) que evita el fenómeno de hidratación y desplaza el equilibrio hacia la formación de más cationes flavilio o bases quinónicas. Como resultado, se produce un aumento de la cantidad de color (efecto hiperocrómico), así como también un cambio de tonalidad hacia púrpura y azul (efecto batocrómico) (Vivar-Quintana et al., 2002). Además, reduce los procesos de oxidación y polimerización asociados al envejecimiento en vino (Boulton, 2001), al depender estas reacciones de la concentración de los compuestos en estado libre y provocar la copigmentación una reducción de su disponibilidad (Darias-Martín et al., 2001).

1.2.3.2. Condensaciones antocianos-taninos

Durante la elaboración del vino, las formas libres de los antocianos disminuyen, pero el color es mantenido gracias a reacciones químicas basadas, principalmente, en la unión entre antocianos y taninos durante el envejecimiento

de los vinos, y pueden o no involucrar acetaldehído. Existen diferentes tipos de condensación principales según los carbonos involucrados:

- Condensación Antociano-Tanino (A-T):

El tanino (flavonoide neutro con carga negativa en C8 y C6) se adhiere a la antocianina en forma de catión generando un flaveno incoloro (A-T) que puede ser oxidado, dando lugar a un pigmento rojo (A⁺-T), manteniéndose un equilibrio entre ambas especies. La sustitución en posición C4 confiere al aducto A⁺-T resistencia a la decoloración por SO₂. Puede darse la aparición de estructuras xantilium, con tonalidades amarillentas (Dallas et al., 1996; Gawel, 1998).

- Condensación Tanino-Antociano (T-A):

Gracias a la ruptura espontánea en medio ácido de los enlaces C-C entre sus unidades constituyentes, los taninos pueden actuar como agentes electrofílicos. Así, los carbocationes (T⁺) se adhieren a la antocianina en estado hemiacetal generando un intermedio incoloro (T-AOH) que se deshidrata en T-A⁺ y presenta una tonalidad roja que puede variar en función de la naturaleza del carbocatión y el grado de polimerización. El aducto formado, a diferencia del A⁺-T sí es susceptible a la decoloración por SO₂, así como a la hidratación. Esta condensación se ve favorecida en ausencia de oxígeno y por la temperatura, siendo ésta la explicación de la evolución de los vinos almacenados en ambientes reductores como depósitos o botella.

Existen otros tipos de condensaciones que involucran las uniones tipo B. La condensación de tipo A se basa en una unión Tipo B (C4-C8/C6) más un enlace éter adicional entre el oxígeno transportado por los carbonos C5 o C7 de la unidad inferior y el carbono C2 de la unidad superior. Se diferencian de los aductos anteriores en su mayor resistencia a la despolimerización química, en condiciones de pH ácido y alta temperatura (Zeng, 2015).

Por otro lado, a partir de la oxidación del etanol, el metabolismo de levaduras y bacterias acéticas y la autooxidación de compuestos fenólicos, se produce y libera al medio acetaldehído (Liu y Pilone, 2000). La protonización del acetaldehído da lugar a un carbocatión que se uniría a un agente nucleofílico como pueden ser antocianinas hidratadas o unidades de tanino. Así, tanto antocianos como taninos pueden unirse por puentes de etilo, formando uniones

entre taninos (T-etil-T), antocianos (A-etil-A) o formando aductos tanino-antociano (T-etil-A). Aquellos complejos que involucran antocianos con puentes etilo presentan mayor resistencia a la decoloración por SO₂ e hidratación que los antocianos en forma libre, presentando una tonalidad púrpura. Según recoge Atanasova et al. (2002), la forma habitual de polimerización de antocianos en vino es mediante la unión por puente de etilo de un catión flavilio a un hemiacetal (A⁺-etil-AOH).

1.2.3.3. Polimerización de taninos

La alta reactividad de los taninos provoca que en el tiempo se produzcan reacciones de polimerización, incrementándose el tamaño de los complejos tánicos. Así, de forma similar a lo procesos de condensación antociano-tanino, las uniones de tipo B pueden establecerse entre taninos cuando una procianidina hidrolizada forma un carbocatión que se une a otra procianidina con carga negativa (C4-C8/C6). En condiciones ácidas, este enlace se rompe liberando la unidad inferior en forma intacta y la unidad superior con un carbocatión localizado en el carbono C4, lo que le permite sufrir de nuevo el ataque nucleofílico de los carbonos C8 o C6 de otra unidad de flavanol o antociano en forma hemiacetal. Esta última opción llevaría a una reducción de la fracción procianidina, provocando una acumulación de oligómeros de proantocianidinas (Vidal et al., 2002). Por otro lado, la polimerización heterogénea o cruzada se basa en la presencia de etanal (producto de oxidación de etanol), capaz de unir moléculas de procianidinas hasta formar un polímero de elevado peso molecular. Ambos tipos de polimerización forman compuestos de tonalidad amarilla pero los obtenidos por polimerización cruzada generan menor astringencia que los polimerizados de forma lineal.

1.2.3.4. Formación de nuevos pigmentos derivados de antocianos

Si bien pueden darse uniones a especies de mayor peso molecular, como unidades tánicas (Francia-Aricha et al., 1997), la cicloadición de antocianos a metabolitos de bajo peso molecular como el ácido pirúvico, acetaldehído o vinilfenol ha sido reportado como origen de nuevos pigmentos derivados de antocianos conocidos como piranoantocianos (Morata et al., 2007).

Estos compuestos poseen un anillo piránico adicional formado entre el grupo OH del carbono C5 y el carbono C4 del catión flavilio. Este anillo resultante de la reacción de cicloadición puede presentar distintos sustituyentes en posición 10. Estos compuestos, cuya sustitución del C4 les confiere menor reactividad ante variación de pH o SO₂, presentan absorbancias a longitudes de onda menores que los antocianos, estabilizando la coloración en una tonalidad roja-anaranjada.

Existen diferentes grupos de piranoantocianos. El grupo mayoritario es el de las carboxipiranoantocianinas, formadas a partir de la cicloadición del antociano con ácido pirúvico. Entre ellos, el compuesto predominante es la vitisina A, formada a partir de malvidina 3-O-glucósido (Morata et al., 2003). Las vitisinas de tipo B, entre las que destaca la vitisina B (formada a partir de malvidina 3-O-glucósido), se generan a partir de interacciones entre el antociano y el acetaldehído (Morata et al., 2003).

Otra familia de piranoantocianos, las pinotinas, son aductos antociano-vinilfenol producidos por la unión de antocianos y ácidos hidroxicinámicos o 4-vinilfenoles, entre los que destaca la pinotina A (malvidina 3-O-glucósido-4-vinicatecol) (Schwarz et al. 2003). Finalmente, las portisinas, identificadas en vino de Oporto (Mateus et al., 2005; Oliveira et al., 2007) se constituyen como vinilpiranoantocianinas unidas a flavanoles.

1.3. EL AROMA EN EL VINO

El aroma del vino es resultante de una mezcla de compuestos odoríferos provenientes de distintas fases de la elaboración, y es considerado uno de los atributos fundamentales determinante de su calidad. Estos compuestos se pueden englobar en 3 categorías:

- Los aromas primarios, varietales, ubicados en el hollejo y en menor medida en la pulpa de la uva, son productos secundarios del metabolismo vegetal, con lo que su concentración se ve determinada tanto por la variedad como por las prácticas de cultivo, climatología, edafología y ubicación geográfica (Cabrita et al., 2007). Los aromas primarios están fundamentalmente constituidos por terpenos, metoxipirazinas, C13-norisoprenoides, alcoholes y aldehídos alifáticos de 6 átomos de carbono,

compuestos bencénicos y compuestos azufrados. Entre los más odoríferos destacan algunos monoterpenoides y C13-norisoprenoides asociados a aromas florales (Ribéreau-Gayon et al., 2006; Muñoz-García, 2023) (Figura 11). Si bien pueden encontrarse en forma libre, como compuestos volátiles, algunos aparecen de forma ligada, como precursores de aroma (Ribéreau-Gayon et al., 1975; Oliver-Simancas et al., 2021), por su unión a ácidos grasos, ácidos fenólicos, aminoácidos y especialmente glucósidos. Es la hidrólisis química o enzimática de estos conjugados la que da lugar a las formas libres odoríferas (Baumes, 2009; Hjelmeland y Ebeler, 2014; Zalacain et al., 2007), y el proceso de vinificación juega un papel fundamental en este tipo de reacciones. La formación de aldehídos y alcoholes C6 (hexanal, n-hexanol, (Z)-3-hexen-1-ol, y (E)-2-hexen-1-ol) a partir de sus precursores lipídicos es favorecida durante etapas prefermentativas gracias a la presencia de oxígeno (Bayonove et al., 2000; Pedroza et al., 2010).

Familia	Compuesto	Descriptor
<i>Terpenos</i>	Linalool	Floral, rosa
	Nerol	Floral, rosa, lima
	Geraniol	Floral, geranio, rosa
	Citronelool	Cítrico, limón verde
	α -terpineol	Pino, lirio
<i>C13-norisoprenoides</i>	β -ionona	Violeta
	β -damascenona	Manzana, miel, floral

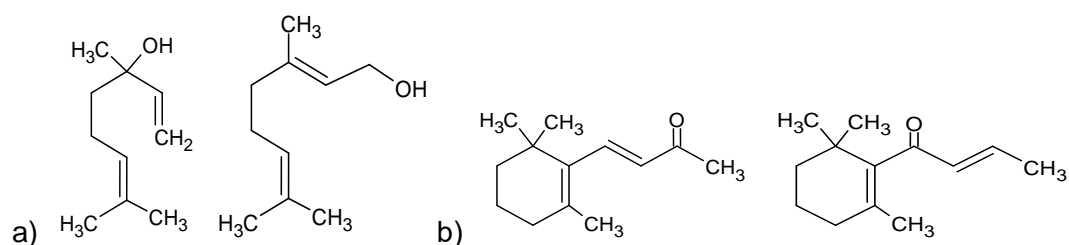


Figura 11: a) Linalool (izq), geraniol (der); b) β -ionona (izq), β -damascenona (der)

- Se consideran aromas secundarios los formados durante la fermentación alcohólica como efecto del metabolismo de las levaduras. Asimismo, dependen de la cepa de levadura empleada, de las características

compositivas del mosto de partida -principalmente en base a la concentración de azúcares y aminoácidos-, de la temperatura de fermentación y la oxigenación durante el proceso. Se engloban en esta categoría ésteres (formados a partir de la combinación de un ácido orgánico y un alcohol) y acetatos (sal o éster de ácido acético) que resultan determinantes del aroma final del vino ya que, pese a no encontrarse en altas concentraciones, se caracterizan por presentar un bajo umbral de percepción olfativa (Boulet y Moutounet, 2000). Por otro lado, compuestos más abundantes como los alcoholes superiores (propanol, isobutanol y alcoholes isoamílicos) pueden afectar negativamente al aroma ya que, a altas concentraciones (>400 mg/L), pueden resultar sensorialmente desagradables, de forma similar al etanol y el ácido acético (Ribéreau-Gayón et al., 2000).

- Los aromas terciarios son aquellos que se forman tras la fermentación, durante el periodo de crianza o envejecimiento en botella, y se obtienen de procesos de hidrólisis, escisiones oxidativas, descarboxilaciones y sulfuraciones. Entre los atributos aromáticos generados, destacan el de manzana verde aportado por el acetaldehído formado por la oxidación del etanol, aromas florales a partir de algunos terpenos intercambiados por procesos de hidrólisis, queroseno a partir del TDN (norisoprenoide) obtenido por la descarboxilación del acetaldehído, o el café tostado proporcionado por el 2-furanmetanotiol, tiol obtenido a partir del furfural (Echave et al., 2021). Estos aromas no han de ser confundidos con aquellos obtenidos por cesión directa de la barrica durante la crianza oxidativa (denominada así en tanto que se produce la microoxigenación del vino a través de los poros de la madera) o mediante el contacto con duelas o virutas por inmersión en el vino (práctica que se ha incrementado en los últimos años). Durante la crianza, el vino se enriquece en compuestos tales como furfurales, lactonas, guaiacoles, vainillina y eugenol. El tipo de madera empleado (especie, procedencia, grado de tostado), tiempo de contacto y condiciones de temperatura y humedad del espacio habilitado para la crianza, determinan el efecto final sobre los vinos (Boulet y Moutounet, 2000).

1.4. EXTRACCIÓN DE LOS COMPUESTOS DE INTERÉS DURANTE LA ETAPA DE MACERACIÓN. DEGRADACIÓN DE LA PARED CELULAR

La extracción de los compuestos de interés durante la maceración requiere la ruptura de las paredes celulares de los hollejos de la uva, las cuales actúan como una barrera de difusión (Pinelo et al., 2006).

1.4.1. Estructura y composición de la pared celular

Las paredes celulares de uva (Figura 12) están constituidas por tres redes estructurales fundamentales:

- La lámina media, formada por pectina, es compartida entre células adyacentes para mantener su adhesión (Carpita y McCann, 2000).
- La pared celular primaria, la más gruesa, está compuesta principalmente por una red de celulosa-hemicelulosa y pectinas embebidas, junto con una baja proporción de proteínas (Zarra y Revilla, 1993), y actúa como soporte principal de la pared celular.

Las cadenas lineales de celulosa, polisacárido formado por la unión lineal de unidades de D-glucopiranosas por enlace glucosídico β -(1 \rightarrow 4), son apiladas mediante uniones por puentes de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals, formando microfibrillas que se recubren de glucoarabinanos y xiloglucanos (McCann et al., 1990). Estos últimos constituyen el polisacárido hemicelulósico principal de la pared celular. Está formado por D-glucopiranosas enlazadas en β -(1 \rightarrow 4), sustituidos en C-6 por residuos de α -L-arabinosa, de β -D-galactosa, o por el disacárido β -D-galactosa- α -L-fucosa (Pauly et al., 1999; Doco et al., 2003). Estas cadenas se unen a las microfibrillas de celulosa por puentes de hidrógeno (Keegstra et al., 1973; Cosgrove, 2001; Bootten et al., 2004), pudiendo también unirse a otros polisacáridos por enlaces covalentes (Cumming et al., 2005; Hrmova et al., 2007). Otros tipos de hemicelulosa serían xilanos y mananos, estos últimos relacionados con las paredes celulares

secundarias sin lignificar. Se encuentran, en relación con ellos, glucomananos y galactoglucomananos, de menor importancia estructural.

La red formada por la unión de celulosa y xilano deja espacios en la estructura que permiten albergar polisacáridos pécticos. Así, existen diferentes tipos de pectinas, de los cuales el polisacárido fundamental es el homogalacturonano (HG), formado por la unión lineal de ácido galacturónico por enlaces α -(1→4). Dichas unidades de ácido galacturónico suelen encontrarse metilesterificadas en el carbono C6. También pueden presentarse acetiladas con uniones a ácido acético en C2 o C3 o esterificadas con unidades de xilosa o apiosa. Otro tipo de pectinas son los ramnogalacturonanos I (RG-I), formados por el enlace de unidades de ácido D-galacturónico en α -(1→4) que pueden presentar metilesterificaciones o acetilaciones, y L-ramnosa en α -(1→2) (Lau et al., 1985). El complejo que se forma se une por enlace glucosídico a los HG (Willats et al., 2001). La esterificación de la L-ramnosa por unidades de arabinosa o galactosa conlleva la formación de arabinanos, galactanos o arabinogalactanos. Los galactanos pueden dar lugar a arabinogalactanos de tipo I (AG-I) cuando su esqueleto de galactosa con uniones β -(1→4) presenta ramificaciones de α -arabinofuranos. Los arabinogalactanos de tipo II (AG-II), sin embargo, presentan un esqueleto de galactosa con uniones β -(1→3) y β -(1→6) con enlace a α -L-arabinosa. Estos pueden darse ligados a proteína (principal presencia de hidroxiprolina), formando arabinogalactano proteína (AGP).

Además de la hidroxiprolina, existen otro tipo de proteínas presentes en la matriz de la pared celular, como las extensinas, las proteínas ricas en glicina y proteínas ricas en prolina (Cassab y Varner, 1988), que aportan compactación o firmeza a la estructura por adhesión molecular y celular (Goulao et al., 2012).

Finalmente, los ramnogalacturonanos II (RG-II), considerados megaoligosacáridos por su alto grado de polimerización (Rodríguez-Carvajal et al., 2003), presentan una base estructural de homogalacturonano sustituidos con cadenas oligosacáridas compuestas por gran diversidad de azúcares (Stevenson et al., 1988). La pared celular secundaria, no

siempre presente, está formada por acumulación de celulosa, hemicelulosa (principalmente xilano) y lignina, que comienza a aparecer al finalizar el crecimiento celular, y provee a la estructura de mayor resistencia mecánica (Carpita y McCann, 2000; Vorwerk et al., 2004). La lignina, polímero formado por unidades de carácter fenólico, aporta hidrofobicidad y resistencia a la estructura (Boudet, 2000).

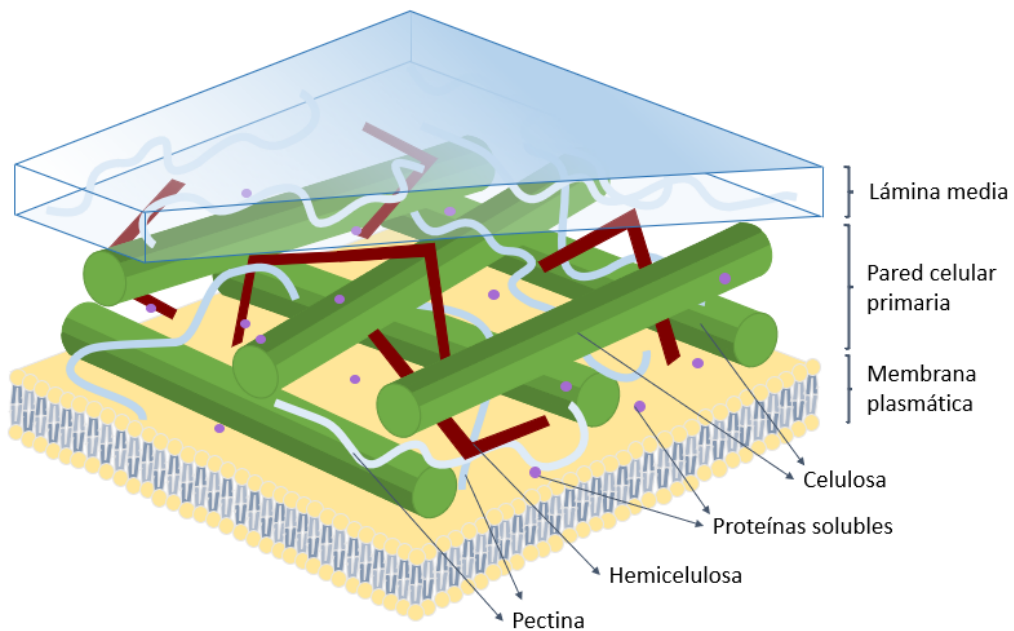


Figura 12: Esquema pared celular vegetal

La proporción de celulosa, hemicelulosa y pectinas suele ser similar en dicotiledóneas como la vid, frente a plantas monocotiledóneas que presentan mayor pared secundaria, y por tanto mayor acumulación de xilano (Carpita y Gibeaut, 1993; Gao et al., 2019).

Durante la maduración de la uva, la estructura y composición de la pared celular sufre cambios debido a procesos de desesterificación y despolimerización de los polisacáridos (Garrido-Bañuelos et al., 2019a, 2019b; Zietsman et al., 2015a) y a reacciones hidrolíticas y enzimáticas provocadas por las enzimas endógenas (Nunan et al. 2001), afectando a la extractabilidad de los compuestos de interés.

1.4.2. Extracción de compuestos de interés durante la maceración

Durante la etapa de maceración, las paredes celulares sufren modificaciones que permiten la extracción de los compuestos de la uva al mosto/vino. Además, el tipo de compuesto, su localización en la uva, así como la temperatura y duración de la etapa de maceración y la técnica enológica aplicada van a condicionar la velocidad y su grado de extracción.

La intensificación de la extracción de compuestos aromáticos gracias al proceso de maceración ha sido reportada en numerosas ocasiones (Sánchez-Palomo et al., 2007; Hjelmeland y Ebeler, 2014), si bien los trabajos actuales se centran en el estudio de técnicas para la optimización de dicho proceso (Tartian et al., 2017), en tanto que unas condiciones de maceración inadecuadas pueden conllevar efectos sensoriales negativos (Cheynier et al., 1989; Ramey et al., 1986). En cuanto al efecto de la temperatura del proceso, se ha observado un incremento de la extracción de monoterpenos en procesos de crio-maceración. Frente a ello, el incremento de temperatura produce degradaciones de los precursores aromáticos, generando un aumento de ésteres, ácidos y ácidos grasos, junto con una degradación de terpenos (Parenti et al., 2004; Tartian et al., 2017; Geffroy et al., 2015, 2018; Oliver-Simancas et al., 2021).

En cuanto a la extracción de compuestos fenólicos, ampliamente estudiada, se ha determinado que los taninos del hollejo y antocianos comienzan a extraerse de forma rápida al inicio de la maceración siguiendo una curva exponencial, para después estabilizarse e incluso descender su ritmo de extracción (Boulton, 1995; Bautista-Ortín et al., 2005; Klenar et al., 2004; Casassa et al., 2013) mientras que los taninos de semillas, por su parte, requieren de un mayor tiempo de maceración debido a la necesidad de solubilizar la capa lipídica externa de las mismas, lo que es favorecido por una mayor presencia de etanol (Glories y Saucier, 2000; Romero-Cascales, 2008).

Por ello, tiempos cortos de maceración de entre 4-7 días se emplean generalmente para la obtención de vinos tintos jóvenes, mientras que maceraciones más largas (8-15 días) son necesarias para la obtención de vinos tintos que van a ser sometidos a un proceso de envejecimiento en barrica, en

tanto que requieren una concentración suficiente de taninos para favorecer la estabilización del color en el tiempo.

Estas cinéticas de extracción dependen de las características estructurales y de la composición de las paredes celulares de las diferentes variedades de uva (Bautista-Ortín et al., 2016; Ortega-Regules et al., 2008). Así, Romero-Cascales et al. (2005) observó una menor extractabilidad de antocianos en uva de variedad Monastrell frente a Syrah, Cabernet Sauvignon o Merlot, aunque éstas presentaban menor concentración de antocianos en la uva, lo que puede deberse a diferencias de grosor y densidad de las paredes celulares de las células del hollejo (Ortega-Regules et al., 2006).

Por otro lado, la extractabilidad de los compuestos también se ve afectada por el grado de maduración de la uva, facilitándose su extracción por la despectinización de las paredes celulares durante este proceso (Garrido-Bañuelos et al., 2019a, 2019b, 2022) y dificultándose la extracción de compuestos de las semillas por un incremento en su lignificación (Bautista-Ortín et al., 2012; Casassa, 2017).

La degradación de las paredes celulares durante la maceración también conlleva la liberación de polisacáridos solubles al mosto/vino. Así, las distintas familias de polisacáridos provenientes de la uva y encontrados en el vino engloban los polisacáridos ricos en arabinosa y galactosa, conocidos como PRAGs (AG-II y AGP), RG-II y oligosacáridos (Apolinar-Valiente et al., 2021). Los PRAGs contienen a la vez ácidos glucurónicos (del 6 al 15%) y galacturónicos (2%) y una débil tasa de proteína (Pellerin et al., 1995). Su concentración es de entre 50 y 150 mg/L en vino blanco y entre 100 y 200 mg/L en vino tinto. Los RG-II se obtienen por degradación de las pectinas debido a la actividad endopoligalacturonasa, liberándose parcialmente a lo largo del periodo de maceración (Doco et al., 1996). Su concentración es menor de 50 mg/L en vino blanco y se sitúa entre 80 y 150 mg/L en vino tinto. Los oligosacáridos engloban una variedad de cadenas de monosacáridos (de 3 a 15 unidades), con la inclusión de los disacáridos según BeMiller (2019). Chong et al. (2019) informaron de que gran parte de los oligosacáridos encontrados en vino partían de la degradación de las paredes celulares de levaduras y uva (oligoglucanos, oligomananos, oligoramnogalacturonanos, oligoarabinogalactanos, oligoarabinanos y

oligoxiloglucanos). Por otro lado, dentro de la familia de proteoglucanos se encuentran las manoproteínas, formadas por un 80% de manosa y un 20% de proteína, que provienen de la pared celular de las levaduras y son liberadas al vino durante la fermentación. Existen dos tipos según si parten del periodo de crecimiento con o sin multiplicación celular (Guadalupe et al., 2010), y su concentración en vino es de entre 100 y 150 mg/L (Ribéreau-Gayon et al., 2006). La práctica enológica de la crianza sobre lías trata de favorecer la difusión de estos compuestos al vino, ya que resultan determinantes en la calidad organoléptica de los vinos, relacionándose especialmente con una menor percepción de astringencia (Boulet et al., 2016, Manjón et al. 2021).

1.5. APLICACIÓN DE TÉCNICAS ENOLÓGICAS PARA FAVORECER LA EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS DE INTERÉS EN EL VINO

Dadas las diferentes necesidades de la industria enológica, la aplicación de técnicas que incentiven la extracción de compuestos de interés se vuelve un recurso fundamental en la obtención de vinos de calidad. La variación de las condiciones climatológicas, acentuada en la actualidad por el cambio climático, provoca la variabilidad en las características organolépticas de la uva en el momento de su cosecha, resultando en añadas de vinos poco coloreados o con bajo perfil de aroma varietal. Junto con ello, la creciente separación temporal entre la madurez tecnológica y la madurez fenólica provoca la necesidad de vendimiar las uvas antes de alcanzar los niveles de concentración fenólica óptima. Así, la aplicación de este tipo de técnicas permitiría extraer el máximo potencial de las uvas.

Por otro lado, dichas alteraciones conllevan problemas logísticos en las bodegas, que ven reducida su capacidad productiva por la llegada de volúmenes de uva a procesar que exceden los límites asumibles por la bodega, especialmente en términos materiales. La posible reducción de los tiempos de elaboración del vino permitiría aumentar dicha capacidad productiva sin acarrear mermas en la calidad del vino. Así, las crecientes necesidades actuales requieren de tecnologías innovadoras que puedan aplicarse individualmente de

forma efectiva o en combinación con las técnicas empleadas tradicionalmente con el fin de mejorar los procesos extractivos.

1.5.1. Técnicas tradicionales

Dichas técnicas tradicionales implican el control del **tiempo** y la **temperatura** aplicados a la maceración, ya que, como se comentaba con anterioridad, son factores determinantes de la extractabilidad de los compuestos de interés. Durante la etapa de maceración fermentativa, el incremento de alcohol, dióxido de carbono y la presencia de dióxido de azufre, en combinación con la temperatura, aumentan la permeabilidad de las membranas y la solubilidad de los taninos y antocianos; si bien, el incremento de temperatura genera una pérdida de estos últimos tras la fermentación temprana, dando lugar a la ausencia de diferencias en el momento del embotellado. El aumento observado de pigmentos poliméricos es así relacionado con la intensificación de la extracción y el mantenimiento en el tiempo de los taninos (Gao et al., 1997; Sacchi et al., 2005).

En tanto que el aumento de temperatura aumenta la permeabilidad celular y, con ello, la mejora de la extracción, distintas tecnologías han sido implementadas y ampliamente extendidas en bodega (Morel-Salmi et al., 2006): **termovinificación** y **flash-release**. En la termovinificación, la pasta estrujada es sometida a un calentamiento de hasta 70°C por una duración de menos de una hora. En el caso del proceso “flash release” o “flash détente”, se aplica una inyección de vapor de agua sobre la uva, aumentando la temperatura a 85-95°C, siendo luego enfriada rápidamente. Aunque la aplicación de calor ha mostrado un aumento de la extracción de antocianos (Piccardo y González-Neves, 2013; Geffroy et al., 2015, 2018), mejorando el color, la extracción limitada de tanino debida a la ausencia de etanol no favorece la estabilización de los antocianos, lo que puede resultar en vinos no aptos para el envejecimiento (Maza et al., 2019a). En cuanto al perfil aromático, se ha reportado la degradación térmica de compuestos varietales (Geffroy et al., 2015), llegando a verse reducida la concentración de metoxipirazinas en vinos de Cabernet Sauvignon, afectando a su distintivo aroma a pimienta verde (De Boubée et al., 2002).

El efecto negativo del incremento de temperatura sobre el perfil organoléptico de los vinos plantea el uso de técnicas basadas en la reducción de temperatura. No obstante y en base a lo comentado anteriormente, en tanto que el incremento de la misma es considerado un factor incentivador de la extracción, no resulta sorprendente que distintos estudios hayan mostrado ausencia de efecto extractivo con el empleo de **maceraciones prefermentativas en frío (MPF)** (Sacchi et al., 2005), procedimiento por el cual el mosto se mantiene durante días a 10 – 15 °C antes de ser encubado. No obstante, en combinación con la MPF, el aporte de dióxido de azufre (100 mg/L) ha resultado ser una técnica útil para el aumento en la extracción de antocianos en vinos de variedad Barbera d’Asti (Casassa et al., 2016). Por otro lado, se ha observado una mejora en la extracción de proantocianidinas en variedades Aglianico, Primitivo y Nero di Troia, mostrándose diferencias en el nivel de extracción según la variedad (de un 25%, 14% y 7%, respectivamente) (Gambacorta et al., 2019). En cuanto a la composición volátil, Gambacorta et al. (2019) observaron un aumento en la extracción de ésteres, que favorecen el carácter afrutado de los vinos.

Una práctica extendida para la reducción de la temperatura durante la maceración prefermentativa es la adición de **nieve carbónica**. Esta técnica consiste en la incorporación, de forma periódica, de pellets de CO₂ en los tanques de maceración. La congelación del líquido intracelular en la pasta estrujada de uva favorece un incremento de su volumen, alterando la estructura de las paredes celulares de las células de la uva y permitiendo la salida de compuestos fenólicos al medio. El empleo de dióxido de carbono en lugar de nitrógeno líquido recae en que su sublimación resulta de interés en el desplazamiento del oxígeno en contacto con el mosto (Sacchi et al., 2005; Busse-Valverde, 2013).

El estudio de Casassa et al. (2015), que emplearon este sistema durante 4 días (tras los cuales todos los vinos mantuvieron una maceración de 10 días en las condiciones de las elaboraciones control), mostró efectos diferentes en los vinos según la variedad de uva de partida. Se observó un aumento de la intensidad de color en vinos de Barbera d’Asti y Cabernet Sauvignon, viéndose también efecto en vinos de Malbec, Merlot, Pinot Noir y Syrah. Perfil aromático,

astringencia, amargor o cuerpo fueron parámetros que no mostraron alteración gracias al tratamiento.

Un aspecto fundamental del uso de esta técnica es la necesaria homogeneización periódica de la pasta para asegurar una bajada de temperatura similar en todos los puntos de la misma. Con el fin de homogeneizar el contenido del tanque, se emplean técnicas como **bazuqueos y remontados**. Estas técnicas -no necesariamente empleadas en combinación con otras-, se emplean principalmente durante la maceración fermentativa: El CO₂ formado durante la fermentación provoca el ascenso de partes sólidas de la uva estrujada dentro del tanque, hasta formar una capa gruesa (sombbrero) cuyo contacto limitado con el líquido inferior reduce el potencial de extracción del proceso. Junto con ello, el calor queda retenido en el interior del depósito. Mediante el bazuqueo, las pieles son sumergidas en el líquido, y mediante el remontado, parte del contenido de la zona inferior se extrae y se vierte de nuevo por la parte superior, mediante un sistema de recirculación con bombeo a través de una tubería. Diversos estudios centrados en la comparación de ambas técnicas muestran un mayor efecto extractivo de los bazuqueos frente a los remontados (Marais, 2003a, 2003b).

Otra técnica ampliamente extendida en la industria enológica es la adición de **preparados enzimáticos** durante el proceso de vinificación. Según la naturaleza compositiva de estos preparados, tendrán aplicaciones diferentes durante la elaboración del vino, empleándose para favorecer la extracción, la clarificación o la evolución durante la crianza sobre lías (Espejo, 2021).

Así, estos preparados suelen presentar proporciones adaptadas de las distintas actividades enzimáticas según el fin al que se destinen. Los preparados comerciales empleados en el proceso de maceración para favorecer la liberación de compuestos intracelulares tras la degradación de la pared celular presentan habitualmente una combinación de actividades pectolítica (poligalacturonasa, pectinmetilesterasa y pectín liasa), celulasa, hemicelulasa y proteasa (Fia et al., 2014; Pinelo et al., 2006).

Dentro de las celulasas, se distinguen distintas enzimas, como son la celobiasa o β -glucosidasa y endo- y exo-glucanasa, que favorecen la separación de las microfibrillas. Cuando su adición es combinada con enzimas pectolíticas

que afectan a la matriz péctica, se favorece el acceso de la celulasa a la red celulósica, mejorando su eficiencia (Zietsman et al., 2015b).

Las hemicelulasas engloban arabinasa, endo- y exo-galactasa, endoglucanasa y xilanasa, ya que la red de la hemicelulosa presenta una naturaleza heterogénea (Apolinar-Valiente, 2012; Romero-Cascales, 2008).

Dentro de las pectinasas se encuentra la pectinmetilesterasa, que desesterifica las pectinas y favorece la acción de la poligalacturonasa (pectinasa que hidroliza la unión entre moléculas de ácido galacturónico de los homogalacturonanos), mientras que pectato liasa y pectín liasa actúan por β -eliminación sobre pectinas de elevado grado de esterificación (Ríos-Alzate y Arias-Vargas, 2002).

El efecto de la adición de enzimas de maceración depende, entre otros factores, del estado estructural de la pared celular, que puede presentar mayor solidez o firmeza al inicio de la maduración de la uva. Estas alteraciones durante la maduración dependen de la actividad enzimática endógena, pudiendo obtenerse mayor degradación de las estructuras con la aplicación en uva madura (Gao et al., 2016).

Los estudios llevados a cabo con la aplicación de enzimas de maceración en el proceso de vinificación en tinto muestran resultados contradictorios en la extracción de compuestos de interés. Así, Bautista-Ortín et al. (2005) no observaron diferencias en parámetros de color de vinos de Monastrell con el empleo de preparaciones con actividad celulasa, hemicelulasa, poligalacturonasa, pectín liasa y pectín esterasa. Borazan y Bozan (2013) observaron una caída en la concentración de antocianinas y ácidos fenólicos con el uso de pectinasas en Ökuzgözü, aunque este estudio no especifica condiciones de tratamiento.

En contraposición y empleando la misma variedad y cocktail enzimático que Bozaran y Bozan (2013), Kelebek et al. (2009) observaron un aumento del contenido de antocianinas, que se asoció a un tiempo de maceración largo (8 días). Además, el uso de pectinasas ha resultado en un aumento en la extracción de proantocianidinas en variedades Monastrell y Nero di Troia (Baiano et al., 2016; Castro-López et al., 2016). Por otro lado, Apolinar-Valiente et al. (2014)

observaron un aumento de polisacáridos en vinos de Monastrell empleando un preparado comercial rico en actividades pectinmetilesterasa y poligalacturonasa, si bien el uso de un preparado de α - y β - galactosidasa no provocó dicho incremento -sí observado en vinos de variedad Syrah-, atribuyéndose a una posible rigidez estructural de la pared celular de Monastrell que impidiera el acceso adecuado de la enzima al sustrato. Por su parte, Sun et al. (2018) encontraron un aumento de compuestos aromáticos C6, terpenos y C13-norisoprenoides empleando β -D-glucosidasa sobre Cabernet Gernischt.

1.5.2. Tecnologías emergentes

1.5.2.1. Tecnologías con incremento de temperatura: Microondas

Como ha sido comentado anteriormente, existen diferentes tecnologías que implican el incremento de temperatura y se vienen empleando en la industria enológica desde hace varias décadas, como son termovinificación (60-75°C) y flash-détente (>90°C). El efecto de estas tecnologías se asocia a un aumento de la permeabilidad de las membranas celulares, implementándose los procesos de transferencia de masa y favoreciendo la difusión de compuestos de interés (Setford et al., 2017; Koyama et al., 2007). Asimismo, la combinación de estas y otras técnicas parece optimizar el efecto de extracción, como fue observado por Aguilar et al. (2016), quienes obtuvieron un incremento de la extracción de compuestos fenólicos y un aumento de la capacidad antioxidante combinando la termovinificación y la adición de enzimas pectolíticas.

No obstante, el uso de estas tecnologías requiere de una alta inversión, con un gran gasto de agua y la instalación de generadores de vapor e intercambiadores de calor, lo que hace necesaria la búsqueda de tecnologías de menor coste energético y de mantenimiento, tratamiento rápido y mayor seguridad, como es el caso del uso de microondas (Salazar-González et al., 2012).

Las microondas (MO) son ondas electromagnéticas cuya frecuencia varía entre 300 MHz y 300 GHz. Mientras los hornos microondas domésticos operan a altas frecuencias (2450 \pm 50 MHz), los hornos microondas industriales lo hacen a baja frecuencia (915 \pm 13 MHz) (Chandrasekaran et al., 2013).

El mecanismo de acción de las microondas se basa en dos fenómenos que tienen lugar al someter un medio acuoso, como es la pasta estrujada de uva o el vino, a un campo electromagnético: rotación dipolar y conducción iónica. Las moléculas de agua, de naturaleza dipolar, tratan de alinearse con el campo electromagnético oscilatorio, generando fricción y traduciéndose dicha energía en un incremento del calor volumétrico. De forma similar, el campo electromagnético produce el fenómeno de conducción iónica consistente en el desplazamiento y colisión de iones presentes en el medio, con la consecuente transmisión de energía cinética y generación de calor. No obstante, parece consistente que el efecto término no es el único dado en el tratamiento con microondas, y los estudios de Barba et al. (2015) y Casassa et al. (2019) plantean una posible extracción de compuestos de interés gracias a que las oscilaciones del campo eléctrico podrían romper la red estructural de la pared y las membranas celulares por un exceso de tensión. Carew et al. (2014) observaron mediante un examen histológico un incremento del daño celular de los hollejos de uva tratadas con MO frente a aquellas maceradas con calor.

Se han desarrollado numerosos estudios centrados en el uso de MO durante la vinificación en los últimos años, la mayoría de ellos concluyen una mejora de los procesos de extracción de los compuestos de interés a partir de la uva o pasta estrujada de distintas variedades, con aumento en el medio de la concentración de polifenoles totales, antocianos y compuestos aromáticos (Casassa et al., 2019; Carew et al., 2013, 2014, 2015; Sánchez-Córdoba et al., 2021; Muñoz-García et al., 2021; Kwiatkowski et al., 2020; Pérez-Porras et al., 2022); y asocian a su aplicación una mayor intensidad de color y mejora sensorial de los vinos (Muñoz-García et al., 2021; Yuan et al., 2020), con condiciones de aplicación de microondas que van desde los 400 W hasta los 700 W, en pulsos de 4 a 12 minutos. Esta mejora de la extracción de compuestos durante la maceración resultaría de especial interés industrial en tanto que aumentaría la capacidad productiva de las bodegas mediante una reducción del tiempo de procesamiento. Aunque algunos autores plantean una menor eficacia de las MO frente a las tecnologías térmicas convencionales debido a la distribución irregular de la temperatura en el medio (Vadivambal y Jayas, 2010), muchos estudios han planteado su efectividad en la esterilización de alimentos y bebidas (Salazar-

González et al., 2012; Tajchakavi et al., 1998; Chandrasekaran et al., 2013), con lo que esta tecnología podría resultar una potencial herramienta para la reducción de la concentración de conservantes como el SO₂ adicionados durante la vinificación. No obstante, la aplicación de microondas no se encuentra entre las prácticas enológicas aprobadas en la actualidad por la OIV (OIV, 2022a).

También ha sido estudiada la extracción de compuestos fenólicos de interés a partir de lías de vino, con el fin de obtener extractos de alta capacidad antioxidante (Pérez-Serradilla y De Castro, 2011). Por otro lado, el estudio de evolución por parte de Yuan et al. (2020), a partir de la aplicación de microondas a 500 W de potencia sobre vino joven, mostró un potencial efecto de aceleración de los procesos oxidativos del vino durante su envejecimiento, observando una disminución de la concentración de compuestos fenólicos y una reducción de la capacidad antioxidante mediante la determinación de DPPH y estableciendo 40°C y 20 minutos de exposición como las condiciones óptimas de aplicación.

Sin embargo, la alta volatilidad de compuestos de interés organoléptico -como son los compuestos aromáticos-, ligado al incremento de temperatura generado por estas tecnologías, produce una pérdida de la calidad en los mostos y, en consecuencia, en los vinos. Por ello, se buscan tecnologías que no supongan un incremento de temperatura en la pasta de uva y, entre ellas, destacan los campos eléctricos pulsados y los ultrasonidos de alta potencia.

1.5.2.2. Tecnologías sin incremento de temperatura

Durante las dos últimas décadas, tecnologías que no provocan incremento de temperatura han sido incorporadas en los protocolos de procesamiento de alimentos con el fin de mejorar la calidad del producto y optimizar su desarrollo. Entre ellas, encontramos el uso de plasma frío a presión atmosférica (Dasan et al., 2016), luz pulsada (Morata, 2010) u ozonización (Paissoni et al., 2016). No obstante, el uso de estas tecnologías se enfoca principalmente en el control microbiológico en alimentos (Hernández-Hernández et al., 2019).

Otras tecnologías como la radiación ionizante (Farkas y Mohácsi-Farkas, 2011; Morata et al., 2015), las altas presiones hidrostáticas (High Hydrostatic Pressure, HHP), la homogeneización a ultra alta presión (Ultra High Pressure Homogenization, UHPH) (Loira et al., 2018; Bañuelos et al., 2020; Vaquero et

al., 2022), los campos eléctricos pulsados y los ultrasonidos de alta potencia, son reconocidos no solo por su efecto antimicrobiano y de alteración enzimática, sino también por capacidad de mejora de procesos extractivos (Cholet et al., 2014; Morata et al., 2021), si bien entre ellos destacan fundamentalmente tres: altas presiones hidrostáticas, campos eléctricos pulsados y ultrasonidos. Tales son los beneficios reportados, que dichas tecnologías han sido recientemente aprobadas por la Organización Internacional de la Viña y el Vino considerando su posible uso en la extracción de compuestos de interés (OIV, 2022a).

1.5.2.2.1. *Altas presiones hidrostáticas (APH)*

En la industria alimentaria, el uso de **altas presiones hidrostáticas** está ampliamente extendido. Esta tecnología se basa en la aplicación sobre la matriz alimentaria de presiones entre 100 y 900 MPa (usualmente 400-600 MPa) mediante el uso, como agente presurizante, de agua potable mezclada con un pequeño porcentaje de aceite que actúa como anticorrosivo (Téllez Luis et al., 2001). Así, a escala industrial suele emplearse como método la compresión indirecta, consistente en el uso de un intensificador de alta presión que bombea el agente presurizante hacia una cámara o vasija de tratamiento donde se ubica el producto a tratar, llenándose hasta conseguir la presión deseada. Entre las condiciones habituales de aplicación, se consideran rangos de 400 a 600 MPa durante periodos de 3 a 10 minutos a temperatura ambiente o bajo refrigeración (Morata et al., 2017). Tras el tratamiento, se procede a la descompresión de la cámara y extracción del producto. Se considera una tecnología no térmica ya que por cada 100 MPa aplicados, se produce el incremento de tan sólo 2-3°C. Otras ventajas de este sistema son la ausencia de residuos generados y la transmisión uniforme de la presión, que asegura el tratamiento homogéneo del producto. Por otro lado, en tanto que la energía del proceso no es suficiente para generar la ruptura de enlaces covalentes, se considera una tecnología útil en el mantenimiento de las propiedades organolépticas de los productos (Oey et al., 2008; Considine et al., 2008; Bermúdez-Aguirre y Barbosa-Cánovas, 2011). En la industria enológica, la aplicación de altas presiones ha presentado gran eficacia en procesos de esterilización microbiana, inactivación enzimática o extracción de compuestos de interés a partir de uva por su capacidad para

romper las paredes celulares. No obstante, cada objetivo requiere condiciones de tratamiento concretas: si bien los procesos extractivos requieren presiones más bajas, de en torno a 200 MPa, los procesos de esterilización han sido optimizados a 400-550 MPa (Corrales et al., 2008, 2009; Morata et al., 2014, 2017, 2019, 2021), siendo aprobado su uso sobre uva y mosto a nivel industrial empleando presiones superiores a 150 MPa (OIV, 2022b). En cuando a su aplicación sobre vino, ha sido observada la aceleración de los procesos asociados al envejecimiento (Tao et al., 2012). No obstante, si bien puede optimizarse mediante la conexión de distintas vasijas, el tratamiento mediante un sistema discontinuo resulta un factor limitante en el procesamiento industrial.

Combatiendo dicha desventaja, en las últimas décadas, se han incorporado a la categoría de sistemas de flujo continuo el uso de campos eléctricos pulsados (CEP) y ultrasonidos de alta potencia (US), que se presentan, así, como tecnologías de interés para la optimización de los procesos a escala industrial.

1.5.2.2. Campos eléctricos pulsados (CEP)

La tecnología basada en campos eléctricos pulsados consiste en someter una matriz ubicada entre dos electrodos a la aplicación de una corriente eléctrica de alto voltaje (kV) de forma intermitente durante cortos periodos de tiempo (ms o μ s) mediante pulsos de tipo exponencial o cuadrado (Álvarez et al., 2006), generando un campo eléctrico de entre 0,1 y 50 kV/cm. Superando un determinado umbral, las membranas celulares sufren alteraciones estructurales por la polarización dieléctrica y reorientación de los fosfolípidos, que produce el fenómeno de electroporación, consistente en la formación de poros en la matriz del producto tratado (Tsong, 1991). Este efecto puede ser reversible o irreversible: la electroporación reversible presenta aplicaciones biotecnológicas y biomédicas y se emplea en fusión celular, inserción de proteínas en membranas celulares o para la introducción de plásmidos, fármacos y distintos compuestos en el citoplasma, tras lo cual, la membrana celular recupera su estado inicial. En la industria alimentaria, sin embargo, se trata de conseguir una electroporación irreversible que genere la salida del contenido citoplasmático al medio, favoreciéndose la extracción de compuestos de interés o la deshidratación celular, lo que permite su uso para la mejora de la calidad

organoléptica de los alimentos y/o como herramienta de control microbiano (Puértolas et al., 2010a; Raso y Heinz, 2006; Ortega-Rivas y Salmerón-Ochoa, 2014).

Con el fin de obtener vinos con más intensidad de color y mayor concentración de compuestos de interés, se ha estudiado la aplicación de CEP en sistemas en continuo sobre uva estrujada empleando una cámara de tratamiento con sistema de electrodos colineales, ubicados en el centro de un tubo por el que circula la uva desde la estrujadora/despalladora hasta el tanque de maceración (Maza et al., 2019a, 2019b).

La electroporación irreversible de las membranas celulares del hollejo de la uva requiere una dosis de energía menor de 10 kJ/kg, lo que se traduce en un incremento de temperatura de la pasta estrujada de 2°C, evitando la alteración organoléptica provocada por los procesos de calentamiento.

En los últimos años, numerosos estudios han sido desarrollados en condiciones de tratamiento continuo (Puértolas et al., 2010a, 2010b), mostrando una mejora significativa en la extracción de compuestos fenólicos de interés con distintas variedades de uva (López-Alfaro et al., 2013; Comuzzo et al., 2020; Ricci et al., 2020), así como un aumento de la capacidad antioxidante (Vicaş et al., 2017), lo que permitiría reducir los tiempos de maceración (Puértolas et al., 2010a; Maza et al., 2019b). En este sentido, los trabajos de Maza et al. (2019b) mostraron un incremento de la extracción de tanino de hollejo frente al de semilla, lo que concuerda con los resultados de estudios en laboratorio de López et al. (2008), que plantean la imposibilidad de rotura de la capa lipídica y lignocelulósica de las células de semilla a partir del uso de CEP. Los trabajos de Ricci et al. (2020) con uva de variedad Sangiovese muestran el interés de aplicar esta tecnología sobre uva inmadura previamente a la maceración, con el fin de evitar los largos periodos de contacto que pueden producir un aumento de la astringencia. Además, se ha observado un mantenimiento de las características de los vinos tras un año de envejecimiento en botella (Puértolas et al., 2010b), mostrando el vino obtenido de uva tratada un mayor contenido de flavan-3-oles, flavonoles y ácidos hidroxicinámicos y sus derivados, respecto al vino control.

En cuanto al efecto de los CEP sobre la composición aromática de los vinos, Maza et al. (2019b) observaron un aumento de β -ionona (asociada al aroma de

violeta), si bien no se presentó un incremento de monoterpenoides y ésteres totales tras la aplicación prefermentativa de CEP en vinos de variedad Garnacha, de forma similar a los resultados obtenidos por Garde-Cerdán et al. (2013) en mostos de las variedades Tempranillo y Graciano. En su caso, contrario a dichas variedades, el mosto elaborado con variedad Garnacha sí mostró una mayor concentración de estos compuestos junto con la β -ionona. En vino blanco, el estudio de Comuzzo et al. (2018) sobre Garganega dio como resultado un incremento de los precursores de aromas varietales.

En estudios donde se comparan los CEP con técnicas que generan incremento de temperatura, El Darra et al. (2016) observaron un mayor efecto de extracción de flavonoles mediante termovinificación frente a los CEP en tratamiento del mosto con el hollejo de la uva de variedad Cabernet Sauvignon, aunque no se observaron diferencias en la extracción de otros compuestos como antocianos, ácidos fenólicos y taninos. No obstante, el consumo energético de los CEP y la temperatura de aplicación fueron de 48 kJ/kg y 7°C, respectivamente, notablemente inferiores a las condiciones de la termovinificación (418,5 kJ/kg, 50°C). El estudio comparativo del uso de CEP o enzimas pectinasas por parte de Puértolas et al. (2009), mostró una mayor eficacia extractiva de los CEP frente a las enzimas, si bien la combinación de ambas técnicas ha resultado de interés en la mejora sinérgica de los mecanismos de acción, favoreciendo la liberación de nitrógeno en mosto de uva blanca (+10%) e incrementando el contenido de aromas primarios en vino (Fauster et al., 2020).

El creciente interés por los CEP, basado en sus potenciales aplicaciones, ha resultado recientemente en la aprobación de su uso industrial para el tratamiento de uva estrujada y despalillada (OIV, 2020c). Esta resolución se suma a la de 2019 en la que la OIV aprobó, en base al mismo objetivo, el uso industrial de otra tecnología innovadora: los ultrasonidos de alta potencia (OIV, 2020d).

1.5.2.2.3. Ultrasonidos de alta potencia (US)

El uso de ultrasonidos de alta potencia y baja frecuencia ($> 0,1 \text{ W/cm}^2$, 16 - 100 kHz) ha sido ampliamente estudiado para una variedad de propósitos industriales en las últimas décadas (Ashokkumar, 2015; Yao et al. 2020; Rojas et

al., 2021): Aplicados en medios sólidos, optimizan procesos de deshidratación, soldadura o descongelación. En medios líquidos, gracias al fenómeno de cavitación transitoria, favorecen la transferencia de calor, reacciones químicas, extracción, atomización de suspensiones coloidales o limpieza. En medio gaseoso se emplean para secado, despumación o limpieza de aire. Sin embargo, cuando estas ondas acústicas de frecuencias superiores al límite de detección humana (16 kHz - 20 MHz) presentan una alta frecuencia (>100 kHz), su empleo se enmarca en el ámbito de la diagnosis médica y en estudios de composición y estructura de alimentos, ya que permiten establecer perfiles de disposición celular y aportar información de propiedades fisicoquímicas del medio sin generar deterioro.

En tanto que ondas mecánicas, los ultrasonidos transitan periodos de compresión -ejerciendo una alta presión sobre el medio-, y de rarefacción -de baja presión-. Cuando la presión local del líquido se reduce por debajo de su presión de vapor, se forman pequeñas burbujas en la solución. Estas microburbujas sufrirán el efecto de los diferentes períodos, expandiéndose y contrayéndose. La tensión superficial de las microburbujas puede resistir la expansión en aquellos casos en que la frecuencia del ultrasonido es alta, dando el efecto conocido como "cavitación estable" (Figura 13).

Sin embargo, cuando la frecuencia del ultrasonido es baja, las microburbujas sufren un aumento paulatino de tamaño, no recuperando su estado previo en las fases de compresión. Así, cuando se alcanza el límite de tensión superficial de las microburbujas, colapsan e implosionan, lo que se conoce como "cavitación transitoria" (Chemat y Khan, 2011), generando puntos calientes de alta temperatura y presión (~5000 K y más de 10 MPa), a lo que se atribuye la capacidad de generar radicales libres $\cdot\text{OH}$ (Krasulya et al., 2014). Además, desde el centro de implosión se emiten ondas de alta energía conocidas como ondas de choque, capaces de romper estructuras rígidas adyacentes, como paredes celulares de plantas o microorganismos.

Es por ello que el uso de ultrasonidos de alta potencia y baja frecuencia se presenta como una posibilidad para acelerar aquellos procesos industriales enfocados en la esterilización de alimentos o la extracción de compuestos de interés (Al Daccache et al., 2020).

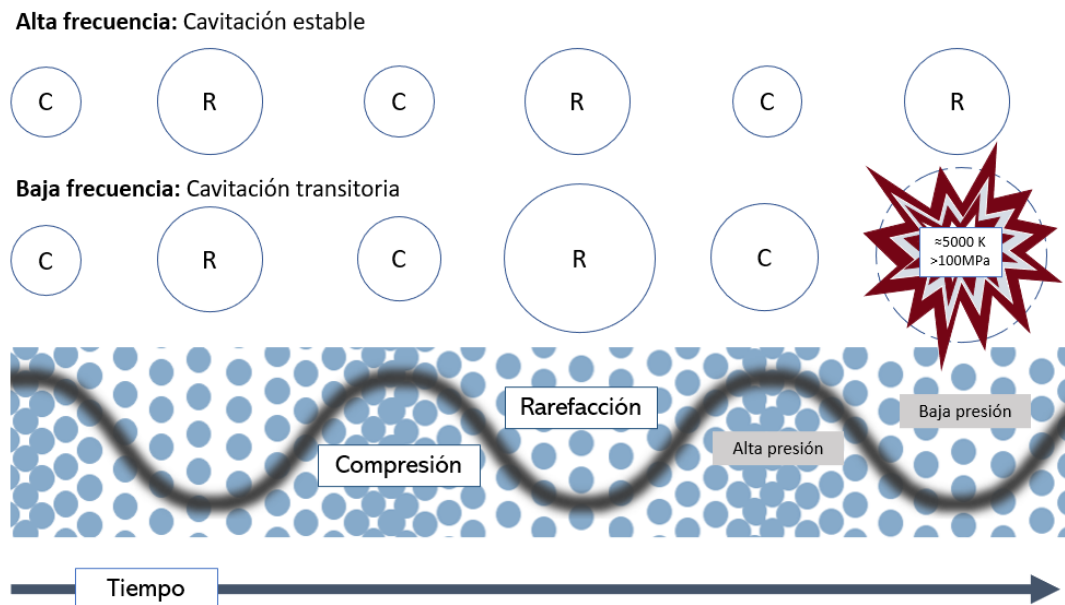


Figura 13: Esquema de fases de la cavitación

La formación de estas ondas se basa en el uso de transductores (dispositivos que transforman un tipo de energía en otro), que convierten la señal mecánica o eléctrica en ondas acústicas. Existen tres tipos: accionados por gas, por líquido o electromecánicos. Entre estos últimos, se distinguen los dispositivos magnetostrictivos y piezoeléctricos. Los magnetostrictivos se basan en la interacción entre campos mecánicos y magnéticos y los materiales ferromagnéticos -generando la deformación del material vibración en el material al tiempo que los pulsos son aplicados-. Es por ello por lo que numerosos estudios se centran en la búsqueda de materiales óptimos para este empleo, llegando a conseguir rangos de frecuencia de 20 kHz a 1-2 MHz (Yao et al., 2020). No obstante, estos sistemas presentan grandes pérdidas de energía por calor, siendo necesaria una correcta refrigeración.

Frente a ellos, los transductores piezoeléctricos requieren menor inversión dada su mayor eficiencia, por lo que son los más habituales en investigación y en la industria (Mason y Peters, 2002). Constan de uno o más discos de material piezoeléctrico intercalado por tramos de metal. Ante la aplicación de una corriente a determinada longitud de onda -inversamente proporcional a la frecuencia-, el conjunto resuena a la mitad de dicha longitud de onda.

Existen distintas geometrías de transductor empleadas específicamente para las distintas aplicaciones, y su importancia recae en la relación entre esta y la eficiencia de los procesos, como el caso de la extracción de compuestos (Santos-Zea et al., 2018) al afectar a la intensidad ultrasónica o densidad de potencia (W/cm^2). Esta se define como el cociente entre la potencia de ultrasonido y la superficie emisora del transductor (Tiwari, 2015), relacionándose con la amplitud de presión de la onda de sonido. Con el aumento de ésta, el colapso de las microburbujas se vuelve más violento, optimizando los daños.

Si bien no hay un método específico establecido para su determinación, la potencia de los ultrasonidos (W) se suele definir como energía transferida y se obtiene en relación a los cambios en el medio tras la aplicación del tratamiento. Así, existen diversos protocolos analíticos físicos y químicos. El análisis por calorimetría es uno de los más importantes: en él la potencia se define como el producto de la masa de disolvente, la capacidad calorífica del solvente a presión constante y el aumento de temperatura por segundo.

Otro factor fundamental determinante de la eficiencia de los ultrasonidos es la frecuencia: ya que el proceso de cavitación requiere un tiempo de iniciación, un periodo de rarefacción demasiado corto (alta frecuencia) puede provocar una disminución de la producción de cavitación así como un crecimiento muy leve o nulo del tamaño de las burbujas (Mason y Peters, 2002; Ashokkumar et al., 2008), aunque estas frecuencias favorecen la formación de radicales (Mason et al., 2011; Ashokkumar, 2015). En el trabajo desarrollado por González-Centeno et al. (2014) se estudió el uso de tres frecuencias diferentes en la extracción de polifenoles de uva (40, 80 y 120 kHz), considerándose más efectiva la frecuencia más baja (40 kHz).

Asimismo, son muchos los estudios que se han desarrollado en la última década en relación al uso de ultrasonidos especialmente en extracción, entre los que se encuentran estudios sobre la capacidad de extracción de compuestos fenólicos (Bautista-Ortín et al., 2017; Ferraretto et al., 2013; Zhang et al. 2016), extracción de compuestos aromáticos en vino blanco y tinto (Bautista-Ortín et al., 2017; Roman et al., 2020), recuperación de compuestos de interés a partir de orujos y lías (Bosiljkov et al., 2017; Drosou et al., 2015), aceleración del envejecimiento (Ferraretto y Celotti, 2016; García-Martín y Sun, 2013) o control

microbiológico (Gracin et al., 2016; Luo et al., 2012). Además, han sido estudiados los efectos de esta técnica en combinación con otras, como por ejemplo las enzimas pectolíticas, mostrándose un efecto sinérgico de la combinación bajo determinados parámetros establecidos de tiempo y temperatura (Dalagnol et al., 2017; Lieu y Le, 2010; Osete-Alcaraz et al., 2019). En cuanto a su combinación con otras tecnologías emergentes, como los CEP, también se han reportado estudios, mostrándose una mejora de extracción polifenólica a partir de raspones de uva cuando los CEP eran aplicados previamente a la extracción asistida por ultrasonidos (Ntourtoglou et al., 2022).

No obstante, hasta el momento, la mayoría de los estudios se han desarrollado empleando baños ultrasónicos (González-Centeno et al., 2014; Osete-Alcaraz et al., 2019) o sondas (Celotti y Ferraretto, 2016; Lukić et al., 2019; Roman et al., 2020). El baño de ultrasonidos, comúnmente empleado en laboratorio, consiste en un tanque de acero inoxidable al que van acoplados los transductores piezoeléctricos. Las ondas son transferidas directamente a la muestra (en aquellas líquidas o de mezcla sólida y líquida) o bien al agua con la que se llena el tanque, introduciéndose en su interior las muestras. Suelen funcionar en frecuencias cercanas a 40 kHz y pueden presentar sistemas de control de temperatura. No obstante, aspectos como el tamaño del baño, el volumen de agua, cantidad y volumen de muestras y la forma de colocación en el interior del baño, pueden generar falta de reproducibilidad en los ensayos. Además, ha de considerarse la pérdida de energía en el paso de las ondas a través de un agente intermediario como es el agua. Las sondas ultrasónicas, por su parte, son mucho más potentes al actuar de forma directa sobre el producto, presentándose el transductor acoplado a la propia sonda. Pueden funcionar a diferentes frecuencias en un rango habitual de 20 a 40 kHz. La aplicación directa de los US genera un gran incremento de temperatura, lo que hace necesaria la búsqueda de sistemas de refrigeración externa que permitan controlar la temperatura para hacer reproducibles los ensayos. Además, su estructura limita la aplicación a una única muestra. Lukic et al. (2020) comparando ambos dispositivos en su aplicación sobre vino, encontraron que el tratamiento no afectó las propiedades del color a largo plazo. Sin embargo, en el experimento desarrollado en baño, uno de los factores influyentes sobre el perfil aromático

fue la temperatura, mientras que en el caso de la sonda fueron determinantes el diámetro o su amplitud.

Estos estudios han permitido la aprobación, por parte de la OIV, del uso de US para la optimización del proceso de extracción de compuestos fenólicos durante la maceración en vino tinto (OIV, 2020d), si bien para llevar a cabo la aplicación de US en bodega, es necesario el uso de dispositivos a escala industrial que permitan a las empresas el tratamiento de grandes volúmenes de uva en continuo. En la actualidad, es la empresa española Agrovin S.A. (Alcázar de San Juan) la que tiene la patente de este tipo de equipos, los cuales se pueden diseñar según las necesidades de la bodega. Estos equipos constan de tres elementos: un depósito donde se vierte la pasta estrujada y despalillada, una cámara de tratamiento en continuo y una bomba que permite la circulación de la pasta estrujada y despalillada. La cámara de tratamiento está constituida de una tubería a la que van acoplados transductores piezoeléctricos de tipo sonoplato, con lo que las ondas son transmitidas directamente a la pasta que circula por su interior perdiéndose la menor energía posible.

En la actualidad, son muy pocos los trabajos desarrollados a nivel semi-industrial (Celotti y Ferraretto, 2016; Gambacorta et al., 2017; Bautista-Ortín et al., 2017), de ahí que esta tesis doctoral haya centrado su estudio a un nivel extrapolable a su uso en bodega.

BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar, T., Loyola, C., de Bruijn, J., Bustamante, L., Vergara, C., von Baer, D., Mardones, C., & Serra, I. (2016). Effect of thermomaceration and enzymatic maceration on phenolic compounds of grape must enriched by grape pomace, vine leaves and canes. *European Food Research and Technology*, 242, 1149-1158.
- Al Daccache, M., Koubaa, M., Salameh, D., Maroun, R. G., Louka, N., & Vorobiev, E. (2020). Ultrasound-assisted fermentation for cider production from Lebanese apples. *Ultrasonics Sonochemistry*, 63, 104952.
- Álvarez, I., Condón, S., & Raso, J. (2006). Microbial Inactivation by Pulsed Electric Fields. En J. Raso & V. Heinz (Eds.), *Pulsed Electric Fields Technology for the Food Industry. Food Engineering Series* (pp. 97-129). Springer Science & Business Media.
- Apolinar-Valiente, R. (2012). *Pared celular de uva y polisacáridos de vinos de distinta procedencia, elaborados mediante tecnologías enzimáticas y de frío* (Tesis doctoral, Universidad de Murcia).
- Apolinar-Valiente, R., Romero-Cascales, I., Williams, P., Gómez-Plaza, E., López-Roca, J. M., Ros-García, J. M., & Doco, T. (2014). Effect of winemaking techniques on polysaccharide composition of Cabernet Sauvignon, Syrah and Monastrell red wines. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 20(1), 62-71.
- Apolinar-Valiente, R., Williams, P., & Doco, T. (2021). Recent advances in the knowledge of wine oligosaccharides. *Food Chemistry*, 342, 128330.
- Ashokkumar, M. (2015). Applications of ultrasound in food and bioprocessing. *Ultrasonics Sonochemistry*, 25, 17-23.
- Ashokkumar, M., Sunartio, D., Kentish, S., Mawson, R., Simons, L., Vilku, K., & Versteeg, C. K. (2008). Modification of food ingredients by ultrasound to improve functionality: A preliminary study on a model system. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 9(2), 155-160.
- 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(1), 15-27.

- Baiano, A., Previtali, M. A., Viggiani, I., & De Gianni, A. (2016). Maceration procedures alternative to the standard vinification in red: the case of Nero di Troia wine. *European Food Research and Technology*, 242, 825-835.
- Bañuelos, M. A., Loira, I., Guamis, B., Escott, C., Del Fresno, J. M., Codina-Torrella, I., Quevedo, J. M., Gervillad, R., Rodríguez-Chavarría, J. M., De Lamo, S., Ferrer-Gallego, R., Álvarez, R., González, C., Suárez-Lepe, J. A., & Morata, A. (2020). White wine processing by UHPH without SO₂. Elimination of microbial populations and effect in oxidative enzymes, colloidal stability and sensory quality. *Food Chemistry*, 332, 127417.
- Barba, F. J., Brianceau, S., Turk, M., Boussetta, N., & Vorobiev, E. (2015). Effect of alternative physical treatments (ultrasounds, pulsed electric fields, and high-voltage electrical discharges) on selective recovery of bio-compounds from fermented grape pomace. *Food and Bioprocess Technology*, 8, 1139-1148.
- Baumes, R. (2009). Wine aroma precursors. En M. V. Moreno Arribas & M. C. Polo (Eds.), *Wine Chemistry and Biochemistry* (pp. 251-274). Springer Science & Business Media.
- Bautista Ortín, A. B. (2005). *Técnicas enológicas para la obtención de vinos de Monastrell de alto contenido polifenólico* (Tesis doctoral, Universidad de Murcia).
- Bautista-Ortín, A. B., Jiménez-Martínez, M. D., Jurado, R., Iniesta, J. A., Terrades, S., Andrés, A., & Gómez-Plaza, E. (2017). Application of high-power ultrasounds during red wine vinification. *International Journal of Food Science and Technology*, 52(6), 1314-1323.
- Bautista-Ortín, A. B., Martínez-Cutillas, A., Ros-García, J. M., López-Roca, J. M., & 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(8), 867-878.
- Bautista-Ortín, A. B., Martínez-Hernández, A., Ruiz-García, Y., Gil-Muñoz, R., & Gómez-Plaza, E. (2016). Anthocyanins influence tannin–cell wall interactions. *Food Chemistry*, 206, 239-248.
- Bautista-Ortín, A. B., Rodríguez-Rodríguez, P., Gil-Muñoz, R., Jiménez-Pascual, E., Busse-Valverde, N., Martínez-Cutillas, A., López-Roca, J. M., & Gómez-Plaza, E. (2012). Influence of berry ripeness on concentration, qualitative

- composition and extractability of grape seed tannins. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 18(2), 123-130.
- Bayonove, C., Baumes, R., Crouzet, J., & Günata, Z. (2000). Aromas. En C. Flanzy (Ed.), *Enología: Fundamentos Científicos y Tecnológicos* (pp. 137-176). AMV Ediciones.
- BeMiller, J. N. (2019). Oligosaccharides. *Carbohydrate Chemistry for Food Scientists* (3^a Ed, pp 49-74). Elsevier Inc.
- Bermúdez-Aguirre, D., & Barbosa-Cánovas, G. V. (2011). An update on high hydrostatic pressure, from the laboratory to industrial applications. *Food Engineering Reviews*, 3, 44-61.
- Biasi, R., Brunori, E., Ferrara, C., & Salvati, L. (2019). Assessing impacts of climate change on phenology and quality traits of *Vitis vinifera* L.: the contribution of local knowledge. *Plants*, 8(5), 121.
- Blanco Vega, D. (2013). *Formación y evolución de pigmentos de Tipo Piranoantociano en la elaboración de vinos tintos y rosados* (Tesis doctoral, Universidad de Castilla-La Mancha).
- Bloomfield, D. G., Heatherbell, D. A., & Nikfardjam, M. P. (2003). Effect of p-coumaric acid on the color in red wine. *Mitteilungen Klosterneuburg*, 53(5-6), 195-198.
- Bootten, T. J., Harris, P. J., Melton, L. D., & Newman, R. H. (2004). Solid-state ¹³C-NMR spectroscopy shows that the xyloglucans in the primary cell walls of mung bean (*Vigna radiata* L.) occur in different domains: a new model for xyloglucan–cellulose interactions in the cell wall. *Journal of Experimental Botany*, 55(397), 571-583.
- Borazan, A. A., & Bozan, B. (2013). The influence of pectolytic enzyme addition and prefermentative mash heating during the winemaking process on the phenolic composition of Okuzgozu red wine. *Food Chemistry*, 138(1), 389-395.
- Bosiljkov, T., Dujmić, F., Bubalo, M. C., Hribar, J., Vidrih, R., Brnčić, M., Zlatic, E., Radojčić Redovniković I. & Jokić, S. (2017). Natural deep eutectic solvents and ultrasound-assisted extraction: Green approaches for extraction of wine lees anthocyanins. *Food and Bioproducts Processing*, 102, 195-203.
- Boudet, A. M. (2000). Lignins and lignification: selected issues. *Plant Physiology and Biochemistry*, 38(1-2), 81-96.

- Boulet, J. C., Trarieux, C., Souquet, J. M., Ducasse, M. A., Caillé, S., Samson, A., Williams, P., Doco, T., & Cheynier, V. (2016). Models based on ultraviolet spectroscopy, polyphenols, oligosaccharides and polysaccharides for prediction of wine astringency. *Food Chemistry*, *190*, 357–363.
- Boulet, J., & Moutounet, M. (2000). Micro-oxigenación de los vinos. En Flancy, E. (Ed.) *Enología: Fundamentos Científicos y Tecnológicos* (pp. 638-642). AMV Ediciones.
- Boulton, R. (1995). Red wines. En A. Lea & J. Piggott (Eds.), *Fermented Beverage Production* (pp. 121-158). Springer Science & Business Media.
- Boulton, R. (2001). The copigmentation of anthocyanins and its role in the color of red wine: A critical review. *American Journal of Enology and Viticulture*, *52*(2), 67-87.
- Brouillard, R. (1982). Chemical structure of anthocyanins. En P. Markakis (Ed.) *Anthocyanins as food colors* (1ª Ed., pp. 1-38). Academic Press.
- Busse-Valverde, N. (2013). *Proantocianidinas de uvas y vinos de las variedades Monastrell, Cabernet Sauvignon y Syrah* (Tesis doctoral, Universidad de Murcia).
- Cabrita, M. J., Freitas, A. C., Laureano, O., Borsa, D., & Di Stefano, R. (2007). Aroma compounds in varietal wines from Alentejo, Portugal. *Journal of Food Composition and Analysis*, *20*(5), 375-390.
- Carew, A. L., Close, D. C., & Dambergs, R. G. (2015). Yeast strain affects phenolic concentration in Pinot noir wines made by microwave maceration with early pressing. *Journal of Applied Microbiology*, *118*(6), 1385-1394.
- Carew, A. L., Gill, W., Close, D. C., & Dambergs, R. G. (2014). Microwave maceration with early pressing improves phenolics and fermentation kinetics in Pinot noir. *American Journal of Enology and Viticulture*, *65*(3), 401-406.
- Carew, A. L., Sparrow, A. M., Curtin, C. D., Close, D. C., & Dambergs, R. G. (2013). Microwave maceration of Pinot Noir grape must: Sanitation and extraction effects and wine phenolics outcomes. *Food and Bioprocess Technology*, *7*, 954-963.
- Carpita, N. C., & Gibeaut, D. M. (1993). Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *The Plant Journal*, *3*(1), 1-30.

- Carpita, N., & McCann, M. (2000). The cell wall. En B. B. Buchananm, W. Gruissem & R. L. Jones (Eds.) *Biochemistry and Molecular Biology of Plants* (pp. 52-108). American Society of Plant Physiologists.
- Casassa, L. F. (2017). Flavonoid phenolics in red winemaking. En M. Soto-Hernández, M. Palma-Tenango, M. R. García-Mateos (Eds.) *Phenolic Compounds-Natural Sources, Importance and Applications* (pp. 153-196). IntechOpen.
- Casassa, L. F., Bolcato, E. A., & Sari, S. E. (2015). Chemical, chromatic, and sensory attributes of 6 red wines produced with prefermentative cold soak. *Food Chemistry*, *174*, 110-118.
- Casassa, L. F., Bolcato, E. A., Sari, S. E., Fanzone, M. L., & Jofré, V. P. (2016). Combined effect of prefermentative cold soak and SO₂ additions in Barbera D'Asti and Malbec wines: Anthocyanin composition, chromatic and sensory properties. *LWT-Food Science and Technology*, *66*, 134-142.
- Casassa, L. F., Larsen, R. C., Beaver, C. W., Mireles, M. S., Keller, M., Riley, W. R., Smithyman, R., & Harbertson, J. F. (2013). Impact of extended maceration and regulated deficit irrigation (RDI) in Cabernet Sauvignon wines: characterization of proanthocyanidin distribution, anthocyanin extraction, and chromatic properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *61*(26), 6446-6457.
- Casassa, L. F., Sari, S. E., Bolcato, E. A., & Fanzone, M. L. (2019). Microwave-assisted extraction applied to Merlot grapes with contrasting maturity levels: effects on phenolic chemistry and wine color. *Fermentation*, *5*(1), 15.
- Cassab, G. I., & Varner, J. E. (1988). Cell wall proteins. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, *39*(1), 321-353.
- Castro-López, L. R., Ortega-Regules, A. E., & Lozada-Ramírez, J. D. (2015). Modificaciones enzimáticas de compuestos fenólicos. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, *9*, 5-14.
- Castro-López, L., Gómez-Plaza, E., Ortega-Regules, A., Lozada, D., & Bautista-Ortín, A. B. (2016). Role of cell wall deconstructing enzymes in the proanthocyanidin–cell wall adsorption–desorption phenomena. *Food Chemistry*, *196*, 526-532.
- Celotti, E., & Ferraretto, P. (23-28 octubre 2016). *Studies for the ultrasound application in winemaking for a low impact enology*. En Proceedings of the 39th World Congress of Vine and Wine (p. 132), Bento Gonçalves, Brazil.
- Chandrasekaran, S., Ramanathan, S., & Basak, T. (2013). Microwave food processing—A review. *Food Research International*, *52*(1), 243-261.

- Chemat, F., & Khan, M. K. (2011). Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. *Ultrasonics Sonochemistry*, *18*(4), 813-835.
- Cheyrier V., Fulcrand H.H., Guyot S., Souquet J.M., & Moutounet M. (1995). 4th International Symposium on *Innovation in Enology* (p. 50), Messe, Stuttgart, Killesberg.
- Cheyrier, V., Duenas-Paton, M., Salas, E., Maury, C., Souquet, J. M., Sarni-Manchado, P., & Fulcrand, H. (2006). Structure and properties of wine pigments and tannins. *American Journal of Enology and Viticulture*, *57*(3), 298-305.
- Cheyrier, V., Rigaud, J., Souquet, J. M., Barillere, J. M., & Moutounet, M. (1989). Effect of pomace contact and hyperoxidation on the phenolic composition and quality of Grenache and Chardonnay wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, *40*(1), 36-42.
- Cholet, C., Delsart, C., Petrel, M., Gontier, E., Grimi, N., L'Hyvernay, A., Ghidossi, R., Vorobiev, E., Mietton-Peuchot, M., & Geny, L. (2014). Structural and biochemical changes induced by pulsed electric field treatments on cabernet sauvignon grape berry skins: Impact on cell wall total tannins and polysaccharides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *62*(13), 2925-2934.
- Chong, H. H., Cleary, M. T., Dokoozlian, N., Ford, C. M., & Fincher, G. B. (2019). Soluble cell wall carbohydrates and their relationship with sensory attributes in Cabernet Sauvignon wine. *Food Chemistry*, *298*, 124745.
- Comuzzo, P., Marconi, M., Zanella, G., & Querzè, M. (2018). Pulsed electric field processing of white grapes (cv. Garganega): Effects on wine composition and volatile compounds. *Food Chemistry*, *264*, 16-23.
- Comuzzo, P., Voce, S., Grazioli, C., Tubaro, F., Marconi, M., Zanella, G., & Querzè, M. (2020). Pulsed Electric Field processing of red grapes (cv. Rondinella): Modifications of phenolic fraction and effects on wine evolution. *Foods*, *9*(4), 414.
- Considine, K. M., Kelly, A. L., Fitzgerald, G. F., Hill, C., & Sleator, R. D. (2008). High-pressure processing—effects on microbial food safety and food quality. *FEMS Microbiology Letters*, *281*(1), 1-9.

- Corrales, M., García, A. F., Butz, P., & Tauscher, B. (2009). Extraction of anthocyanins from grape skins assisted by high hydrostatic pressure. *Journal of Food Engineering*, 90(4), 415-421.
- Corrales, M., Toepfl, S., Butz, P., Knorr, D., & Tauscher, B. (2008). Extraction of anthocyanins from grape by-products assisted by ultrasonics, high hydrostatic pressure or pulsed electric fields: A comparison. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 9(1), 85-91.
- Cosgrove, D. J. (2001). Wall structure and wall loosening. A look backwards and forwards. *Plant Physiology*, 125(1), 131-134.
- Cosme, F., Milheiro, J., Pires, J., Guerra-Gomes, F. I., Filipe-Ribeiro, L., & Nunes, F. M. (2021). Authentication of Douro DO monovarietal red wines based on anthocyanin profile: Comparison of partial least squares–discriminant analysis, decision trees and artificial neural networks. *Food Control*, 125, 107979.
- Cumming, C. M., Rizkallah, H. D., McKendrick, K. A., Abdel-Massih, R. M., Baydoun, E. A., & Brett, C. T. (2005). Biosynthesis and cell-wall deposition of a pectin–xyloglucan complex in pea. *Planta*, 222, 546-555.
- Dalagnol, L. M., Dal Magro, L., Silveira, V. C., Rodrigues, E., Manfroi, V., & Rodrigues, R. C. (2017). Combination of ultrasound, enzymes and mechanical stirring: A new method to improve *Vitis vinifera* Cabernet Sauvignon must yield, quality and bioactive compounds. *Food and Bioproducts Processing*, 105, 197-204.
- Dallas, C., Ricardo-da-Silva, J. M., & Laureano, O. (1996). Products formed in model wine solutions involving anthocyanins, procyanidin B2, and acetaldehyde. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(8), 2402-2407.
- Darias-Martín, J., Carrillo, M., Díaz, E., & Boulton, R. B. (2001). Enhancement of red wine colour by pre-fermentation addition of copigments. *Food Chemistry*, 73(2), 217-220.
- Dasan, B. G., Boyaci, I. H., & Mutlu, M. (2016). Nonthermal plasma treatment of *Aspergillus* spp. spores on hazelnuts in an atmospheric pressure fluidized bed plasma system: Impact of process parameters and surveillance of the residual viability of spores. *Journal of Food Engineering*, 196, 139-149.
- De Boubée, D. R., Cumsille, A. M., Pons, M., & Dubourdieu, D. (2002). Location of 2-Methoxy-3-isobutylpyrazine in Cabernet Sauvignon Grape Bunches and Its Extractability during Vinification. *American Journal of Enology and Viticulture*, 53, 1–5.

- de Freitas, V. (1995). *Recherches sur les tanins condensés: application à l'étude des structures et propriétés des procyanidines du raisin et du vin* (Tesis doctoral, Université de Bordeaux-II).
- Doco, T., Brillouet, J. M., & Moutounet, M. (1996). Evolution of grape (Carignan noir cv.) and yeast polysaccharides during fermentation and post-maceration. *American Journal of Enology and Viticulture*, 47(1), 108-110.
- Doco, T., Williams, P., Pauly, M., O'Neill, M. A., & Pellerin, P. (2003). Polysaccharides from grape berry cell walls. Part II. Structural characterization of the xyloglucan polysaccharides. *Carbohydrate Polymers*, 53(3), 253-261.
- Drosou, C., Kyriakopoulou, K., Bimpilas, A., Tsimogiannis, D., & Krokida, M. (2015). A comparative study on different extraction techniques to recover red grape pomace polyphenols from vinification byproducts. *Industrial Crops and Products*, 75, 141-149.
- Echave, J., Barral, M., Fraga-Corral, M., Prieto, M. A., & Simal-Gandara, J. (2021). Bottle aging and storage of wines: A review. *Molecules*, 26(3), 713.
- El Darra, N., Turk, M. F., Ducasse, M. A., Grimi, N., Maroun, R. G., Louka, N., & Vorobiev, E. (2016). Changes in polyphenol profiles and color composition of freshly fermented model wine due to pulsed electric field, enzymes and thermovinification pretreatments. *Food Chemistry*, 194, 944-950.
- Espejo, F. (2021). Role of commercial enzymes in wine production: A critical review of recent research. *Journal of Food Science and Technology*, 58(1), 9-21.
- Farkas, J., & Mohácsi-Farkas, C. (2011). History and future of food irradiation. *Trends in Food Science and Technology*, 22(2-3), 121-126.
- Fauster, T., Philipp, C., Hanz, K., Scheibelberger, R., Teufl, T., Nauer, S., Scheiblhofer, H., & Jaeger, H. (2020). Impact of a combined pulsed electric field (PEF) and enzymatic mash treatment on yield, fermentation behaviour and composition of white wine. *European Food Research and Technology*, 246, 609-620.
- Ferraretto, P., & Celotti, E. (2016). Preliminary study of the effects of ultrasound on red wine polyphenols. *CyTA-Journal of Food*, 14(4), 529-535.
- Ferraretto, P., Cacciola, V., Batllo, I. F., & Celotti, E. (2013). Ultrasounds application in winemaking: grape maceration and yeast lysis. *Italian Journal of Food Science*, 25(2), 160-168.

- Fia, G., Canuti, V., & Rosi, I. (2014). Evaluation of potential side activities of commercial enzyme preparations used in winemaking. *International Journal of Food Science and Technology*, 49(8), 1902-1911.
- Figueiredo, P., George, F., Tatsuzawa, F., Toki, K., Saito, N., & Brouillard, R. (1999). New features of intramolecular copigmentation byacylated anthocyanins. *Phytochemistry*, 51(1), 125-132.
- Francia-Aricha, E. M., Guerra, M. T., Rivas-Gonzalo, J. C., & Santos-Buelga, C. (1997). New anthocyanin pigments formed after condensation with flavanols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(6), 2262-2266.
- Gambacorta, G., Trani, A., Fasciano, C., Paradiso, V. M., & Faccia, M. (2019). Effects of prefermentative cold soak on polyphenols and volatiles of Aglianico, Primitivo and Nero di Troia red wines. *Food Science and Nutrition*, 7(2), 483-491.
- Gambacorta, G., Trani, A., Punzi, R., Fasciano, C., Leo, R., Fracchiolla, G., & Faccia, M. (2017). Impact of ultrasounds on the extraction of polyphenols during winemaking of red grapes cultivars from southern Italy. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 43, 54-59.
- Gao, L., Girard, B., Mazza, G., & Reynolds, A. G. (1997). Changes in anthocyanins and color characteristics of Pinot Noir wines during different vinification processes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(6), 2003-2008.
- Gao, Y., Fangel, J. U., Willats, W. G., Vivier, M. A., & Moore, J. P. (2016). Effect of commercial enzymes on berry cell wall deconstruction in the context of intravineyard ripeness variation under winemaking conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(19), 3862-3872.
- Gao, Y., Zietsman, A. J., Vivier, M. A., & Moore, J. P. (2019). Deconstructing wine grape cell walls with enzymes during winemaking: New insights from glycan microarray technology. *Molecules*, 24(1), 165.
- García-Estévez, I., Ramos-Pineda, A. M., & Escribano-Bailón, M. T. (2018). Interactions between wine phenolic compounds and human saliva in astringency perception. *Food and Function*, 9(3), 1294-1309.
- García-Martín, J. F., & Sun, D. W. (2013). Ultrasound and electric fields as novel techniques for assisting the wine ageing process: The state-of-the-art research. *Trends in Food Science and Technology*, 33(1), 40-53.
- Garde-Cerdán, T., González-Arenzana, L., López, N., López, R., Santamaría, P., & López-Alfaro, I. (2013). Effect of different pulsed electric field treatments on the

- volatile composition of Graciano, Tempranillo and Grenache grape varieties. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 20, 91-99.
- Garrido-Bañuelos, G., Buica, A., & Du Toit, W. J. (2022). Relationship between anthocyanins, proanthocyanidins, and cell wall polysaccharides in grapes and red wines. A current state-of-art review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 62(28), 7743-7759.
- Garrido-Bañuelos, G., Buica, A., Schückel, J., Zietsman, A. J., Willats, W. G., Moore, J. P., & Du Toit, W. J. (2019a). Investigating the relationship between grape cell wall polysaccharide composition and the extractability of phenolic compounds into Shiraz wines. Part I: Vintage and ripeness effects. *Food Chemistry*, 278, 36-46.
- Garrido-Bañuelos, G., Buica, A., Schückel, J., Zietsman, A. J., Willats, W. G., Moore, J. P., & Du Toit, W. J. (2019b). Investigating the relationship between cell wall polysaccharide composition and the extractability of grape phenolic compounds into Shiraz wines. Part II: Extractability during fermentation into wines made from grapes of different ripeness levels. *Food Chemistry*, 278, 26-35.
- Gawel, R. (1998). Red wine astringency: a review. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 4(2), 74–95.
- Geffroy, O., Lopez, R., Feilhes, C., Violleau, F., Kleiber, D., Favarel, J. L., & Ferreira, V. (2018). Modulating analytical characteristics of thermovinified Carignan musts and the volatile composition of the resulting wines through the heating temperature. *Food Chemistry*, 257, 7-14.
- Geffroy, O., Lopez, R., Serrano, E., Dufourcq, T., Gracia-Moreno, E., Cacho, J., & Ferreira, V. (2015). Changes in analytical and volatile compositions of red wines induced by pre-fermentation heat treatment of grapes. *Food Chemistry*, 187, 243-253.
- Glories, Y., & Saucier, C. (2000). *Tannin evolution from grape to wine. Effects on wine taste*. En: Proceedings of the ASEV 50th Anniversary Annual Meeting JM Rantz (Ed.) (pp. 353-355), Seattle, WA, USA.
- González-Centeno, M. R., Knoerzer, K., Sabarez, H., Simal, S., Rosselló, C., & Femenia, A. (2014). Effect of acoustic frequency and power density on the aqueous ultrasonic-assisted extraction of grape pomace (*Vitis vinifera* L.)—A response surface approach. *Ultrasonics Sonochemistry*, 21(6), 2176-2184.

- Goulao, L. F., Fernandes, J. C., Lopes, P., & Amâncio, S. (2012). Tackling the cell wall of the grape berry. En H. Gerós, M. M. Chaves, S. Delrot (Eds.), *The biochemistry of the grape berry* (pp. 172-193). *Bentham Books*.
- Gracin, L., Jambrak, A. R., Juretić, H., Dobrović, S., Barukčić, I., Grozdanović, M., & Smoljanić, G. (2016). Influence of high power ultrasound on *Brettanomyces* and lactic acid bacteria in wine in continuous flow treatment. *Applied Acoustics*, *103*, 143-147.
- Guadalupe, Z., Martínez, L., & Ayestarán, B. (2010). Yeast mannoproteins in red winemaking: Effect on polysaccharide, polyphenolic, and color composition. *American Journal of Enology and Viticulture*, *61*(2), 191-200.
- Gunata, Y. Z., Sapis, J. C., & Moutounet, M. (1987). Substrates and aromatic carboxylic acid inhibitors of grape phenol oxidases. *Phytochemistry*, *26*(6), 1573-1575.
- Hanlin, R. L., Hrmova, M., Harbertson, J. F., & Downey, M. O. (2010). Condensed tannin and grape cell wall interactions and their impact on tannin extractability into wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, *16*(1), 173-188.
- He, F., Liang, N. N., Mu, L., Pan, Q. H., Wang, J., Reeves, M. J., & Duan, C. Q. (2012). Anthocyanins and their variation in red wines II. Anthocyanin derived pigments and their color evolution. *Molecules*, *17*(2), 1483-1519.
- Hernández-Hernández, H. M., Moreno-Vilet, L., & Villanueva-Rodríguez, S. J. (2019). Current status of emerging food processing technologies in Latin America: Novel non-thermal processing. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, *58*, 102233.
- Hjelmeland, A. K., & Ebeler, S. E. (2014). Glycosidically bound volatile aroma compounds in grapes and wine: a review. *American Journal of Enology and Viticulture*, *66*(1), 1-11.
- Hrmova, M., Farkas, V., Lahnstein, J., & Fincher, G. B. (2007). A barley xyloglucan xyloglucosyl transferase covalently links xyloglucan, cellulosic substrates, and (1, 3; 1, 4)- β -D-glucans. *Journal of Biological Chemistry*, *282*(17), 12951-12962.
- Keegstra, K., Talmadge, K. W., Bauer, W. D., & Albersheim, P. (1973). The structure of plant cell walls: III. A model of the walls of suspension-cultured sycamore cells based on the interconnections of the macromolecular components. *Plant Physiology*, *51*(1), 188-197.

- Kelebek, H., Canbas, A., & Selli, S. (2009). Effects of different maceration times and pectolytic enzyme addition on the anthocyanin composition of *Vitis vinifera* cv. Kalecik karasi wines. *Journal of Food Processing and Preservation*, 33(3), 296-311.
- Klenar, I., Berovič, 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(1), 11-17.
- Knorr, D., Froehling, A., Jaeger, H., Reineke, K., Schlueter, O., & Schoessler, K. (2011). Emerging technologies in food processing. *Annual Review of Food Science and Technology*, 2, 203-235.
- Koyama, K., Goto-Yamamoto, N., & Hashizume, K. (2007). Influence of maceration temperature in red wine vinification on extraction of phenolics from berry skins and seeds of grape (*Vitis vinifera*). *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 71(4), 958-965.
- Krasulya, O., Shestakov, S., Bogush, V., Potoroko, I., Cherepanov, P., & Krasulya, B. (2014). Applications of sonochemistry in Russian food processing industry. *Ultrasonics Sonochemistry*, 21(6), 2112-2116.
- Kumar, Y., Marangon, M., & Mayr Marangon, C. (2023). The Application of Non-Thermal Technologies for Wine Processing, Preservation, and Quality Enhancement. *Beverages*, 9(2), 30.
- Kwiatkowski, M., Kravchuk, O., Skouroumounis, G. K., & Taylor, D. K. (2020). Microwave-assisted and conventional phenolic and colour extraction from grape skins of commercial white and red cultivars at veraison and harvest. *Journal of Cleaner Production*, 275, 122671.
- Langcake, P. (1981). Disease resistance of *Vitis* spp. and the production of the stress metabolites resveratrol, ϵ -viniferin, α -viniferin and pterostilbene. *Physiological Plant Pathology*, 18(2), 213–226.
- Lau, J. M., McNeil, M., Darvill, A. G., & Albersheim, P. (1985). Structure of the backbone of rhamnogalacturonan I, a pectic polysaccharide in the primary cell walls of plants. *Carbohydrate Research*, 137, 111-125.
- Lieu, L. N., & Le, V. V. M. (2010). Application of ultrasound in grape mash treatment in juice processing. *Ultrasonics Sonochemistry*, 17(1), 273-279.

- Liu, S. Q., & Pilone, G. J. (2000). An overview of formation and roles of acetaldehyde in winemaking with emphasis on microbiological implications. *International Journal of Food Science and Technology*, 35(1), 49-61.
- Loira, I., Morata, A., Bañuelos, M. A., Puig-Pujol, A., Guamis, B., González, C., & Suárez-Lepe, J. A. (2018). Use of Ultra-High Pressure Homogenization processing in winemaking: Control of microbial populations in grape musts and effects in sensory quality. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 50, 50-56.
- López, N., Puértolas, E., Condón, S., Álvarez, I., & Raso, J. (2008). 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-Alfaro, I., González-Arenzana, L., López, N., Santamaría, P., López, R., & Garder-Cerdán, T. (2013). Pulsed electric field treatment enhanced stilbene content in Graciano, Tempranillo and Grenache grape varieties. *Food Chemistry*, 141(4), 3759-3765.
- Lukić, K., Brnčić, M., Čurko, N., Tomašević, M., Tušek, A. J., & Ganić, K. K. (2020). Quality characteristics of white wine: The short-and long-term impact of high power ultrasound processing. *Ultrasonics Sonochemistry*, 68, 105194.
- Lukić, K., Brnčić, M., Čurko, N., Tomašević, M., Valinger, D., Denoya, G. I., Barba, F. J., & Ganić, K. K. (2019). Effects of high power ultrasound treatments on the phenolic, chromatic and aroma composition of young and aged red wine. *Ultrasonics Sonochemistry*, 59, 104725.
- Luo, H., Schmid, F., Grbin, P. R., & Jiranek, V. (2012). Viability of common wine spoilage organisms after exposure to high power ultrasonics. *Ultrasonics Sonochemistry*, 19(3), 415-420.
- Ma, W., Guo, A., Zhang, Y., Wang, H., Liu, Y., & Li, H. (2014). A review on astringency and bitterness perception of tannins in wine. *Trends in Food Science and Technology*, 40(1), 6-19.
- Manjón, E., Recio-Torrado, A., Ramos-Pineda, A. M., García-Estévez, I., & Escribano-Bailón, M. T. (2021). Effect of different yeast mannoproteins on the interaction between wine flavanols and salivary proteins. *Food Research International*, 143, 110279.

- Marais, J. (2003a). Effect of different wine-making techniques on the composition and quality of Pinotage wine. I. Low-temperature skin contact prior to fermentation. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 24(2), 70-75.
- Marais, J. (2003b). Effect of different wine-making techniques on the composition and quality of Pinotage wine. II. Juice/skin mixing practices. *South African Journal for Enology and Viticulture*, 24(2), 76-79.
- Markham, K. R., Gould, K. S., Winefield, C. S., Mitchell, K. A., Bloor, S. J., & Boase, M. R. (2000). Anthocyanic vacuolar inclusions—their nature and significance in flower colouration. *Phytochemistry*, 55(4), 327-336.
- Martínez-Pérez, M. P., Bautista-Ortín, A. B., Pérez-Porrás, P., Jurado, R., & Gómez-Plaza, E. (2020). A new approach to the reduction of alcohol content in red wines: The use of high-power ultrasounds. *Foods*, 9(6), 726.
- Mason T. J., & Peters, D. (2^a Ed). (2002). Practical sonochemistry: power ultrasound and applications. Horwood Publishing.
- Mason, T. J., Cobley, A. J., Graves, J. E., & Morgan, D. (2011). New evidence for the inverse dependence of mechanical and chemical effects on the frequency of ultrasound. *Ultrasonics Sonochemistry*, 18(1), 226-230.
- Mateus, N., Oliveira, J., González-Paramás, A. M., Santos-Buelga, C., & de Freitas, V. (2005). Screening of Portisins (Vinylpyranoanthocyanin Pigments) in Port Wine by LC/DAD-MS. *Food Science and Technology International*, 11(5), 353–358.
- Maza, M. A., Martínez, J. M., Hernández-Orte, P., Cebrián, G., Sánchez-Gimeno, A. C., Álvarez, I., & Raso, J. (2019b). Influence of pulsed electric fields on aroma and polyphenolic compounds of Garnacha wine. *Food and Bioproducts Processing*, 116, 249-257.
- Maza, M., Álvarez, I., & Raso, J. (2019a). Thermal and non-thermal physical methods for improving polyphenol extraction in red winemaking. *Beverages*, 5(3), 47.
- McCann, M. C., Wells, B., & Roberts, K. (1990). Direct visualization of cross-links in the primary plant cell wall. *Journal of Cell Science*, 96(2), 323-334.
- Mizuno, H., Hirano, K., & Okamoto, G. (2006). Effect of anthocyanin composition in grape skin on anthocyanic vacuolar inclusion development and skin coloration. *VITIS - Journal of Grapevine Research*, 45(4), 173.
- Morata, A. (2^a Ed). (2010). *Nuevas tecnologías de conservación de alimentos*. Ed. Antonio Madrid Vicente.

- Morata, A., Bañuelos, M. A., Tesfaye, W., Loira, I., Palomero, F., Benito, S., Callejo, M.J., Villa, A., González, M.C., & Suárez-Lepe, J. A. (2015). Electron beam irradiation of wine grapes: Effect on microbial populations, phenol extraction and wine quality. *Food and Bioprocess Technology*, 8, 1845-1853.
- Morata, A., Calderón, F., González, M. C., Gómez-Cordovés, M. C., & Suárez, J. A. (2007). Formation of the highly stable pyranoanthocyanins (vitisins A and B) in red wines by the addition of pyruvic acid and acetaldehyde. *Food Chemistry*, 100(3), 1144-1152.
- Morata, A., Escott, C., Loira, I., López, C., Palomero, F., & González, C. (2021). Emerging non-thermal technologies for the extraction of grape anthocyanins. *Antioxidants*, 10(12), 1863.
- Morata, A., Gómez-Cordovés, M. C., Colomo, B., & Suárez, J. A. (2003). Pyruvic acid and acetaldehyde production by different strains of *Saccharomyces cerevisiae*: relationship with vitisin A and B formation in red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(25), 7402-7409.
- Morata, A., González, C., Tesfaye, W., Loira, I., & Suárez-Lepe, J.A. (2019). Maceration and fermentation: New technologies to increase extraction. En A. Morata (Ed.), *Red Wine Technology* (pp. 35-49). Elsevier.
- Morata, A., Loira, I., Vejarano, R., Bañuelos, M. A., Sanz, P. D., Otero, L., & Suárez-Lepe, J. A. (2014). Grape processing by high hydrostatic pressure: Effect on microbial populations, phenol extraction and wine quality. *Food and Bioprocess Technology*, 8, 277-286.
- Morata, A., Loira, I., Vejarano, R., González, C., Callejo, M. J., & Suárez-Lepe, J. A. (2017). Emerging preservation technologies in grapes for winemaking. *Trends in Food Science and Technology*, 67, 36-43.
- Morel-Salmi, C., Souquet, J. M., Bes, M., & Cheynier, V. (2006). Effect of flash release treatment on phenolic extraction and wine composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(12), 4270-4276.
- Muñoz García, R., Oliver Simancas, R., Díaz-Maroto, M. C., Alañón Pardo, M. E., & Pérez-Coello, M. S. (2021). Effect of microwave maceration and SO₂ free vinification on volatile composition of red wines. *Foods*, 10(6), 1164.
- Muñoz-García, R. (2023). *Aplicación de ultrasonidos y microondas como técnicas innovadoras en la industria enológica* (Tesis doctoral, Universidad de Castilla-La Mancha).

- Ntourtoglou, G., Drosou, F., Chatzimitakos, T., Athanasiadis, V., Bozinou, E., Dourtoglou, V. G., Elhakem, A., Sami, R., Ashour, A. A., Shafie, A., & Lalas, S. I. (2022). Combination of pulsed electric field and ultrasound in the extraction of polyphenols and volatile compounds from grape stems. *Applied Sciences*, 12(12), 6219.
- Nunan, K. J., Davies, C., Robinson, S. P., & Fincher, G. B. (2001). Expression patterns of cell wall-modifying enzymes during grape berry development. *Planta*, 214, 257-264.
- Oey, I., Lille, M., Van Loey, A., & Hendrickx, M. (2008). Effect of high-pressure processing on colour, texture and flavour of fruit-and vegetable-based food products: a review. *Trends in Food Science and Technology*, 19(6), 320-328.
- OIV. (2022a). International code of oenological practices. Paris, France: Organisation Internationale de la Vigne et du Vin (OIV).
- OIV. (2022b). Treatment by discontinuous high pressure processes (Oeno 594A-2019) International code of oenological practices. Paris, France: Organisation Internationale de la Vigne et du Vin (OIV).
- OIV. (2022c). Treatment of grapes by pulsed electric fields (PEF) (Oeno 634-2020) International code of oenological practices. Paris, France: Organisation Internationale de la Vigne et du Vin (OIV).
- OIV. (2022d). Treatment of crushed grapes with ultrasound to promote the extraction of their compounds (Oeno 616-2019) International code of oenological practices. Paris, France: Organisation Internationale de la Vigne et du Vin (OIV).
- Oliveira, J., de Freitas, V., Silva, A. M., & Mateus, N. (2007). Reaction between hydroxycinnamic acids and anthocyanin– pyruvic acid adducts yielding new portisins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(15), 6349-6356.
- Oliver Simancas, R., Díaz-Maroto, M. C., Alañón Pardo, M. E., Pérez Porras, P., Bautista-Ortín, A. B., Gómez-Plaza, E., & Pérez-Coello, M. S. (2021). Effect of power ultrasound treatment on free and glycosidically-bound volatile compounds and the sensorial profile of red wines. *Molecules*, 26(4), 1193.
- Ortega-Regules, A., Romero-Cascales, I., Ros-García, J. M., Bautista-Ortín, A. B., López-Roca, J. M., Fernández-Fernández, J. I., & Gómez-Plaza, E. (2008). Anthocyanins and tannins in four grape varieties (*Vitis vinifera* L.). Evolution of their content and extractability. *OENO One*, 42(3), 147-156.

- Ortega-Regules, A., Romero-Cascales, I., Ros-García, J. M., López-Roca, J. M., & Gómez-Plaza, E. (2006). A first approach towards the relationship between grape skin cell-wall composition and anthocyanin extractability. *Analytica Chimica Acta*, 563(1-2), 26-32.
- Ortega-Rivas, E., & Salmerón-Ochoa, I. (2014). Nonthermal food processing alternatives and their effects on taste and flavor compounds of beverages. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 54(2), 190-207.
- Osete-Alcaraz, A., Bautista-Ortín, A. B., Ortega-Regules, A. E., & Gómez-Plaza, E. (2019). Combined use of pectolytic enzymes and ultrasounds for improving the extraction of phenolic compounds during vinification. *Food and Bioprocess Technology*, 12, 1330-1339.
- Paissoni, M. A., Segade, S. R., Giacosa, S., Torchio, F., Cravero, F., Englezos, V., Rantsiou, K., Carboni, C., Gerbi, V., Teissedre, P.L., & Rolle, L. (2016). Impact of post-harvest ozone treatments on the skin phenolic extractability of red winegrapes cv Barbera and Nebbiolo (*Vitis vinifera* L.). *Food Research International*, 98, 68-78.
- Parenti, A., Spugnoli, P., Calamai, L., Ferrari, S., & Gori, C. (2004). Effects of cold maceration on red wine quality from Tuscan Sangiovese grape. *European Food Research and Technology*, 218, 360-366.
- Pauly, M., Albersheim, P., Darvill, A., & York, W. S. (1999). Molecular domains of the cellulose/xyloglucan network in the cell walls of higher plants. *The Plant Journal*, 20(6), 629-639.
- Pedroza, M. A., Zalacain, A., Lara, J. F., & Salinas, M. R. (2010). Global grape aroma potential and its individual analysis by SBSE–GC–MS. *Food Research International*, 43(4), 1003-1008.
- Pellerin, P., Vidal, S., Williams, P., & Brillouet, J. M. (1995). Characterization of five type II arabinogalactan-protein fractions from red wine of increasing uronic acid content. *Carbohydrate Research*, 277(1), 135-143.
- Pérez-Porras, P., Gómez-Plaza, E., Muñoz García, R., Díaz-Maroto, M. C., Moreno-Olivares, J. D., & Bautista-Ortín, A. B. (2022). Prefermentative grape microwave treatment as a tool for increasing red wine phenolic content and reduce maceration time. *Applied Sciences*, 12(16), 8164.

- Pérez-Serradilla, J. A., & De Castro, M. L. (2011). Microwave-assisted extraction of phenolic compounds from wine lees and spray-drying of the extract. *Food Chemistry*, *124*(4), 1652-1659.
- Piccardo, D., & González-Neves, G. (2013). Extracción de polifenoles y composición de vinos tintos Tannat elaborados por técnicas de maceración prefermentativa. *Agrociencia (Uruguay)*, *17*(1), 36-44.
- Pinelo, M., Arnous, A., & Meyer, A. S. (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*(11), 579-590.
- Prieur, C., Rigaud, J., Cheynier, V., & Moutounet, M. (1994). Oligomeric and polymeric procyanidins from grape seeds. *Phytochemistry*, *36*(3), 781-784.
- Puértolas, E., López, N., Condón, S., Álvarez, I., & Raso, J. (2010a). Potential Applications of PEF to Improve Red Wine Quality. *Trends in Food Science and Technology*, *21*, 247–255.
- Puértolas, E., Saldaña, G., Condón, S., Álvarez, I., & Raso, J. (2010b). Evolution of polyphenolic compounds in red wine from Cabernet Sauvignon grapes processed by pulsed electric fields during aging in bottle. *Food Chemistry*, *119*(3), 1063-1070.
- Puértolas, E., Saldaña, G., Condón, S., Álvarez, I., & Raso, J. (2009). 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*(9), C647-C652.
- Ramey, D., Bertrand, A., Ough, C. S., Singleton, V. L., & Sanders, E. (1986). Effects of skin contact temperature on Chardonnay must and wine composition. *American Journal of Enology and Viticulture*, *37*(2), 99-106.
- Raso, J., & Heinz, V. (1ª Ed.) (2006). Pulsed Electric Fields Technology for the Food Industry: Fundamentals and Applications; Food Engineering Series. Springer Science & Business Media.
- Rebolo López, S. (2007). *Estudio de la composición polifenólica de vinos tintos gallegos con DO: Ribeiro, Valdeorras y Ribeira Sacra*. (Tesis doctoral, Universidad Santiago de Compostela).
- Ribéreau-Gayon, P., Boidron, J. N., & Terrier, A. (1975). Aroma of Muscat grape varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *23*(6), 1042-1047.

- Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B. and Lonvaud, A. (2000). Handbook of Enology, Volume I: The Microbiology of Wine and Vinifications. Wiley & Sons Ltd. West Sussex: England
- Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., & Dubourdieu, D. (2006). Handbook of Enology, Volume II: The chemistry of wine stabilization and treatments. Wiley & Sons Ltd. West Sussex: England
- Ricci, A., Parpinello, G. P., Banfi, B. A., Olivi, F., & Versari, A. (2020). Preliminary study of the effects of pulsed electric field (PEF) treatments in wines obtained from early-harvested sangiovese grapes. *Beverages*, 6(2), 34.
- Ríos-Alzate, L. R., & Arias Vargas, F. J. (2002). *Inmovilización de pectinasas y/o celulasas y determinación de algunos de sus efectos en el jugo de guayaba*. (Tesis de grado, Universidad Nacional de Colombia).
- Rodríguez-Carvajal, M. A., du Penhoat, C. H., Mazeau, K., Doco, T., & Pérez, S. (2003). The three-dimensional structure of the mega-oligosaccharide rhamnogalacturonan II monomer: a combined molecular modeling and NMR investigation. *Carbohydrate Research*, 338(7), 651-671.
- Rojas, M. L., Kubo, M. T., Caetano-Silva, M. E., & Augusto, P. E. (2021). Ultrasound processing of fruits and vegetables, structural modification and impact on nutrient and bioactive compounds: a review. *International Journal of Food Science and Technology*, 56(9), 4376-4395.
- Roman, T., Tonidandel, L., Nicolini, G., Bellantuono, E., Barp, L., Larcher, R., & Celotti, E. (2020). Evidence of the possible interaction between ultrasound and thiol precursors. *Foods*, 9(1), 104.
- Romero Cascales, M. I. (2008). *Extracción de compuestos fenólicos de la uva al vino. Papel de los enzimas de maceración* (Tesis doctoral, Universidad de Murcia).
- Romero-Cascales, I., Ortega-Regules, A., López-Roca, J. M., Fernández-Fernández, J. I., & Gómez-Plaza, E. (2005). Differences in anthocyanin extractability from grapes to wines according to variety. *American Journal of Enology and Viticulture*, 56(3), 212-219.
- Sacchi, K. L., Bisson, L. F., & Adams, D. O. (2005). A review of the effect of winemaking techniques on phenolic extraction in red wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 56(3), 197-206.

- Salazar-González, C., San Martín-González, M. F., López-Malo, A., & Sosa-Morales, M. E. (2012). Recent studies related to microwave processing of fluid foods. *Food and Bioprocess Technology*, 5, 31-46.
- Sánchez-Córdoba, C., Durán-Guerrero, E., & Castro, R. (2021). Olfactometric and sensory evaluation of red wines subjected to ultrasound or microwaves during their maceration or ageing stages. *LWT - Food Science and Technology*, 144, 111228.
- Sánchez-Palomo, E., González-Viñas, M. A., Díaz-Maroto, M. C., Soriano-Pérez, A., & Pérez-Coello, M. S. (2007). Aroma potential of Albillo wines and effect of skin-contact treatment. *Food Chemistry*, 103(2), 631-640.
- Santos-Zea, L., Antunes-Ricardo, M., Gutierrez-Urbe, J. A., García-Pérez, J. V., & Benedito, J. (2018). Effect of ultrasound transducer design on the acoustically-assisted supercritical fluid extraction of antioxidants from oregano. *Ultrasonics Sonochemistry*, 47, 47-56.
- Schwarz, M., Jerz, G., & Winterhalter, P. (2003). Isolation and structure of Pinotin A, a new anthocyanin derivative from Pinotage wine. *VITIS-Journal of Grapevine Research*, 42(2), 105.
- Setford, P. C., Jeffery, D. W., Grbin, P. R., & Muhlack, R. A. (2017). Factors affecting extraction and evolution of phenolic compounds during red wine maceration and the role of process modelling. *Trends in Food Science and Technology*, 69, 106-117.
- Souquet, J. M., Cheynier, V., Brossaud, F., & Moutounet, M. (1996). Polymeric proanthocyanidins from grape skins. *Phytochemistry*, 43(2), 509-512.
- Stevenson, T. T., Darvill, A. G., & Albersheim, P. (1988). Structural features of the plant cell-wall polysaccharide rhamnogalacturonan-II. *Carbohydrate Research*, 182(2), 207-226.
- Sun, W. X., Hu, K., Zhang, J. X., Zhu, X. L., & Tao, Y. S. (2018). Aroma modulation of Cabernet Gernischt dry red wine by optimal enzyme treatment strategy in winemaking. *Food Chemistry*, 245, 1248-1256.
- Tajchakavit, S., Ramaswamy, H. S., & Fustier, P. (1998). Enhanced destruction of spoilage microorganisms in apple juice during continuous flow microwave heating. *Food Research International*, 31(10), 713-722.
- Tao, Y., Sun, D. W., Górecki, A., Błaszczak, W., Lamparski, G., Amarowicz, R., Fornal, J., & Jeliński, T. (2012). Effects of high hydrostatic pressure processing on the

- physicochemical and sensorial properties of a red wine. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 16, 409-416.
- Tartian, A. C., Cotea, V. V., Niculaua, M., Zamfir, C. I., Colibaba, C. L., & Moroşanu, A. M. (2017). The influence of the different techniques of maceration on the aromatic and phenolic profile of the Busuioacă de Bohotin wine. In *Bio web of conferences*, 9 (p. 02032). EDP Sciences.
- Téllez Luis, S. J., Ramírez, J. A., Lamela, C. P., Vázquez, M., & Gándara, J. S. (2001). Aplicación de la alta presión hidrostática en la conservación de los alimentos. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 3(2), 66-80.
- Tiwari, B. K. (2015). Ultrasound: A clean, green extraction technology. *Trends in Analytical Chemistry*, 71, 100-109.
- Tsong, T. Y. (1991). Electroporation of cell membranes. *Biophysical Journal*, 60(2), 297-306.
- Vadivambal, R., & Jayas, D. S. (2010). Non-uniform temperature distribution during microwave heating of food materials—A review. *Food and Bioprocess Technology*, 3, 161-171.
- Vaquero, C., Escott, C., Loira, I., Guamis, B., del Fresno, J. M., Quevedo, J. M., Gervilla, R., De Lamo, S., Ferrer-Gallego, R., González, C., Bañuelos, M. A., Suárez-Lepe, J. A., & Morata, A. (2022). Cabernet Sauvignon red must processing by UHPH to produce wine without SO₂: the colloidal structure, microbial and oxidation control, colour protection and sensory quality of the wine. *Food and Bioprocess Technology*, 15(3), 620-634.
- Vergara Rosales, C. A. (2010). *Diferenciación varietal y evolución del perfil de flavonoides y actividad antioxidante del vino tinto durante el proceso de guarda* (Tesis doctoral, Universidad de Concepción).
- Vicaş, S. I., Bandici, L., Teuşdea, A. C., Turcin, V., Popa, D., & Bandici, G. E. (2017). The bioactive compounds, antioxidant capacity, and color intensity in must and wines derived from grapes processed by pulsed electric field. *CYTA-Journal of Food*, 15(4), 553-562.
- Vidal, S., Cartalade, D., Souquet, J. M., Fulcrand, H., & Cheynier, V. (2002). Changes in proanthocyanidin chain length in winelike model solutions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(8), 2261-2266.

- Vivar-Quintana, A. M., Santos-Buelga, C., & Rivas-Gonzalo, J. C. (2002). Anthocyanin-derived pigments and colour of red wines. *Analytica Chimica Acta*, 458(1), 147-155.
- Vivas, N., & Glories, Y. (1993). Les phénomènes d'oxydoréduction liés à l'élevage en barrique des vins rouges: aspects technologiques. *Revue Française d'Oenologie*, 33(142), 33-38.
- Vorwerk, S., Somerville, S., & Somerville, C. (2004). The role of plant cell wall polysaccharide composition in disease resistance. *Trends in Plant Science*, 9(4), 203-209.
- Willats, W. G., McCartney, L., Mackie, W., & Knox, J. P. (2001). Pectin: cell biology and prospects for functional analysis. *Plant Molecular Biology*, 47, 9-27.
- Yao, Y., Pan, Y., & Liu, S. (2020). Power ultrasound and its applications: A state-of-the-art review. *Ultrasonics Sonochemistry*, 62, 104722.
- Yuan, J. F., Wang, T. T., Chen, Z. Y., Wang, D. H., Gong, M. G., & Li, P. Y. (2020). Microwave irradiation: impacts on physicochemical properties of red wine. *CyTA-Journal of Food*, 18(1), 281-290.
- Zalacain, A., Marín, J., Alonso, G. L., & Salinas, M. R. (2007). Analysis of wine primary aroma compounds by stir bar sorptive extraction. *Talanta*, 71(4), 1610-1615.
- Zarra, I., & Revilla, G. (1993). Pared celular. Estructura y función. En Azcon-Bieto J, Talon M (Eds.), *Fisiología y Bioquímica Vegetal* (pp. 3-22). McGraw Hill.
- Zeng, L. (2015). *Étude de la composition macromoléculaire du raisin et des vins: impact sur la qualité sensorielle* (Tesis doctoral, Université de Bordeaux).
- Zhang, Q. A., Shen, Y., Fan, X. H., & Garcia Martin, J. F. (2016). Preliminary study of the effect of ultrasound on physicochemical properties of red wine. *CyTA-Journal of Food*, 14(1), 55-64.
- Zietsman, A. J., Moore, J. P., Fangel, J. U., Willats, W. G., & Vivier, M. A. (2015b). Profiling the hydrolysis of isolated grape berry skin cell walls by purified enzymes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(37), 8267-8274.
- Zietsman, A. J., Moore, J. P., Fangel, J. U., Willats, W. G., Trygg, J., & Vivier, M. A. (2015a). Following the compositional changes of fresh grape skin cell walls during the fermentation process in the presence and absence of maceration enzymes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(10), 2798-2810.

2. OBJETIVOS

La calidad organoléptica del vino depende de la concentración y composición de las distintas familias de compuestos químicos presentes en el mismo, bien sean estas pertenecientes al grupo de compuestos fenólicos, aromáticos o polisacáridos.

Ya que las paredes celulares actúan como barrera difusional en la extracción de compuestos durante la maceración, distintas técnicas y tecnologías han sido ampliamente estudiadas con el fin de optimizar el proceso extractivo con dos objetivos principales:

1. Obtener vinos con **mayor calidad organoléptica**.
2. Hacer posible una **reducción del tiempo de elaboración** sin reducir la calidad del vino.

En los últimos años, tecnologías innovadoras como los ultrasonidos, los pulsos eléctricos o las altas presiones hidrostáticas han sido aprobadas por la OIV para su uso en bodega, frente a otras tecnologías que siguen exclusivamente en fase experimental, como las microondas.

Por ello, el **objetivo principal** de esta Tesis doctoral es el estudio de la aplicación de los ultrasonidos de alta potencia y microondas para incrementar la extracción de compuestos de interés, como compuestos fenólicos, polisacáridos o compuestos y precursores aromáticos y obtener vinos de alta calidad organoléptica.

Para ello, se proponen los siguientes **objetivos parciales**:

- Estudio de las condiciones de operación adecuadas para favorecer la ruptura de la pared celular de células del hollejo con el fin de facilitar la liberación de compuestos de interés (compuestos fenólicos, polisacáridos y compuestos aromáticos) y reducir el tiempo de maceración (**Publicación 3.1.**).
- Estudio en vino del efecto de los ultrasonidos sobre uva estrujada en base a las diferencias estructurales y compositivas de las paredes celulares debidas al estado sanitario de uva parcialmente botritizada (**Publicación 3.2.**).

- Estudio en vino del efecto de los ultrasonidos sobre uva estrujada en base a las diferencias estructurales y compositivas de las paredes celulares debidas al estado de maduración de la uva (**Publicación 3.2., 3.3.**).
- Estudio comparativo en vino del efecto de los US en aplicación individual o en combinación con enzimas pectolíticas -técnica tradicional extendida en la industria enológica- sobre uva estrujada (**Publicación 3.3.**).
- Estudio en vino del efecto de los ultrasonidos sobre uva estrujada en base a las diferencias estructurales y compositivas de distintas variedades de uva (**Publicación 3.4.**).
- Estudio de ultrasonidos de alta potencia en la obtención de vinos rosados de mayor calidad organoléptica mediante su aplicación sobre uva estrujada (**Publicación 3.5.**).
- Estudio del uso de microondas sobre uva estrujada en la obtención de vinos con mayor contenido en compuestos fenólicos en menor tiempo de producción (**Publicación 3.6.**).

3. RESULTADOS

3.1. Using high-power ultrasounds in red winemaking: Effect of operating conditions on wine physico-chemical and chromatic characteristics

3.2. The effect of ultrasound on Syrah wine composition as affected by the ripening or sanitary status of the grapes

3.3. Combining high-power ultrasound and enological enzymes during winemaking to improve the chromatic characteristics of red wine

3.4. High-power ultrasound in Enology: Is the outcome of this technique dependent on grape variety?

3.5. The technology of high-power ultrasound and its effect on the color and aroma of rosé wines

3.6. Prefermentative grape microwave treatment as a tool for increasing red wine phenolic content and reduce maceration time

3.1.

Uso de ultrasonidos de alta potencia en la elaboración de vinos tintos: Efecto de las condiciones de operación sobre las características fisicoquímicas y cromáticas del vino

Using high-power ultrasounds in red winemaking: Effect of operating conditions on wine physico-chemical and chromatic characteristics

Paula Pérez-Porras¹, Ana Belén Bautista-Ortín¹, Ricardo Jurado², Encarna Gómez-Plaza¹.

¹Departamento de Tecnología de los Alimentos, Nutrición y Bromatología, Facultad de Veterinaria, Universidad de Murcia, 30100 Murcia, España.

²Agrovin, S.A. Av. De Los Vinos s/n, Alcázar de San Juan, 13600 Ciudad Real, España.

LWT – Food Science and Technology, 2021, 138, 110645.

<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110645>

Abstract

This study presents the application of high-power ultrasounds (US) to crushed grapes using winery-scale equipment and studies, for the first time at this scale, how the frequency of the ultrasounds affects the extraction of phenolic compounds from grapes and the chromatic and physico-chemical characteristics of the finished wines, in an attempt to optimize the maceration process. The results showed how US modified the physical characteristics of the grape skin, facilitating phenolic extraction and improving the wine chromatic characteristics but only produced slight differences in the physico-chemical characteristics of the finished wines. The two different frequencies applied led to some differences in the wine phenolic composition, especially higher tannin extraction at 20 kHz whereas anthocyanin extraction was favoured at 28 kHz. Wines made with sonicated grapes and 72 h of skin maceration time were chromatically very similar to control wines with four more days of skin contact, indicating that this technological process may increase the working capacity of the winery by allowing a reduction of more than 50% in the maceration time.

Numerosos estudios desarrollados a escala de laboratorio muestran los efectos de los ultrasonidos de alta potencia sobre la extracción de compuestos de interés a partir de uva y otras matrices alimentarias. No obstante, la escasa producción científica acerca de la aplicación de ultrasonidos a escala semiindustrial e industrial, así como el estudio de los parámetros de aplicación, plantean la importancia del presente trabajo, que muestra el efecto de la aplicación de ultrasonidos de alta potencia (US) sobre uva estrujada empleando para ello un equipo a escala semiindustrial. Este estudio muestra, por primera vez a dicha escala, la importancia de la selección de la frecuencia de aplicación adecuada sobre la extracción de compuestos fenólicos de la uva y las características cromáticas y fisicoquímicas de los vinos tintos producidos. Así, se estudió el efecto de dos frecuencias de ultrasonidos (20 kHz y 28 kHz) y dos tiempos de maceración distintos (48 horas y 72 horas) respecto al tiempo tradicionalmente empleado (7 días) en la mejora de la extracción de compuestos fenólicos de uva estrujada y despalillada de variedad Monastrell, con el objetivo de reducir el tiempo de elaboración manteniendo la calidad y estabilidad del color de los vinos tintos. Para el tratamiento con US fue empleado un sistema compuesto por un sonorreactor, un tubo hexagonal (1 m de longitud) con sonoplatos acoplados, a través del cual circula la uva estrujada y despalillada. El sistema permite el tratamiento de 400 kg de uva por hora, operando a 2500 W y una densidad de potencia de 8 W/cm² (MiniPerseo, Agrovin S.A., Alcázar de San Juan, España).

Se analizó el efecto de los US sobre la morfología de la pared celular del hollejo de uva (análisis de microscopía óptica) y sobre la cinética fermentativa, así como sobre las propiedades cromáticas y de composición tánica de los mosto-vinos en el momento del descube, el vino tras la finalización de la fermentación alcohólica y el vino embotellado tras un proceso de estabilización por frío durante un mes. También se desarrolló la caracterización fisicoquímica de estos últimos.

Los resultados mostraron una alteración estructural del hollejo de la uva con el uso de ambas frecuencias, observándose una ligera compresión del epicarpio, plasmólisis de células subepidérmicas y cierto grado de colapso del mesocarpio. Las uvas sonicadas también mostraron más células con coloración uniforme y

más células sin coloración, indicando una mayor liberación de compuestos intracelulares al medio, acompañado con una mejora de las características cromáticas en mosto y vino. Además, las diferentes frecuencias aplicadas dieron lugar a efectos variados en la composición fenólica del vino, produciendo un contenido más alto de taninos la frecuencia de 20 kHz, mientras que la frecuencia de 28 kHz favoreció especialmente una mayor extracción de antocianos. Por otro lado, los vinos elaborados con sonicación a 28 kHz y con 72 horas de maceración fueron cromáticamente muy similares a los vinos control de 7 días de maceración, lo que permite una reducción de más del 50% en el tiempo de maceración.

3.2.

El efecto de los ultrasonidos en la composición de vino Syrah afectado por la maduración o el estado sanitario de las uvas

The effect of ultrasound on Syrah wine composition as affected by the ripening or sanitary status of the grapes

Paula Pérez-Porras¹, Encarna Gómez-Plaza¹, Andrea Osete-Alcaraz¹, Pilar Martínez-Pérez¹, Ricardo Jurado², Ana Belén Bautista-Ortín¹.

¹Departamento de Tecnología de los Alimentos, Nutrición y Bromatología, Facultad de Veterinaria, Universidad de Murcia, 30100 Murcia, España.

²Agrovin, S.A. Av. De Los Vinos s/n, Alcázar de San Juan, 13600 Ciudad Real, España.

European Food Research and Technology, 2023, 249, 641-651.

<https://doi.org/10.1007/s00217-022-04159-9>

Abstract

Several studies have demonstrated that the application of ultrasounds to crushed grapes improves the chromatic and sensory characteristics of the resulting wines by facilitating the extractability of compounds from grapes to the must-wine. The objective of this work was to determine whether the application of ultrasounds to grapes of different maturity levels or different sanitary status leads to the same positive outcome as regards chromatic characteristics, phenolic and aroma compounds as well as sensory properties. The results showed that, independent of grape ripening or sanitary status, the application of ultrasounds to Syrah crushed grapes leads to wines with better chromatic characteristics at the moment of bottling, increasing colour intensity, total phenol content and tannin concentration up to 12%, 18% and 43%, respectively, in the wines from less ripen grapes and 13%, 23% and 30% in the wine from partially rotten grapes. The concentration of volatile compounds was less affected by sonication than the chromatic characteristics, with small decreases in the main families of volatile compounds, although the sensory analysis showed clear differences between control wines and those made from sonicated grapes, which were generally preferred and score higher for most of the sensory parameters evaluated.

Si bien la aplicación de US ha demostrado ser eficaz para facilitar la extracción de los compuestos de interés de la uva al mosto, es importante considerar que la propia extractabilidad de los compuestos aumenta de forma natural durante la maduración de la uva debido a la degradación asociada a procesos de despectinización y desesterificación de las paredes celulares de las bayas, pudiendo resultar diferente el efecto de aplicar US sobre uvas en distintos estadios de maduración. Por otro lado, la presencia de uvas afectadas por hongos como *Botrytis cinerea* puede causar problemas microbiológicos y químicos durante la elaboración del vino, su almacenamiento y envejecimiento, ya que, si bien la uva afectada presenta un hollejo más degradado, facilitándose la extracción, algunos estudios han demostrado que los vinos elaborados con uvas parcialmente afectadas microbiológicamente presentan mayor extracto seco y acidez volátil, además de exhibir un color alterado debido a la actividad de enzimas oxidasas que podrían actuar sobre los compuestos fenólicos.

Por ello, este trabajo presenta dos objetivos fundamentales: estudiar el efecto de la sonicación sobre a) uva de distinto grado de maduración, y b) el efecto sobre uva parcialmente afectada por *Botrytis cinerea*, determinando parámetros fisicoquímicos, cromáticos, composición tánica, aromática y características sensoriales del vino tinto.

En el estudio se empleó uva de variedad Syrah de dos niveles de maduración (12 y 13,5° Baumé), obteniendo en la segunda cosecha un lote de uvas sanas y un lote de uvas con un 25% de uva afectada por podredumbre. Una parte de dichos lotes fue destinada a las respectivas elaboraciones control, mientras otra parte de la uva sana estrujada de 12° y 13,5° Baumé, así como de la uva parcialmente afectada de 13,5°, fue tratada a escala piloto usando un equipo de ultrasonidos de alta potencia (MiniPerseo, Agrovin S.A., Alcázar de San Juan, España) operando a una frecuencia de 30 kHz.

Los resultados mostraron que, independientemente de la maduración de la uva o del estado sanitario, la aplicación de ultrasonidos a uva estrujada de la variedad Syrah conduce a vinos con mejores características cromáticas tras el embotellado, aumentando intensidad del color, contenido de fenoles totales y concentración de taninos hasta un 12%, 18% y 43%, respectivamente, en los vinos de uvas menos maduras y un 13%, 23% y 30% en el vino procedente de

uvas parcialmente botrificadas. La concentración de compuestos volátiles fue menos afectada por la sonicación que las características cromáticas, con pequeñas disminuciones en las principales familias de compuestos volátiles, aunque el análisis sensorial mostró claras diferencias entre los vinos control y los elaborados a partir de uva sonicada, siendo generalmente estos últimos los preferidos y obteniendo las puntuaciones más altas en la mayoría de los parámetros sensoriales evaluados.

3.3.

Combinación de ultrasonidos de alta potencia y enzimas enológicas durante la vinificación para mejorar las características cromáticas del vino tinto

Combining high-power ultrasound and enological enzymes during winemaking to improve the chromatic characteristics of red wine

Paula Pérez-Porras¹, *Ana Belén Bautista-Ortín*¹, *Ricardo Jurado*², *Encarna Gómez-Plaza*¹.

¹*Departamento de Tecnología de los Alimentos, Nutrición y Bromatología, Facultad de Veterinaria, Universidad de Murcia, 30100 Murcia, España.*

²*Agrovin, S.A. Av. De Los Vinos s/n, Alcázar de San Juan, 13600 Ciudad Real, España.*

LWT – Food Science and Technology, 2022, 156, 113032.

<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.113032>

Abstract

Several techniques have been used by the winemaking industry to facilitate the extraction of grape phenolic compounds during the maceration process. Interest in innovative techniques such as high-power ultrasound (US) has increased in recent years, replacing more traditional techniques such as the addition of pectolytic enzymes (E). This study evaluates the combined effect of ultrasound and enological enzymes, used at semi-industrial scale at the time of crushing, on the chromatic characteristics of red wine. Variables such as the timing of enzyme addition and the ripening state of the grapes were considered. The results showed that ultrasound had a greater effect than enological enzymes when used alone, especially when the ripest grapes were used. The results also indicate that, when added after sonication, the enzymes favored the US effect, enabling the contact time necessary to achieve a wine with chromatic characteristics similar to those resulting from a traditional maceration process to be reduced by 4 days. Carried out on a semi-industrial scale, the study demonstrates that the adequate combination of these two techniques can optimize the maceration process both in terms of time and the wine organoleptic characteristics, making the technique of special interest for industrial application.

Si bien en los últimos años se ha incrementado el interés por tecnologías innovadoras, como son los ultrasonidos de alta potencia, aún se encuentran ampliamente extendidas otras técnicas tradicionales como la adición de enzimas pectolíticas (E). Frente a su uso exclusivo como tecnología alternativa, existen estudios que plantean el posible interés en la combinación de técnicas basadas en distintos fundamentos fisicoquímicos con el objeto de mejorar el efecto respecto a su aplicación de forma individual.

Por ello, el objetivo de este trabajo es estudiar los efectos de la aplicación de enzimas pectolíticas o US aplicados mediante el uso de un equipo a escala semiindustrial (Ultrawine, Agrovin S.A., Alcázar de San Juan, España), así como el estudio de la combinación de ambas técnicas, en la producción de vino tinto, con el fin de conseguir posibles mejoras en la calidad del producto respecto a la aplicación, previa a la etapa de maceración, de las técnicas de forma individual. Para el tratamiento enzimático se empleó un preparado comercial (Enozym Lux, Agrovin S.A., Alcázar de San Juan, España) conforme a las especificaciones del proveedor (3 mL/hL). Para los tratamientos con US, las condiciones de operación utilizadas fueron 30 kHz de frecuencia, 9000 W de potencia y 58,5 W/cm² de densidad de potencia.

En tanto que la composición y estructura del hollejo de la uva son diferentes a lo largo del proceso de maduración pudiendo obtener diferentes efectos del uso de las técnicas aplicadas, se realizaron ensayos sobre uva de variedad Monastrell de dos grados diferentes de maduración (12° y 14° Baume). Además, se estudiaron dos tiempos de maceración (3 y 7 días), aunque los ensayos con enzima solo se llevaron a cabo con 3 días de maceración.

Además, con uva de 12° Baume se tuvo en cuenta el momento de aplicación de la enzima como posible factor determinante del efecto, realizándose la adición antes o después de la aplicación de US (E+US y US+E, respectivamente). El uso de la enzima previo a la sonicación no dio lugar a resultados potencialmente positivos sobre el control, por lo que se descartó dicho ensayo sobre uva madura.

Los resultados mostraron que los ultrasonidos tienen un mayor efecto sobre la composición fenólica de los vinos que las enzimas enológicas cuando ambas técnicas se aplican de forma individual y especialmente en uva más madura. Además, la adición de la enzima a la uva después de la sonicación favoreció el

efecto de los US, permitiendo una reducción del tiempo de contacto en un 50% comparado con el necesario para conseguir un vino tinto de calidad similar al elaborado con el método tradicional con maceración de 7 días. En este sentido, en vinos obtenidos de uva menos madura, solo los antocianos poliméricos, el contenido en taninos y su grado medio de polimerización dieron valores más altos en el vino control frente al vino US+E, mientras que en vinos elaborados a partir de uvas más maduras, el índice de polifenoles totales, y la concentración de antocianos y taninos totales fueron aún mayores en el vino US+E. Teniendo en cuenta que la exposición de la uva a altas temperaturas durante su maduración da lugar a vendimias adelantadas y poco espaciadas en el tiempo, y que la disponibilidad de tanques de maceración en las bodegas puede ser limitada, la combinación de US y E podría considerarse una práctica interesante para reducir los tiempos de maceración y, así, aumentar la capacidad productiva de las bodegas sin producir mermas en la calidad del vino final.

En cuanto a la aplicación de US en elaboraciones con 7 días de maceración, los vinos elaborados con uva más y menos madura mostraron un incremento en la extracción de compuestos fenólicos. Así, la combinación de sonicación y largos tiempos de maceración pueden facilitar la extracción de compuestos fenólicos, permitiendo obtener vinos muy coloreados de uva menos madura, lo que resulta de interés con el fin de obtener vinos con menor grado alcohólico sin afectar a la calidad organoléptica.

3.4.

Ultrasonidos de alta potencia en Enología: ¿Depende el resultado de esta técnica de la variedad de uva?

High-power ultrasound in Enology: Is the outcome of this technique dependent on grape variety?

Paula Pérez-Porras¹, Encarna Gómez-Plaza¹, Leticia Martínez-Lapuente², Belén Ayestarán², Zenaida Guadalupe², Ricardo Jurado³, Ana Belén Bautista-Ortín¹.

¹Departamento de Tecnología de los Alimentos, Nutrición y Bromatología, Facultad de Veterinaria, Universidad de Murcia, 30100 Murcia, España.

²Instituto de Ciencias de la Vid y el Vino (ICVV), Universidad de La Rioja, Finca La Grajera, 26007 Logroño, España.

³Agrovin, S.A. Av. De Los Vinos s/n, Alcázar de San Juan, 13600 Ciudad Real, España.

Foods, 2023, 12, 2236.

<https://doi.org/10.3390/foods12112236>

Abstract

The disruptive effect exerted by high-power ultrasound (US) on grape cell walls is established as the reason behind the chromatic, aromatic and mouthfeel improvement that this treatment causes in red wines. Given the biochemical differences that exist between the cell walls of different grape varieties, this paper investigates whether the effect of the application of US in a winery may vary according to the grape variety treated. Wines were elaborated with Monastrell, Syrah and Cabernet Sauvignon grapes, applying a sonication treatment to the crushed grapes using industrial-scale equipment. The results showed a clear varietal effect. The wines made with sonicated Syrah and Cabernet Sauvignon grapes showed an important increase in the values of color intensity and concentration of phenolic compounds, and these increases were higher than those observed when sonication was applied to Monastrell crushed grapes, whereas Monastrell wines presented the highest concentration in different families of polysaccharides. These findings correlate with the differences in the composition and structure of their cell walls since those of Monastrell grapes presented biochemical characteristics associated with a greater rigidity and firmness of the structures.

Una vez establecido que la mejora cromática, aromática y sensorial ejercida por los US en la elaboración de vinos tintos gracias a los US es debida a su efecto sobre las paredes celulares y en base a estudios que correlacionan las características estructurales y compositivas de las paredes celulares con la extractabilidad de compuestos fenólicos, se plantea la posibilidad de obtener efectos diferentes a partir del uso de US sobre uva de distintas variedades, cuyas diferencias han sido ampliamente caracterizadas.

Por ello, este trabajo analiza si el efecto de la aplicación de los US en bodega puede variar según la variedad de uva tratada. Para ello, se elaboraron vinos con uvas de variedad Monastrell, Syrah y Cabernet Sauvignon, aplicando un tratamiento de sonicación a la uva estrujada y despalillada empleando un equipo a escala industrial (Ultrawine, Agrovin S.A., Alcázar de San Juan, España).

Se caracterizó el efecto del tratamiento sobre las células del hollejo por microscopía óptica y se analizó bioquímicamente el material de la pared celular. Además, se realizaron análisis de parámetros fisicoquímicos y cromáticos, así como el estudio de taninos por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y monosacáridos por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS).

Los resultados mostraron un claro efecto varietal. Los vinos elaborados con uva sonicada de las variedades Syrah y Cabernet Sauvignon mostraron un incremento importante en los valores de intensidad de color y concentración de compuestos fenólicos, siendo estos aumentos más altos que los observados cuando la sonicación se aplicó a la uva Monastrell, aunque los vinos de esta variedad presentaron la mayor concentración en diferentes familias de polisacáridos.

Estos hallazgos se correlacionan con las diferencias en la cantidad, composición y estructura de las paredes celulares analizadas ya que las de uva Monastrell presentaban características asociadas a una mayor cantidad de pared celular frente a Cabernet Sauvignon y Syrah.

Este estudio refuerza resultados previos que indican que la aplicación de ultrasonidos en la elaboración de vinos tintos resulta una estrategia muy

interesante para aumentar su contenido fenólico, confirmándose los resultados para vinos elaborados con diferentes variedades.

3.5.

La tecnología de ultrasonidos de alta potencia y su efecto sobre el color y aroma de vinos rosados

The technology of high-power ultrasound and its effect on the color and aroma of rosé wines

*Lara Labrador-Fernández*¹, **Paula Pérez-Porras*²**, María Consuelo Díaz-Maroto¹, Encarna Gómez-Plaza², María Soledad Pérez-Coello¹, Ana Belén Bautista-Ortín².*

¹*Instituto Regional de Investigación Científica Aplicada (IRICA), Universidad de Castilla La-Mancha, 13005 Ciudad Real, España.*

²*Departamento de Tecnología de los Alimentos, Nutrición y Bromatología, Facultad de Veterinaria, Universidad de Murcia, 30100 Murcia, España.*

Journal of The Science of Food and Agriculture, 2023.

<https://doi.org/10.1002/jsfa.12757>

**Ambas autoras contribuyeron por igual en el trabajo.*

Abstract

Background: The application of high-power ultrasound (US) has been studied extensively to obtain value-added red wines using short maceration times. It is a technique of wide interest for the extraction of aromatic compounds and compounds responsible for color, so it could also be an important tool to use in the elaboration process of rosé wines. Thus, this study focused on the effect of the application of US on the phenolic, aromatic, and sensorial profile of rosé wines. For this, three different types of rosé wine were produced: a control with direct pressing after crushing, another wine obtained from a 4 h macerated must, and a wine whose crushed and destemmed grape was sonicated and subsequently pressed.

Results: The results showed a higher color intensity and a higher total polyphenol and anthocyanin content in the wine obtained from sonicated grape compared to both control wine and that obtained from grape macerated for 4 h. Ultrasound treatment enhanced the extraction of varietal volatile compounds in must, especially the free fraction of terpenes and norisoprenoids. It also gave rise to wines with a higher concentration of C6 alcohols and other compounds such as guaiacol and 4-vinylguaiacol, but led to fewer fatty acids, especially C6, C4 and C8 acids. Sensorially these wines showed intense aromas of red fruits and flowers, while no defects in aroma or astringency were found.

Conclusions: The color and sensory profile of the resulting wines indicate that the US may be an interesting tool for obtaining quality rosé wines, replacing the maceration stage and reducing potential oxidation problems.

Como se ha visto en los anteriores trabajos, el tiempo de contacto con el mosto permite la extracción de compuestos fenólicos y aromáticos presentes en el hollejo. Sin embargo, tiempos de maceración demasiado prolongados pueden provocar cierta oxidación de compuestos fenólicos, así como una disminución de los aromas afrutados y florales, especialmente importantes en vinos rosados.

Con el fin de evitar fenómenos de oxidación en la elaboración de vinos rosados, distintas técnicas han sido estudiadas para reducir los tiempos de maceración.

En esa línea, el presente trabajo se centra en el estudio de la aplicación de US sobre el perfil fenólico, aromático y sensorial de los vinos rosados con el fin de acelerar el proceso de extracción y permitir la reducción del tiempo de elaboración.

Así, a partir de uva de variedad Monastrell se desarrollaron tres tipos de elaboración de vino rosado: una control prensando inmediatamente la uva estrujada y despalillada, otra elaboración macerando la uva estrujada y despalillada durante 8 horas a 10°C antes de prensar y una tercera elaboración tratando con ultrasonidos de alta potencia la uva estrujada y despalillada, antes de prensar, empleando para el tratamiento un equipo a escala semiindustrial (Ultrawine, Agrovin S.A., Alcázar de San Juan, España). El desarrollo de las siguientes etapas del proceso de vinificación fue similar en las 3 elaboraciones.

Los análisis realizados mostraron una mayor intensidad de color y un mayor contenido de polifenoles totales y antocianos en el vino obtenido a partir de uva sonicada frente al vino control y al obtenido a partir de uva macerada durante 8 horas. El tratamiento con US mejoró la extracción de compuestos volátiles varietales en el mosto, especialmente la fracción libre de terpenos y norisoprenoides. También dio lugar a vinos con mayor concentración de alcoholes C6 y otros compuestos como guayacol y 4-vinilguayacol, pero condujo a un menor contenido en ácidos grasos, especialmente ácidos C6, C4 y C8. Sensorialmente, estos vinos mostraron intensos aromas a frutos rojos y flores, mientras que no se encontraron defectos en el aroma ni astringencia.

Estos resultados indican que los US pueden ser una herramienta interesante para obtener vinos rosados de calidad, reemplazando la etapa de maceración y reduciendo posibles problemas de oxidación.

3.6.

Tratamiento prefermentativo con microondas sobre uva como herramienta para aumentar el contenido fenólico del vino tinto y reducir el tiempo de maceración

Prefermentative grape microwave treatment as a tool for increasing red wine phenolic content and reduce maceration time

Paula Pérez-Porras¹, Encarna Gómez-Plaza¹, Raquel Muñoz García², María Consuelo Díaz-Maroto², Juan Daniel Moreno-Olivares³, Ana Belén Bautista-Ortín¹.

¹Departamento de Tecnología de los Alimentos, Nutrición y Bromatología, Facultad de Veterinaria, Universidad de Murcia, 30100 Murcia, España.

²Instituto Regional de Investigación Científica Aplicada (IRICA), Universidad de Castilla La-Mancha, 13005 Ciudad Real, España.

³Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario (IMIDA), Ctra. La Alberca s/n, 30150 Murcia, España.

Applied Sciences, 2022, 12, 8164.

<https://doi.org/10.3390/app12168164>

Abstract

Phenolic compounds are responsible for color and, with it, the quality of red wines. Its content will depend, among other factors, on the oenological techniques applied in the winery and, among them, the maceration time. Long maceration times can generate logistical problems at the moment of maximum grape entry into the winery. Applying techniques that accelerate the extraction of phenolic compounds from the grape solid parts to the must-wine would allow reducing the maceration time. Among the techniques of interest, microwaves use electromagnetic waves to produce dipole rotation and ion conduction, which can increase the elasticity of cell walls and cause the destruction of the cell membrane, facilitating the phenolic compound extraction. To study this effect, crushed grapes of the Cabernet Sauvignon variety were treated with this technology, macerated for 72 h and 7 days, and compared with respect to a control wine without any treatment. The results showed that the application of microwaves to the crushed grape favored a rapid extraction of the phenolic compounds, increasing the color of the wine and with only 72 h of maceration, the wines from treated grapes showed a similar phenolic content and chromatic characteristics to a control wine with 7 maceration days. The extraction of the less astringent skin tannins and the formation of stable pigments was also favored indicating that this technology may allow reducing the maceration time during the winemaking process without affecting the quality and stability of the wine.

Junto con los US, existen otras tecnologías innovadoras de posible aplicación enológica con fines extractivos. Entre ellas, se encuentra el uso de microondas (MO), ondas electromagnéticas que -gracias a su capacidad para generar pequeños incrementos de temperatura por los fenómenos de rotación dipolar y conducción iónica- pueden aumentar la elasticidad de las paredes celulares y provocar la destrucción de la membrana celular, lo que facilita la extracción de compuestos fenólicos.

Para estudiar dicho efecto con el fin de reducir el tiempo de maceración, este trabajo presenta la elaboración de vinos tintos a partir de la aplicación de microondas sobre uva estrujada y despalillada de la variedad Cabernet Sauvignon. Se aplicaron tiempos de maceración de 72 horas y 7 días, y se compararon con sus respectivas elaboraciones sin tratamiento con microondas. El tratamiento se realizó empleando un horno microondas doméstico LG MJ3965ACS (LG electrónica, Madrid, España), con aplicaciones de 12 minutos a 700 W (3 intervalos de 4 minutos) para evitar que la temperatura se incrementara por encima de los 40°C. Se realizaron análisis en vino tras el momento del embotellado, determinando parámetros cromáticos por espectrofotometría, así como antocianos, flavonoles, ácidos fenólicos y taninos por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Se realizó, además, un análisis de compuestos fenólicos por cromatografía de exclusión por tamaño (SEC).

Los resultados mostraron que la aplicación de microondas a la uva estrujada y despalillada favorece una rápida extracción de los compuestos fenólicos, aumentando la intensidad de color en el vino. Los vinos de uvas tratadas y 72 horas de maceración presentaron un contenido fenólico y características cromáticas similares al vino control con 7 días de maceración. La extracción de taninos procedentes del hollejo, menos astringentes, fue favorecida por las microondas, junto con la formación de pigmentos estables. Así, el tratamiento con MO condujo a la obtención de vinos con una mayor concentración de piranoantocianos tipo A y solo aumentó ligeramente el contenido de vitisina B y malvidina-(6-cumaroil)-3-glucósido acetaldehído, posiblemente también debido a la participación de acetaldehído en la formación de otros pigmentos presentes. La concentración de flavonoles en el vino de uva tratada y con 72 horas de

maceración no difirió de la concentración presente en el vino control con 7 días de maceración, mientras que el vino con uvas tratadas y 7 días de maceración presentó un aumento del 22% en el contenido de flavonoles en comparación con su vino control. Además, la concentración de ácidos fenólicos también se incrementó gracias a la aplicación de microondas. Ello resulta de especial interés en tanto que el incremento de estos compuestos (flavonoles y ácidos fenólicos) puede contribuir a la estabilización del color de los vinos tintos por el efecto de copigmentación y/o participar en la formación de pigmentos derivados de los antocianos. Por tanto, estos resultados no solo indican el papel de las MO en favorecer la extracción de los compuestos de interés, sino también en un posible interés en su empleo en bodega con el fin de reducir el tiempo de maceración durante el proceso de vinificación sin afectar a la calidad y estabilidad del vino.

4. DISCUSIÓN GENERAL

En las últimas décadas, el creciente interés por la incorporación de nuevas tecnologías al proceso de elaboración del vino ha supuesto un aumento considerable de los estudios respecto al uso de técnicas emergentes, sus fundamentos, y diseños realizados en base a las necesidades de los productores y su potencial para la mejora de los procesos enológicos. Tal ha sido el aumento de estudios a este respecto que varias de las tecnologías desarrolladas han sido presentadas y aprobadas por la Organización Internacional de la Viña y el Vino para su uso industrial, con la finalidad de mejorar los procesos tecnológicos en bodega. Así, en 2019 los ultrasonidos de alta potencia se convirtieron en la primera tecnología emergente cuya aplicación industrial era permitida (OIV, 2022a), a la que se unen las altas presiones hidrostáticas (OIV, 2022b) y los campos eléctricos pulsados (OIV, 2022c). No obstante, hasta 2019, la mayor parte de los estudios realizados con estas técnicas se concentraban en su aplicación a escala de laboratorio (González-Centeno et al., 2014; Osete-Alcaraz et al., 2019; Celotti y Ferraretto, 2016; Roman et al., 2020).

En vista de la falta de estudios a escala semiindustrial e industrial y de la necesidad de conocer las condiciones de aplicación adecuadas de esta tecnología -atendiendo a su efecto a nivel celular, sobre la dinámica fermentativa o sobre las características organolépticas de los vinos producidos-, fueron diseñados distintos ensayos centrados en la elaboración de vino a partir de la aplicación de US mediante un dispositivo a escala semiindustrial empleado en bodega.

En base a ensayos reportados hasta el momento que reflejaban una mejora significativa de la extracción de compuestos fenólicos cuando las uvas eran sonicadas (Gambacorta et al., 2017), se decidió estudiar la posibilidad de reducir el tiempo de maceración en bodega utilizando US y verificar si esta tecnología permite, por tanto, obtener vinos de características similares a las obtenidas mediante una maceración tradicional de mayor duración, permitiendo aumentar, de esta forma, la capacidad productiva de las bodegas mediante la reducción del tiempo de elaboración. Asimismo, y dada la necesidad de determinar las condiciones de aplicación más adecuadas, se investigó el efecto de la aplicación de distintas frecuencias de ultrasonidos de alta potencia. Así, en la **Publicación 3.1.** se realizó el estudio de la aplicación de US a dos frecuencias diferentes (20

kHz y 28 kHz) y tres tiempos de maceración diferentes (48 horas, 72 horas y 7 días) en la elaboración de vinos tintos de uva de la variedad Monastrell. Los resultados mostraron que el empleo de US provocó una alteración morfológica de las capas celulares más externas del hollejo y promovió una mayor salida del contenido polifenólico de las uvas al mosto-vino. Así, la maceración de 72 horas en uva tratada permitió obtener vinos con características similares a las obtenidas en vinos con maceración tradicional de 7 días, lo que permite una reducción de más de un 50% del tiempo de maceración. En cuanto a las condiciones de operación, la aplicación de US a 20 kHz dio lugar a vinos con mayor contenido tánico, asociado a una mayor capacidad de ruptura de las paredes celulares de semilla por parte de los US, ya que menores frecuencias generan mayor efecto de cavitación (Ashokkumar et al., 2008), siendo este resultado de interés para la elaboración de vinos destinados a guarda. Frente a ello, la frecuencia de 28 kHz fue considerada la más adecuada para la extracción de antocianos y mejora del color en vino. Una mayor vulnerabilidad de las paredes celulares del hollejo, menos lignificadas, permite una rotura suficiente por parte de los ultrasonidos. No obstante, se requiere una frecuencia menor (mayor poder cavitacional) para acceder al tejido de la semilla y favorecer así la extracción de tanino. Junto con ello, los análisis centrados en la caracterización de los polisacáridos del vino y de la fracción aromática de estos mismos vinos mostraron que aquellos producidos bajo una maceración media de uva tratada con 28 kHz de frecuencia presentaban una mayor concentración de PRAGs, MP y RG-II (Martínez-Lapuente et al., 2021a, 2021b) y compuestos aromáticos varietales en forma libre, con especial presencia de ácidos y ésteres, aumentando el perfil frutal, floral y herbáceo frente a los vinos elaborados de forma tradicional (Oliver-Simancas et al., 2021).

Una vez comprobada la alteración de la estructura celular producida por los US, se planteó la hipótesis de que la estructura y composición de las paredes celulares pudiera determinar el efecto de la técnica, viéndose comprometida la extracción de compuestos de interés si las paredes celulares son más rígidas o gruesas. En relación a esta hipótesis, hay que considerar que existen dos situaciones que afectan a la calidad del vino: por un lado, la extracción de compuestos fenólicos resulta especialmente difícil a partir de uva inmadura, en

tanto que sus paredes celulares presentan un mayor estado de cohesión y rigidez frente a aquellas de uva madura, cuya desesterificación y despolimerización de los polisacáridos estructurales por reacciones hidrolíticas y enzimáticas debilitan la pared celular y facilitan la difusión de compuestos (Garrido-Bañuelos et al., 2019a, 2019b; Zietsman et al., 2015). Por otro lado, el cambio climático incrementa la separación temporal de la madurez fenólica y tecnológica, haciendo en ocasiones necesario cosechar la uva antes de alcanzar su estado de madurez polifenólica. Además, condiciones climáticas adversas en estadios tardíos de maduración favorecen la aparición de contaminaciones microbiológicas -siendo la más común la provocada por el hongo *Botrytis cinerea*-, que debilitan la estructura celular y pueden favorecer la salida de enzimas oxidativas que dan lugar a aromas desagradables.

Por ello, con el objetivo de determinar el efecto de los US en la elaboración de vinos con uvas de diferente grado de maduración o con afectación por podredumbre gris, se procedió al desarrollo de los ensayos presentes en la **Publicación 3.2.**, estudiando las características del vino producido a partir de la aplicación de US sobre uva de variedad Syrah de distintos grados de maduración y parcialmente afectada por *Botrytis cinerea*. Los resultados mostraron que el uso de US sobre uva parcialmente botritizada no da lugar a vinos de características diferentes a los obtenidos mediante una elaboración tradicional. Además, no se detectaron aromas desagradables en el análisis sensorial de dichos vinos. Por otro lado, se observó el incremento en la extracción de compuestos fenólicos y mejora de las características sensoriales a partir de uva menos madura tratada con US comparado con su control, optimizando la extracción de compuestos de interés. Estos resultados plantean, por tanto, una posible solución a la producción de vinos elaborados a partir de uva cuya madurez fenólica y aromática no ha sido alcanzada.

No obstante, y dado que los estudios de caracterización varietal muestran las diferencias entre las estructuras celulares del hollejo de Syrah y Monastrell (Ortega-Regules et al., 2008), se planteó un estudio similar del efecto de los US sobre uva de distinto grado de maduración, empleando en este caso la variedad Monastrell y utilizando las condiciones de aplicación establecidas en la **Publicación 3.1.** Por otro lado, son muchos los estudios que tratan de combinar

distintas tecnologías (emergentes o tradicionales) con el fin de hallar efectos sinérgicos en el objetivo final, la mejora de los vinos, por lo que surgió el interés de comparar el uso de esta tecnología innovadora como son los US con técnicas de elaboración tradicionales de importancia industrial, como la adición de enzimas pectolíticas. Es por ello por lo que, en base a los estudios de Osete-Alcaraz et al. (2019) y Osete-Alcaraz et al. (2022) sobre el empleo de enzimas de maceración en la extracción de compuestos fenólicos y su uso en combinación con US a escala de laboratorio, se planteó el estudio de la aplicación de ambas técnicas tanto de forma aislada como combinada sobre uvas estrujadas de variedad Monastrell de distintos grados de maduración a nivel semiindustrial (**Publicación 3.3.**). Todos los tratamientos se desarrollaron en mostos con maceraciones de 72 horas y los vinos fueron analizados y comparados con un vino control y otro elaborado con uva sonicada con una maceración de 7 días. Frente a los estudios de Osete-Alcaraz et al. (2019) que planteaban el efecto sinérgico de la aplicación de ambas técnicas cuando las enzimas eran adicionadas con varios días de antelación al tratamiento de US y dada su difícil aplicación industrial, el estudio presentado en la **Publicación 3.3.** investigó el efecto de la aplicación enzimática inmediatamente antes o después del tratamiento con US. Cuando la enzima fue adicionada consecutivamente al tratamiento de US, se observaron efectos positivos y sinérgicos. Sin embargo, no se observó un efecto positivo cuando los US eran aplicados tras la adición de las enzimas, lo que podría relacionarse con una posible inactivación de las mismas mediante el uso de esta tecnología (Rathnakumar et al., 2023). Los vinos obtenidos mediante la adición de enzima posterior al tratamiento de US mostraron, en ambos grados de maduración de uva, una mayor intensidad de color y contenido fenólico frente a aquellos desarrollados mediante el uso de las técnicas de forma individual. El vino elaborado con 3 días de maceración a partir de uva inmadura tratada con US y con posterior adición de enzima (US+E) mostró, frente al vino control de 7 días de maceración (C7), resultados similares, obteniendo incluso una mayor calidad en las vinificaciones llevadas a cabo con uva madura. Los análisis desarrollados por Martínez-Lapuente et al. (2022) mostraron que el perfil polisacárido de dichas elaboraciones (US+E y C7) en uva inmadura se mantuvo similar, con una mayor cantidad de PRAGs frente a RG-II en ambas elaboraciones, si bien el vino elaborado con US y posterior

adición de enzima a partir de uva madura presentó un perfil con mayor cantidad de RG-II frente a PRAGs. Por otro lado, en cuanto a los vinos con una maceración de 7 días, aquellos elaborados con uva tratada mostraron mejores características que sus respectivos controles en ambos estados de maduración de la uva, resultando de gran interés la similitud entre el vino de uva inmadura sonicada y el vino control de uva madura. Estos resultados indican la posible obtención de dos objetivos diferenciados: incrementar la calidad de los vinos elaborados con tiempo de maceración reducido -lo que aumenta la capacidad productiva de las bodegas-, así como obtener el máximo potencial en la elaboración de vinos con uva más inmadura, consiguiendo una nueva herramienta para ayudar a paliar los efectos del cambio climático sobre la producción de vinos, de acuerdo a su vez con el estudio de Martínez-Pérez et al. (2020), que mostró la eficacia de la aplicación de US sobre uva con menor contenido en azúcar para obtener vinos de menor grado alcohólico pero de características organolépticas similares a los vinos elaborados con uva más madura.

El efecto fundamental de la sonicación de uvas recae, así, sobre las características estructurales y la composición de las paredes celulares. Esto lleva a plantear la hipótesis de que variedades de uva con distinta composición química y estructural de sus paredes celulares, den lugar a diferencias en el efecto de los tratamientos. Es más, estudios previos han relacionado una mayor presencia en vino de mono y polisacáridos cuando en las vinificaciones se utilizó uva con una mayor cantidad de material de pared celular (Gil Cortiella et al., 2020). Por tanto, diferencias fisicoquímicas y sensoriales en vinos de uva tratada de distintas variedades podrían depender tanto de la capacidad de los US para acceder a las estructuras y abrir espacios que favorezcan la extracción de compuestos fenólicos, como de una posible mayor liberación de polisacáridos de la pared al medio en aquellas variedades que presentan una pared más gruesa, pudiendo afectar de forma directa sobre parámetros sensoriales, como la astringencia. Así pues, en base a los estudios de caracterización realizados y la gran relevancia de la fracción polisacárida de las paredes celulares de la uva, se planteó la necesidad de un estudio varietal, llevándose a cabo los ensayos presentes en la **Publicación 3.4.**, centrados en el efecto de los ultrasonidos

sobre tres variedades diferentes de uva (Monastrell, Syrah y Cabernet Sauvignon). Se analizó el efecto de la sonicación sobre la estructura y composición de la pared celular, así como las características cromáticas y de composición tánica y polisacárida de los vinos obtenidos. En este caso se estableció una maceración de 7 días para todos los vinos elaborados, con el fin de observar el máximo efecto posible del tratamiento sobre la calidad organoléptica de los vinos de las 3 variedades usadas. Los resultados mostraron diferencias en el efecto de los US según la variedad tratada, con un mayor aumento de la extracción de compuestos polifenólicos en aquellas variedades con una pared celular más delgada, como Syrah y Cabernet Sauvignon. En cambio, la uva Monastrell mostró una mayor cantidad de material de pared celular y los vinos obtenidos a partir de dicha variedad presentaron mayores concentraciones de las fracciones polisacáridas analizadas, concordando con la hipótesis inicial y los resultados obtenidos por Martínez-Lapuente et al. (2021a, 2021b), que observaron altas y crecientes concentraciones de PRAG, RG-II, HL y MP o mananos en mosto-vino de variedad Monastrell durante la maceración, siendo especialmente intensificada la liberación de PRAG a partir de las muestras sonicadas. En cuanto a su mantenimiento en el tiempo, tras el prensado de los orujos y una vez finalizada la fermentación alcohólica, observaron un aumento de la concentración polisacárida en vinos de uva tratada, lo que se atribuyó a una intensificación de la liberación de polisacáridos pécticos en el momento del prensado.

Hasta el momento, todos los estudios realizados parten de la importancia del periodo de maceración en la extracción de compuestos de interés, en tanto que centrados en la elaboración de vinos tintos. No obstante, en base a los resultados mostrados acerca de la ruptura directa de las paredes celulares y extracción de antocianos en el mosto-vino por parte de los US (**Publicación 3.1.**) y al interés de esta tecnología en la mejora aromática de los vinos (**Publicación 3.2.**), se planteó como hipótesis que la sonicación de uva estrujada y despallada y su consiguiente prensado fuera un método adecuado para optimizar la elaboración de vinos rosados de calidad. Maceraciones largas en la elaboración de estos vinos pueden dar lugar a procesos oxidativos que afecten a compuestos fenólicos y reduzcan el potencial de aroma frutal y floral, siendo estos los aromas

más característicos en vinos rosados. Así pues, se realizó el ensayo presente en la **Publicación 3.4.**, centrado en la aplicación de US sobre uva Monastrell estrujada y despalillada para la obtención de vino rosado. Se llevaron a cabo tres elaboraciones: una de prensado directo tras el estrujado y despalillado de la uva, otra con maceración de 8 horas y otra con la aplicación de US tras estrujado y despalillado previa al prensado. El vino elaborado a partir de uva tratada con US mostró una mayor intensidad de color y contenido fenólico. Si bien algunos estudios reportan la presencia de aromas desagradables en vino a partir de la aplicación de US (Gracin et al., 2016), estos no fueron percibidos en este ensayo, obteniendo altas concentraciones de terpenos y norisoprenoides, especialmente en la fracción libre, que dieron lugar a aromas florales y de fruta roja más intensos que en las otras elaboraciones. Dicha intensificación de los atributos varietales mediante el empleo de US fue también observada por Labrador-Fernández et al. (2022) en vino blanco de variedad Viognier, ligado al aumento de terpenos en forma libre. Por otro lado, el estudio de Martínez-Lapiente et al. (2023) plantea posibles cambios en la estructura de la pared celular sobre tejidos celulares de Viognier y Monastrell gracias a los US, aumentando la solubilidad de los polisacáridos e incrementando la presencia de PRAG y HL en vino rosado y blanco. Este último también mostró un mayor contenido de RG-II, lo que, sugirió, pudiera deberse a un menor grosor de la pared celular de la variedad blanca.

Con todo ello, se presenta en el conjunto de esta tesis la eficacia de los ultrasonidos de alta potencia en la ruptura de la pared celular de células del hollejo (**Publicaciones 3.1. y 3.4.**) con su consecuente liberación de compuestos de interés analizados en vino (compuestos fenólicos, polisacáridos y compuestos aromáticos), considerando diferencias estructurales y compositivas de las paredes celulares en base al estado de maduración de la uva (**Publicaciones 3.2. y 3.3.**), alteraciones microbiológicas (**Publicación 3.2.**) y naturaleza varietal (**Publicación 3.5.**). Así, se han obtenido resultados concluyentes de la optimización del proceso de elaboración de vinos tintos de valor añadido mediante el uso de US y tiempos de elaboración habituales (**Publicaciones 3.1., 3.2., 3.3. y 3.4.**), así como de vinos tintos y rosados de calidad a partir del uso de US y menor tiempo de procesamiento (**Publicaciones 3.1., 3.3. y 3.5.**), especialmente en aquellos casos en que se combinan con técnicas tradicionales

como la adición de enzimas pectolíticas (**Publicación 3.3.**), permitiéndose así no sólo mejorar las características organolépticas de aquellos vinos cuyo potencial inicial sea insuficiente, sino también la reducción del tiempo de tratamiento sin detrimento de la calidad, incrementando la capacidad productiva de las bodegas.

No obstante, este trabajo no es sino el resultado de la suma de estos ensayos y tantos como fueron previamente desarrollados por numerosos investigadores que, con sus estudios -generalmente a partir de matrices modelo, uso de baños de laboratorio, sondas ultrasónicas o dispositivos de escala piloto-, han aportado a la industria agroalimentaria conocimiento de gran valor. Estas investigaciones desarrolladas hasta el año 2019 han sido determinantes para la consideración, por parte de la Organización Internacional de la Viña y el Vino, de los ultrasonidos de alta potencia como tecnología de interés para la industria enológica. Esta situación plantea la posibilidad de que tecnologías actualmente no aprobadas sean en un futuro relevantes para la mejora de la elaboración de los vinos, por lo que los estudios sobre su eficacia con distintas finalidades industriales resultan fundamentales para la evolución de la investigación y la optimización de los sistemas de procesamiento actuales.

Una de las tecnologías ampliamente conocidas, asequibles y no aprobadas por la OIV hasta la fecha, son las microondas (MO). Numerosos estudios se han centrado en la aplicación de MO para la optimización de la etapa de maceración y control microbiológico en vino. Entre ellos, los ensayos desarrollados por Muñoz-García et al. (2022) mostraron la eficacia de las MO en la extracción de compuestos fenólicos y polisacáridos, así como la mejora de la cinética fermentativa en vinos tintos mediante la reducción de la fase de latencia, lo que ha sido relacionado con un aumento de compuestos volátiles generados durante la fermentación (Muñoz-García et al., 2021). Este último estudio plantea además la mayor obtención de compuestos aromáticos en mosto, tanto en fracción libre como ligada, y la posible reducción de SO₂ en elaboraciones desarrolladas con MO, en tanto que fue valorada positivamente por el panel de catadores expertos.

No obstante, si bien se reporta una mejora de la extracción de compuestos de interés, surge como hipótesis la posibilidad de reducción del tiempo de elaboración de vino de calidad gracias al uso de MO (**Publicación 3.6.**),

empleándose para dicho ensayo los tiempos de maceración determinados en la **Publicación 3.1.** Este estudio, desarrollado con uva de variedad Cabernet Sauvignon, mostró una mejora de las características cromáticas de los vinos, con un aumento de compuestos fenólicos totales y pigmentos polimerizados, frente a elaboraciones tradicionales. La mayor presencia de tanino propio del hollejo, asociado a un mayor grado medio de polimerización, plantea una baja ruptura de las estructuras celulares de semilla, que podría considerarse de interés con el fin de evitar un exceso de astringencia en los vinos producidos. Así, el vino elaborado con MO y 3 días de maceración mostró características similares a las del vino elaborado sin tratamiento de MO y con 7 días de maceración, lo que plantea la posible reducción del tiempo de elaboración. No obstante, se requieren más estudios sobre esta tecnología que permitan diseñar y desarrollar equipos de tratamiento en continuo con control de temperatura, ya que los sistemas actuales permiten tan solo su aplicación a la uva estrujada y despalillada en discontinuo y resulta difícil el control del incremento de la temperatura.

La eficacia extractiva de las MO y los US no se centra exclusivamente en su tratamiento sobre pasta estrujada, sino también para la aceleración del proceso de extracción de compuestos aromáticos durante el contacto de vino tinto con madera (Muñoz-García et al., 2023a) o la optimización del proceso de crianza sobre lías en vino tinto (Muñoz-García et al., 2023b).

Así, las numerosas aplicaciones que ofrecen ambas tecnologías las convierten en herramientas con alto potencial para el desarrollo de vinos de calidad. No obstante, la aprobación para la aplicación en industria y la capacidad de trabajo en continuo convierten a los US en una tecnología de mayor relevancia en la actualidad.

5. RESUMEN

El creciente interés en la aplicación de nuevas tecnologías, limpias y seguras, que mejoren la productividad y eficiencia de los procesos industriales y satisfagan las necesidades de los consumidores, ha llevado a la investigación enología a explorar las posibilidades tecnológicas que permitan reducir la adición de aditivos y evitar procesos que impliquen el uso de altas temperaturas que alteren las cualidades organolépticas de los vinos producidos en bodega.

Por otro lado, la elaboración de vinos de calidad (con un mayor contenido de compuestos antioxidantes, una mayor intensidad de color y aromas agradables) está muy unida en la actualidad a las necesidades logísticas de la industria enológica, que observa de forma creciente alteraciones en el ciclo de la vida, con la consecuente descompensación de la maduración fenólica y tecnológica de la uva a causa de las altas temperaturas y los fenómenos climatológicos extremos -cada vez más frecuentes- asociados al cambio climático. Estas condiciones hacen, además, más probable las afectaciones microbiológicas y, con ello, la merma de calidad sanitaria de la uva.

Por todo esto, en las últimas décadas, tecnologías utilizadas en la industria alimentaria, como la aplicación de altas presiones hidrostáticas, campos eléctricos pulsados y ultrasonidos (US), se han abierto paso hasta obtener la aprobación por parte de la Organización Internacional de la Viña y el Vino de cara a su uso industrial en la elaboración de vinos de valor añadido.

Frente a ellas, otras tecnologías emergentes potencialmente aplicables en Enología, como las microondas, siguen aún en periodo de prueba mediante ensayos a escala de laboratorio.

El uso de estas tecnologías, y más específicamente de los US (primera tecnología no térmica aprobada por la OIV), con fines extractivos se presenta como posible herramienta en la obtención de vinos de mayor calidad y en la reducción del tiempo de procesamiento necesario, ya que el fenómeno de cavitación facilita la rotura de las paredes celulares y favorece la liberación acelerada de compuestos de interés como antocianos, taninos, y también precursores aromáticos y compuestos polisacáridos.

No obstante, los ensayos desarrollados hasta el momento se limitan, mayoritariamente, a ensayos a escala de laboratorio, lo que hace necesario el

estudio de esta tecnología a escala semiindustrial e industrial, para la extrapolación de resultados a bodega.

Así, en esta tesis doctoral se demuestra la capacidad de los ultrasonidos de alta potencia de acelerar el proceso de extracción de compuestos fenólicos durante el proceso de maceración en vinos tintos gracias a la rotura de la pared celular. Las condiciones operacionales fueron establecidas considerando que una menor frecuencia genera un mayor efecto cavitacional (en torno a 20 kHz), actuando más agresivamente sobre estructuras de difícil acceso, como las paredes lignificadas de las semillas. Frente a ello, 28 kHz de frecuencia fue considerada óptima para la extracción de antocianos. Junto con ello, la aceleración de la extracción de compuestos de interés permitió la reducción del tiempo de maceración, sin pérdida de calidad, consiguiendo en tiempos de maceración de 4 días menos (7, en la elaboración tradicional; 3, en la de uva tratada) el aprovechamiento del potencial compositivo de la uva de partida.

En esta línea, y ante la necesidad de realizar vendimias de uva inmadura en términos fenólicos para evitar altos grados alcohólicos en los vinos finales, el uso de US sobre uva de menor grado de maduración del establecido como óptimo permitió incrementar la extracción de compuestos fenólicos, obteniendo vinos con una calidad similar a los obtenidos de uva de óptima maduración y sin defectos organolépticos asociados a la sonicación cuando el tratamiento se desarrolla sobre uva parcialmente botritizada.

En el estudio comparativo con técnicas tradicionales, como son las enzimas pectolíticas, su adición con anterioridad al tratamiento de US no dio lugar a un resultado favorable. Sin embargo, sí fue observado un efecto positivo y sinérgico en la adición de la enzima con posterioridad al tratamiento de la uva con US, obteniéndose vinos con mayor intensidad de color y contenido fenólico frente a los obtenidos mediante el uso de las técnicas aplicadas individualmente, llegando a obtener resultados similares al vino control elaborado con 4 días más de maceración (3 y 7 días, respectivamente) cuando se empleaba uva inmadura e incluso resultados más favorables con la combinación de técnicas cuando se partió de uva más madura.

En tanto que el efecto de los US radica en su capacidad de rotura de las paredes celulares, se desarrollaron estudios de aplicación de US sobre uva de

distintas variedades y, por tanto, con distintas características estructurales y de composición de la pared celular, observándose un efecto diferenciado entre aquellas variedades de pared celular más fina (Cabernet Sauvignon y Syrah) y más gruesa (Monastrell). Además, los vinos tintos de Monastrell presentaron mayores concentraciones de las fracciones polisacarídicas determinadas.

Así, el interés de la aplicación de US con fines extractivos queda establecido a nivel semiindustrial, con su posible uso sobre uva de distintos grados de maduración, de distintas variedades y con uva afectada por *Botrytis cinerea*, permitiendo la obtención de vinos de calidad, además, en un menor tiempo de procesamiento, reduciéndose en hasta 4 días el tiempo de maceración necesario para la obtención de vinos tintos de características similares a los elaborados de forma tradicional.

Por otro lado, se presenta en esta tesis doctoral su posible uso para la elaboración de vinos rosados, con el fin de obtener el color deseado y una alta calidad aromática sin necesidad de aplicar maceraciones prefermentativas que puedan acarrear posibles alteraciones microbiológicas y oxidaciones. En este caso, la aplicación de US dio lugar a vinos de características cromáticas y aromáticas de calidad superior a las obtenidas en el vino elaborado a partir de una maceración prefermentativa de 8 horas, favoreciendo los US un incremento de la intensidad de color y mayor presencia de terpenos y norisoprenoides, especialmente en la fracción libre.

No obstante, el interés en nuevas tecnologías pasa por su estudio en distintas escalas, comenzando en el laboratorio. En este sentido, algunas tecnologías requieren un mayor desarrollo de estudios antes de ser consideradas aptas en su aplicación industrial. Así, este trabajo presenta el interés de las microondas como herramienta de potenciación de la extracción de compuestos de interés, y es por ello que se presenta en esta tesis el trabajo desarrollado a partir de uva Cabernet Sauvignon tratada con esta tecnología. Los vinos elaborados a partir del uva tratada mostraron una mayor concentración de compuestos fenólicos totales y pigmentos polimerizados, resultando en una posible reducción del tiempo de maceración en 4 días, de forma similar a los estudios previos con US.

Los resultados de esta tesis doctoral muestran un claro beneficio del uso de los US y el potencial de las MO como herramientas que potencian la extracción

de compuestos de interés y permiten reducir los tiempos de procesamiento y por tanto aumentar la productividad de las bodegas. No obstante, el conocimiento de las condiciones operacionales óptimas y la presente situación legislativa convierten a los US en una tecnología prioritaria en la actualidad.

6. ABSTRACT

The growing interest in the application of new, clean and safe technologies that improve the productivity and efficiency of industrial processes and satisfy the needs of consumers has led oenological research to explore the technological possibilities of reducing the addition of additives and avoiding processes involving the use of high temperatures that alter the organoleptic qualities of wines produced in the winery.

On the other hand, the production of quality wines (with a higher content of antioxidant compounds, greater colour intensity and pleasant aroma) is currently closely linked to the logistical needs of the wine industry, which is increasingly observing alterations in the vine cycle, with the consequent decompensation of the phenolic and technological ripening of the grape due to high temperatures and the increasingly frequent extreme weather phenomena associated with climate change. These conditions also increase the likelihood of microbiological damage and, with it, a reduction in the sanitary quality of the grapes.

For all these reasons, in recent decades, technologies used in the food industry, such as the application of high hydrostatic pressures, pulsed electric fields and ultrasound (US), have made their way to obtain the approval of the International Organisation of Vine and Wine for their industrial use in the production of value-added wines.

In contrast, other emerging technologies potentially applicable in oenology, such as microwaves, are still being tested in laboratory-scale trials.

The use of these technologies, and more specifically of US (the first non-thermal technology approved by the OIV), for extractive purposes is presented as a possible tool for obtaining higher quality wines and reducing the necessary processing time, since the cavitation phenomenon facilitates the breaking of cell walls and favours the accelerated release of compounds of interest such as anthocyanins, tannins, as well as aromatic precursors and polysaccharide compounds.

However, the tests developed so far are mostly limited to laboratory-scale tests, which makes it necessary to study this technology on a semi-industrial and industrial scale, in order to extrapolate results to the winery.

Thus, this doctoral thesis demonstrates the capacity of high-power ultrasound to accelerate the extraction process of phenolic compounds during the maceration process in red wines by breaking the cell wall. The operational conditions were established considering that a lower frequency generates a higher cavitation effect (around 20 kHz), acting more aggressively on structures that are difficult to access, such as the lignified walls of the seeds. In contrast, 28 kHz frequency was considered optimal for anthocyanin extraction. Together with this, the acceleration of the extraction of compounds of interest allowed a reduction in maceration time, without loss of quality, achieving maceration times of 4 days less (7, in traditional production; 3, in treated grapes) to exploit the compositional potential of the grape as a starting point.

Along these lines, and given the need to harvest phenolically immature grapes to avoid high alcoholic content in the final wines, the use of US on grapes with a lower degree of ripeness than that established as optimal allowed us to increase the extraction of phenolic compounds, obtaining wines with a quality similar to those obtained from grapes of optimal ripeness and without organoleptic defects associated with sonication when the treatment is carried out on partially botrytised grapes.

In the comparative study with traditional techniques, such as pectolytic enzymes, their addition prior to US treatment did not produce a favourable result. However, a positive and synergistic effect was observed in the addition of the enzyme after treatment of the grapes with US, obtaining wines with greater intensity of colour and phenolic content compared to those obtained using the techniques applied individually, obtaining similar results to the control wine made with 4 days more of maceration (3 and 7 days, respectively) when immature grapes were used, and even more favourable results with the combination of techniques when more mature grapes were used.

As the effect of the US lies in its ability to break the cell walls, studies were carried out on the application of US on grapes of different varieties and, therefore, with different structural and compositional characteristics of the cell wall, observing a differentiated effect between those varieties with a thinner cell wall (Cabernet Sauvignon and Syrah) and thicker ones (Monastrell). In addition,

Monastrell red wines showed higher concentrations of the polysaccharide fractions determined.

Thus, the interest of the application of US for extractive purposes is established at a semi-industrial level, with its possible use on grapes of different degrees of ripeness, of different varieties and with grapes affected by *Botrytis cinerea*, allowing quality wines to be obtained in a shorter processing time, reducing by up to 4 days the maceration time necessary to obtain red wines with similar characteristics to those produced in the traditional way.

On the other hand, this doctoral thesis presents its possible use in the production of rosé wines, in order to obtain the desired colour and a high aromatic quality without the need to apply pre-fermentation macerations that could lead to possible microbiological alterations and oxidation. In this case, the application of US gave rise to wines with chromatic and aromatic characteristics of higher quality than those obtained in the wine made from an 8-hour pre-fermentation maceration, with US favouring an increase in colour intensity and a greater presence of terpenes and norisoprenoids, especially in the free fraction.

However, the interest in new technologies is based on their study at different scales, starting in the laboratory. In this sense, some technologies require further studies before being considered suitable for industrial application. Thus, this work presents the interest of microwaves (MW) as a tool to enhance the extraction of compounds of interest, and that is why this thesis presents the work developed from Cabernet Sauvignon grapes treated with this technology. Wines made from the treated grape showed a higher concentration of total phenolic compounds and polymerised pigments, resulting in a possible reduction of maceration time by 4 days, similar to previous studies with US.

The results of this doctoral thesis show a clear benefit of the use of US and the potential of MW as tools that enhance the extraction of compounds of interest and allow a reduction in processing times and, thus, increase winery productivity. However, the knowledge of the optimal operational conditions and the present legislative situation make US a priority technology at present.

7. CONCLUSIONES

1. La aplicación de US a uva estrujada altera las paredes celulares de las células de la uva, afectando a su morfología, generando roturas y facilitando la liberación del contenido intracelular (**Publicaciones 3.1. y 3.4.**).
2. Las condiciones de empleo de los US determinan el efecto generado sobre las paredes celulares de los distintos tejidos y, por tanto, afectan a la extractabilidad de los compuestos de interés. Así, el uso de frecuencias más bajas favorece la ruptura de estructuras más rígidas, como las paredes celulares lignificadas de semilla (**Publicación 3.1.**).
3. A igualdad de tiempo de maceración, el uso de US favorece una mayor intensidad de color y mayor concentración de compuestos fenólicos en los vinos tintos (**Publicaciones 3.3. y 3.4.**).
4. El uso de US permite la reducción del tiempo de elaboración y el aumento de la capacidad productiva de las bodegas, ya que su uso permite obtener vinos de características cromáticas similares a las de vinos con maceraciones largas pero empleando tiempos de maceración más cortos, gracias a que los US facilitan la disgregación de las estructuras celulares y la extracción de compuestos de interés presentes en la uva (**Publicaciones 3.1., 3.2., 3.3., 3.4. y 3.5.**).
5. El uso de US sobre uvas con grado de maduración bajo (bajo contenido en azúcar) y fenólicamente inmaduras facilita la extracción de compuestos de interés y permite obtener vinos de alta calidad organoléptica y menor contenido alcohólico (**Publicaciones 3.2. y 3.3.**).
6. El empleo de US sobre uva parcialmente botritizada no resulta en un detrimento de la calidad de los vinos obtenidos al no observarse características sensoriales indeseables (**Publicación 3.2.**).
7. El uso de US facilita una mayor extracción de compuestos de interés comparado con el uso de enzimas pectolíticas, si bien la combinación de la aplicación de US y posterior adición de enzima da lugar a un efecto sinérgico de ambas técnicas, llevando a la producción de vinos de mayor

calidad fenólica que con la aplicación de las técnicas por separado (**Publicación 3.3.**).

8. La aplicación de US sobre distintas variedades de uva produce efectos diferentes, debido a las diferencias estructurales y de composición de las paredes celulares de las variedades tratadas, observándose una mayor extracción de compuestos fenólicos a partir de aquellas variedades con una pared celular menos gruesa, como Syrah y Cabernet Sauvignon, frente a la mayor extracción de polisacáridos en Monastrell, con paredes celulares más gruesas y rígidas (**Publicación 3.4.**).
9. El uso de US en la elaboración de vino rosado da lugar a vinos con mayor intensidad de color y una mayor presencia de terpenos y norisoprenoides, compuestos aromáticos ligados al perfil floral (**Publicación 3.5.**), pudiendo esta técnica sustituir a la maceración prefermentativa.
10. El uso de microondas sobre uva estrujada favorece la obtención de vinos con mayor contenido en compuestos fenólicos (antocianos, flavonoles, ácidos fenólicos y taninos) y pigmentos poliméricos en menor tiempo de maceración, permitiendo la reducción del tiempo de elaboración y una mayor estabilización del color (**Publicación 3.6.**).

8. CONCLUSIONS

1. The application of US to crushed grapes alters the cell walls of grape cells, affecting their morphology, generating ruptures and facilitating the release of intracellular content (**Publications 3.1.** and **3.4.**).
2. The conditions of use of the US determine the effect generated on the cell walls of the different tissues and therefore affect the extractability of the compounds of interest. Thus, the use of lower frequencies favours the breakdown of more rigid structures, such as lignified seed cell walls (**Publication 3.1.**).
3. At equal maceration time, the use of US favours a higher colour intensity and higher concentration of phenolic compounds in red wines (**Publications 3.3.** and **3.4.**).
4. The use of US allows the reduction of the elaboration time and the increase of the productive capacity of the wineries since its use leads to the production of wines with similar chromatic characteristics to long maceration wines but using shorter maceration times, thanks to the fact that it facilitates the disintegration of the cellular structures and the extraction of compounds of interest present in the grape (**Publications 3.1., 3.2., 3.3., 3.4.** and **3.5.**).
5. The use of US on low ripening (low sugar content) and phenolically immature grapes facilitates the extraction of compounds of interest and allows obtaining wines with high organoleptic quality and lower alcohol content (**Publications 3.2.** and **3.3.**).
6. The use of US on partially botrytised grapes does not result in a detriment to the quality of the wines obtained as no undesirable sensory characteristics are observed (**Publication 3.2.**).
7. The use of US facilitates a higher extraction of compounds of interest compared to the use of pectolytic enzymes, although the combination of the application of US and subsequent addition of enzyme results in a synergistic effect of both techniques, leading to the production of wines

with higher phenolic quality than with the application of the techniques separately (**Publication 3.3.**).

8. The application of US on different grape varieties produces different effects, due to the structural and compositional differences in the cell walls of the treated varieties, with a greater extraction of phenolic compounds from those varieties with a less thick cell wall, such as Syrah and Cabernet Sauvignon, compared to a greater extraction of polysaccharides in Monastrell, with thicker and more rigid cell walls (**Publication 3.4.**). The use of microwaves on crushed grapes results in obtaining wines with a higher content of phenolic compounds (anthocyanins, flavonols, phenolic acids and tannins) and polymeric pigments in a shorter maceration time, allowing a reduction in the production time and a greater stabilisation of the colour (**Publication 3.6.**).
9. The use of US in the production of rosé wine results in wines with greater colour intensity and a higher presence of terpenes and norisoprenoids, aromatic compounds linked to the floral profile (**Publication 3.5.**), and this technique can replace pre-fermentation maceration.
10. The use of microwaves on crushed grapes favours obtaining wines with a higher content of phenolic compounds (anthocyanins, flavonols, phenolic acids and tannins) and polymeric pigments in a shorter maceration time, allowing for a reduction in production time and greater colour stabilisation (**Publication 3.6.**).

BIBLIOGRAFÍA

- Ashokkumar, M., Sunartio, D., Kentish, S., Mawson, R., Simons, L., Vilku, K., & Versteeg, C. K. (2008). Modification of food ingredients by ultrasound to improve functionality: A preliminary study on a model system. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 9(2), 155-160.
- Celotti, E., & Ferraretto, P. (23-28 octubre 2016). *Studies for the ultrasound application in winemaking for a low impact enology*. En Proceedings of the 39th World Congress of Vine and Wine (p. 132), Bento Gonçalves, Brazil.
- Gambacorta, G., Trani, A., Punzi, R., Fasciano, C., Leo, R., Fracchiolla, G., & Faccia, M. (2017). Impact of ultrasounds on the extraction of polyphenols during winemaking of red grapes cultivars from southern Italy. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 43, 54-59.
- Garrido-Bañuelos, G., Buica, A., Schüchel, J., Zietsman, A. J., Willats, W. G., Moore, J. P., & Du Toit, W. J. (2019a). Investigating the relationship between grape cell wall polysaccharide composition and the extractability of phenolic compounds into Shiraz wines. Part I: Vintage and ripeness effects. *Food Chemistry*, 278, 36-46.
- Garrido-Bañuelos, G., Buica, A., Schüchel, J., Zietsman, A. J., Willats, W. G., Moore, J. P., & Du Toit, W. J. (2019b). Investigating the relationship between cell wall polysaccharide composition and the extractability of grape phenolic compounds into Shiraz wines. Part II: Extractability during fermentation into wines made from grapes of different ripeness levels. *Food Chemistry*, 278, 26-35.
- Gil Cortiella, M., Úbeda, C., del Barrio-Galán, R., & Peña-Neira, A. (2020). Impact of berry size at harvest on red wine composition: a winemaker's approach. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 100(2), 836-845.
- González-Centeno, M. R., Knoerzer, K., Sabarez, H., Simal, S., Rosselló, C., & Femenia, A. (2014). Effect of acoustic frequency and power density on the aqueous ultrasonic-assisted extraction of grape pomace (*Vitis vinifera* L.)—A response surface approach. *Ultrasonics Sonochemistry*, 21(6), 2176-2184.
- Gracin, L., Jambrak, A. R., Juretić, H., Dobrović, S., Barukčić, I., Grozdanović, M., & Smoljanić, G. (2016). Influence of high power ultrasound on *Brettanomyces* and

- lactic acid bacteria in wine in continuous flow treatment. *Applied Acoustics*, 103, 143-147.
- Labrador Fernández, L., Díaz-Maroto, M. C., Pérez Porras, P., Bautista-Ortín, A. B., Alañón, M. E., Gómez-Plaza, E., & Pérez-Coello, M. S. (2022). Power ultrasound treatment of Viognier grapes as a tool to increase the aromatic potential of wines. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 103(7), 3613-3620.
- Martínez-Lapuente, L., Guadalupe, Z., Ayestarán, B., Pérez-Porras, P., Bautista-Ortín, A. B., & Gómez-Plaza, E. (2021a). Ultrasound treatment of crushed grapes: Effect on the must and red wine polysaccharide composition. *Food Chemistry*, 356, 129669.
- Martínez-Lapuente, L., Guadalupe, Z., Ayestarán, B., Pérez-Porras, P., Bautista-Ortín, A. B., & Gómez-Plaza, E. (2022). Effects of combining high power ultrasound and enological enzymes on the composition of polysaccharides in red wine. *LWT - Food Science and Technology*, 170, 114060.
- Martínez-Lapuente, L., Guadalupe, Z., Higuera, M., Ayestarán, B., Pérez-Porras, P., Bautista-Ortín, A. B., & Gómez-Plaza, E. (2023). Effect of Pre-fermentative Treatments on Polysaccharide Composition of White and Rosé Musts and Wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.
- Martínez-Lapuente, L., Guadalupe, Z., Pérez-Porras, P., Bautista-Ortín, A. B., Gómez-Plaza, E., & Ayestarán, B. (2021b). Effect of sonication treatment and maceration time in the extraction of polysaccharide compounds during red wine vinification. *Molecules*, 26(15), 4452.
- Martínez-Pérez, M. P., Bautista-Ortín, A. B., Pérez-Porras, P., Jurado, R., & Gómez-Plaza, E. (2020). A new approach to the reduction of alcohol content in red wines: The use of high-power ultrasounds. *Foods*, 9(6), 726.
- Muñoz-García, R., Díaz-Maroto, M. C., Arévalo-Villena, M., Pérez-Coello, M. S., & Alañón, M. E. (2023a). Ultrasound and microwave techniques as physical methods to accelerate oak wood aged aroma in red wines. *LWT - Food Science and Technology*, 179, 114597.
- Muñoz-García, R., Martínez-Lapuente, L., Guadalupe, Z., Ayestarán, B., Marchante, L., Díaz-Maroto, M. C., Pérez-Porras, P., Bautista-Ortín, A. B., Gómez-Plaza, E., & Pérez-Coello, M. S. (2023b). Ultrasound and microwave techniques for assisting ageing on lees of red wines. *Food Chemistry*, 136660.

- Muñoz-García, R., Oliver Simancas, R., Díaz-Maroto, M. C., Alañón Pardo, M. E., & Pérez-Coello, M. S. (2021). Effect of microwave maceration and SO₂ free vinification on volatile composition of red wines. *Foods*, *10*(6), 1164.
- Muñoz-García, R., Oliver-Simancas, R., Arévalo Villena, M., Martínez-Lapiente, L., Ayestarán, B., Marchante-Cuevas, L., Díaz-Maroto, M. C., & Pérez-Coello, M. S. (2022). Use of microwave maceration in red winemaking: Effect on fermentation and chemical composition of red wines. *Molecules*, *27*(9), 3018.
- OIV. (2022a). Treatment of crushed grapes with ultrasound to promote the extraction of their compounds (Oeno 616-2019) International code of oenological practices. Paris, France: Organisation Internationale de la Vigne et du Vin (OIV).
- OIV. (2022b). Treatment by discontinuous high pressure processes (Oeno 594A-2019) International code of oenological practices. Paris, France: Organisation Internationale de la Vigne et du Vin (OIV).
- OIV. (2022c). Treatment of grapes by pulsed electric fields (PEF) (Oeno 634-2020) International code of oenological practices. Paris, France: Organisation Internationale de la Vigne et du Vin (OIV).
- Oliver Simancas, R., Díaz-Maroto, M. C., Alañón Pardo, M. E., Pérez Porrás, P., Bautista-Ortín, A. B., Gómez-Plaza, E., & Pérez-Coello, M. S. (2021). Effect of power ultrasound treatment on free and glycosidically-bound volatile compounds and the sensorial profile of red wines. *Molecules*, *26*(4), 1193.
- Ortega-Regules, A., Romero-Cascales, I., Ros-García, J. M., Bautista-Ortín, A. B., López-Roca, J. M., Fernández-Fernández, J. I., & Gómez-Plaza, E. (2008). Anthocyanins and tannins in four grape varieties (*Vitis vinifera* L.). Evolution of their content and extractability. *OENO One*, *42*(3), 147-156.
- Osete-Alcaraz, A., Bautista-Ortín, A. B., Ortega-Regules, A. E., & Gómez-Plaza, E. (2019). Combined use of pectolytic enzymes and ultrasounds for improving the extraction of phenolic compounds during vinification. *Food and Bioprocess Technology*, *12*, 1330-1339.
- Osete-Alcaraz, A., Gómez-Plaza, E., Pérez-Porrás, P., & Bautista-Ortín, A. B. (2022). Revisiting the use of pectinases in enology: A role beyond facilitating phenolic grape extraction. *Food Chemistry*, *372*, 131282.
- Rathnakumar, K., Kalaivendan, R. G. T., Eazhumalai, G., Charles, A. P. R., Verma, P., Rustagi, S., Bharti, S., Kothakota, A., Siddiqui, S. A., Lorenzo, J. M., & Pandiselvam, R. (2023). Applications of ultrasonication on food enzyme

inactivation-Recent review report (2017-2022). *Ultrasonics Sonochemistry*, 106407.

Roman, T., Tonidandel, L., Nicolini, G., Bellantuono, E., Barp, L., Larcher, R., & Celotti, E. (2020). Evidence of the possible interaction between ultrasound and thiol precursors. *Foods*, 9(1), 104.

Zietsman, A. J., Moore, J. P., Fangel, J. U., Willats, W. G., Trygg, J., & Vivier, M. A. (2015). Following the compositional changes of fresh grape skin cell walls during the fermentation process in the presence and absence of maceration enzymes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(10), 2798-2810.

