

R.11081478

T
1273



Área de Nutrición y Bromatología
Departamento de Bioquímica, Bromatología, toxicología y Medicina Legal
Facultad de Farmacia. Universidad de Sevilla

ELABORACIÓN Y ENVEJECIMIENTO ACELERADO DE VINAGRES OBTENIDOS A PARTIR DE VINOS DE JEREZ

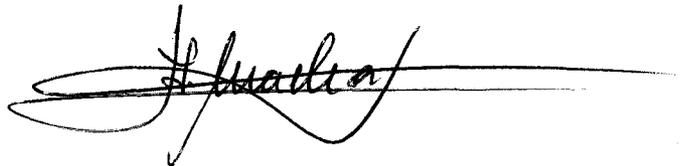
Memoria presentada por
Benita Benítez Bellido
Para optar al grado de
Doctora por la Universidad de Sevilla

Sevilla, Julio de 2005

D. Alberto Machado de la Quintana: Catedrático y Director del departamento de Bioquímica, Bromatología, Toxicología y Medicina Legal de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Sevilla.

Certifica: Que la presente Tesis Doctoral, titulada "Envejecimiento acelerado en vinagre de Jerez", con la que aspira al grado de Doctora en Farmacia la Lda. Benita Benítez Bellido, ha sido realizada en el área de conocimiento de Nutrición y Bromatología de este departamento, bajo la dirección de las Dras Ana M^a Troncoso González, catedrático, M^a Carmen García Parrilla, profesora titular y M^a Lourdes Morales Gómez, profesora titular, del área de Nutrición y Bromatología de la Universidad de Sevilla, durante el tiempo exigido y reuniendo los requisitos para este tipo de trabajos.

Y para que así conste, firmo el presente certificado en Sevilla, a 18 de Julio de dos mil cinco.



Fdo. Alberto Machado de la Quintana

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
SECRETARÍA GENERAL

Queda registrada esta Tesis Doctoral
al folio 018 número 281 del libro
correspondiente.

Sevilla, 25-07-05

El Jefe del Negociado de Tesis



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Depositado en Dpto. Biog., Bromatolog., Tox y ML
de la Facultad de Farmacia
de esta Universidad desde el día 24-9-05

hasta el día 11-10-05

Sevilla de

EL DIRECTOR DE



Dña. Ana M^a Troncoso González, catedrática del área de Nutrición y Bromatología, **Dña. M^a Carmen García Parrilla** y **Dña. M^a Lourdes Morales Gómez**, profesoras titulares del área de Nutrición y Bromatología del Departamento de Bioquímica, Bromatología, Toxicología y Medicina Legal de la Universidad de Sevilla.

Certifican: que la presente Tesis Doctoral, titulada "Envejecimiento acelerado en Vinagre de Jerez" que presenta la Lda. Benita Benítez Bellido para optar al grado de Doctora en Farmacia, ha sido realizada en esta área de conocimiento de Nutrición y Bromatología y en las instalaciones de la empresa Vinagres de Yema S.L. bajo su dirección, reuniendo a su juicio los requisitos en este tipo de trabajo, y autorizan la presentación.

Y para que así conste, firmamos el presente en Sevilla, a de marzo de dos mil cinco.



Dña. Ana M^a Troncoso González



Dña. M^a Carmen García Parrilla



Dña. M^a Lourdes Morales Gómez

Deseo expresar mis más sincero agradecimiento a todas aquellas personas que han hecho posible con su ayuda y apoyo la realización de la presente Tesis Doctoral y que para mi ha sido conseguir un sueño, una meta.

A mis directoras de Tesis Ana María Troncoso González, M^a Carmen García Parrilla y M^a Lourdes Morales, a las que les tengo gran respeto y admiración. Por su amistad, por los buenos momentos que me han hecho pasar durante todos estos años y que espero sigan en años venideros.

A Ana, por haberme acogido en su grupo investigador, iniciarme en las tareas investigadoras e introducirme en el mundo científico.

A M^a Carmen, por sus consejos, por transmitirme su experiencia en este camino, por haberme dado las pautas que van a marcar un mayor grado de confianza en mí misma.

A Lourdes, por su paciencia y gran capacidad de trabajo y profesionalidad, por todo lo que me ha enseñado.

A wendu, porque sin su ayuda mi esfuerzo por terminar la Tesis hubiese tenido que ser más grande con mayores ausencias en casa y en la empresa.

A la empresa José y Miguel Martín que cedió virutas desinteresadamente.

A todos los que formaron el panel de cata por su buena disponibilidad y ayuda.

A la memoria de D.Fernando Terry, porque hizo posible que pudiera compatibilizar mi trabajo en la empresa con el trabajo de investigación, porque siempre tuvo una proyección de futuro, porque creyó que sería positivo la interrelación empresa-universidad.

A su hijo Carmelo por hacer posible que pudiera continuar el trabajo iniciado, por la confianza que ha depositado en mí y la posibilidad que me ha dado de poder asistir a la facultad cuantas veces lo he necesitado.

A Lola, mi compañera y amiga, por el interés que siempre ha mostrado en las tareas de investigación, por su apoyo y sincera amistad, por los buenos y malos momentos que compartimos.

A Macarena, por su ayuda y paciencia informática.

A mi querida amiga Inge por su ayuda con las traducciones.

A mis padres, que a pesar de su edad, me siguen alentando y apoyando.

A Jerónimo, mi marido, por su cariño, paciencia y apoyo para que yo pudiera continuar la formación y que también era mi ilusión.

A mi hijo, al que le quiero transmitir que se debe luchar por conseguir metas pero con honestidad, que el saber, aprender y profundizar en el conocimiento nos hace sentirnos libres y mantener el espíritu joven.

***A mi hijo, a mi marido.
A mis padres.***

INDICE

1.- INTRODUCCIÓN.....	1
2.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	5
2.1.- El vinagre: Definición, tipos de vinagres y evolución histórica.....	5
2.1.1.- Definición.....	5
2.1.2.- Tipos de Vinagres.....	6
2.2.- Evolución Histórica.....	7
2.2.1.- Las bacterias acéticas.....	9
2.3.- Métodos de elaboración de vinagre.....	15
2.3.1.- Métodos tradicionales de acetificación con cultivo superficial.....	16
2.3.1.1.- Método de Orleáns.....	16
2.3.1.2.- Método Luxemburgués.....	19
2.3.1.3.- Método de Schützenbach o método alemán.....	20
2.3.1.4.- Métodos de obtención de vinagres artesanales de alta calidad.....	22
2.3.2.-Métodos de acetificación con cultivo sumergido.....	26
2.3.2.1.- Modelos Frings.....	
2.4.- Envejecimiento en madera del vinagre de vino.....	29
2.4.1.- Envejecimiento Tradicional.....	29
2.4.2.- Composición química de la madera.....	35
2.4.3.- Cambios durante el envejecimiento.....	42
2.4.4.- Nuevas estrategias de envejecimiento: envejecimiento acelerado.....	50
2.5.- Análisis sensorial.....	51
2.5.1.- Bases científicas.....	51
2.5.1.1.- Parámetros determinados por análisis sensorial.....	53
2.5.2.- Herramientas de Medida utilizadas en el Análisis sensorial...	63
2.5.2.1.- Relación entre respuesta y estímulo. Bases psicofísicas del análisis sensorial.....	64
2.5.3.- El panel de análisis sensorial.....	69
2.5.3.1.- Terminología.....	70
2.5.4.- Las pruebas.....	72
2.5.4.1.- Pruebas discriminatorias.....	72
2.5.4.2.- Pruebas descriptivas. El perfil sensorial.....	73
2.5.4.3.- Antecedentes de análisis sensorial de vinagre.....	74

3.- OBJETIVOS.....	77
4.- MATERIAL Y MÉTODOS.....	79
4.1.- Ensayos de envejecimiento acelerado.....	79
4.1.1.- Muestras.....	79
4.1.2.- Acondicionado de virutas.....	81
4.1.3.- Toma de muestras.....	83
4.1.4.- Codificación de muestras.....	83
4.2.- Métodos de análisis Físico-químicos.....	84
4.2.1.- Extracto seco.....	84
4.2.2.- Acidez total o Grado Acético.....	86
4.2.3.- Índice de Polifenoles Totales.....	88
4.2.4.- Determinación de compuestos volátiles en vinagre.....	90
4.2.5.- Determinación de compuestos volátiles procedentes de la madera.....	93
4.2.6.- Determinación de compuestos fenólicos por CLAE con inyección directa de la muestra.....	97
4.2.7.- Análisis sensorial.....	102
4.2.7.1.- Selección de los miembros del Panel de Cata.....	103
4.2.7.2.- Entrenamiento.....	105
4.2.7.3.- Validación del Panel de Cata.....	111
4.2.7.4.- Análisis sensorial de las muestras de vinagre.....	113
5.- RESULTADO Y DISCUSIÓN.....	119
5.1.- Extracto Seco.....	119
5.2.- Fenoles Totales.....	120
5.3.- Compuestos volátiles.....	123
5.4.- Compuestos volátiles procedentes de la madera.....	129
5.5.- Compuestos fenólicos.....	135
5.6.- Análisis sensorial.....	143
5.6.1.- Selección de los miembros del panel de cata: discriminación de sabores.....	143
5.6.2.- Entrenamiento del panel de cata: aprendizaje de olores.....	145
5.6.2.1.- Sensación punzante.....	146
5.6.2.2.- Acetato de etilo.....	146
5.6.2.3.- Carácter vinoso.....	146
5.6.2.4.- Descriptores de la madera.....	147

5.6.3.- Validación del panel de cata.....	149
5.6.4.- Análisis sensorial de las muestras.....	150
5.6.4.1.- pruebas discriminatorias: pruebas triangulares.....	150
6.- CONCLUSIONES.....	160
7.-BIBLIOGRAFIA.....	164

1. INTRODUCCIÓN

1.- INTRODUCCIÓN

Las preferencias de los consumidores hacia productos de alta calidad se dejan sentir en todos los tipos de alimentos. Así, el vinagre de calidad, prácticamente valorado tan sólo en la alta restauración y gastronomía ha visto acrecentada notablemente su demanda en los últimos años. Los vinagres de vino producidos mediante métodos tradicionales alcanzan altos precios en el mercado debido a que tanto su velocidad de acetificación como su estancia en madera son procesos largos y por lo general, los productores no llegan a satisfacer la demanda del mercado.

Por ello, resulta interesante poner a punto métodos de elaboración destinados a acortar el tiempo de producción mediante estrategias que supongan un aumento en la velocidad del proceso de transformación vino-vinagre y estancia en madera, sin menoscabo en la calidad final del producto. En este sentido el Grupo de investigación Derivados de la uva trabaja en una línea de investigación sobre: "Nuevas estrategias para el envejecimiento acelerado de vinagres de vino: evaluación de la calidad". El propósito final es conseguir un producto homogéneo con una calidad aceptable y menor coste.

El vinagre de vino se ha obtenido tradicionalmente mediante dos sistemas de acetificación distintos que dan lugar a productos muy diferentes desde el punto de vista químico y organoléptico. Podemos hablar así de dos tipos de vinagre: los vinagres producidos mediante un proceso lento de acetificación (cultivo superficial), y los obtenidos por acetificación rápida en biorreactores (cultivo sumergido).

El primer paso hacia la industrialización del proceso de fermentación acética lo constituye el desarrollo de generadores verticales tipo torre y diversos sistemas de acetificación basados, con algunas modificaciones, en

el cultivo superficial, concretamente las bacterias acéticas se inmovilizan sobre virutas de haya sobre las que se rocía vino o en otros tipos de soportes que alternativamente se sumergen en el caldo a fermentar y se exponen al aire para su oxigenación. La mayoría de estos sistemas suponen una mejora en la transferencia entre la fase gaseosa y líquida, provocando de esta forma una mayor concentración de oxígeno que la conseguida con los sistemas estáticos, basados estos últimos en el clásico "sistema Orleáns" en los que la biomasa viable se mantiene en la superficie del medio de fermentación. Una variante de este sistema clásico lo constituye el sistema tradicional de producción de vinagre de Jerez, resultado de la superposición del sistema de solera al método de Orleáns, consiguiéndose simultanear una fase dinámica, durante el trasiego de vinagre de una escala a otra dentro del sistema de criaderas y solera, y otra estática en el interior de las botas.

En nuestros días, estos métodos han sido reemplazados por los sistemas de cultivo sumergido. En ellos, las bacterias acéticas llevan a cabo todas sus funciones fermentativas en el seno del líquido a acetificar. Por tanto, se hace necesario conseguir unas buenas condiciones de agitación y aireación que mantengan a dichas bacterias en suspensión y les proporcionen el adecuado nivel de oxígeno disuelto en el medio. Un avance decisivo en la industrialización a gran escala del proceso lo supuso la comercialización del llamado acetificador Frings, que consiste en un depósito provisto de agitación, donde el mismo dispositivo consigue la aireación y la mezcla aire-líquido. Con este sistema la eficiencia de aireación es muy buena y, por tanto, las velocidades de acetificación son altas. Además, el gasto de energía es relativamente bajo.

En España existen distintas zonas vinícolas que tradicionalmente han elaborado vinagres envejecidos, pero de ellas es Jerez la más famosa y de mayor pujanza económica. El vinagre de Jerez alcanza cifras importantes de

producción y está presente en amplios mercados. El Consejo Regulador de este Marco Vinícola ha sido pionero en establecer la Denominación de Origen del Vinagre de Jerez, para proteger la genuidad y garantía de origen de dicho producto. En la reglamentación de vinagre de Jerez se contempla el envejecimiento de los vinagres mediante dos sistemas diferentes: uno dinámico, de criaderas y solera y otro estático en añadas, pudiéndose emplear botas de roble o castaño siempre que el volumen no exceda de 1000 litros. En cuanto al tiempo de envejecimiento recogido en la reglamentación, puede ser variable, pero no será nunca inferior a seis meses. Este período de envejecimiento dará lugar a los vinagres de calidad solera (Consejería de Agricultura y Pesca, 2000).

El vinagre de Jerez ha de producirse a partir de vinos adecuados. El Reglamento establece que son vinos adecuados aquellos obtenidos a partir de variedades de uva obtenidas de viñas inscritas en el Consejo Regulador “Jerez-Xérès-Sherry, manzanilla Sanlúcar de Barrameda y vinagre de Jerez” con una graduación alcohólica mínima de 9.5° y una acidez total mínima de 2.5g/l expresada en tartárico. El vinagre de Jerez en la actualidad combina tecnología y tradición en su producción y para su elevada calidad sensorial precisa de un envejecimiento oxidativo en botas de roble durante un tiempo mínimo de 2 años para la calidad Reserva. En un futuro se implantará la calidad Gran Reserva para vinagres con más de 10 años de envejecimiento.

De acuerdo con la exposición anterior el presente trabajo pretende poner a punto técnicas alternativas al sistema de envejecimiento tradicional a través de un sistema de envejecimiento acelerado. Para ello es necesario conocer la evolución de ciertos compuestos volátiles y fenólicos relacionados con el envejecimiento y así proponer la estrategia dirigida a acortar el tiempo de envejecimiento con el consiguiente beneficio económico que esto supone. Es obvio que el concepto de excelencia o calidad es un concepto subjetivo y difícilmente caracterizable sólo a través de análisis físico-químico. Es

necesario también realizar catas para la valoración de los productos obtenidos.

Concretamente, se pretende evaluar factores implicados en el envejecimiento acelerado y parámetros relacionados con la calidad de los vinagres. Las variables de estudio son pues:

- Establecer acondicionado óptimo de las virutas de roble.
- Seguimiento de la evolución de marcadores de calidad.
- Realización de catas descriptivas.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1.- El Vinagre: Definición, Tipos de Vinagres y Evolución Histórica

2.1.1.- Definición

La palabra vinagre procede etimológicamente del latín "*vinum acre*", de la que deriva la locución francesa "*vin aigre*" equivalente al vino agrio, pero en esta acepción su procedencia no queda relegada al vino, sino que cualquier sustrato amiláceo es susceptible de ser utilizado (Schumacher, 1911).

Según la FAO/OMS (Codex Alimentarius, 1985), "el vinagre es un líquido, apto para el consumo humano, que es producido exclusivamente a partir de materias primas de origen agrícola, que contengan almidones y/o azúcares, por un doble proceso de fermentación, alcohólica y acética". Pueden contener cantidades determinadas de ácido acético, y otros ingredientes opcionales (hierbas, especias, sal), lo que será regulado por la Comisión del *Codex Alimentarius*, según el tipo de ingrediente, al objeto de obtener un aroma peculiar y característico de cada tipo de vinagre.

Según la Reglamentación Técnico Sanitaria correspondiente (*Presidencia del Gobierno, 1993*) con la denominación genérica de vinagre se designa: "*el líquido apto para el consumo humano resultante de la doble fermentación, alcohólica y acética de productos de origen agrario que contengan azúcares o sustancias amiláceas, con una riqueza mínima de 50 g/L*". Se entiende por grado de acidez de los vinagres su acidez total expresada en gramos de ácido acético por 100 mL, a 20°C.

La Unión Europea (CEE, 1970) aplica el término de vinagre de vino a aquél que se obtiene exclusivamente a través de la fermentación acética del vino, que presenta un grado de acidez total no inferior a 60g/L, expresado en

ácido acético. Se permite añadir un calificativo relativo al origen vinícola, en caso de que el vinagre haya sido elaborado a partir del vino de la denominación en cuestión, apropiado para el consumo.

2.1.2.- Tipos de vinagre

Cualquier sustrato azucarado o amiláceo puede ser utilizado en la elaboración de vinagres. Asimismo los métodos de elaboración serán diferentes. Por tanto, los vinagres se pueden clasificar en función del tipo de sustrato empleado o del método usado en su elaboración.

Según la materia prima originaria se establecen los siguientes tipos (Presidencia del Gobierno, 1993):

- *Vinagre de vino*: Es el producto obtenido exclusivamente por fermentación acética de vino.
- *Vinagre de frutas*: Es el producto obtenido a partir de frutas o bayas.
- *Vinagre de alcohol*: Es el producto obtenido por la fermentación acética de alcohol destilado de origen agrario.
- *Vinagre de cereales*: Es el producto obtenido sin destilación intermedia por el procedimiento de doble fermentación alcohólica y acética, de cualquier cereal en grano, cuyo almidón se ha desdoblado en azúcares mediante un procedimiento distinto de la diastasa de la cebada malteada.
- *Vinagre de malta*: Es el producto obtenido sin destilación intermedia por el procedimiento de doble fermentación alcohólica y acética a partir de la cebada malteada, con o sin adición de grano, cuyo almidón se ha desdoblado en azúcares mediante la diastasa de la cebada malteada.
- *Vinagre de miel*: Es el producto obtenido a partir de la miel.
- *Vinagre de suero de leche*: Es el producto obtenido a partir de suero de leche.

2.1.3- Evolución Histórica

El vinagre ha formado parte de la alimentación humana desde la antigüedad más remota como condimento y conservador de alimentos, así como base de remedios sencillos para hombres y animales. La fermentación alcohólica seguida de la acética se produce espontáneamente sobre cualquier sustrato azucarado expuesto al polvo y a los insectos que transportan levaduras y bacterias. Duddington (1961) afirma que la elaboración de vino es un arte que data al menos de hace unos 10.000 años, por lo que podemos suponer la existencia del vinagre desde este tiempo. Las referencias más antiguas al uso del vinagre se hallan en la cultura babilónica (5000 a.C.) sobre la obtención de vinagre de dátiles.

El ácido acético que contiene el vinagre fue durante siglos el ácido más fuerte del que se disponía. Su uso como disolvente por los alquimistas, viene rodeado por las anécdotas de personajes históricos como Cleopatra o Aníbal. Según Plinio, la reina egipcia para ganar la apuesta de ingerir una comida por un valor de un millón de sestercios disolvió perlas valiosas en vinagre y se las bebió. Tito Livio narra que los soldados de Aníbal arrojaban sobre las rocas vinagre caliente para disolverlas y que sus elefantes pudieran atravesar los Alpes.

Los alquimistas representaban al vinagre por los símbolos “+” y “x”, que cuando se completaban con cuatro puntos significaban vinagre destilado y concentrado o ácido acético “fuerte”. El símbolo de la cruz o aspa parece tener relación con el uso del vinagre como bebida para los sometidos a crucifixión. En los Evangelios hay alusiones explícitas a esta práctica.

La limpieza de llagas y heridas por medio de vinagre diluido e incluso la desinfección del oído externo, son aplicaciones del vinagre conocidas desde antiguo. Las epidemias de peste o de cólera que arrasaban Europa hasta el pasado siglo, hacían surgir disposiciones de los gobiernos para lavar en

vinagre todas las hortalizas y frutas antes de su consumo en las epidemias de cólera de 1830 y 1884. El alivio de la tos con una mezcla de miel y vinagre fue recomendado por Galeno y se atribuye a Hipócrates el uso de vinagre en los remedios contra molestias respiratorias. Su uso como antídoto para las picaduras de insectos que inyectan sustancias alcalinas, es un conocido remedio casero, se ha empleado para neutralizar la ingestión accidental de líquidos alcalinos. También se ha usado el vinagre para aliviar torceduras y para reducir las varices (Llaguno, 1991).

En un principio, sobre el proceso de elaboración de vinagre sólo se sabía que el vino, la sidra, la cerveza o cualquier líquido hidroalcohólico se acetificaba o avinagraba espontáneamente, en contacto con el aire, sobre todo en verano (Llaguno, 1991). Por tanto, para obtener un vinagre bastaba con añadir a un sustrato “la madre del vinagre” que era una especie de masa más o menos gelatinosa y cuyo efecto o función realmente no se conocía.

En 1732, el holandés Boerhaave hace notar que la llamada “madre del vinagre” es un organismo vivo, aunque sin precisar su papel en la acetificación. Lavoisier demuestra que la acetificación consiste en la oxidación de etanol, pero sin sospechar la existencia de bacterias acéticas. Persoon (1822) describe las películas grasas que se forman en la superficie del vino, la cerveza o el vinagre como sustancias de naturaleza vegetal, y en la “Micología europea” añade nuevas especies de *Micoderma*: *ollare*, *mesentericum*, *lagenoe* y *pergameneum*. También Chaptal había observado que la producción de vinagre va bien cuando en la superficie del vino aparecen las llamadas “flores de vino”, cuya aparición anuncia y precede a la acetificación, pero sobre esto Berzelius advertía que en todas las materias orgánicas en descomposición, expuestas al aire aparece el mismo tipo de vegetación. La acetificación también llega a formar parte de la controversia entre y químicos como Berzelius y Liebig quienes mantienen que el proceso era puramente químico (Berzelius 1829-1833). En cuanto a la “madre del

vinagre”, Kützing observó que la débil película que recubre la superficie del líquido acidificado está formada por glóbulos seis veces más pequeños que los de las levaduras; se trataba de bacterias acéticas que fueron observadas al microscopio por primera vez por Kützing (1837) por lo que, en las primeras clasificaciones taxonómicas de estos microorganismos, se denominó *Acetobacter kützingianum* a una especie de ellos (Llaguno, 1991).

Pasteur publicó en el año 1864 una amplia memoria sobre la fermentación acética “Études sur le vinaigre, sa fabrication, ses maladies, mohines de les prévenir” que recoge la conferencia que pronunció en Orleáns en 1867. Pasteur afirma que siempre que el vino se transforma en vinagre, es debido a la acción de un velo de *Micoderma aceti* desarrollado en su superficie: *“No existe, en ningún sitio, una gota de vino, avinagrado espontáneamente, en contacto con el aire, sin que el Micoderma aceti haya estado presente previamente. Este pequeño vegetal microscópico tiene la facultad de condensar el oxígeno del aire como el negro de platino o los glóbulos de la sangre y de llevar este oxígeno sobre materias subyacentes. Yo he establecido que en el procedimiento de fabricación llamado “proceso alemán”, las virutas de madera o los trozos de carbón colocados en los toneles de acetificación no son más que los soportes para el Micoderma aceti y que no intervienen en el fenómeno químico por su porosidad, como se creía antes de la publicación de mi memoria”.*

2.2.- Las bacterias acéticas

Las bacterias acéticas constituyen un grupo ecológico que comprende bacterias gram-negativas (gram-positivas en cultivos viejos), estrictamente aerobias y muy sensibles al SO₂. Al microscopio óptico las bacterias acéticas se presentan como pequeñas células cilíndricas, frecuentemente en parejas cocobacilares, cortas y algo gruesas, alineadas o en cadenas, y a menudo agrupadas en forma de ocho. Constituyen un grupo de morfología variable

(polimorfo), que se presentan en forma elipsoidal o de bastoncillos (Suarez e Iñigo, 1990), que crecen en materiales vegetales que han sufrido una fermentación alcohólica; estas bacterias convierten el alcohol en ácido acético.

Las primeras clasificaciones de bacterias acéticas se hicieron atendiendo exclusivamente a criterios morfológicos. Visser't Hooft (1925) toma en consideración también su fisiología, y más tarde Asai (1968) clasifica las bacterias acéticas según su capacidad para metabolizar la glucosa y el ácido acético. Frateur (1950) propone un sistema de clasificación del género *Acetobacter* en cuatro grupos, en base a los caracteres bioquímicos siguientes: producción de catalasa, oxidación de acetato y lactato a carbonato, formación de compuestos cetónicos, producción de ácido glucónico y capacidad para crecer en un medio con alcohol y sales de amonio como única fuente de Nitrógeno (medio de Hoyer). Propuso los siguientes grupos: *Acetobacter peroxydans*, *Acetobacter mesoxydans*, *Acetobacter oxydans* y *Acetobacter suboxydans*. El nombre de cada grupo alude fundamentalmente a su grado de capacidad para oxidar el etanol a ácido acético.

Durante largo tiempo se aceptó que las bacterias acéticas móviles, pertenecientes al género *Acetobacter*, tenían flagelos polares monotricos, y dicho género estaba incluido por lo tanto en la familia *Pseudomonadaceae*. Sin embargo, Leifson (1954) descubrió que 30 cepas de *Acetobacter* no mostraban este tipo de flagelos, poniendo de manifiesto otro tipo de flagelación peritrica. Propuso entonces separar *Acetobacter* en dos géneros: *Acetobacter* y *Acetomonas* género nov., incluyendo en este último las especies con flagelos polares multitricos y las no flageladas, todas incapaces de oxidar el acetato y el lactato a CO₂ y H₂O.

Según la clasificación recogida en el manual de Bergey, en su 8ª edición (1974), las bacterias acéticas pertenecen al orden *Pseudomonadales*, familia *Pseudomonadaceae*, incluyendo en esta última dos géneros distintos al género *Pseudomonas* (sobre todo por su capacidad de crecimiento a pH inferior a 4.5): el género *Gluconobacter* y el género *Acetobacter*, que incluye a su vez tres especies importantes: *Acetobacter aceti*, *Acetobacter pasteurianus* y *Acetobacter peroxydans*. El género *Acetobacter* puede variar en su forma de elipsoide a barra derecha, o ligeramente curva, 0.6-0.8 μm x 1.0-1.4 μm . Se encuentran individualmente, en pares o agrupadas en cadenas. Las células pueden ser móviles o no. Si son móviles, los flagelos son peritricos o laterales, oxida acetato y lactato a CO_2 y H_2O . El pH óptimo para el crecimiento es de 5.4-6.3 (De Ley et al., 1984). El género *Gluconobacter* es capaz de producir grandes cantidades de ácido glucónico a partir de glucosa, tiene incapacidad de formar películas en medios líquidos y pobre crecimiento en sustratos que contienen etanol. Además, es incapaz de oxidar el acetato.

En una serie de trabajos publicados por diversos autores, principalmente Shinwell y Carr (1960), se pone de manifiesto la clara tendencia de las especies de *Acetobacter* a dar cepas mutantes, originándose especies distintas a las ya existentes. Carr (1968) publicó un trabajo en el que pone de manifiesto las observaciones hechas por Shimwell, y afirma que en general, las bacterias acéticas no son genéticamente estables, aunque unas especies sean más estables que otras.

La taxonomía tradicional de los microorganismos, basada fundamentalmente en criterios morfológicos y fisiológicos, se ha visto sometida a continuas reordenaciones y cambios. Esto se ha debido fundamentalmente a la aplicación de técnicas moleculares muy potentes al estudio taxonómico como son la hibridación ADN-ADN, la secuenciación de diferentes regiones del genoma bacteriano, etc. La familia *Acetobacteriaceae*

no ha sido una excepción a este proceso de reordenación de géneros y especies. En el año 1997, a los dos géneros mencionados, *Acetobacter* y *Gluconobacter*, hay que sumarle la definición de dos nuevos géneros de bacterias acéticas: *Gluconoacetobacter* y *Acidomonas* (Yamada et al., 1997); y en los dos últimos años se han definido otros dos nuevos géneros más: *Asaia* (Yamada et al., 2000) y *Kozakia* (Lisdiyanti et al., 2002).

Por tanto, en estos momentos, la familia *Acetobacteriaceae* está formada por 6 géneros y 34 especies de bacterias acéticas (Tabla 1). *Acetobacter* y *Gluconoacetobacter*, con 14 y 11 especies respectivamente, son los géneros donde mayor diversidad de especies se han descrito (Guillamón et al., 2003).

Tabla 1. Géneros y especies de bacterias acéticas descritos según Yamada, 2003.

<i>Acetobacter</i>	<i>Gluconoacetobacter</i>	<i>Gluconobacter</i>
<i>A. aceti</i>	<i>Ga. Liquefaciens</i>	<i>G. oxydans</i>
<i>A. pasteurianus</i>	<i>Ga. diazotrophicus</i>	<i>G. frateurii</i>
<i>A. Pomorum</i>	<i>Ga. xylinus</i>	<i>G. assaii</i>
<i>A. peroxydans</i>	<i>Ga. hansenii</i>	
<i>A. indonesiensis</i>	<i>Ga. obodiens</i>	
<i>A. tropicalis</i>	<i>Ga. intermedius</i>	
<i>A. syzygii</i>	<i>Ga. sacchari</i>	
<i>A. cibinongensis</i>	<i>Ga. entanii</i>	
<i>A. orientalis</i>	<i>Ga. johannae</i>	
<i>A. orleanensis</i>	<i>Ga. azotocaptans</i>	
<i>A. lovaniensis</i>	<i>Ga. europaeus</i>	
<i>A. estunensis</i>		
<i>A. malorum</i>		
<i>A.cerevisiae</i>		
<i>Acidomonas</i>	<i>Asaia</i>	<i>Kozakia</i>
<i>Ac. methanolica</i>	<i>A. bogorensis</i>	<i>K. baliensis</i>
	<i>A. siamensis</i>	
	<i>A. indonesiensis</i>	
	<i>A. krungthepensis</i>	

Los requisitos nutritivos básicos para los procesos microbiológicos son la energía, el carbono, el nitrógeno y las sustancias minerales. Con frecuencia, la fuente de energía y carbono es un compuesto orgánico que se oxida liberando energía y que al mismo tiempo proporciona el carbono estructural para la síntesis de nuevo material celular. Los microorganismos que usan el carbono de este modo son los que se llaman "heterótrofos". Las bacterias acéticas se encuentran muy extendidas en la naturaleza, en flores, frutos maduros, suelos y bebidas alcohólicas fermentadas. Aparecen con mayor frecuencia en uvas atacadas por *Botrytis cinerea* que en uvas sanas; algunos autores señalan que la mitad de las muestras de racimos de uvas sanas, recogidas asépticamente, presentan bacterias acéticas y que este porcentaje disminuye al 30% durante la primera fase de la etapa fermentativa (Suarez e Iñigo, 1990). Además de su capacidad para formar cantidades relativamente elevadas de ácido acético a partir de etanol, estos organismos muestran un grado de tolerancia al ácido que es poco frecuente entre los quimioheterótrofos aerobios. Pueden crecer en medios con un pH inicial de 4.5. Se cultivan fácilmente en medios complejos suplementados con algunos de los sustratos que el grupo oxida con mayor prontitud: etanol o un azúcar soluble, como la glucosa.

Una característica importante de las bacterias acéticas es la capacidad de oxidar una gran variedad de sustratos, y de poder acumular los productos del metabolismo en el medio sin gran toxicidad para las bacterias. La capacidad de oxidación es debida, en parte, a la gran actividad de las deshidrogenasas que poseen en la membrana celular. Estas deshidrogenasas están íntimamente interconectadas con la cadena de citocromos (Matsushita et al., 1985). La actividad de las bacterias acetificantes se basa en su energético poder oxidante del alcohol etílico.

El conocer qué cepas y bacterias acéticas están implicadas en la transformación de etanol en ácido acético es de gran importancia por su

repercusión y aplicación a la producción industrial. En general, la producción de vinagres sólo se ha asociado con las especies: *A. aceti*, *A. pasteurianus*, *Ga. europaeus* Gax. No obstante, es probable que la especie *G. oxydans* se encuentra asociada a la producción de “condimentos alimentarios” que parten directamente de mosto para la producción de acético, como sería el “Aceto Balsamico Tradizionale” (Guillamón et al., 2003).

En los últimos años se vienen aplicando las distintas técnicas de biología molecular para la identificación de microorganismos de interés enológico. En el caso de las bacterias acéticas, se están desarrollando nuevas líneas de investigación centradas en la búsqueda de técnicas de identificación rápida que además pueden aplicarse a una correcta clasificación de las mismas. Como técnicas específicas para la cuantificación e identificación de la bacteria en el proceso de acetificación se contemplan las siguientes:

- PCR cuantitativa: Esta técnica ya ha sido aplicada para la cuantificación del número total de bacterias (mediante el uso de cebadores universales) en una muestra biológica (Franke et al., 2000). En el caso de bacterias acéticas se podrían diseñar cebadores universales de bacterias acéticas diseñados ya para los métodos de identificación (Ruiz et al., 2000), así como cebadores particulares de especie, lo que nos permitiría una segunda cuantificación a nivel de especie.
- Sistemas basados en el uso de marcadores fluorescentes, es decir epifluorescencia y FISH (Fluorescent In Situ Hybridisation). Ambas técnicas han sido utilizadas ya por Macias et al, y Ferrer et al para la cuantificación de bacterias acéticas totales. La técnica de FISH puede permitir la identificación de bacterias acéticas a nivel de especie lo que

sería de gran utilidad y posiblemente complementaria de la PCR cuantitativa.

- Un último método a utilizar para una rápida cuantificación y que podría tener una gran utilidad a nivel industrial es el basado en el análisis indirecto por modificación de la impedancia del medio, lo que está en relación directa con la cantidad de biomasa de la muestra. Este método, comercializado en forma de "Bactrac"TM, que permite la medida de la impedancia del medio, se está utilizando para la cuantificación de microorganismos contaminantes en diversos alimentos, por lo que puede ser de suma utilidad para el análisis poblacional.

En la actualidad hay pocos grupos a nivel mundial que estén realizando trabajos taxonómicos y de identificación con bacterias acéticas. Sin duda alguna, el equipo que ha realizado un mayor número de trabajos, aunque en general muy orientado a la taxonomía de las bacterias acéticas es el grupo de Yamada, de la Tokio University of Agriculture, en Japón. A nivel europeo cabe destacar el grupo de M. Teuber, de Zurcú, de F. Barja en Ginebra y de P. Giudicci en Regio Emilia.

2.3.- Métodos de Elaboración de Vinagre

En general, existen en el mercado dos tipos de vinagres de calidad. El primero se obtiene como producto de la fermentación o acetificación con cultivo superficial, las bacterias acéticas se encuentran en contacto directo con oxígeno gaseoso, situadas bien en la interfase líquido/gas o bien fijadas a soportes de materiales tales como virutas, elaborándose así la mayoría de los vinagres tradicionales. El segundo tipo se elabora por la acetificación o fermentación con cultivo sumergido, donde las bacterias acéticas están sumergidas libremente en el seno del líquido a fermentar, en el que

constantemente se introduce aire, (solo o enriquecido con oxígeno), en condiciones que permitan la máxima transferencia posible desde la fase gaseosa a la fase líquida. Así se obtienen de forma rápida los vinagres comerciales actuales de menor precio.

El vinagre de vino, se produce en los países mediterráneos de forma mayoritaria en biorreactores y con cultivo sumergido, que puede después envejecerse o no en madera. Los métodos tradicionales, lentos, con cultivo superficial se llevan a cabo en toneles de madera de diferente capacidad y suponen un menor volumen de producción (García-Parrilla et al., 1998).

2.3.1.- Métodos tradicionales de acetificación con cultivo superficial

A continuación se detallan los métodos de acetificación con cultivo superficial que se han utilizado a lo largo del tiempo.

2.3.1.1.- Método de Orleáns

Es uno de los métodos más antiguos para fabricar vinagres. Emplea toneles de aproximadamente 250 - 300 litros de capacidad, que se colocan tumbados en filas horizontales y superpuestas, provistos de 2 agujeros de aproximadamente 5 cm en cada extremo de los fondos de cada barril a 2/3 de la altura del fondo, que se rellenan con estopa para evitar la entrada de las moscas del vinagre, pero que dejan pasar aire (Figura 1).

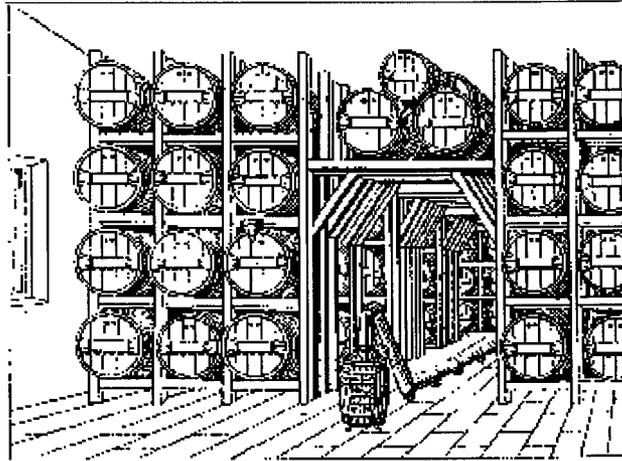


Figura 1. Pilas de botas para la acetificación en una fábrica de vinagre por el método de Orleáns.

Además, en el lateral superior se hace otro orificio que se tapa con un tapón de corcho por donde penetra un tubo de vidrio, recto, que llega casi hasta el fondo del líquido permitiendo renovar el sustrato sin alterar el velo bacteriano situado en la superficie (Figura 2). Se trata de un procedimiento estático donde el líquido a acetificar es una mezcla de vino de bajo grado alcohólico con un 20% de vinagre turbio. Los rendimientos de la transformación de etanol en acético son bajos y el proceso dura de 8 a 10 días una vez comenzada la acetificación.

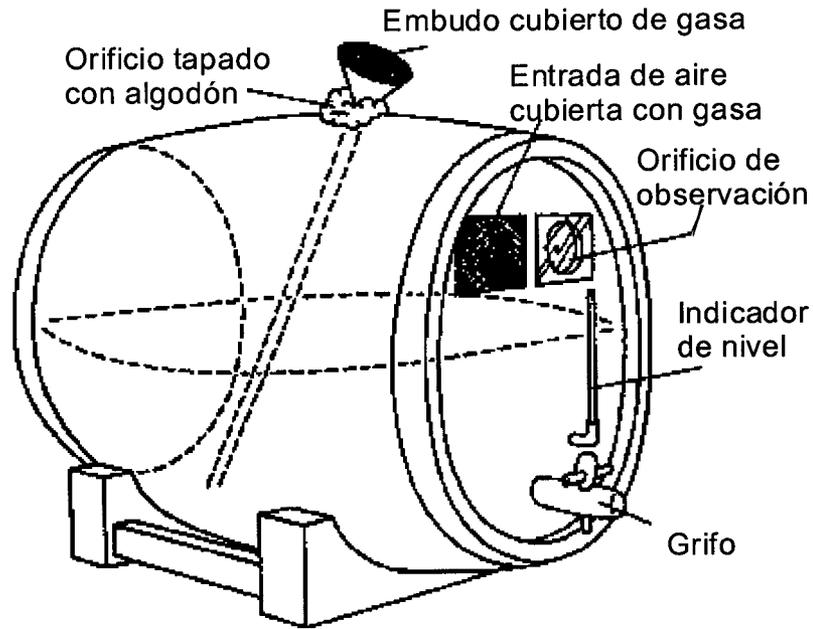


Figura 2. Acetificación por el método de Orleáns (Adams, 1980).

Se comienza añadiendo 60 litros de un excelente vinagre. Después de ocho días se adicionan unos 12 litros del vino, que se transforma en vinagre, es decir, una quinta parte del volumen de vinagre. Inmediatamente, se inocula el tonel con un cultivo de un tonel vinagrero en marcha normal o, en su defecto, de una telilla especialmente criada. Esta operación se lleva a cabo con una varilla de vidrio recta. Se tapa el tonel con el tapón provisto de un tubo. Se mantienen en locales a temperaturas de 20–25°C, y al cabo de 8 días se añaden poco a poco y por el tubo recto de vidrio, otros 12 litros de vino o piqueta; estas adiciones se reiteran cada 8 días hasta que el líquido llegue casi al borde inferior del orificio de entrada de aire, quedando entonces en marcha normal el tonel vinagrero. A partir de este momento, semanalmente se sacan por el tubo de nivel unos 12 litros de vinagre ya hecho, que se sustituyen por otros 12 litros de vino o piqueta, continuándose así indefinidamente la elaboración. El plazo de una semana entre cada adición no es matemático y depende de la temperatura, de la clase y capacidad de las bacterias acetificantes y del grado alcohólico y composición

del vino o piqueta. Pero en cualquier caso, para obtener 12 litros de vinagre es necesario esperar 7 semanas (Xandri, 1977).

2.3.1.2.- Método Luxemburgués

El fundamento de este método y su diferencia fundamental con el método de Orleáns estriba en emplear virutas de haya que periódicamente quedan sumergidas en el líquido que está acetificándose. Así se consigue aumentar la superficie de acetificación de la bacteria y mejorar la transferencia de oxígeno, por lo que aumenta la velocidad de acetificación.

La cuba giratoria más elemental (Figura 3) se prepara con un orificio grande en el centro de uno de los fondos, para procurar la entrada de aire. En uno de los costados de esta cuba, en la parte más alejada de la abertura, se practica un orificio estrecho, que puede obturarse con un tapón; es una canilla de madera o vidrio para vaciado del envase. El tonel está dividido en dos partes desiguales por un falso fondo, agujereado, con numerosos y finos orificios. La parte menor del tonel está llena de virutas de haya. En este compartimento penetra un largo termómetro para controlar la temperatura, aspecto muy interesante para todo método rápido o semirrápido. Se obtienen cantidades de vinagre, que pueden llegar como máximo, cada cuarenta y ocho horas, a la cuarta parte del contenido de un tonel. El vinagre elaborado, que se extrae de las cubas, se sustituye por porciones iguales de vino, continuando la elaboración indefinidamente, salvo accidente (Xandri, 1977).

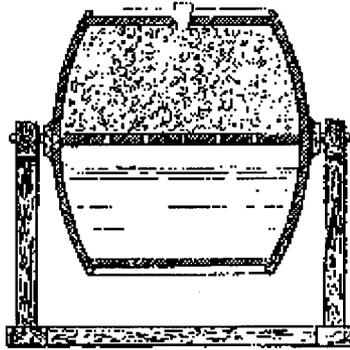


Figura 3. Cuba rotatoria del método Luxemburgués.

2.3.1.3.- Método de Schützenbach o Método Alemán

Se emplean toneles o generadores verticales de encina con doble fondo (Figura 4). Sobre el primero, agujereado, se colocan una serie de capas de virutas de madera de haya, impregnadas de vinagre de buena calidad. Sobre el borde superior lleva un diafragma perforado, con los orificios obturados con algodón.

Al pasar el vino por el diafragma, burbujea aire que existe entre las virutas. El vinagre se extrae por la parte inferior. Se pueden emplear barriles de roble giratorios, parcialmente llenos de virutas, consiguiéndose así una mejor aireación. Las ventajas que se destacan de este proceso son la regulación de oxígeno y su uso para la producción continua de vinagre.

El vinagre obtenido con el método de cultivo superficial tiene el aroma y el gusto propio de la lentitud de la acetificación que se ve favorecido por el simultáneo envejecimiento (Llaguno y Polo, 1991).

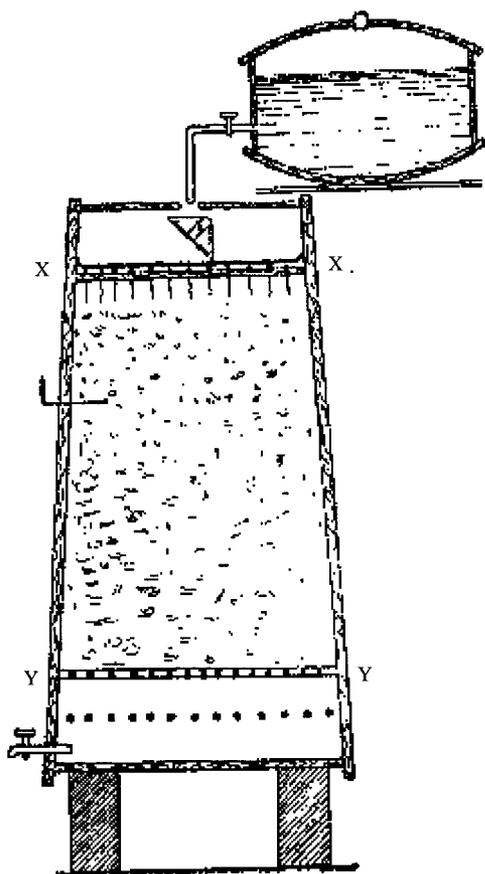


Figura 4. Esquema de un generador vertical, para la producción de vinagres véricos.

Los principales inconvenientes de los métodos de acetificación en cultivo superficial que emplean las virutas como soporte son:

- Acumulación de bacterias muertas sobre las virutas (debido a falta de aireación o aumentos de temperaturas).
- Desarrollo de bacterias productoras de celulosa (*Acetobacter xylinum*).
- La infección por anguílulas (pequeños nematodos) que son imposibles de combatir una vez que se desarrollan.

- Aumentos de temperatura difícilmente controlables, pérdidas de alcohol por evaporación en la corriente ascendente de aire caliente, con bajada del rendimiento.
- Necesidad de gran espacio (generadores de relleno).

2.3.1.4.- Métodos de obtención de vinagres artesanales de alta calidad

Entre los vinagres artesanales producidos por fermentación con cultivo superficial con denominación de origen y reconocimiento internacional destacan el “Aceto Balsamico Tradizionale” de la ciudad italiana de Módena y el no menos prestigioso “Vinagre de Jerez”.

2.3.1.4.1.- El Vinagre de Jerez

El vinagre de Jerez es el obtenido exclusivamente de vinos procedentes de las variedades de uvas cultivadas en la zona de producción de la Denominación de Origen “Jerez-Xérès-Sherry” y manzanilla Sanlúcar de Barrameda”, consideradas aptas para la producción de los vinos amparados por la misma y que posean una graduación alcohólica mínima de 9.5° y una acidez total mínima de 2.5 g/L expresada en tartárico (Consejería de Agricultura y Pesca, 2000).

El vinagre de Jerez se envejece bien mediante un sistema estático de añadas, bien mediante un sistema dinámico característico y peculiar de criaderas y solera. Este último es el más difundido y generalizado. En este proceso de elaboración de vinagre ocurre simultáneamente el proceso de acetificación y de envejecimiento. El sistema de criaderas y solera está compuesto por una serie indeterminada de botas, usualmente de roble americano, agrupadas en filas horizontales o escalas cuyo número puede oscilar (en el caso del vinagre) entre tres y cinco (Figura 5). La escala que está a ras del suelo recibe el nombre de “solera”, sobre ella se encuentra la

primera criadera, sobre la cual se sitúa la segunda y así sucesivamente. La edad del vinagre que contienen las botas aumenta conforme descendemos en el sistema, siendo la solera la de mayor envejecimiento.

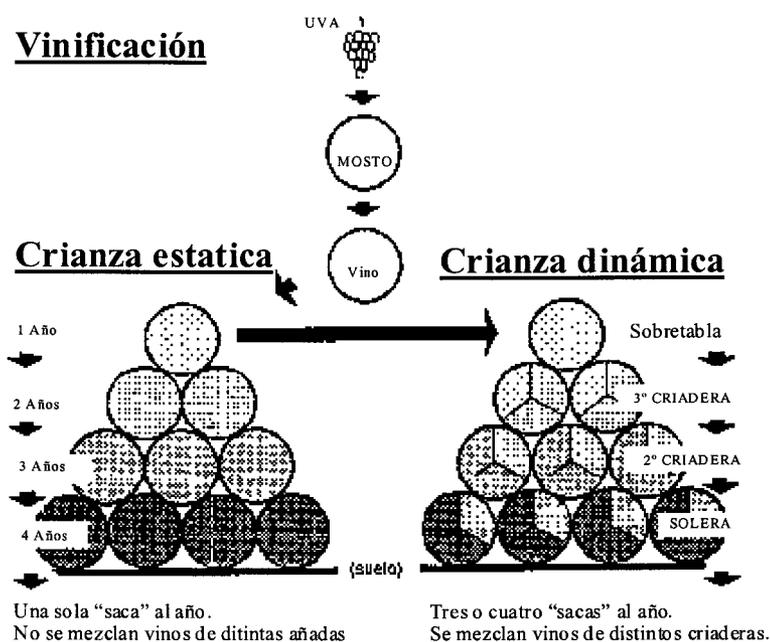


Figura 5. Sistemas de soleras

El vinagre acabado se obtiene de la solera, no pudiendo exceder la cantidad que se saca de la bota en un tercio del contenido de la misma. Esta cantidad se repone con el contenido de la primera criadera. Ésta a su vez se nutre del de la segunda y así sucesivamente, ingresando el sustrato de partida en el sistema por la criadera superior. Estas operaciones se llaman "sacas" y "rocíos". La periodicidad con la que se efectúan es variable según la bodega en la que se realicen. El vinagre que se saca de una escala se reparte entre las botas de la escala inferior. Dado el número de botas de un sistema de soleras y la periodicidad de la saca, se tiene una gran homogeneización en todo el sistema. Además la aireación del proceso es relativamente mayor en comparación con el sistema estático. Considerando

las características de este peculiar envejecimiento es imposible determinar la edad exacta de un vinagre, y se habla de una edad media aproximada.

El sustrato de partida para elaboración de vinagre puede ser mosto del año no alcoholizado o bien vinos que han sufrido una crianza biológica mínima de dos años.

2.3.1.4.2.- Vinagre Balsámico de Módena

En el año 1986 el vinagre balsámico tradicional de la región de Módena y Regio Emilia fue reconocido como un producto de una región específica, terminología equivalente a un producto con Denominación de Origen (Ley N° 93,1986).

La materia prima para la fermentación consiste en mosto de la uva local, variedad Trebbiano, que se concentra por calentamiento hasta al menos un tercio de su volumen inicial, mediante ebullición suave, lo que producirá la eliminación de la flora espontánea y un incremento del 30% del contenido en azúcares. La fermentación se lleva a cabo mediante un proceso lento, tradicional a lo largo del cual se emplean madera de diferentes tipos y tamaños (Seidemann, 1996). El mosto concentrado es fermentado por levaduras osmófilas pertenecientes al género *Zygosaccharomyces*. Simultáneamente las bacterias acéticas metabolizan el etanol a ácido acético.

El vinagre terminado después de un proceso que dura varios años, se extrae del último barril de la serie siendo de madera de moral o morera y de 20 litros de volumen, que se rellena de vinagre procedente del anterior, de 30 litros construido en madera de fresno, que a su vez se rellena de otro de 40 litros de capacidad y madera de cerezo. El último barril de la serie, es de madera de castaño de 50 litros que recibe el vinagre de un barril de 60 litros de capacidad construido en madera de roble y al que se añade mosto de uva

concentrado hasta completar el volumen extraído (Figura 6). La porosidad de cada tipo de madera y la entrada de oxígeno que permite, influye tanto en el desarrollo de la acetificación como en el aroma y color del vinagre obtenido. Los períodos de tiempo de envejecimiento son de al menos 12 años (Pleissi et al., 1989; Stacchini et al., 1990; Turtura y Bortoloti, 1991; Giudici et al., 1992). El producto resultante es un líquido marrón oscuro, de aspecto siruposo, con sabor agridulce.

Existen dos categorías comerciales de vinagre balsámico en el mercado: “Aceto Balsamico Tradizionale di Módena” (doce años de envejecimiento) y “Aceto Balsamico di Modena”. La diferencia más importante entre el vinagre de vino y el “Aceto Balsamico Tradizionale di Módena” (ABTM) está ligada a los microorganismos involucrados en el proceso biológico. En el ABTM, la fermentación alcohólica del mosto calentado y concentrado es incompleta, superándose con dificultad los 7° alcohólicos; por tanto, los azúcares están siempre presentes en gran cantidad en la masa fermentativa base para la producción de éste. De este modo, en la producción del aceto balsámico tiene lugar de forma simultánea la fermentación del azúcar y del etanol (Chiavaro et al., 1998). Por el contrario, en el vinagre de vino se da un proceso fermentativo en dos etapas bien definidas: fermentación alcohólica (*Saccharomyces*) y oxidación acética (*Acetobacter*).

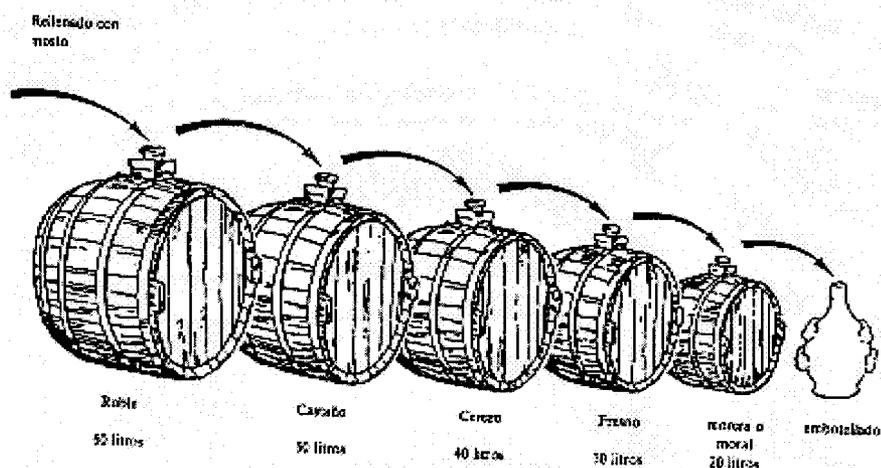


Figura 6. Elaboración de Vinagre Balsámico de Módena (Italia) (Bergonzini, 1979).

2.3.2.- Métodos de acetificación con cultivo sumergido

Se entiende por fermentación sumergida aquella en la que no se utiliza material poroso o soporte, sino que se hacen circular pequeñas burbujas de aire a través de la biomasa, con lo que se favorece el proceso fermentativo. Emplea toneles de madera o tanques acero inoxidable quedando siempre una parte del vinagre de la operación anterior como inóculo para iniciar el ciclo siguiente. Se llena con el vino, y se introduce posteriormente una fuerte corriente de aire. La acetificación es muy rápida. Este proceso se utiliza ampliamente utilizado en la actualidad. Los rendimientos de la transformación del alcohol en ácido acético (hasta el 94%) resultan ser muy elevados. La velocidad a la que se desarrolla el proceso es mayor (25-30 horas), así como la uniformidad del producto y, sobre todo, se puede lograr la acetificación de iguales volúmenes de alcohol en mucho menor volumen de instalación, con el consiguiente ahorro de espacio. Se puede trabajar con dispositivos automáticos que no sólo regulen el control de la aireación, sino también los ciclos de carga y descarga (Llaguno, 1991a).

2.3.2.1.- Modelos Frings

En 1878, Heinrich Frings fundó en Aquisgrán una sociedad productora de vinagre, que más tarde, en 1950, incorpora las patentes de invención resultantes de la investigación del proceso de fermentación sumergida, alcanzando un alto grado de desarrollo. Nació así el Acetator Frings, base de la biotecnología vinagrera actual.

A partir de las investigaciones de Hromatka y Ebner (1949), en los años 40 fue construido el ACETATOR FRINGS (Figura 7) que se mantiene funcionando, con algunas modificaciones, en gran parte de las industrias vinagreras actuales y en el que se elabora la mayor parte de la producción.

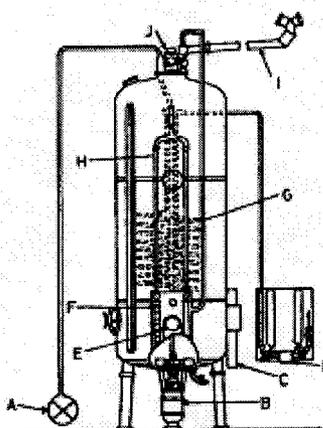
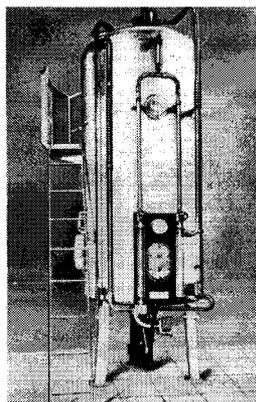


Figura 7. Acetator Frings en acero inoxidable

A, bomba de carga; B, aireador y motor; C, dispositivo para determinación de alcohol residual; D, válvula entrada agua refrigeración; E, termostato reguladora ; F, rotámetro; G, serpentín de refrigeración; H, entrada de aire; I, salida de gases; J, dispositivo antiespuma

El fundamento es la presencia de cultivo sumergido en el seno del líquido a acetificar, que se satura constantemente de pequeñas burbujas de aire. Una mayor población bacteriana así como la disponibilidad de oxígeno por los microorganismos permiten obtener un mayor rendimiento de la transformación de etanol en ácido acético (del 94%) y una mayor velocidad del proceso (25-30 horas). Este procedimiento requiere la estricta vigilancia de tres parámetros: la temperatura, la presión parcial de oxígeno y los ciclos de carga y descarga.

La bacteria acética es viable entre 28-33°C, pero la velocidad de fermentación varía en función de la temperatura. La temperatura de la fermentación debe estar comprendida dentro del intervalo entre 30-31°C (Ormaechea, 1991) que es la temperatura óptima para obtener un mayor

rendimiento. Es obvio que la oxidación de etanol a ácido acético es una reacción exotérmica que puede producir alrededor de 8.4 MJ por cada litro de etanol que se oxida (Adams, 1985) elevando la temperatura del depósito. Por otra parte, cuando la temperatura es elevada aumentan las pérdidas de alcohol y productos volátiles y, en menor cuantía, de ácido acético, pero quizás lo más importante, es que puede ocurrir la parada del proceso por la muerte de bacterias.

Un elevado suministro de aire puede causar el fenómeno de sobreoxidación y arrastre de los componentes volátiles y, por otro lado, su carencia puede paralizar la acetificación dado el carácter aerobio de las bacterias acéticas. Además de la cantidad de aire, se ha de tener en cuenta su calidad y pureza, ya que las bacterias acéticas son sensibles a los contaminantes de este.

Todos los parámetros están interrelacionados en la acetificación; el etanol no debe llegar a agotarse totalmente ya que las bacterias acéticas mueren rápidamente y se pierde el cultivo. Por ello en este tipo de sistema de producción de vinagre se suele llevar a cabo la acetificación de forma discontinua realizándose ciclos de descarga-carga. Así se impide que las bacterias acéticas metabolicen el ácido acético formado convirtiéndolo en CO₂ y agua. Se descarga aproximadamente el 40-45% del volumen de líquido, que se repone con nueva materia prima suministrándole sustrato a la bacteria. Por eso, se puede trabajar de forma automatizada con dispositivos que regulen el control de la temperatura y de la aireación, así como los ciclos de carga y descarga. El acetificador está constituido por un depósito de acero inoxidable de capacidad entre 100 y 300 HL. Los conductos están rodeados por un intercambiador de calor de agua para disipar el calor producido en el proceso y mantener la temperatura a 30°C (Ormaechea, 1991).

Para evitar las pérdidas de compuestos volátiles se ha desarrollado un sistema cerrado (Cantero et al., 1996), mejorando sensiblemente los resultados del proceso fermentativo. El fermentador consta de un sistema de recirculación de aire y un sistema de control automatizado que inyecta oxígeno en dicha corriente a medida que éste es consumido por la biomasa. Se alcanzan así rendimientos cercanos al 100% (Gómez et al., 1993).

2.4.- Envejecimiento en Madera del Vinagre de Vino

2.4.1.- Envejecimiento tradicional

El envejecimiento en madera aplicado a los vinagres de vino es una técnica muy antigua. De hecho los primeros vinagres artesanales se produjeron siempre en barriles de madera. Los vinagres envejecidos son aquellos que, después del proceso normal de acetificación, clarificación y filtración, son sometidos a un proceso de maduración, al final del cual obtienen unas características organolépticas que no poseían al finalizar la fermentación acética (Ormaechea. 1991).

La primacía, ya muy antigua, del roble en la fabricación de las barricas se explica por su extensa representación en los bosques de Europa, Asia y América del Norte y por sus propiedades bien adaptadas al uso posterior: resistencia, fisurabilidad, suavidad, flexibilidad, estanqueidad y durabilidad natural.

Del género *Quercus* existen unas doscientas cincuenta especies pero tan sólo tres (*Quercus petraea*, *Quercus alba* y *Quercus robur*) parecen tener significado enológico por constituir la base material de barricas y cubas. Así, las principales especies de roble usados para hacer barriles se pueden dividir en dos grandes grupos: el roble americano y el roble europeo. El primero se encuentra en la zona este de EEUU y la especie botánica principal es

Quercus alba. Los robles europeos comprenden dos especies *Quercus petraea* y *Quercus robur* (roble pedunculado). En la práctica, muchos de los robles europeos son híbridos de ambos tipos y, como resultado, los robles que se utilizan para el envejecimiento de bebidas alcohólicas se conocen con frecuencia con el nombre de la localidad geográfica de donde provienen. Así entre los robles franceses están los de Gasconia o Limousin, entre otros (Haslam, 1988).

Junto a estas especies más importantes, se pueden citar otros robles que son utilizados de manera anecdótica, pero cuyas propiedades frente a la calidad de los vinos y de los aguardientes parecen poco apreciadas: *Quercus cerris*, *Quercus pubescens*, *Quercus farnetto* en Europa; *Quercus mirbeckii*, *Quercus afares* en Africa del Norte; *Quercus mongólica* en Asia (Puech et al., 2000a).

Es importante la capacidad de cesión de la madera, la cual depende por una parte, de la edad de la misma y, por otra, de su tamaño. Por ejemplo, el contenido en elagitaninos aumenta con la edad de la madera, desde la parte exterior hacia el interior (Virost et al., 1993).

Como unidad de volumen se ha generalizado la barrica, en torno a los 225 litros de capacidad. En la D.O. Jerez-Xérès-Sherry, manzanilla Sanlúcar de Barrameda y vinagre de Jerez, la unidad de trabajo está en torno a los 500 litros.

Los tipos de botas que se fabrican son diversos aunque las utilizadas para el añejamiento en el Marco de Jerez se pueden dividir en tres tipos (Fernández de Bobadilla, 1995):

- La bota de extracción de 500 litros de capacidad equivalente a 30 arrobas (1 arroba = 16.66 L).

- La bota bodeguera de 33 arrobas (550 litros).
- La bota gorda de 36 arrobas equivalente a 600 litros.

La aptitud de estas botas para añejar requiere el cumplimiento de un requisito indispensable: haber contenido previamente vino de Jerez. Para envinar nuevas botas y hacerlas válidas son necesarios de tres a cuatro años como mínimo y que en ellas hayan tenido lugar al menos dos fermentaciones tumultuosas o primera fermentación de mostos. Este corto período es muy favorable para que tenga lugar la impregnación de la madera de sus aromas singulares. De ahí que otros productos, como el whisky escocés, también se envejezcan en botas envinadas con vinos de Jerez.

La bota de roble americano desempeña un papel fundamental en la mejora cualitativa de los vinagres durante el proceso de envejecimiento, empleándose la misma clase de roble que para el resto de los productos del marco de Jerez, es decir, procedente de Luisiana y de Nueva York. Las experiencias realizadas con roble español para envejecimiento no han sido satisfactorias por ser una madera de más peso que además confiere un sabor distinto y con excesiva porosidad, con las consiguientes pérdidas de líquido, por lo que su empleo ha sido rechazado. La porosidad del roble americano es la adecuada para permitir el contacto del vinagre con el oxígeno del aire, facilitando la oxidación que favorece el añejamiento (Fernández de Bobadilla, 1995).

La penetración de oxígeno a través de la madera, cuando se trata de buenos toneles de roble, es escasa; está calculada en 25 cm³ por litro en un año. Ello depende del espesor y la naturaleza de la madera. Esa penetración es más importante cuando se trata de maderas de fibras menos compactas, como las de la acacia y el castaño. Es mayor en los barriles más pequeños. En los toneles con duelas de 5 cm de espesor es prácticamente nula (Peynaud, 1999).

Otras características para la elección de un determinado tipo de madera son; la resistencia física a la filtración y al golpe y la inercia gustativa. En España, se han usado adicionalmente cerezo, castaño y hasta olmo. En general, estas maderas se emplean como materiales para reparar las cubas de roble.

Si observamos el corte de los troncos podremos apreciar una diferenciación clara entre el roble y las otras maderas. El roble presenta una estructura definida por radios medulares que rompen los anillos anuales mientras que el olmo, castaño y cerezo parecen a nivel vascular más compactas, pero carecen de los radios medulares. El radio medular de roble es vítreo, duro e impermeable. Ésta es una razón más para la preferencia del roble ante otras maderas.

Las maderas de roble empleadas en tonelería que se denominan con el nombre de duelas, provienen de árboles con una edad de 100 años o más, que miden a veces de 30 a 35 metros de altura. Esta madera ha sido elegida por sus propiedades mecánicas, su aptitud al cimbrado y su porosidad (Puech et al., 2000b).

La fabricación de las barricas cuenta de las siguientes fases:

a) Acondicionamiento o secado:

El acondicionamiento o secado tiene como fin maderero llegar a formas estables (Figura 8). La madera de roble que se encuentra en el estado fresco después de cortar el árbol posee una humedad del 40 al 60%. Después del corte, se utilizan dos tipos de secado: secado al aire y en secadero; actualmente los toneleros asocian estas dos técnicas.

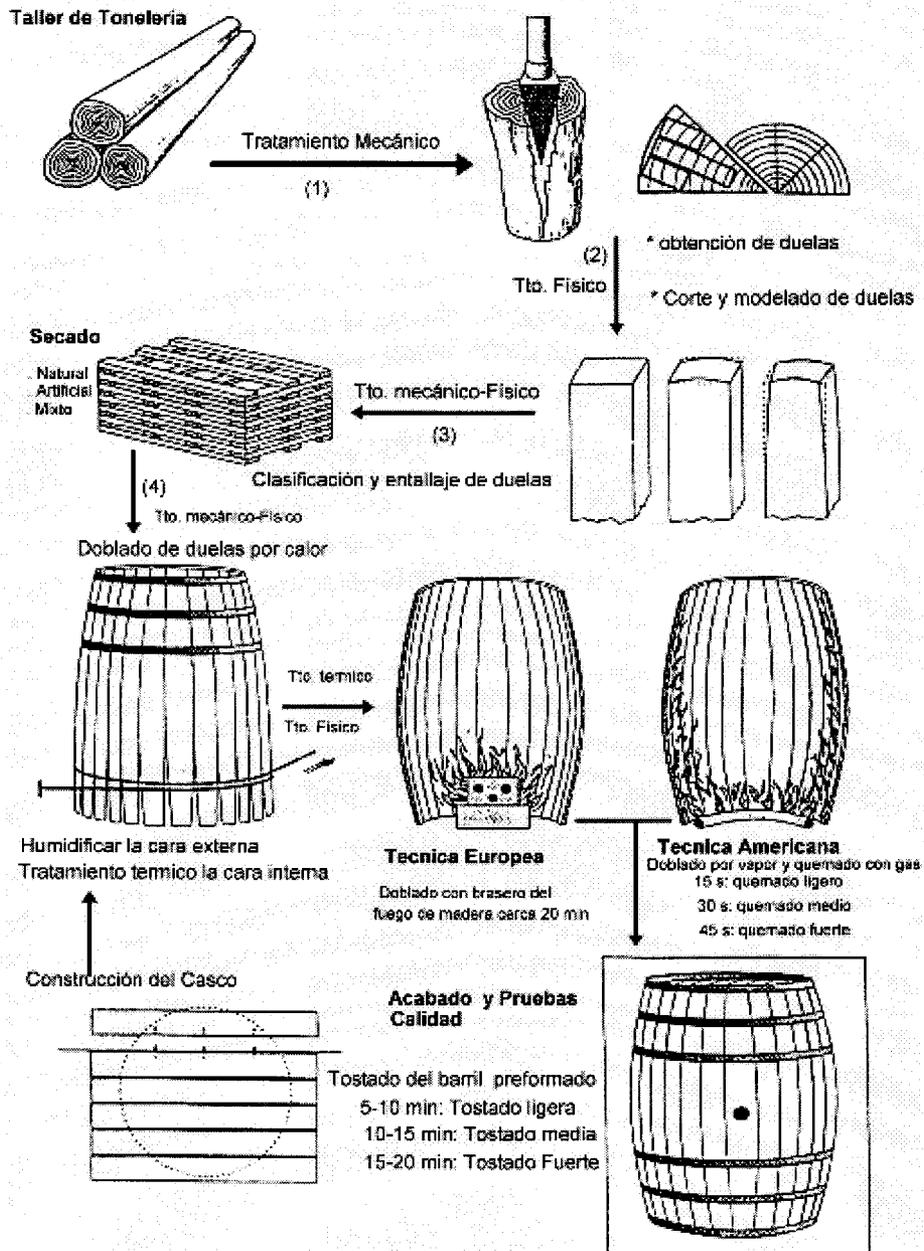


Fig 2.13 Acondicionamiento del barril (según Puech y Moutounet, 1993)

Figura 8. Acondicionamiento del barril (Puech y Moutounet, 1993).

b) Construcción de la barrica:

Durante el tratamiento térmico que se realiza en la elaboración de las barricas, la parte interna de las duelas que la componen, debe someterse a un quemado y a una humidificación para, de esta manera, conseguir el doblado de las mismas sin que lleguen a partirse (Artajona, 1991).

Dependiendo de la intensidad del quemado y tiempo medio de tostado podemos hablar de tres tipos de quemado (Mosedale y Puech, 1998):

- Ligerito: cuando el quemado se realiza en un tiempo medio de 5-10 minutos.
- Medio: cuando el quemado dura un tiempo medio de 10-15 minutos.
- Fuerte: cuando este se realiza en un tiempo medio de 15-20 minutos.

Con respecto a la temperatura de quemado, Schuetz (1986) afirma que ambos robles, americano y francés, liberan agua a 100°C. La pérdida de sólidos empieza a 250°C aumentando hasta una temperatura de 310°C, llegando a doblarse a 360°C. Alrededor de un 70% del peso original se pierde a temperatura de 400°C. La pirólisis de la hemicelulosa es completa a temperaturas entre 220 y 300°C. La pirólisis de celulosa ocurre a temperaturas entre 310 y 380°C con oxidación de sólidos residuales entre 460 y 500°C.

La mayor o menor intensidad del quemado se realiza de una forma totalmente empírica caracterizando así el arte de cada maestro tonelero. Asimismo, se aplica el procedimiento del tostado una vez que el barril ha sido preformado o terminada su construcción.

La Tabla 2 describe las temperaturas mínimas y máximas correspondientes a los diferentes calentamientos (Sarni et al., 1990a). En el

transcurso del calentamiento fuerte, en el interior de la barrica se pueden alcanzar temperaturas superiores a 300°C. Si estas temperaturas se mantienen varias decenas de segundos puede producirse una inflamación de la barrica. Es de destacar que en Estados Unidos el cimbrado de las duelas se efectúa con vapor de agua.

Tabla 2. Temperatura de caldeo.

Fase	Duración (minutos)	Temperatura °C		Características
		Mínima	Máxima	
Cimbrado	20-30	50	200	Elevación gradual de la temperatura
Caldeo ligero	10	120	225	Caldeo superficial de las duelas
Caldeo medio	10-15	120	275	Caldeo en profundidad de las duelas
Caldeo fuerte	15-20	200	350	Exposición a fuertes temperaturas.

Después de la elaboración del casco de la barrica, las piezas de los fondos se unen entre sí mediante pasadores de madera. En general los fondos, que representan el 25% de la superficie de la barrica, no se calientan (Puech et al., 2000b).

2.4.2.- Composición química de la madera

Los factores que afectan a los compuestos presentes en la madera son el origen geográfico del roble y el tratamiento térmico al que son sometidas

para la construcción de las barricas (Towey y Waterhouse, 1996b; Miller y Howell, 1992).

La madera de roble químicamente está compuesta por sustancias de tipo macromolecular como son la celulosa, la hemicelulosa y la lignina y en menor medida otros componentes como son los galotaninos y elagitaninos. Nos encontramos también con otros compuestos en menor concentración y de bajo peso molecular como son ácidos volátiles y no volátiles, azúcares, esteroides, terpenos, fenoles volátiles y lactonas (Maga, 1984; Nykanen, 1983) (Figura 9).

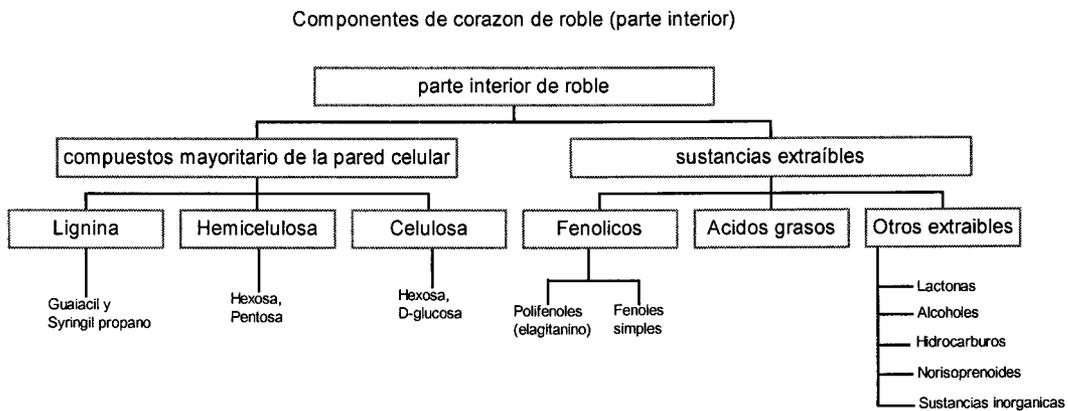


Figura 9. Componentes de corazón de roble.

Los polímeros celulosa, hemicelulosa y lignina se encuentran en la madera formando redes insolubles (Fengel y Wegener, 1984).

La celulosa se encuentra en una proporción cercana al 40% (Tabla 3) del total de los compuestos que constituyen la madera siendo, por tanto, el componente más abundante. Es un polisacárido constituido únicamente por moléculas de glucosa, se presenta en forma de agregados fibrilares cristalinos.

Tabla 3. Análisis cuantitativo de los componentes mayoritarios de la madera (Puech et al., 2000b).

Roble	Celulosa %	Hemicelulosa %	Lignina %
Quercus róbur	41.1	22.2	29.6
Quercus spec. Roble	40.5	23.3	22.2
Madera de corazón	37.6	28.6	24.5
Roble blanco americano	50.0	22.0	32.0

La hemicelulosa está constituida por polímeros de azúcares (arabinosa, xilosa, manosa, galactosa), que se unen con ácidos urónicos. La hemicelulosa se encuentra en un 23% de forma amorfa o paracristalina, en las paredes celulares.

La madera no tratada térmicamente contiene pequeñas cantidades de furfural y alcohol furfurílico, derivados de guayacol, eugenol y vainillina, y los isómeros *cis* y *trans* de β -metil- γ -octalactona (Sefton, 1993).

Los polisacáridos, celulosa y hemicelulosa cuando sufren un tratamiento térmico, dan lugar a la formación de aldehídos furánicos. Concretamente, la glucosa de la celulosa origina 5-metilfurfural y 5-hidroximetilfurfural y las pentosas (arabinosa y xilosa) de la hemicelulosa son las responsables de la aparición del furfural (Chatonnet et al., 1989; Guymon y Crowell, 1972; Onishi et al., 1977; Villalón et al., 1991). Según sea el tiempo y la intensidad del quemado al que haya sido sometido el roble, la cantidad de aldehídos furánicos extraíbles variará, siendo máxima durante el quemado de intensidad media, y disminuyendo en el quemado fuerte (Chatonnet et al., 1989). El furfural se forma en mayor cuantía y es el responsable de dar a las

bebidas alcohólicas envejecidas en madera el carácter de fruto seco, especialmente a almendras tostadas (Sauvageot y Feuillat, 1999; Spillman et al., 1998; Chatonnet et al., 1999).

La fragmentación de la cadena carbonada de estos productos primarios de deshidratación da lugar a la formación de otros compuestos, como son ácido levulínico, ácido fórmico, acetal, acetoína, diacetilo o los ácidos láctico, pirúvico y acético (Whistler y Daniel, 1993).

La lignina es un polímero de fenil propanos (Figura 10) y llega a representar el 25%-30% de la composición total de la madera (Tabla 3). Se distribuye impregnando la matriz polisacáridica de las paredes de las células que componen la misma, siendo su constituyente fundamental (Chatonnet et al., 1989).

Sólo una pequeña proporción de la lignina es fácilmente soluble y en consecuencia puede extraerse durante la maduración. La lignina se solubiliza por la hidrólisis de los enlaces alfa y beta arílicos (Figura 10). Los enlaces beta arílicos de la lignina son estables a percolación prolongada con agua a 100°C y requieren la presencia de ácidos fuertes para su separación (Conner et al., 1992). El enlace éter beta arílico es el más abundante en las uniones interfenil propano (40-60%) de la lignina (Higuchi, 1985).

La lignina es parcialmente degradada en el transcurso del secado al aire; conduce a la aparición de vainillina y siringaldehído en estado de trazas. La degradación afecta a las unidades monómeras terminales implicando la aparición de compuestos de tipo hidroxicinámico. La ruptura de la doble unión en alfa-beta conduce a la aparición de aldehídos benzoicos. Comparado con el efecto de los calentamientos, los contenidos de productos de degradación de la lignina durante el secado de la madera son pequeños (Puech et al., 2000b).

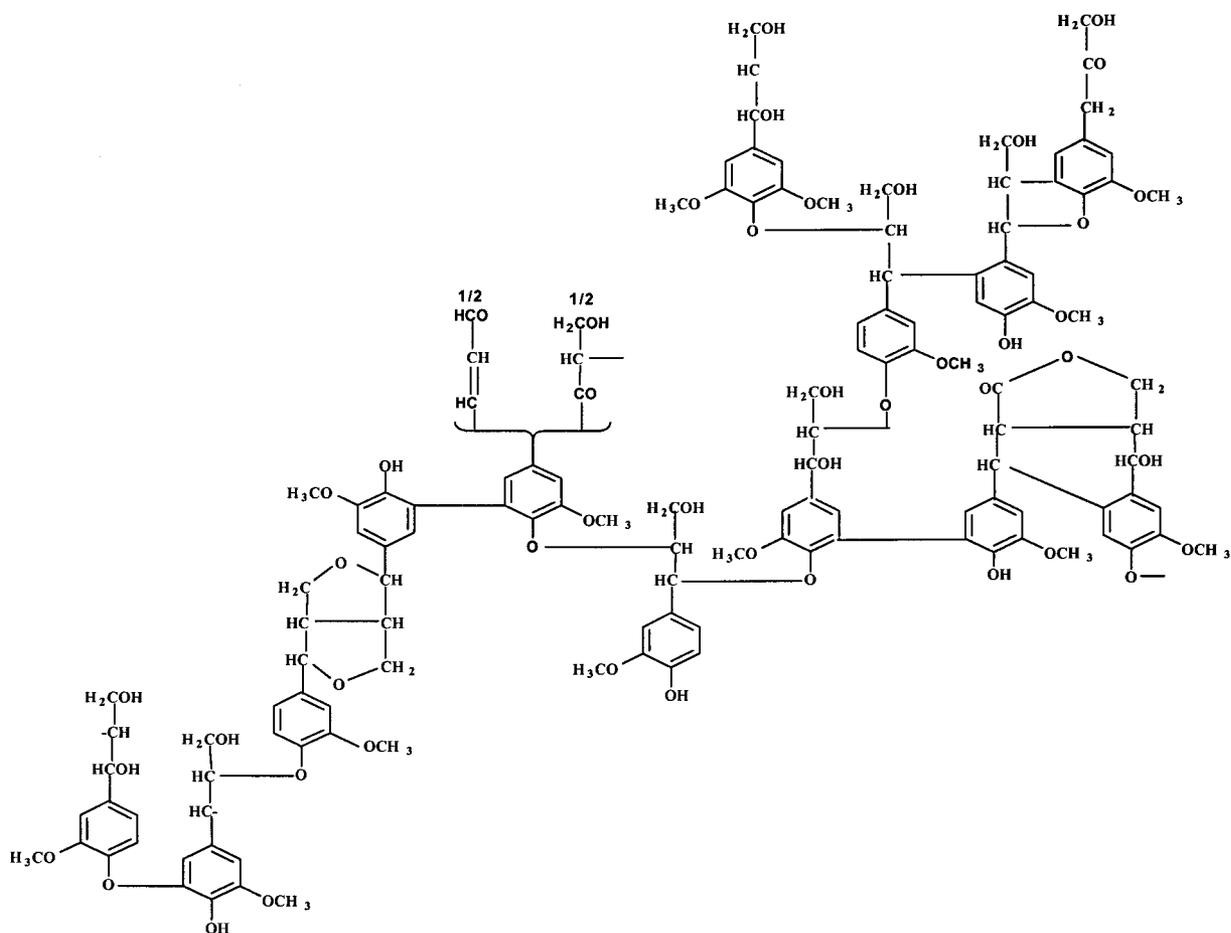


Figura 10. Estructura de la lignina.

Cuando la lignina es sometida a la acción del fuego se degrada formando fenoles volátiles, aldehídos fenólicos (benzoicos y cinámicos) y fenilcetonas. La oxidación subsiguiente de estos aldehídos da lugar a ácidos aromáticos (Puech et al., 1977). A 120°C se forman los aldehídos fenólicos (Nishimura et al., 1983; Sarna et al., 1990b) como es la vainillina (4-hidroxi-3-metoxibenzaldehído), esta influye directamente en el aroma de los vinos envejecidos en madera dando el carácter de vainilla (Puech, 1987); el siringaldehído (hidroxi-3,4-dimetoxibenzaldehído), que también se le relaciona con el atributo de vainilla de los vinos (Chatonnet et al., 1999; Chatonnet,

1988). A temperaturas elevadas, próximas a 200°C, la degradación de la lignina produce diversos fenoles volátiles y entre ellos los más destacados son el guayacol (o-metoxifenol), responsable del aroma a tostado en vinos (Aiken y Noble, 1984; Guymon y Crowell, 1972; Hale et al., 1999; Chatonnet, 1988). Eugenol (2-metoxi-4,2-propenilfenol) contribuye al carácter especiado a clavo y a humo en vinos envejecidos en madera (Aiken y Noble, 1984; Feuillat et al., 1999).

La sensibilidad de la lignina a la degradación térmica disminuye a temperaturas entre 220°C-230°C, por lo que la formación de derivados fenólicos también se ve desfavorecida (Chatonnet et al., 1989).

Además de la degradación de la lignina que se produce por el tostado y quemado (termólisis) hay que considerar la debida a la hidrólisis producida por etanol (alcoholisis) y agua durante la maduración. Para barriles muy usados, la hidrólisis resulta ser la vía principal de cesión de sustancias a partir de la lignina. A lo largo del envejecimiento, la lignina es parcialmente degradada por una hidroalcoholisis a temperatura ambiente próxima a la hidrólisis, con formación de los compuestos monómeros correspondientes, asociados al desarrollo de aroma a madera de todos los compuestos que se incorporan al vino por alcoholisis de la lignina, el más importante sin duda es la vainillina. La acidez del medio, al que se añade un proceso de hidrólisis que libera ácido acético a partir de los xilanos de la madera que refuerza esta acidez, cataliza la degradación de las macromoléculas (Puech et al., 2000b). En el caso del envejecimiento de vinagres, es de esperar que este fenómeno sea aún más acusado.

Chen (1970) y después Seikel et al, (1971) han señalado la presencia de galotaninos en la madera de médula de *Quercus alba* y *Quercus rubra*. Este dato es retomado después en la literatura enológica aunque ninguna estructura de galotaninos haya sido claramente identificada, hasta hoy, en la

madera de roble. Esta familia de taninos sería, en cualquier caso, cuantitativamente minoritaria en la madera de médula con respecto a la familia de elagitaninos.

Los galotaninos son precursores de elagitaninos. Las reacciones necesarias para convertir uno en otro son oxidación y acilación. Los taninos elágicos son ésteres hexahidroxidifénicos de tipo C-glicosídico, muy extendidos en las angiospermas dicotiledóneas, especialmente en el género *Quercus*. Han sido puestos en evidencia en la madera de *Quercus alba* y *Quercus rubra* (Chen, 1970; Seikel et al., 1971) pero son objeto de estudios más detallados en la madera *Quercus robur* y *Quercus petraea*. El elagitanino se llama así porque tras hidrólisis en medio ácido o alcalino produce ácido elágico, insoluble en agua (Fernández-Izquierdo, 1998).

Los vinos y bebidas a base de frutas contienen elagitaninos, pero en la bibliografía aparecen los valores correspondientes a ácido elágico, ya que la determinación de elagitaninos es difícil. Sin embargo, el ácido elágico sí es común en vinos envejecidos.

Los *isómeros cis* y *trans* β -metil- γ -octalactona, comúnmente conocido como whisky lactona fue descubierta en el bourbon (Suomalainen y Nykanen, 1970), químicamente tienen su origen en los lípidos del roble (Mosedale et al., 1999). Son los responsables del aroma a madera y a coco (Pollnitz et al., 1999; Chatonnet, 1995; Boidron, Chatonnet, y Pons, 1988; Pérez-Coello et al., 1999; Spillman et al., 1988; Spillman, 1977). Presenta bajos umbrales de percepción 92 $\mu\text{g/L}$ para el isómero *cis* y 460 $\mu\text{g/L}$ para el isómero *trans*. Altas concentraciones de este compuesto asocia a los vinos un perfume intenso a vainilla (Boidron et al., 1988; Feuillat et al., 1999; Spillman et al., 1988).

2.4.3.- Cambios durante el envejecimiento

Durante el envejecimiento se producen cambios en la composición química del producto envejecido que van a determinar las características organolépticas. Los fenómenos implicados incluyen (Mosedale y Puech, 1998):

- Evaporación de los compuestos volátiles (moléculas pequeñas) y concentración de las moléculas grandes.
- Extracción directa de los compuestos de la madera.
- Descomposición de macromoléculas de la madera y posterior extracción de los productos.
- Reacción entre los componentes de madera y el producto que va a envejecer.
- Reacción entre compuestos de la madera.
- Reacciones entre los compuestos del producto a envejecer.
- Procesos químicos como oxidación e hidrólisis (Cantagrel et al., 1995).

Como se ha expuesto anteriormente, los barriles de madera presentan gran variabilidad en su composición y características físicas. Esta variabilidad se puede deber tanto a las distintas especies de roble como a las prácticas toneleras: acondicionamiento y tostado. Incluso barriles del mismo origen, sometidos a idénticos tratamientos pueden presentar diferente comportamiento durante el envejecimiento de vinos (Towey y Waterhouse, 1996). En general, los cambios que sufren se detallan a continuación y se pueden agrupar en evaporación, extracción de la madera, oxidación y reacción entre los componentes.

Evaporación

Están bien descritas las pérdidas de volumen durante el envejecimiento de bebidas alcohólicas que se conocen con el nombre de mermas. Así, se observa un decremento del 2% al 3% del volumen en un año de maduración, dependiendo del tamaño de la barrica, temperatura, humedad relativa, circulación de aire alrededor del barril. Se ha demostrado que tanto el agua como el etanol escapan del barril intacto durante el envejecimiento de bebidas alcohólicas (Guymon, 1972; Guymon y Crowell, 1970).

Cuando la humedad ambiente es elevada las pérdidas de etanol pueden superar a las de agua y se ha verificado que, en estas condiciones, se produce una extracción superior de fenoles.

El agua, debido a su bajo peso molecular (18), tiene un grado de difusión más alto que otras sustancias, como el oxígeno (PM=32) o nitrógeno (PM=28) aunque también se producen pérdidas de etanol (PM=46) debido a la difusión y evaporación. La temperatura y la humedad influyen las pérdidas de volumen siendo la temperatura la que en mayor medida determina este fenómeno. La humedad ambiental crea un gradiente en contra de la evaporación de agua; sin embargo, el etanol no tiene que vencer gradiente alguno. Cuando la humedad ambiental es baja, la evaporación del agua será superior a la del etanol y cuando la humedad sea alta el etanol se evaporará más que el agua (Singleton, 1995). Como consecuencia, en el interior de la barrica el volumen disminuye y los constituyentes volátiles y no volátiles se concentran, pero la concentración del etanol en el volumen restante depende de la velocidad relativa de pérdida de agua y etanol.

En vinagres de Jerez sometidos a un envejecimiento estático se producen mermas como consecuencia de la evaporación y esto hace que

tenga lugar un aumento del extracto seco, y un aumento del grado de acidez (Tsfaye, 2001)

Extracción de la madera

La cantidad de sustancias extraídas de un barril en un tiempo dado es proporcional a la relación superficie/volumen; es decir, el tamaño del barril tiene importancia en la concentración de los fenoles en el producto envejecido. Una barrica comercial presenta un volumen de 225 L y una relación superficie/volumen de $90 \text{ cm}^2/\text{L}$, siendo esta de aproximadamente $198 \text{ cm}^2/\text{L}$ para barriles de 20 L. Así pues, el grado de extracción en un barril pequeño sería el doble, ya que es directamente proporcional a dicha relación. Igualmente, hay que tener en cuenta la edad de la vasija, conforme aumenta la edad disminuye la capacidad de cesión de sustancias.

Se ha estudiado la cinética de la extracción fenólica en botas de 20 L. Los resultados de este estudio muestran una rápida disolución de fenoles totales los primeros días, debido a la disolución de los fenoles de la superficie de la madera. A partir de la segunda semana en adelante, la extracción disminuyó. Mediante un modelo matemático basado en la capacidad de cesión de fenoles, concluyen estos autores que el mecanismo de transporte de fenoles no es la difusión ya que un modelo de flujo capilar, en el que la penetración del líquido en la madera es el factor limitante, explica mejor los resultados obtenidos.

Numerosas publicaciones tratan sobre la extracción de compuestos a partir de la madera, tanto volátiles como no volátiles, y su contribución a las características sensoriales del vino (Lebrun et al., 1991; Maga, 1985; Pontallier et al., 1992; Rous y Alderson, 1983; Aiken y Noble, 1984; Francis et al., 1992; Pocock et al., 1994).

Así, cuando el etanol está en mayor contacto con la matriz de la madera y debido al efecto de la alcoholisis de la lignina, la extracción de los aldehídos es superior y se extraen siringaldehído, coniferaldehído, sinapaldehído y vainillina (Puech, 1987). En el vino, aunque la vainillina esté en menor concentración que el resto de los aldehídos, al ser el umbral de detección menor, su contribución a las características sensoriales es notable. Los umbrales de estas sustancias en disolución del 10% de alcohol son (Singleton, 1995):

Vainillina	0.5 mg/L
Siringaldehído	≈25 mg/L
Sinapaldehído	80 mg/L
Ácido vainílico	≈25 mg/L
Ácido siríngico	≈25 mg/L

Los extractos de madera de roble contienen igualmente ácidos vainílico y siríngico (Puech et al., 1988). Durante la evaluación sensorial de vino blanco en madera (Pocock et al., 1994), se detectaron compuestos volátiles derivados de la madera a concentraciones muy bajas.

El vinagre de Jerez envejecido en madera contienen componentes fenólicos extraídos de la madera como son aldehídos fenólicos (vainillina y siringaldehído), ácidos fenólicos (cumárico y cafeico, protocatéquico, vainílico y p-hidroxibenzoico), aldehídos furánicos (5-hidroximetilfurfural y furfural) (Tsfaye, 2001).

Además de celulosa, hemicelulosa y lignina, la madera de roble contiene aproximadamente un 10% de fenoles extraíbles, esencialmente elagitaninos (Scalbert et al., 1988; Scalbert et al., 1989). Estos compuestos se extraen fácilmente del polvo de la madera en disoluciones agua-alcohol o

agua-acetona (Peng et al., 1991), son solubles en agua y menos solubles en alcohol puro.

El ácido elágico, procedente de la hidrólisis de los elagitaninos, es un constituyente común en vinos envejecidos en madera (Moutounet et al, 1989). Cuando se envejece en vino nuevos, su concentración en el vino puede llegar a alcanzar los 50 mg/L (Clifford y Scalbert, 2000; Virot et al., 1993; Laszlavik et al., 1995). La mayoría de los elagitaninos son extraíbles y su concentración máxima se alcanza en el primer año de envejecimiento (Peng et al., 1991). Los elagitaninos se solubilizan rápidamente durante los primeros años de envejecimiento de las bebidas alcohólicas, no obstante, simultáneamente se degradan a ácido elágico (Virot et al., 1993). Igualmente, habrá que tener en cuenta el proceso de degradación sufrido por este tipo de taninos en la madera, lo que también incrementaría el contenido de ácido elágico en aguardientes (Sarni et al., 1990b; Puech y Moutounet, 1992). Scalbert et al. (1991) estudiaron los elagitaninos que se extraen de la madera de roble durante la fase inicial del envejecimiento de las bebidas alcohólicas, identificando los compuestos principales como, castalgina, vescalgina, roburina E y el dímero de roburinas A-D.

La solubilización de los fragmentos de la estructura de lignina requiere la ruptura de los enlaces covalentes. Así pues este proceso es más lento que el anterior pero permanece durante todo el período de envejecimiento.

Por otra parte, aunque no se ha estudiado la presencia de cumarinas en vinagres envejecidos, se han detectado cantidades de cumarinas en aguardientes de Armagnac (Bricout, 1971) y en muestras de Cognac (Joseph y Marche, 1972). El contenido en cumarinas es característico de todas las bebidas sometidas a un envejecimiento ya que tienen su punto de partida en la madera (Otsuka y Zenibayashi, 1974). La escopoletina es la más abundante de las cumarinas (esculetina, umbeliferona y β -metilumbeliferona)

puestas en evidencia en la madera de *Quercus rubra* (Seikel et al., 1971) y en la madera de roble de origen europeo (Puech y Moutounet, 1988a). La madera de roble americano se caracteriza por sus contenidos elevados de escopoletinas (Puech y Moutounet, 1988a).

La extracción de compuestos volátiles procedentes de la madera depende de la cantidad de compuestos que originalmente están presentes en un barril nuevo potencialmente extraíble y otros factores como el tiempo de contacto entre el sustrato sometido a envejecimiento y la madera (Garde et al., 2002a). Los factores que afectan el contenido de extracción del roble, son la especie y el origen geográfico de la madera (Chatonnet, 1991; Miller et al., 1992), las condiciones de maduración de la misma (Sefton et al., 1993; Vivas y Glories, 1993), el tostado de los barriles (Chatonnet et al., 1989) y la edad de los barriles (Chatonnet, 1991).

Aunque cientos de compuestos volátiles han sido identificados en madera de roble no tostada (Chatonnet, 1991; Maga, 1984; Nishimura et al., 1983), relativamente son pocos compuestos volátiles los que efectivamente se extraen en cantidades significativas (Chatonnet, 1991; Sefton et al., 1993). Entre estos nos encontramos con la vainillina, eugenol, derivados del guayacil y los isómeros cis y trans de la β -metil- γ -octalactona (Kepner et al., 1972). Otros compuestos volátiles, son originados por la degradación térmica de la lignina, celulosa y hemicelulosa durante el proceso de tostado. El tostado puede aumentar los niveles de estos compuestos encontrados en roble no tostado (Chatonnet et al., 1989).

Eugenol y vainillina extraídos de la madera de roble son compuestos que proceden de la degradación de la lignina o incluso como productos de la biosíntesis de la lignina. El eugenol tiene un aroma a clavo y su concentración puede aumentar en función del nivel de tostado (medio o fuerte) cuando los barriles son quemados. La vainillina, principal compuesto aromático de

vainilla natural (Clark, 1990), es generalmente considerado por su importante contribución en la calidad de vino y bebidas espirituosas envejecidas en barriles de madera de roble (Sefton et al., 1993). La concentración de vainillina en la madera puede verse incrementada por el calentamiento (Nishimura, 1983; Chatonnet, 1989).

Las lactonas de la madera están entre los compuestos volátiles más importantes que contribuyen al aroma de bebidas envejecidas en barriles. La concentración total de estos compuestos presenta grandes diferencias según el tipo de madera empleado e incluso la ratio de sus isómeros está condicionada por el origen de la misma. La concentración de estos compuestos puede verse incrementado por el tostado (Chatonnet, 1989; Maga, 1989 a). El calentamiento y carbonizado de la madera parece no afectar la ratio de los dos isómeros whiskylactona y consecuentemente esta ratio ha sido usado como índice para identificar maderas de diferentes especies y diferente origen geográfico (Pérez-Coello et al., 1997; Waterhouse y Towey, 1994).

Oxidación y Reacción entre los componentes

El oxígeno juega un papel importante en muchas de las reacciones químicas que ocurren durante el envejecimiento. Los fenómenos de oxidación se consideran generalmente favorables, o incluso indispensables, para el apropiado desarrollo del aroma en los vinos generosos, olorosos o dulces. En el caso del vinagre la oxidación es un fenómeno inherente al producto (Cutzach et al., 2000).

El oxígeno podría difundir entre los poros de la madera para alcanzar, bien el líquido contenido en el barril, bien el aire de la superficie. Para ello, debería vencer la corriente de agua y alcohol que va en sentido contrario. Si fuera este el caso, podría reaccionar con los componentes de la madera

susceptibles de ser oxidados tales como el ácido gálico antes de llegar a la propia bebida.

A lo largo de la crianza en barrica en ambiente reductor, Ribéreau-Gayon (1931) estableció que la cantidad de oxígeno que penetra en los vinos tintos varía entre 15 y 40 mg/L y año, según las prácticas de las bodegas.

Durante el envejecimiento, se pueden producir reacciones en las que están implicados compuestos de la materia prima a envejecer y compuestos que se extraen de la madera, vía oxidación-reducción, esterificación, reacciones de Maillard, polimerización y policondensaciones (Mosdale y Puech, 1998).

El acético puede proceder de la madera, como se ha demostrado con ^{14}C en el caso del envejecimiento del Whisky (Reazin, 1981, Reazin, 1983). La oxidación del etanol es una reacción acoplada al peróxido de hidrógeno que se produce en la oxidación de fenoles. En un segundo estadio, el ácido acético esterifica al etanol formando acetato de etilo.

El oxígeno disuelto en el aguardiente entraña la formación de peróxidos, oxidantes intermedios, que transmiten su oxígeno a otros constituyentes que posean una forma oxidada más estable que la suya (Djanpoladyan y Petrosyan, 1957; Wildenradt y Singleton, 1974).

Los elagitaninos en las bebidas alcohólicas o bien se hidrolizan durante el envejecimiento o bien pueden oxidarse, ya que los destilados siempre contienen oxígeno (Mourgues et al., 1973). Los productos de oxidación fenólicas se polimerizan con lo cual apenas difunden al seno del líquido que está envejeciendo y se vuelven pardos formando una interfase marrón en la madera.

Se admite en general que los ácidos benzoicos se pueden generar a partir de los aldehídos correspondientes por proceso de oxidación. Las reacciones oxidativas son responsables de la generación de vainillina y siringaldehído de los fragmentos de ligninas durante el envejecimiento (Virost et al., 1993).

2.4.4.- Nuevas estrategias de envejecimiento: envejecimiento acelerado

El envejecimiento por el sistema tradicional supone unos enormes costes económicos. Con el fin de disminuir su tiempo de almacenamiento y reducir los costes se han desarrollado métodos de envejecimiento acelerado con aplicación de calor, frío, e incluso temperatura de congelación (Lafont, 1971) o borboteo de oxígeno (Krolenko et al., 1981) o ambos simultáneamente (Semenenko et al, 1982; Mendzhoyan et al., 1989).

Pero las intervenciones del hombre para dirigir el envejecimiento son muy diversas. Puede limitarse a establecer las mejores condiciones de temperatura, de aireación y de conservación, con el fin de que las transformaciones naturales se produzcan en las mejores condiciones. Puede también, conociendo los procesos de envejecimientos naturales y sus factores principales, acelerar esas condiciones y factores, y ampliar los fenómenos para conseguir el mismo resultado de modo más rápido.

Los procedimientos mejor estudiados de envejecimiento provocado son los que ponen en juego oxidaciones fuertes con variaciones importantes de temperatura. Consisten en realizar sucesivamente cambios bastante elevados de temperatura, oxigenando todo el producto. La idea directriz es reproducir y respetar, de manera alterna por medios artificiales, las condiciones del verano, que envejecen los vinos, y las condiciones de invierno, que los estabilizan (Peynaud, 1999).

Sin embargo, la técnica que se ha usado con más éxito emplea extractos de madera de roble (Puech, 1987; Puech y Moutounet, 1992). Dichos extractos se preparan mediante cocción, infusión, percolación y maceración (Mangas et al., 1996) de la madera que puede o no haber sido sometida previamente a tratamientos físicos (como ultrasonido, presiones elevadas o tratamiento térmico) o químico (con ácidos o bases).

Para obtener extractos con un contenido en fenoles similar al de vinos olorosos se ensayaron distintos procedimientos de quemado controlando la temperatura y el tiempo de quemado. De once compuestos fenólicos ensayados (ácidos gálico, protocatéquico, p-hidroxibenzoico, siríngico, vainílico, cafeico, cumárico y ferúlico, siringaldehído, vainillina y sinapaldehído), sólo el ácido gálico estaba influenciado por la temperatura. Por otra parte, se pone de manifiesto que los macerados elaborados con virutas tostadas a 180°C durante 3 horas son los que tienen una composición fenólica más parecida a las muestras comerciales de oloroso (Monedero et al., 1999).

2.5.- Análisis Sensorial

2.5.1.- Bases científicas

La calidad sensorial de un alimento no es una característica propia, sino el resultado de la interacción entre el alimento y el hombre, por lo que puede ser definida como la sensación humana provocada por determinados estímulos procedentes del alimento, mediatizada por las condiciones fisiológicas, psicológicas y sociológicas de la persona o grupo de personas que la evalúa (Sancho et al., 1999). Este tipo de análisis pretende explicar, al menos parcialmente, la relación compleja entre el individuo y el producto que consume (Nicod, 2000).

El consumo de productos alimentarios no sólo cubre las necesidades nutricionales del organismo, sino que además aporta la sensación de placer producida al comer (Issanchou, 1988). La percepción de la calidad de un producto puede estar influenciada por factores externos (marca, imagen, embalaje) que hacen que la medida real de aceptabilidad de un producto sea más compleja de lo que se prevé (Nicod, 2000).

Comparando y analizando las características de los productos que los consumidores aprecian o rechazan, la evaluación sensorial contribuye a destacar los aspectos positivos y negativos y a adaptarlos para responder mejor al gusto de los consumidores (Torre, 2000), y de este modo dar lugar a la llamada calidad sensorial. Como calidad sensorial se entiende el placer de comer que resulta de la suma compleja de una serie de sensaciones visuales, olfativas, táctiles, gustativas y auditivas (Llamazares y Martínez, 2001) y que permiten apreciar el aspecto, flavor y textura de los alimentos (Duran y Costell, 1999).

La evaluación de los alimentos mediante los sentidos o análisis sensorial es una función primaria del hombre que, desde su infancia y de una forma inconsciente, acepta o rechaza los alimentos en relación con las sensaciones que experimenta al consumirlos. Ahora bien, las sensaciones que motivan esta aceptación o rechazo varían con el tiempo y el momento en que se perciben: dependen tanto de la persona como del entorno (Sancho et al., 1999). Así, se establecen unos criterios para la selección de los alimentos, criterios que inciden sobre una de las partes de la calidad global del alimento denominada calidad sensorial (Barcina, 2001).

La Asociación Española de Normalización (AENOR) define el análisis sensorial como el examen de las propiedades organolépticas de un producto realizable con los sentidos (UNE 87-001-94).

2.5.1.1.- Qué se mide a través del análisis sensorial

El primer contacto del ser humano con un producto alimenticio se produce habitualmente a través de la vista, el olfato, el oído, el tacto, o bien por dos o tres de estas percepciones sensoriales simultáneamente. Una vez introducido el alimento en la boca intervienen el gusto, e inconscientemente el olfato (vía indirecta), el tacto y el oído (Figura11) (Sancho et al., 1999). En otras palabras, inconscientemente cuando ingerimos un alimento estamos evaluando, su flavor y su textura.

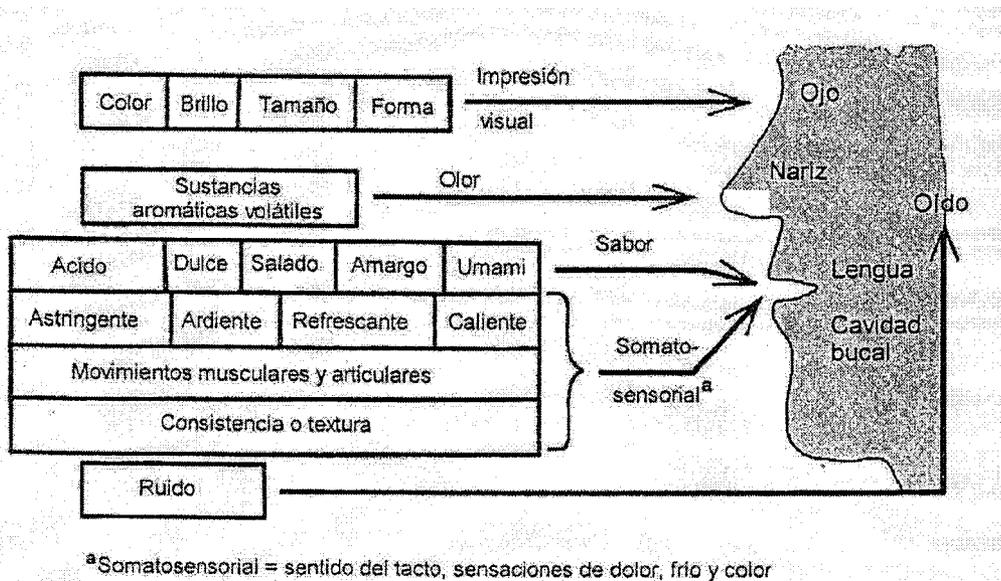


Figura11. Sensograma (Sancho et al., 1999).

2.5.1.1.1.- Aspecto

El aspecto de un alimento es el conjunto de propiedades que se aprecian con la vista (UNE-87-001-94). La visión permite una discriminación a través de impresiones sensoriales producidas por las radiaciones visibles (UNE 87-001-94). El receptor visual que capta la imagen del exterior es la retina, en la cual se localizan los fotorreceptores que son los encargados de convertir la energía luminosa en energía bioeléctrica (Tresguerres, 1999). Existen dos tipos de fotorreceptores: los conos, capaces de distinguir los

colores y los bastones, que detectan la forma y el tamaño de los objetos. Estas células se estimulan a partir de radiaciones electromagnéticas de longitudes de onda comprendidas entre 400 y 700 nm (Daget, 1976). El sentido de la vista nos aporta así información sobre el aspecto de un alimento: estado, forma, tamaño, textura y color (Daget, 1976).

El aspecto es normalmente el único atributo sobre el cual basamos la decisión de compra o de consumo; por este motivo el impacto visual es un elemento utilizado por la industria alimentaria para atraer al consumidor sobre un determinado producto (Daget, 1976).

Sauvageot (1991) define el “flaveur” como el conjunto de estímulos olfato-gustativos y de sensibilidad química común. El término flavor denominado sabor en la norma UNE 87-001-94, es definido como el conjunto de sensaciones percibidas por el órgano del gusto cuando es estimulado por ciertas sustancias solubles.

La normativa UNE no contempla una traducción del término “flaveur” (en francés) como flavor, sino como sabor, y para evitar confusiones utilizaremos el término para referirnos al equivalente “flaveur” y el término sabor, para hacer referencia a cualquiera de los cuatro sabores elementales o 5 sabores si se considera el umami.

En la percepción del flavor intervienen el sentido del gusto, el olfato y el tacto que nos permiten percibir los sabores, olores, aromas y sensaciones trigeminales presentes en los alimentos.

2.5.1.1.2.- Olor y Aroma

El olor es la propiedad organoléptica perceptible por el órgano olfativo cuando inspira determinadas sustancias volátiles (UNE 87-001-94). El aroma

es la propiedad organoléptica perceptible por vía indirecta por el órgano olfativo durante la degustación (UNE 87-001-94 Def. 3.31).

El sistema olfativo aporta información al sujeto sobre su entorno químico (Godinot, 1994). Los olores son percibidos cuando ciertas moléculas activan los receptores del epitelio olfativo, localizados en la parte posterior de las fosas nasales, del septum y de la parte superior de los cornetes (Figura 12) (Shiffman, 1998).

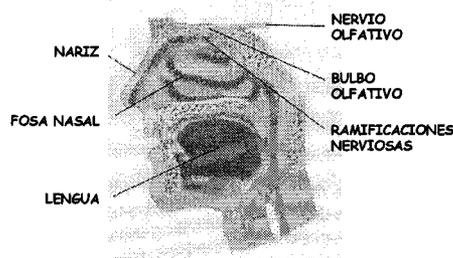


Figura12. Esquema del sistema olfativo.

La nariz humana es sensible a una amplia variedad de olores que a menudo están altamente diluidos (Daget, 1976). Se ha estimado que el ser humano discrimina del orden de 2.000 olores diferentes (Fantino, 1999; Axel, 1995). En vertebrados terrestres sólo los compuestos volátiles de peso molecular inferior a 500 Daltons pueden producir el estímulo olfativo y desencadenar una respuesta (Thorngate, 1997). Estos compuestos deben de poseer además una polaridad adecuada para poder solubilizarse en la

membrana acuosa de la mucosa (Farbman, 1992). La mayoría de estas partículas son lipofílicas por lo que para atravesar el medio, se unen a una proteína de unión (OBP) (Pevsner et al., 1988), que les ayuda a atravesar el medio hidrófilo hasta las células receptoras.

Existen varias teorías que intentan establecer una clasificación de los olores en función del mecanismo de acción. La teoría más aceptada corresponde a la de Amoore et al. (1964), en la que se propone la existencia de una estereoquímica específica del receptor y la molécula olorosa, del mismo modo que una llave encaja en su cerradura. Se acepta que también podrían intervenir otros factores como las propias características eléctricas de la molécula olfativa. En función de esta teoría, se postulan 9 formas diferentes de receptores y, paralelamente, 9 categorías de olores primarios (Tabla 4), que combinados entre sí darían lugar a las restantes impresiones olfativas.

Tabla 4. Estructura estereoquímica correspondiente y olores primarios. (Sancho y col., 1999)

A-DULCE	D-ALCANFORADO	G-GRASO
B-NAFTALÍNICO	E-JAZMÍNICO	H-FLORAL
C-ALMIZCLADO	F-ANISADO	I-LEÑOSO

En el caso de las moléculas de pequeño tamaño en las que apenas existen diferencias en la forma y el tamaño, son los grupos funcionales los que determinan la categoría del olor (Tabla 5). A medida que aumenta el tamaño de la molécula, el grupo funcional pasa a un segundo plano siendo la forma y el tamaño de la misma, los factores que definen el olor (Sancho et al., 1999).

Tabla 5. Grupos funcionales de los olores tomada de Sancho et al., 1999.

PRODUCTO	GRUPO FUNCIONAL	OLOR
Amoníaco	-NH ₂	Penetrante
Acido sulfhídrico	-SH	Huevos podridos
Metil mercaptano	CH ₃ - y -SH	Col podrida

Más adelante, Farbman (1992) propuso otra teoría basada en una organización del sistema olfativo de modo similar al sistema inmunológico en la que existiría una gran población de receptores estímulo-específicos. Buck y Axel (1991) al identificar una familia multigénica de 100 receptores únicamente olfativos, sostendrían esta teoría.

La mucosa olfativa está constituida por dos capas distintas separadas por una membrana basal: el neuroepitelio, donde se localizan las cápsulas de Bownan responsables de las secreciones mucosas, y la lámina propia (Tresguerres, 1999).

Las células olfativas son neuronas bipolares formadas por dendritas, cuyo extremo superior termina en una dilatación llamada botón olfativo del que salen de 5 a 20 cilios que se introducen en el moco y cubren el epitelio, y por un axón que atraviesa la lámina cribosa del etnoides para entrar en el bulbo olfativo y terminar formando una estructura denominada glomérulo (Garrido, 2001; Tresguerres, 1999; Anholt, 1987). Esta configuración específica hace de ella un caso particular de célula nerviosa ya que es a la vez receptora y célula nerviosa sensorial primaria (Sancho et al., 1999).

Para que las sustancias odoríferas aspiradas por la nariz puedan ser percibidas deben solubilizarse en la secreción acuosa que recubre las

terminaciones ciliadas y posteriormente estimular el receptor (Sancho et al., 1999). Aunque el sistema olfativo humano es capaz de discriminar entre unos 2.000 olores, los receptores olfativos utilizan un número limitado de sistemas de transducción de los que sólo se han identificado dos: por activación de adenilato ciclasa o por producción de inositol trifosfato (IP₃) (Fantino, 1999; Tresguerres, 1999; Thorngate, 1997).

Se ha comprobado que las distintas regiones del bulbo olfativo pueden mostrar una actividad diferencial frente a varias categorías o cualidades de los olores, lo cual nos determina otro aspecto importante de este proceso sensorial: la discriminación entre olores (Sancho et al., 1999).

La información, recogida por el bulbo olfativo, se distribuye hacia el paleocórtex donde se produce el fenómeno de percepción consciente del olor (Garrido, 2001; Tresguerres, 1999).

2.5.1.1.3.- Sabor

El sabor se define como la sensación transmitida por las células receptoras del sabor, por lo que se excluyen las sensaciones de calor, frío, dolor e incluso la astringencia (Thorngate, 1997). El ser humano es capaz de percibir y distinguir 5 sabores elementales: dulce, amargo, ácido, salado y umami. El umami fue incluido como sabor elemental hace unos años (Kawamura y Kare., 1987).

La información del gusto tiene su origen en la estimulación, a partir de funciones químicas definidas, de estructuras neurosensoriales específicas denominadas botones o células gustativas (Fantino, 1999). La lengua, es el principal órgano del sentido del gusto, su superficie está recubierta por las denominadas papilas en las que se localizan estos botones gustativos que actúan como receptores sensoriales. Los botones gustativos están formados por grupos de entre dos y doce células (Sancho et al., 1999) (Figura 13).

El ser humano cuenta con 4.000 papilas y el 75% de ellas están localizadas sobre la superficie dorsal de la lengua (Fantino,1999). Las papilas se clasifican por su forma en cuatro tipos: foliadas, filiformes, fungiformes y calciformes. Las papilas foliadas apenas presentan actividad frente a los estímulos gustativos. Las filiformes son principalmente táctiles. Las fungiformes y las calciformes sí son verdaderos receptores del gusto y poseen los botones gustativos sensibles a los sabores específicos (Abdi, 2992; Smith y Margolskee, 2001).

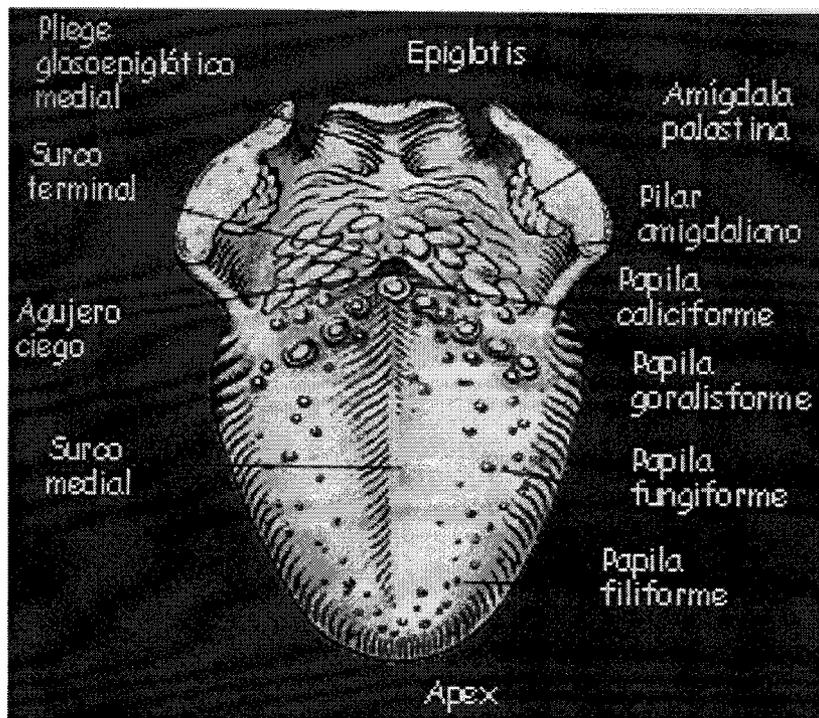


Figura13. Esquema del sistema gustativo.

La sensibilidad a los diferentes sabores se reparte uniformemente por toda la lengua ya que las papilas gustativas pueden responder a más de un sabor elemental (Sancho et al., 1999; Laing y Links, 1996; Arvidson y Friberg, 1980). Todas las sustancias sápidas son percibidas por todas las regiones de

la lengua, a condición de que los botones gustativos estén presentes. La creencia de una localización específica para cada uno de los sabores en diferentes regiones de la lengua, es una interpretación errónea de finales del siglo XIX (Smith y Margolskee, 2001).

El mecanismo de transmisión de la sensación gustativa se activa cuando las sustancias químicas procedentes de los alimentos estimulan las células gustativas al ser liberadas a partir del proceso de masticación y deglución (Schiffman, 1988). La sustancia química tras difundir a través de la saliva, alcanza la célula receptora que está conectada a una fibra nerviosa que transmite la sensación al cerebro (Sancho et al., 1999).

Los estímulos gustativos son compuestos químicos no volátiles y solubles en agua ya que deben actuar siempre en medio acuoso (saliva) (Laing y Links, 1996). El proceso de transmisión del sabor implica la interacción de la sustancia sávida con el receptor correspondiente y para ello la molécula debe de disolverse en la saliva para poder difundir hasta el receptor. Las moléculas lipofílicas como la quinina o algunos edulcorantes artificiales como la sacarina, difundirían por la saliva unida a proteínas transportadoras del mismo modo que ocurre en el olfato (Schmale et al., 1990).

Una vez producida la interacción, la información recibida es enviada al cerebro. Las papilas fungiformes transmiten la información a través de la cuerda del tímpano, una rama del nervio craneal VII. Las papilas caliciformes lo hacen a través del nervio craneal IX o glossofaríngeo y las papilas foliáceas transmiten la información tanto a través de la cuerda del tímpano como del glossofaríngeo. Estos nervios, a su vez, derivan la información a la porción talámica del cerebro y, finalmente, al córtex o corteza cerebral (Abdi, 2002; Faurion, 1992; Kinnamon, 1987).

Según la naturaleza del estímulo, que puede ser interacción de la molécula gustativa a receptores específicos o a canales iónicos localizados en la región apical de las células, la transmisión está asociada o no, a una despolarización (lo más habitual), o a una hiperpolarización de la membrana de la célula gustativa (Fantino, 1999). Esta respuesta es específica de cada sabor:

-SALADO: Esta sensación está producida tanto por el anión como por el catión de una sal que principalmente es el cloruro de sodio (Durán y Costell, 1999).

-ÁCIDO: El estímulo lo constituye una concentración potencial de iones hidrógeno (H^+) y es considerado como el sabor más simple desde un punto de vista físico-químico (Durán y Costell, 1999).

-DULCE: Las estructuras químicas de las sustancias dulces son diversas: disacáridos como la sacarosa, sales inorgánicas, dióxidos de oxatiazinona como el acesulfamo-K, aminoácidos como el glutamato, péptidos como el aspartamo, proteínas o polialcoholes como el sorbitol o el xilitol (Schiffman, 1988). La teoría más aceptada para describir la estructura química responsable de esta sensación es la de Shallenberger y Acree (1967) basada en la unidad estructural HA/B a la que posteriormente se le añadió un tercer componente X (Sancho et al., 1999). A y B son átomos electronegativos (oxígeno, nitrógeno o cloro), H es un átomo de hidrógeno y X un resto apolar de la molécula. El grupo HA es un donante de protones y B otro receptor de protones separados por una distancia de entre 0.25-0.40 Amstrongs. Los receptores del sabor dulce tienen una estructura complementaria a esta estructura que se unen a los de la molécula estableciendo enlaces por puentes de hidrógenos.

-AMARGO: La percepción del sabor amargo producido por compuestos como la quinina o la cafeína, puede explicarse de un modo similar a la percepción del sabor dulce, ya que estas moléculas también presentan una estructura HA/B, pero en este caso la distancia entre A y B debe de estar comprendida entre 1-1.5 Amstrongs (Sancho et al., 1999) para que la sensación sea percibida como amarga.

-UMAMI: Este sabor ha sido aceptado, recientemente como un sabor elemental (Kawamura y Kare, 1987). El principal responsable de este sabor es el glutamato monosódico, así como algunos nucleótidos, 5'-ribonucleótidos, tales como el inosinato y guanilato (Yamaguchi y Ninomiya, 2000), que disueltos en agua producen una sensación no agradable, pero que añadidos a algunos alimentos refuerzan otros sabores como el dulce o el salado (Durán y Costell, 1999). La percepción del sabor umami podría implicar receptores del glutamato presentes en algunas células gustativas (Fantino, 1999)

2.5.1.1.4.- Sensaciones trigeminales

Las sensaciones trigeminales producen una irritación del trigémino que generalmente se manifiesta como sensaciones irritantes o agresivas percibidas en la cavidad bucal (UNE 87-001-94). El sistema trigeminal integra diferentes modalidades sensoriales tales como el tacto, la temperatura, y sensaciones propioceptivas y nociceptivas (Abdi, 2002). Estas sensaciones son tanto químicas como táctiles y son percibidas por las papilas filiformes (Smith y Malgorskee., 2001) que a su vez están inervadas por el nervio craneal V, o trigeminal (Thorngate, 1997).

Como sensaciones trigeminales podemos citar la ardiente, astringente, refrescante, caliente, templado o metálico.

2.5.1.1.5.- Textura

La textura es el conjunto de propiedades mecánicas, geométricas y de superficie de un producto perceptibles por los mecano-receptores, los receptores táctiles y en ciertos casos los visuales y auditivos (UNE 87-001-94.).

El sentido del tacto permite el reconocimiento de la forma o el estado de un producto por el contacto directo con la piel (UNE 87-001-94). Este sentido está localizado en las terminaciones nerviosas que están situadas justo debajo de la piel de todo el cuerpo. A través del tacto obtenemos información sobre la textura, forma, peso, temperatura y consistencia de un producto a dos niveles: en las manos y en la boca. La información recibida en las manos completa la información recibida a través de la vista y en boca, a través de los receptores localizados en los labios, mejillas, lengua y paladar los cuales son altamente sensibles, pueden discriminar partículas de entre 20 y 25 micras de diámetro (Daget, 1976).

Las sensaciones trigeminales tales como la astringencia y el picante, también se perciben a través de este sentido.

2.5.2.- Herramientas de medida utilizadas en el análisis sensorial

La percepción del estímulo sensorial se manifiesta simultáneamente de tres formas diferentes: a través del aspecto cuantitativo, que se corresponde a la intensidad percibida, el aspecto cualitativo, que refleja la naturaleza del estímulo y permite identificarlo y, el aspecto hedónico que corresponde al placer que acompaña a la sensación (Urdapilleta, 2001). Estos tres componentes del estímulo dan lugar a la medida sensorial analítica y a la medida hedónica (Issanchou y Hossenlopp, 1992).

2.5.2.1.- Relación entre respuesta y estímulo. Bases psicofísicas del análisis sensorial

El estímulo es el agente físico, químico o psíquico que provoca la estimulación de los receptores específicos de los sentidos. Estos receptores son células nerviosas especializadas y existen tres tipos:

- Receptores químicos: olfato y gusto.
- Receptores mecánicos: tacto, presión, dolor, temperatura y sonido.
- Fotorreceptores: sensibles a la luz.

La sensación se define como un fenómeno subjetivo y reflejo que resulta de la estimulación de los receptores sensoriales. La interpretación de la sensación o toma de conciencia sensorial es lo que se denomina percepción.

La relación entre la intensidad del estímulo y la fuerza de la sensación han sido estudiados por la psicofísica. La fuerza de la sensación con la intensidad del estímulo puede relacionarse a partir de una curva propuesta por Sauvageot (1990) que define 4 zonas (Figura 14):

- Zona subliminar: La sensación es confusa e inestable.
- Zona liminar: La sensación es percibida de un modo aleatorio, a veces clara, a veces confusa y su intensidad es siempre muy débil.
- Zona supraliminar: La sensación es clara y su intensidad varía de débil a fuerte cuando la intensidad del estímulo se incrementa.
- Zona de saturación: La sensación apenas varía aunque la intensidad del estímulo se incremente.

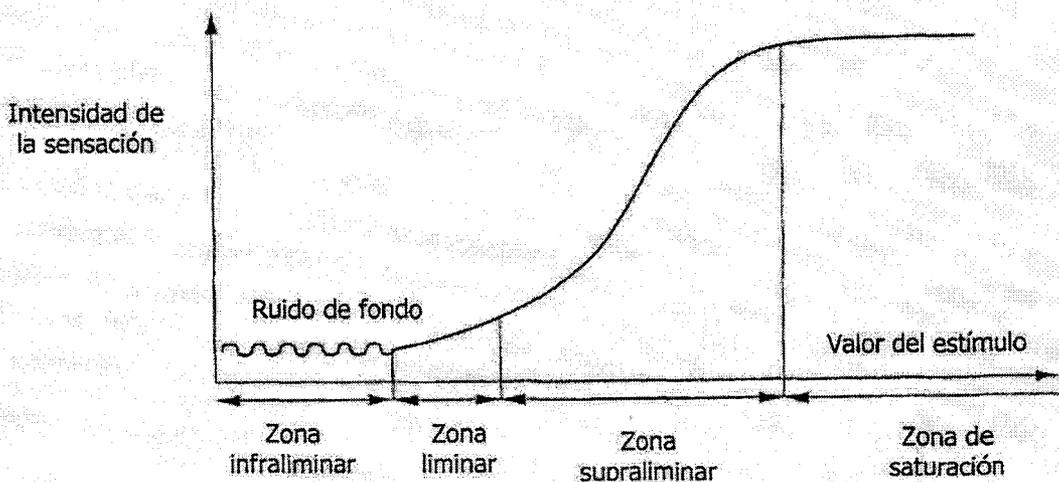


Figura 14. Evolución de la intensidad de la sensación en función de la fuerza del estímulo.

Para evaluar el aspecto cuantitativo del estímulo y obtener una medida objetiva de las percepciones, Fechner y posteriormente Stevens buscaron una ley universal que relacionara el estímulo con su percepción (Urdapilleta, 2001).

a) Ley de Fechner.

Esta Ley (Fechner, 1860) se basa en la ley de Weber según la cual, existiría una relación constante entre una diferencia justamente perceptible (Just noticeable difference, JND) y un estímulo dado (Bonnet, 1986). La base de esta Ley es el principio según el cual una percepción no puede ser jamás medida directamente, siendo únicamente posible una medida de las diferencias entre las percepciones.

$$I = K \ln S + b$$

I: Percepción

b y K :Constantes de la ecuación

S: Estímulo

La relación entre la percepción (I) y el estímulo (S) es de tipo logarítmico, lo que significa que cuando las intensidades del estímulo son débiles una pequeña variación en la estimulación basta para percibir un cambio, pero cuando las intensidades son fuertes se debe producir una variación de la estimulación mayor para observar el mismo cambio. Es decir, la intensidad de la percepción crece rápidamente para valores físicos débiles y más lentamente para valores físicos más fuertes (Weil Barais, 1993).

b) Ley de Stevens

Stevens utilizó un método de evaluación directa que consiste en presentar un estímulo estándar al cual se le asigna un valor (por ej. 10). Posteriormente se evalúan cada uno de los estímulos propuestos asignándoles un valor en relación al valor del estímulo estándar. Por ejemplo: si el estímulo es dos veces más intenso que el estándar el sujeto le asignará un valor de 20.

$$I = KS^n$$

I: Percepción

n y K :Constantes de la ecuación

S: Estímulo

En este caso, la intensidad de la sensación varía con la fuerza del estímulo según una relación potencial.

2.5.2.2.- Escalas de medida

Para que la respuesta dada por los sentidos y su traducción por el cerebro tenga algún interés y validez desde un punto de vista científico, es necesario que se pueda cuantificar esa respuesta. Si el incremento o variación en la

intensidad del estímulo físico o químico se traduce en un incremento en las sensaciones visuales, auditivas, táctiles, olfativas o gustativas, se puede asignar un valor numérico a estos cambios en una sensación concreta (Ibáñez, 2001).

AENOR (1997), en su norma UNE 87-020-93 describe diferentes tipos de escalas de medida para la evaluación de las propiedades organolépticas, o un atributo en particular de una muestra dada.

Esta norma describe tres tipos de escalas:

- Escala ordinal: Escala en la que los puntos de referencia forman una progresión continua o una progresión de conceptos pre-establecidos.
- Escala de intervalos: Escala en la que los tramos se escogen de manera que a intervalos iguales correspondan diferencias de percepción sensorial iguales. La ventaja de esta escala es que al poseer puntos intermedios de anclaje, no queda al total criterio de los jueces, pero hay que definir cada uno de estos puntos para establecer un marco de referencia (Anzaldúa-Morales., 1990).
- Escala proporcional: Escala en la que los números se escogen de manera que a cocientes iguales correspondan cocientes de percepción sensorial iguales. Estas escalas se obtienen generalmente por el método llamado estimación de la magnitud.

Ibáñez (2001) y Sauvageot (1990) describen un cuarto tipo de escala:

- Escala nominal: Los sujetos clasifican cada muestra en una de las categorías que conforman la escala ordenada (Ibáñez, 2001; Sauvageot, 1990).

Estas escalas pueden clasificarse en estructuradas o en no estructuradas (Sauvageot., 1990):

- Escala estructurada: En este tipo de escalas el significado de cada punto de la escala está indicado sobre el cuestionario en forma de cifra o de número (Figura 15).
- Escala no estructurada: Escala en la que únicamente están barrados los dos extremos finales, los cuales están definidos por referencias, de modo que es el propio sujeto el que construye su propia escala (Anzaldúa-Morales, 1994) (Figura 16).



Figura 15. Escala estructurada (UNE 87-029-93.)

Poco aromático

Muy aromático

Figura 16. Escala no estructurada.

Para poder evaluar una sensación y poder medir la respuesta del sujeto, se elegirá aquella escala que mejor se adecue a las siguientes consideraciones (Ibáñez, 2001):

- Fácilmente comprensible por los sujetos.
- Fácilmente manejable, sencilla, con instrucciones y preguntas concretas.
- Imparcial.
- Apropiaada al tipo de característica que se desea medir.

2.5.3.- El panel de análisis sensorial

La evaluación sensorial puede ser realizada a partir de dos perspectivas: una perspectiva analítica en la que el sujeto es utilizado como instrumento de medida y otra perspectiva hedónica en la que el sujeto evalúa la aceptación subjetiva de un producto. El equipo de catadores es el instrumento de medida utilizado en el análisis sensorial. De igual forma que los datos obtenidos con otro tipo de instrumentos depende en gran parte de su buen funcionamiento y del correcto calibrado de los mismos, la calidad de los datos sensoriales está directamente relacionada con el correcto funcionamiento del equipo y éste a su vez dependerá básicamente, de los métodos empleados durante la preselección, selección y entrenamiento de los sujetos (Barcenás, 2001).

El entrenamiento tiene como finalidad desarrollar la habilidad para detectar, reconocer y describir un determinado estímulo sensorial. Su duración suele depender del tipo de producto a evaluar, así como de las diferencias existentes entre las distintas muestras. En la práctica, el entrenamiento del equipo analítico en el reconocimiento y medida de una escala de una determinada sensación no conocida puede resultar un proceso arduo y duradero. Sin embargo, si el estímulo es conocido, los resultados pueden ser buenos incluso para individuos poco entrenados (Piggott, 1995). De acuerdo con la literatura, no existe un consenso sobre la duración del

proceso del entrenamiento de un equipo sensorial descriptivo. Existen autores que recomiendan desde 10-20 horas (Stone y Sidel., 1993; Drake et al.,1996) hasta los que sugieren más de 100 (Meilgaard et al., 1991; Heisserer y Chambers, 1993).

Una vez entrenado, el grupo está en condiciones de dar una serie de valoraciones y juicios, que no sólo expresan concordancias que confirman los mismos juicios, sino que los datos de esta evaluación pueden ser tratados estadísticamente estableciendo diferencias significativas con una probabilidad determinada.

2.5.3.1.- Terminología

Es importante conocer la nomenclatura empleada para aludir a conceptos relativos a los sujetos participantes en el análisis sensorial, a los objetos empleados y a los tipos de ensayos que se realizan.

Sujetos

- Juez (sensorial): Cualquier persona que toma parte en una prueba sensorial.
- Catador: persona seleccionada por su capacidad para llevar a cabo una prueba sensorial, por su perspicacia, sensibilidad y gran entrenamiento.
- Experto: persona competente que, por sus conocimientos en torno a un producto, es capaz de efectuar individualmente o en grupo, el análisis y valoración sensorial de dicho producto. En análisis sensorial, se definen dos tipos de expertos: el “juez experto” y “ el juez experto especializado”.
- Juez experto: catador con un grado elevado de sensibilidad sensorial y experiencia en su metodología, que es capaz de efectuar un juicio fiable de diversos productos por medio del análisis sensorial.

- Juez experto especializado: Juez experto que tiene, además, experiencia probada como especialista en el producto, en su proceso de fabricación o de comercialización, que es capaz de efectuar el análisis sensorial del producto y evaluar o prever los efectos debidos a la variación en materias primas, formulaciones, condiciones de fabricación, de almacenamiento, de envejecimiento, etc.

Ensayos

A la hora de seleccionar una determinada técnica sensorial se debe tener en cuenta que, a pesar de que no existe el método perfecto, aquel elegido debe ser el menos exigente y duro para los jueces, más rápido, versátil y fácil de entender, o tal y como indica Durr (1986) una combinación de aprendizaje y entrenamiento siempre es bienvenida.

La degustación puede ser más o menos detallada, tendiendo a descomponer sus caracteres en elementos simples o únicamente expresando el placer o disgusto. Para beber, el placer fisiológico es suficiente. Para degustar hace falta inteligencia y memoria. Cuando la degustación es detallada se llama degustación analítica o análisis sensorial.

En relación a los ensayos se puede indicar que existe una gran pluralidad de los mismos y la selección depende del objetivo perseguido. Así es necesario, muy a menudo, una discusión o reflexión atenta antes de elegir la prueba apropiada. Por ejemplo, sería inútil hacer una prueba de preferencia con un gran número de personas, sin haberse asegurado previamente de la posible existencia de una diferencia significativa entre las muestras. Esto se puede determinar con un número menor de catadores por medio de una prueba de diferencias.

2.5.4.- Las Pruebas

2.5.4.1.- Pruebas discriminatorias

Estas pruebas permiten establecer si existen diferencias entre dos o más muestras, pero sin indicar la magnitud y el sentido de las diferencias (Costell, 1992). Se trata de pruebas muy simples, tanto de realizar como de interpretar: los sujetos perciben o no una diferencia en la propiedad sensorial estudiada (Touraille, 1990). Están especialmente indicadas para las siguientes determinaciones (Herrero, 2000):

- Establecer si existen diferencias entre dos o más muestras.
- Controlar la calidad de un producto.
- Determinar el efecto de los cambios en el proceso de elaboración en las materias primas, en la sustitución de un ingrediente, etc.

En este tipo de pruebas son de juicio forzado (Bartoshuck y Marks, 1986), en ellas los sujetos reciben varias muestras, (n blancos y p estímulos), y deben de indicar la(s) muestra(s) que contienen el estímulo.

Las pruebas discriminatorias más frecuentes son las siguientes (UNE 87-001-94):

- Prueba de comparación por parejas: Prueba en la que se presentan las muestras agrupadas por parejas, con objeto de compararlas entre sí según atributos definidos.
- Prueba triangular: Prueba de diferencias en la que se presentan tres muestras marcadas en clave, dos de las cuales son idénticas. El juez deberá indicar cuál de las muestras es diferente.
- Prueba dúo-trío: Prueba de diferencias en la que se presenta en primer lugar una muestra de referencia. A continuación se presentan dos

muestras, una de las cuales es la de referencia; el juez debe identificar ésta.

- Prueba dos de cinco: Prueba de diferencias en la que se presentan cinco muestras marcadas en clave, de las cuales dos pertenecen a un lote y tres a otro. El juez debe agrupar los dos juegos de muestras.
- Prueba A/no A: Prueba en la que varias muestras que pueden ser A o no serlo se presentan a los jueces consultados una vez que estos han aprendido a reconocer la muestra A. Estos han de indicar si cada una de las muestras es A o no lo es.

Este tipo de pruebas son de juicio forzado; no permiten cuantificar la intensidad de las diferencias; deben ser utilizadas en su forma más simple, y suelen preceder a las pruebas de tipo descriptivo o hedónico, en caso de poner de manifiesto diferencias entre las muestras.

2.5.4.2.- Pruebas descriptivas. El perfil sensorial

Estas pruebas son las que permiten establecer no sólo si hay diferencias entre dos o más muestras, sino también el sentido o magnitud de la misma (Velez et al., 1990) a la vez que establecen un verdadero perfil de identidad sensorial (Urdapilleta, 2001).

La evaluación de una magnitud sensorial compleja implica una metodología basada en la búsqueda y la cuantificación de descriptores apropiados para poder realizar el llamado perfil sensorial (Barthelemy, 1990).

La formación de los conceptos sensoriales (atributos a evaluar) es de especial relevancia en el análisis descriptivo (O`Mahony et al., 1990), ya que uno de los objetivos es el de establecer una terminología compartida e interpretada del mismo modo por todos los catadores (Barcenas et al., 2000a).

Este tipo de pruebas descriptivas tienen principalmente un carácter analítico y deben ser realizadas por jueces seleccionados y entrenados, variando el grado de entrenamiento en función de la prueba y del objetivo del análisis (Velez et al., 1990).

Algunas propiedades sensoriales no pueden ser descritas por un solo atributo, sino como una combinación o agrupación de varias características o notas que conforman el atributo en cuestión (Anzaldúa-Morales et al., 1984; Civille y Szczesniak, 1973; Caul, 1957). Es especialmente aplicable a los casos del sabor y de la textura.

- La norma UNE 87017-92 describe una metodología para establecer el perfil olfato-gustativo a partir de una serie de métodos que permiten describir y evaluar las propiedades olfato-gustativa de los alimentos por medio de catadores entrenados y cualificados.
- La norma UNE 87025-96 describe una metodología para realizar el perfil de textura e incluye las diferentes etapas del proceso a seguir para describir completamente la textura de un producto.

2.5.4.3.- Antecedentes de análisis sensorial de vinagre

El vinagre resulta un producto difícil de catar, debido a las sensaciones intensas que provoca. El alto contenido en acético tiende a emmascarar el resto de los aromas y se precisa cierta familiarización con el producto para proceder a su cata. De hecho, no existe siquiera consenso en cómo ha de catarse el vinagre. Aparte del acético el vinagre de vino posee otros componentes sápidos y aromáticos que le son característicos (González Viñas et al, 1995). Así el vinagre de vino puede distinguirse del vinagre de manzana por la diferencia en sus características sensoriales (Gerbi et al, 1977). Dentro de los vinagres de vino a través de cata a ciega pueden diferenciarse los vinagres de vino blanco de los vinagres de vino tinto (Tefaye et al, 2002). La literatura científica relativa a estudios sensoriales de

vinagres de vino es bien escasa (Nieto, 1993; González Viñas, 1996; Tesfaye, 2001).

En la bibliografía aparecen básicamente dos formas de catar este producto. La primera de ellas consiste en analizar el vinagre diluido con agua (para rebajar el grado acético), añadido de cloruro de sodio y sobre hojas de lechuga (Nieto et al., 1993; González Viñas et al., 1996). Este modelo se corresponde con una cata afectiva que pretende mostrar los gustos y para llevarla a cabo es necesario una población de jueces no entrenados que sea representativa de los consumidores de vinagre y del mercado al que va destinado el producto. Otros autores (Gerbi et al., 1977) consideran que la dilución puede alterar las características organolépticas. De hecho es frecuente que en las bodegas se cate con una copa bodeguera usando unos 50 mL de muestra. La copa bodeguera recoge mejor los aromas de las cata y se perciben aún mejor cuando se inclina hacia la derecha o izquierda con respecto a la nariz. Para evitar interferencias del color hay autores que sugieren que las copas sean opacas y tapadas con un vidrio de reloj para evitar pérdidas de compuestos aromáticos.

El análisis sensorial del vinagre requiere pues, un panel bien entrenado, la elección de atributos concretos y adecuados que sean útiles para diferenciar muestras de vinagres con el mayor grado de aciertos posibles. Al ser el producto tan peculiar, el número de muestras que se pueden examinar en cada sesión es muy bajo para no agotar a los catadores (Tsfaye et al, 2002a).

En cuanto al entrenamiento del panel, nuestro grupo ha utilizado disoluciones de diferentes concentración de los compuestos más característicos del vinagre de vino (Tsfaye et al., 2002b). Así se han utilizado disoluciones de ácido acético, acetato de etilo, extracto de madera obtenido por maceración en disoluciones hidroalcohólicas, entre otras.

El análisis descriptivo de las muestras se basa en evaluar los atributos previamente seleccionados por el panel. Los atributos más utilizados para describir las muestras de vinagre han sido: color, intensidad aromática, olor a madera, olor herbáceo, olor a frutas, olor a acetato de etilo, olor a vino, sensación punzante (Nieto et al., 1993; Gerbi et al., 1997; Tesfaye et al., 2002b; Tesfaye et al., 2004).

En cuanto a la utilidad del análisis sensorial para discriminar distintos tipos de muestras de vinagres hay que señalar los estudios llevados a cabo para diferenciarlas en función de las materias primas empleadas (Gerbi et al., 1997), o en relación al método de elaboración empleado (González Viñas et al., 1996). Más recientemente se han llevado a cabo estudios sobre la influencia de la crianza en madera sobre las características sensoriales (Teskaye et al., 2002b). En este sentido descriptores tales como olor a madera e intensidad aromática fueron muy útiles para discriminar entre vinagres de Jerez y vinagres comunes.

3. OBJETIVOS

3.- OBJETIVOS

El vinagre de vino de Jerez presenta unas características de calidad genuinas y ello es debido a la conjunción de tres factores: la materia prima de procedencia (vinos de Jerez), el proceso de fermentación lento con cultivo superficial y tiempo de permanencia en botas de roble para su envejecimiento y maduración. Es un proceso de acetificación artesanal y muy lento.

Como alternativa para favorecer el proceso de acetificación se emplean biorreactores (cultivo sumergido), sin embargo, es preciso su envejecimiento en madera para poseer características organolépticas similares a los obtenidos por el método tradicional.

Los vinagres de Jerez deben permanecer según el Reglamento de la D.O.(Orden de 22 de febrero de 2000 BOJA nº 33) 6 meses en madera (vinagre de Jerez) o 2 años (vinagre de Jerez Reserva). Esto hace que el producto así obtenido presente un gran valor añadido. El objetivo de este trabajo es ensayar métodos para acelerar el proceso de envejecimiento empleando virutas de roble previamente acondicionadas .

Objetivos:

- Establecer acondicionado óptimo de las virutas de roble.
- Estudio de la evolución de parámetros físico-químicos tales como extracto seco, acidez total, grado alcohólico en muestras de vinagres sometidas a un envejecimiento acelerado (maceración en virutas de roble) en un sistema cerrado.
- Estudio de la evolución de compuestos fenólicos durante el tiempo de maceración en virutas de roble al que son sometidas las muestras de vinagres con distinto grado alcohólico.

- Estudio de la evolución de compuestos volátiles y volátiles de la madera durante el tiempo de maceración en virutas de roble al que son sometidas las muestras de vinagres con distinto grado alcohólico.

La calidad de un vinagre no sólo se determina por parámetros físico-químicos, también es preciso definir su característica sensorial, por ello este estudio plantea asimismo:

- Análisis sensorial de muestras de vinagres con distinta graduación alcohólica durante el tiempo de maceración en virutas de roble, y muestras de vinagres comerciales.
- Descripción del perfil aromático.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.- MATERIAL Y MÉTODOS

4.1.- Ensayos de Envejecimiento Acelerado

4.1.1.- Muestras

Se han llevado a cabo un total de 8 ensayos de envejecimiento, 6 empleando un vinagre de vino obtenido por fermentación acética con cultivo sumergido y 2 empleando un vinagre sintético que se prepara en el laboratorio y que utilizamos como testigo. Ambos se maceran con virutas de roble americano sometidas a dos tipos de pretratamiento. Además, estos tratamientos se han ensayado para distintos contenidos alcohólicos de los vinagres a envejecer (0.1, 1 y 2° alcohólicos). Para ello, se añadió alcohol destilado vínico hasta la concentración deseada. El vinagre sintético presentaba un valor de 2 grados alcohólicos.

Tabla 6. Ensayos de envejecimiento: Muestras y tratamientos

Ensayos de Envejecimiento (n=8)	Tipo de vinagre	° alcohólico	Virutas mojadas y tostadas	Virutas tostadas
VE0MT	Vinagre de vino de Jerez	0°	X	
VE0T	Vinagre de vino de Jerez	0°		X
VE1MT	Vinagre de vino de Jerez	1°	X	
VE1T	Vinagre de vino de Jerez	1°		X
VE2MT	Vinagre de vino de Jerez	2°	X	
VE2T	Vinagre de vino de Jerez	2°		X
VSMT	Vinagre sintético	2°	X	
VST	Vinagre sintético	2°		X

Los vinagres sometidos a envejecimiento acelerado se obtuvieron mediante un método rápido de acetificación en fermentador con cultivo sumergido a partir de vinos sanos y jóvenes pertenecientes a la D.O. Jerez-Xérès-Sherry, Manzanilla de Sanlúcar de Barrameda y Vinagre de Jerez. El fermentador utilizado es de tipo industrial de la marca Hasenosa, con aireación por turbina (motor 10 CV con filtro) y un flujo de aire de 40 m³/h, la temperatura del líquido que está fermentando se mantiene a 30°C con un serpentín interior por donde circula agua fría alimentado a través de una torre de refrigeración. El volumen de carga y descarga es de 3000 L/día, esto corresponde a 1/3 del volumen de carga del fermentador (9000L).

El vinagre sintético (testigo) se preparó disolviendo en agua las sustancias que a continuación se señalan en la Tabla 7 cuyas concentraciones corresponden a valores medios encontradas en la bibliografía (Troncoso, 1986; Guerrero, 1994; Morales, 1999).

Tabla 7. Composición del vinagre sintético para el envejecimiento acelerado

Sustancia	Cantidad añadida por L
Ácido acético	78.90 g (7.9° acético)
Etanol	20.02 mL
Acetato de etilo	24.30 g
Glicerina	3.74 g
Metanol	1.58 g
3-Metil-1-butanol	1.00 g
Acetato de metilo	0.923 g
Acetaldehído dietilacetal	0.891 g
Acetaldehído	0.424 g
Acetoína	0.40 g
L-Prolina	0.50 g
Ácido gálico	25.20 mg
Ácido tartárico	3.00 g
Agua destilada	875 mL

4.1.2.- Acondicionado de virutas

Aparatos

- Estufa de desecación P-Selecta con temperatura máxima de 250°C.
- Recipiente metálico de Acero inoxidable de 8 L de capacidad.
- Balanza analítica Sartorius con precisión de 0.0001 g.

Procedimiento

Las virutas de madera empleadas proceden de roble blanco americano (*Quercus alba L.*) previamente secadas al aire libre durante un año y medio. Las virutas presentan un tamaño medio de 5-10 mm de ancho y 10-15 mm de largo. Las proporcionó una empresa dedicada a la fabricación de botas (José y Miguel Martín S.L).

En primer lugar las virutas se sometieron a diferentes métodos de acondicionamiento:

a) Virutas mojadas y tostadas

Se realiza una infusión en agua desmineralizada al 2% (P/V) y se somete a ebullición a 100°C durante 2 horas. Se filtra por papel de filtro. Se secan en estufa sobre bandeja de cristal de tamaño 30 cm de largo × 22.5 cm de ancho × 3.5 cm de altura, a 100°C durante 2 horas. Se enfrían en un desecador y finalmente se tuestan en estufa a 180°C durante 3 horas.

b) Virutas tostadas.

Para el tostado disponemos las virutas en bandeja de cristal de tamaño 30 cm de largo × 22.5 cm de ancho × 3.5 cm de altura y mantenemos en estufa, previamente calentada a 180°C, durante 3 horas. Se enfrían en un desecador.

Los cuatro tipos de vinagre (vinagre sintético, vinagre joven, vinagre con 1° alcohólico y vinagre con 2° alcohólicos) se disponen en frascos de vidrio de 5 L de capacidad. Para cada tipo de vinagre se emplean 2 frascos, a uno se le añaden virutas mojadas y tostadas y a otro virutas tostadas. La concentración de virutas en cada frasco es de 2g/100 mL y el volumen final de 4 L.

4.1.3.- Toma de muestra

Para el seguimiento de los cambios fisicoquímicos y sensoriales se tomaron muestras a lo largo del envejecimiento acelerado a los 15, 30, 60 y 90 días. El volumen total de muestra tomado fue de 250 mL. Las muestras se guardan en tarros de cristal y se conservan en frigorífico a una temperatura entre 2°–8°C. Una fracción de cada muestra (100 mL) se congela en tarros de vidrio color topacio para su posterior análisis sensorial.

4.1.4.- Codificación de muestras

La codificación empleada para identificar las muestras es de la forma ABC-X.

En la posición A indicaremos si la muestra es un vinagre de vino o es el vinagre sintético. Así, aparecerán las letras

V para vinagres obtenido por fermentación sumergida

S para el sintético

En la posición B indicaremos el grado alcohólico de la siguiente forma:

E0 cuando no hemos adicionado alcohol vínico

E1 cuando se ha elevado su contenido en alcohol residual hasta 1°

E2 cuando se ha elevado su contenido en alcohol residual hasta 2°

En la posición C haremos referencia al tipo de acondicionamiento al que hemos sometido las virutas que se indicará con:

MT cuando las virutas han sido mojadas y tostadas

T cuando han sido sólo tostadas

Por último, la posición X indicará el tiempo de envejecimiento o momento de toma de muestra y tomará los valores

0 (tiempo 0)

15 (15 días)

30 (30 días)

60 (60 días)

90 (90 días)

Tabla 8. Codificación de muestras de vinagre empleada en ensayos de envejecimiento acelerado.

Muestras vinagre	Grado alcohólico (%v/v)	Tratamiento de virutas de roble		
		MT	T	
Vinagre de vino	V	0.1	VE0MT	VE0T
	V	1	VE1MT	VE1T
	V	2	VE2MT	VE2T
Vinagre sintético	S	2	SE2MT	S2T

4.2.- Métodos de Análisis Físico-Químico

4.2.1.- Extracto seco

Fundamento

El extracto Seco o Total de un vinagre se define como el conjunto de todas las sustancias que en condiciones fijas determinadas no se volatilizan (Ministerio de Sanidad y Consumo, 1985). Este parámetro en combinación con otros se ha utilizado para la caracterización de vinagres (Artiles et al., 1993).

El método consiste en una evaporación del vinagre en baño de agua con secado posterior en estufa a $100-105^{\circ}\pm 0.1^{\circ}\text{C}$.

Material y aparatos

- Balanza analítica Sartorius con precisión de 0.0001 g.
- Estufa P-Selecta con temperatura máxima de 250 °C.
- Desecador de vidrio con gel de sílice.
- Baño con termostato de inmersión Digiterm 3000542 Selecta.
- Cápsula de porcelana de fondo plano de 5 cm de diámetro interior.
- Pipetas aforadas de 10 mL con doble enrase.

Procedimiento

Agitar bien la muestra y filtrar a través de un papel de filtro plegado. Disponer 10.0 mL del vinagre filtrado en una cápsula previamente tarada. Evaporar en baño hirviente durante 30 minutos y mantener en la estufa durante dos horas y media a 105 °C. Dejar secar la cápsula en el interior del desecador y, una vez fría, pesar en la balanza de precisión hasta peso constante.

Consideraciones

Las cápsulas se manejaron en todo momento con pinzas.

Cálculos

El valor del extracto total del vinagre, en % p/v (g/100 mL), se hallará mediante la fórmula siguiente:

Extracto Total = $(M - m) \times 10$

M= masa, en gramos, de la cápsula con el extracto seco.

m= masa, en gramos, de la cápsula vacía.

4.2.2.- Acidez total o grado acético

Fundamento

La acidez total se puede considerar, o representa, la cantidad total de los ácidos orgánicos volátiles (ácidos acético, propiónico, etc.) y no volátiles (ácido tartárico, cítrico, málico, succínico, etc.) presentes en el vinagre vínico, y también los ácidos parcialmente salificados. Los resultados se expresan en gramos de ácido acético por 100 mL de vinagre. Por tanto se toma como referencia el ácido acético.

Es un parámetro muy importante en la legislación alimentaria para diferenciar el vinagre de vino de los otros tipos de vinagres.

A pesar de que recientemente se han propuesto para determinar la acidez métodos conductimétricos (Maimo et al., 1989), o técnicas de valoración en flujo discontinuo con detección fotométrica del punto final (Cardwell et al., 1991), el Método oficial en España es el de una volumetría ácido-base (Presidencia del Gobierno, 1977) con sosa y fenolftaleína.

Material y aparatos

- Bureta de 50 mL graduada en décimas de mL.
- Pipeta aforada de 10 mL con doble enrase.
- Matraces Erlenmeyer de 250 mL de capacidad.
- Balanza analítica de precisión Sartorius.

Reactivos

- Disolución de hidróxido sódico 0.5 N (Merck Art. 6498).
- Ftalato ácido de potasio (Merck Art.141481).
- Disolución indicadora de fenolftaleína. Para prepararla se disuelven 10 g de fenolftaleína (Merck, art.131013) en alcohol etílico 96% v/v, y se completa a un litro con el mismo disolvente.

Procedimiento

En primer lugar, se debe estandarizar la disolución de sosa preparada, utilizando para ello como patrón analítico ftalato ácido de potasio previamente desecado, siguiendo el procedimiento normal de estandarización.

Se toman 10 mL de vinagre, previamente filtrado con papel de filtro plegado. Se diluyen con 100-150 mL de agua destilada en un erlenmeyer de 250 mL, hasta conseguir una disolución débilmente coloreada. Se añaden 6 gotas de la disolución indicadora de fenolftaleína y se agrega hidróxido de sódico 0.5 N desde la bureta, gota a gota, y agitando, hasta viraje del indicador (aparición de color rosa persistente).

Cálculos

El valor de la acidez, o grado acético del vinagre, en porcentaje, se hallará mediante la siguiente expresión:

$$\text{Acidez total} = a \times 0.5 \times f \times 60 \times 10^{-3} \times 10 = a \times 0.5 \times f \times 0.6$$

a= volumen en mL de la disolución de NaOH.

f= factor volumétrico de la disolución de NaOH.

4.2.3.- Índice de polifenoles totales

Fundamento

El reactivo de Folin Ciocalteu, es una mezcla de ácido fosfotúngstico y fosfomolibdico. En presencia de un exceso de este reactivo, los polifenoles reducen a los ácidos anteriores a óxidos de tungsteno y molibdeno de color azul. La absorbancia de los óxidos azules es máxima a 765 nm. Tratando la muestra problema con exceso de reactivo de Folin Ciocalteu, en presencia de Na_2CO_3 , la lectura de absorbancia a 765 nm es proporcional a la concentración de polifenoles y se expresa como índice de Folin Ciocalteu.

Los resultados se expresan como concentración de ácido gálico en mg/L. La utilidad del Índice de Polifenoles Totales (IPT) radica en ofrecer una idea general del contenido fenólico en su conjunto, que se exprese como índice.

Material y aparatos

- Matraces aforados de 100mL.
- Cubetas de vidrio de 10 mm de paso de luz.
- Balanza Sartorius.
- Desecador.
- Estufa Selecta-P modelo 296B.
- Espectrofotómetro UV-Visible Agilent 8453 E.

Reactivos

- Disolución patrón: se disuelven 0.500 g de ácido gálico, desecado previamente en estufa a 100 °C durante 2 horas y enfriado en desecador, en 100 mL de agua.
- Disolución de carbonato sódico al 20% (p/v).
- Reactivo de Folin Ciocalteu (Merck Art. N°.UN 3264).

Procedimiento

Curva de calibrado: se toman con la pipeta 0.0, 1.0, 2.0, 3.0, 5.0, 10.0 mL de la disolución patrón de ácido gálico que se vierten en otros tantos matraces aforados de 100 mL y se diluyen con agua hasta enrase. La concentración de fenol en estas disoluciones es de 0.50, 100, 150, 250 y 500 mg/L, respectivamente. De cada una de estas disoluciones se toma 1mL y se vierte en el correspondiente matraz aforado de 100 mL. Se añade a cada matraz 60 mL de agua, aproximadamente. Se agita, se añaden 5 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu y se mezcla bien. Después de 30 segundos y antes de 8 minutos, se añaden 15 mL de disolución de carbonato sódico al 20%. Se agita bien y se diluye con agua hasta enrase. Se deja reposar la disolución durante 2 horas a 24°C y se determina la absorbancia de cada disolución a 765 nm en cubetas de 10 mm. Se representa la absorbancia frente a la concentración.

En el caso de los vinagres, se diluyen 10 mL de muestra en 50 mL para que la medida de absorbancia esté entre los valores de mínimo error en espectrofotometría. Se toma 1 mL de esta disolución diluida y se procede como antes, a partir de la adición de 60 mL de agua.

4.2.4.- Determinación de compuestos volátiles en vinagre

Material e instrumentación

La determinación de compuestos volátiles en vinagres se llevó a cabo en un cromatógrafo de gases modelo 6890 (Hewlett-Packard) provisto de un detector de ionización de llama (FID); la columna empleada fue una columna capilar WCot de sílice fundida CP-Wax 57 CB de 50 m x 0.25 mm D.I. x 0.2 μm de espesor de fase líquida químicamente ligada (Chrompack, Middelburg Holanda).

Preparación de patrones

Las disoluciones empleadas para construir las rectas de calibrado se preparan, en medio hidroalcohólico al 10% v/v en agua MiliQ, tomando distintos volúmenes de una serie (n= 19) de disoluciones madre, una de cada compuesto volátil estudiado. Como patrón interno se empleó 1-pentanol a una concentración de 105.3 mg/L. Estas disoluciones madre son también hidroalcohólicas pero su contenido en alcohol difiere en función de la solubilidad del compuesto. Para el caso del patrón interno el contenido de etanol es siempre del 10% v/v.

Condiciones cromatográficas

Las condiciones del análisis fueron:

- Temperatura del detector: 250°C
- Temperatura del inyector: 220°C
- Volumen de muestra inyectado: 1 μL
- Modo de inyección: División de flujo 1: 60
- Gas portador: H₂

- Flujo constante: 1mL/min
- Gradiente de temperatura del horno: 35°C durante 5 min, $\Delta 4^\circ\text{C}/\text{min}$ hasta 150°C, 150°C durante 17.5 minutos

Las muestras se pasan por filtros Millex-GV₁₃ de 0.22 μm y se les añade 10 μL del patrón interno antes de su inyección.

Identificación y cuantificación

La identificación de los compuestos volátiles se realiza comparando el tiempo de retención con los patrones respectivos.

La cuantificación se lleva a cabo utilizando un patrón interno. Para ello se construyen rectas de calibrado con los cocientes entre las áreas de los picos de cada compuesto y la del patrón interno frente a la concentración interno y las de cada compuesto. Las rectas de calibrado se construyeron inyectando por triplicado 5 niveles de concentración para cada compuesto. Las ecuaciones así obtenidas, los intervalos de concentración y sus coeficientes de regresión se muestran en la Tabla 9.

Tabla 9. Ecuaciones de las rectas de calibrados, intervalos de concentración y coeficiente de regresión de los compuestos volátiles; $y=A_c /A_{PI}$; $x=conc.del$ compuesto/ $conc. PI$.

Compuestos	T _R (min)	Intervalos(mg/L)	Ecuación	r
Acetaldehído	4.5	15.6-283.3	$y = 0.367x + 0.0068$	0.9987
Formiato de Etilo	5.7	100.06-512.4	$y = 0.227x + 0.0639$	0.9980
Acetato de Metilo	5.8	16.3-246.2	$y = 0.492x - 0.0675$	0.9927
Acetato de Etilo	6.8	10.1-10800	$y = 0.575x - 1.538$	0.9886
Metanol	7.4	14.2-106.6	$y = 0.583x - 0.0132$	0.9991
Etanol	8.7	0.5-40	$y = 7.60x - 2.303$	0.9989
Acetato de isobutilo	10.5	15.2-107.4	$y = 0.737x - 0.0651$	0.9851
Propanol	11.9	4.9-104	$y = 0.761x + 0.0212$	0.9957
Isobutanol		26.6-106.6	$y = 0.464x - 0.0191$	0.9710
Acetato de Isoamilo	14.4	5.02-105.3	$y = 0.766x - 0.0651$	0.9950
2-metil-1-butanol	18	9.84-98.4	$y = 0.494x + 0.0058$	0.9981
3-metil-1-butanol	18.1	4.9-246.2	$y = 1.055x + 0.0133$	0.9999
Acetoína	20.6	50-2000	$y = 0.277x - 0.0090$	0.9997
Lactato de Etilo	22.5	15.4-103	$y = 0.164x + 0.0020$	0.9971
Benzaldehído	28.1	5.1-108.6	$y = 0.863x + 0.0160$	0.9953
γ-butirolactona	31.5	16.9-244	$y = 0.393x - 0.1602$	0.9946
Succinato de dietilo	32.5	4.9-246.2	$y = 0.393x - 0.1602$	0.9644
Acetato de 2-Feniletanol	36.6	15.5-107.4	$y = 0.269x + 0.0317$	0.9202
2 -Feniletanol	40.8	4.8-244.6	$y = 0.562x + 0.0689$	0.9006

4.2.5.- Determinación de compuestos volátiles procedentes de la madera

Para realizar la determinación de compuestos volátiles procedentes de la madera, es preciso someter a las muestras a un pretratamiento que permita conseguir una adecuada concentración de estos. Para ello se empleó la técnica de extracción en fase sólida (EPS).

Material y Aparatos

- Centrífuga
- Sistema de vacío con múltiples posiciones: Visipred (Supelco Bellefonte, PA).
- Cartuchos de extracción en fase sólida:
LiChrolut EN (Merck).
Bond Elut ENV (Varian).
- Cromatógrafo de gases modelo 6890 (Hewlett-Packard) provisto de un detector de ionización de llama (FID).
- Columna capilar WCot de sílica fundida CP-Wax 57 CB de 50 m x 0.25 mm D.I. x 0.2 μm de espesor de fase líquida químicamente ligada (Chrompack, Middelburg Holanda).

Reactivos

Diclorometano p.a. (Merck).

Metanol p.a. para cromatografía líquida (Merck).

Bicarbonato sódico.

Para la preparación de patrones se utilizaron las siguientes sustancias:

Guayacol	Sigma Aldrich (Steinheim, Alemania)
Eugenol	Sigma Aldrich (Steinheim, Alemania)
β -metil-y-octalactona	Sigma Aldrich (Steinheim, Alemania)
2-furfural	Sigma Aldrich (Steinheim, Alemania)
3,4-dimetilfenol (P.I. en el proceso de extracción)	Sigma Aldrich (Steinheim, Alemania)
Vainillina	Merck (Darmstadt, Barcelona)
2-octanol (P.I. para el análisis por CG)	Merck (Darmstadt, Barcelona)
5-metilfurfural	Fluka (Steinheim, Alemania)
Alcohol furfurílico	Fluka (Steinheim, Alemania)

Procedimiento: extracción en fase sólida

Los ensayos de extracción en fase sólida se llevaron a cabo empleando dos tipos de resinas de adsorción:

a) LiChrolut EN (López et al., 2002). El adsorbente se acondiciona primero con 2 mL de metanol puro y posteriormente se pasan 6 mL de agua. A continuación se añade 10 mL de vinagre que contiene 10 μ L de patrón interno (3,4-dimetilfenol, a una concentración de 1mg/mL) y se hacen pasar a través del cartucho previamente acondicionado a una velocidad de flujo de 2 mL/min. La columna se enjuaga con 5 mL de agua y se seca pasándole aire lentamente (0.6 Bar, 10 min). Finalmente, los compuestos objeto de estudio se recuperan mediante elución con 1 mL de diclorometano.

b) Bond Elut ENV (Ferreira et al., 2004). El adsorbente se acondiciona primero con 2 mL de metanol puro y posteriormente se pasan 6 mL de agua. A continuación se añaden 10 mL de vinagre que contienen 10 μ L de patrón interno y después se hacen pasar 10 mL de una solución que contenía 40% v/v de metanol puro y 1% p/v de

bicarbonato sódico seguido de 2 mL de agua. El cartucho se seca antes de la elución de los analitos. La elución se realiza con 1 mL de diclorometano.

En ambos casos, después de EFS, las muestras eluidas se centrifugan (3 min a 2.000 r.p.m) y el volumen final recuperado es de 0.490 mL. Después se añade 10 µL de 2-octanol como patrón interno a una concentración de 52.5 ppm.

Condiciones cromatográficas

Las condiciones del análisis fueron:

- Temperatura del detector: 220°C
- Temperatura del inyector: 200°C
- Volumen de muestra inyectado: 1µL
- Modo de inyección: sin división de flujo 1: 60
- Gas portador: H₂
- Flujo constante: 1.5mL/min
- Gradiente de temperatura del horno:

Temperatura inicial de 100°C Δ2.5°C/min hasta 180°C durante 2 minutos.

Δ1°C/min hasta 200°C (Díaz Plaza et al., 2002).

Preparación de patrones

Las disoluciones empleadas para construir las rectas de calibrado se preparan en soluciones de diclorometano que contenían todos los fenoles volátiles, isómeros de βmetil-Yoctalactona y 3,4 dimetilfenol (P.I del proceso de extracción).

La identificación se lleva a cabo mediante la comparación de los tiempos de retención de los picos cromatográficos de los respectivos patrones. En el caso particular de los isómeros cis y trans de β -Metil-y-octalactona al haberse empleado como patrón una mezcla de ambos para la identificación seguimos el criterio de Chatonnet (1991) considerando que el primer compuesto que eluye corresponde al isómero trans, el siguiente al isómero cis cuando se emplea una columna como la nuestra.

Tabla 10. Ecuaciones de las rectas de calibrados, intervalos de concentración y coeficiente de regresión de los compuestos volátiles; $y=A_c /A_{PI}$; $x=conc.del$ compuesto/ $conc. PI$.

Compuestos volátiles	Intervalo (mg/L)	Ecuación	r
2-Furfural	5.72-102.1	$y= 0.0116x - 0.0156$	0.9991
5-Metilfurfural	5.69-101.7	$y=0.0139x - 0.0191$	0.9994
Alcohol furfurilico	5.83-104.1	$y=0.0114x - 0.0063$	0.9997
Guaiacol	5.72-102.1	$y=0.0114x - 0.0143$	0.9995
trans- β -Metil-y-octalactona	6.18-110.4	$y=0.0164x - 0.0116$	0.9995
cis- β -Metil-y-octalactona	5.55-99.1	$y=0.0165x - 0.0141$	0.9995
Eugenol	5.75-102.7	$y=0.0166x - 0.0151$	0.9990
3,4 Dimetilfenol	8.0-200	$y=0.0206x - 0.0199$	0.9994
Vainillina	5.6-100	$y=0.0103x - 0.0148$	0.9888

Cuando se hacen las rectas de calibrado de los isómeros trans- β -Metil-y-octalactona y cis- β -Metil-y-octalactona (Watherhouse, 4 Towey, 1994) los dos dan la misma señal en FID.

La cuantificación se lleva a cabo utilizando un patrón interno (2-octanol a una concentración de 52.5 ppm). Para ello se construyen rectas de calibrado con los cocientes entre las áreas de los picos de cada compuesto y la del patrón interno frente a cocientes de la concentración del patrón interno y la de cada compuesto. Las rectas de calibrado se construyen inyectando por triplicado 5 niveles de concentración. Las ecuaciones obtenidas, los intervalos de concentración empleados, así como sus coeficientes de regresión se muestran en la Tabla 10. Las concentraciones se corrigen con las correspondientes medias de los porcentajes de recuperación (SPS).

4.2.6.- Determinación de compuestos fenólicos por CLAE con inyección directa de la muestra

Se ha seguido una técnica de fase reversa que separa los compuestos fenólicos simples en función de su polaridad y solubilidad. La identificación y cuantificación se lleva a cabo con detector de fotodiodos. La muestra se inyecta en la columna sin ninguna manipulación, sólo la filtración. En este estudio se realiza una técnica de inyección directa de la muestra (Betes Saura, 1996).

Material y aparatos

- Equipo cromatográfico Waters, formado por:
Inyector manual Rheodyne 7125 con un Bucle de inyección de 50 µl de volumen.
Bomba cuaternaria Waters 600 E System Controller.
Detector de haz de fotodiodos Waters 996
Horno Waters Steel Column heater Module.
- Columna de fase reversa Superspher 100 RP-18 (250-4 mm) Ref 1.16056.001 Merck.

- Precolumna Nova-Pack C18 de Waters Ref. 50957 Merck.
- Filtros de uso único Millex-GV₁₃ de 0.22µm Ref. SJGV013NS.
- Baño de ultrasonido Selecta-P.
- Sistema de filtración de agua Milli-Q (Millipore).
- Agitadores Selecta-P.

Reactivos

Los eluyentes calidad HPLC empleados en la cromatografía fueron:

Acetonitrilo	(Carlo Erba Art. 412412)
Ácido acético	(Carlo Erba Art. 401392)
Agua Milli-Q	

Las sustancias empleadas como patrones se detallan a continuación:

Ácido gálico	Merck art. 280
5-Hidroximetilfurfural (5HMF)	Merck Art. 820678
Protocualdehído	Sigma D-108400-5
Furfural	Sigma Art. 4259
Ácido p-hidroxibenzoico	Merck Art. 821814
Tirosol	Fluka Art. 56105
Ácido p-hidroxifenilacético	Merck Art. 820690
p-hidroxibenzaldehído	Merck Art. 804536
Ácido vainílico	Sigma Art. 43600-1
Ácido cafeico	Fluka Art. 60020
Siringaldehído	Sigma Art. S760-2
Ácido p-cumárico	Fluka Art. 28200
Aldehído vainílico	Merck Art. 818718

Ácido ferúlico	Merck Art. 822070
Resveratrol	Sigma Art. R-5010
Ácido pirogálico	Sigma Art. 2S400-2
Catequina	Fluka Art. 22130
Epicatequina	Sigma Art. 85021-5
Tirosina	Sigma Art. 14, 572-6
Ácido 3,4 dihidroxifenilacético	Sigma Art. 85021-7
Alcohol 4-Hidroxi-3-metoxibencilico	Fluka Art. 55570
Ácido m-hidroxibenzoico	Merck Art. 804537
Ácido 2,3-dihidroxibenzoico	Sigma Art. 31078-6
2,3-dihidroxibenzaldehído	Sigma Art. 18,983-9
m-hidroxibenzaldehído	Merck Art. 804535
Triptófano	Sigma Art. 16,269-8
Ácido gentísico	Merck Art. 814092
Ácido m-cumárico	Fluka Art. 28180
4-Hidroxi 3-metoxicinamalaldehído	Aldrich Art. 14021LG
Quercetina	Fluka Art. 833370
Éster metílico del ácido cinámico	Sigma Art. C-6405
Ácido trans-cinámico	Sigma Art. C-6004
4-hidroxi 3-metoxicetofenona	Fluka Art. 64071
Cinamalaldehído	Merck Art. 802505
Ácido sinápico	Fluka Art. 85430
Aldehído o-vainíllico	Fluka Art.94760
Fenilacetaldehído	Fluka Art. 77800

Preparación de disoluciones y eluyentes

Los patrones se prepararon con una disolución madre con una concentración de 5 mg/L de cada uno de los fenoles. A partir de estas disoluciones madre se obtuvieron 5 diluciones en un intervalo de 0.1 a 5 mg/L con las que se realizaron las curvas de calibrado

Los eluyentes se desgasificaron con un baño de ultrasonidos Selecta-P y se mantuvieron desgasificados durante el tiempo de análisis gracias a agitadores magnéticos.

Condiciones cromatográficas

El gradiente utilizado es el siguiente:

Fase A: ácido acético glacial en agua (pH 2.65)

Fase B: Acetonitrilo: ácido acético en agua (pH 2.65) en las proporciones 80/20.

La fase A contiene aproximadamente 1.5% de ácido acético en agua, para alcanzar el pH de 2.65 que se ajustó con un pHmetro. Esta fase móvil se desgasifica en un baño de ultrasonido y con agitadores magnéticos se evita que se disuelva aire en la fase móvil durante el análisis. El gradiente de elución se muestra en la Tabla 11.

El flujo es de 1.5 mL/min y la temperatura de la columna es de 40°C (Betes Saura et al., 1996). El eluyente adquiere dicha temperatura a su paso por el horno antes de entrar en la columna. Una cobertura interna mantiene la estabilidad térmica durante toda la operación. La oscilación de los valores de temperatura a lo largo de todo el compartimento que contiene la columna es de $\pm 0.1^\circ\text{C}$. Este control de temperatura evita oscilaciones en la medida de la línea de base, y permite obtener tiempos de retención extraordinariamente constantes. La duración de cada análisis completo es de 40 minutos. La resolución es de 2.4nm.

Tabla 11. Gradiente de elución

T (minutos)	%A	%B
0	100	0
35	70	30
40	0	100

Identificación

Los datos adquiridos con el detector de fotodiodos se han procesado mediante la estación de datos. Cada espectro se transforma mediante un algoritmo matemático en un vector multidimensional. Los vectores correspondientes a los patrones y a los picos desconocidos se superponen y la diferencia se traduce en un ángulo. Entre dos espectros de la misma sustancia no existe diferencia alguna; por tanto, el ángulo entre los dos vectores resultantes es cero. Cuando, por tratarse de diferentes compuestos, los vectores resultantes guarden entre sí cierto ángulo, éste será mayor cuanto mayores sean las diferencias espectrales. Este procedimiento es de gran utilidad para diferenciar espectros de compuestos con estructuras químicas muy relacionadas entre sí.

Cuando se realiza el test de pureza de pico, el espectro tomado en el máximo de absorbancia del pico se toma como referencia y los espectros tomados a lo largo de todo el pico se comparan con el de referencia. Si el pico es puro, todos los espectros serán iguales y no existirán ángulos entre ellos. Si, por el contrario, hay alguna contaminación, no se encontrará homogeneidad espectral a lo largo de todo el pico.

Cuantificación

La cuantificación se llevó a cabo mediante calibrado externo comparando las áreas de los picos identificados en las muestras con la de los patrones. En todos los caso se realizó una inyección con volumen completo del bucle de inyección de 50 µl. Las longitudes de onda empleadas para realizar la cuantificación fueron 280, 313 y 320 nm.

Las ecuaciones de las rectas de calibrado obtenidas con seis concentraciones conocidas de patrón cercanas al contenido esperado en los vinagres se muestran en la Tabla 12.

Tabla 12. Ecuaciones de las rectas de calibrados.

COMPUESTO	ECUACIÓN	r
Ácido gálico	$y= 94750 x -4670$	0.99990
Ácido protocatéquico	$y=49300 x +60137$	0.9998
5-hidroximetilfurfural	$y=4379 \times 10^{-2} x +1071 \times 10^3$	0.99934
Furfural	$y=3257 \times 10^2 x +23290$	0.99985
Ácido vainílico	$y=69043 x - 36000$	0.99812
Aldehído vainílico	$y=187000 x +314700$	0.99927
Ácido siríngico	$y=1256 \times 10^2 x +2202 \times 10^2$	0.99672
Siringaldehído	$y=1468 \times 10^2 x - 6301$	0.99959

4.2.6.- Análisis sensorial

En primer lugar, se seleccionaron los componentes del panel de cata garantizando que contaban con aptitudes físicas suficientes para el análisis sensorial. La segunda etapa consistió en entrenar

adecuadamente a los integrantes en la cata de vinagre para lo que se realizaron una serie de ejercicios que a continuación se describen. Posteriormente, se validó el panel y por último se analizaron las muestras de vinagres.

4.2.6.1.-Material

- Copas de cata: copas oscuras o copas normales cubiertas por papel de plata, ambas normalizadas (ISO, 1977, Standard 3591)
- Vidrios de reloj: para tapar las copas durante el análisis sensorial y así evitar las pérdidas de los componentes volátiles.
- Fichas: se emplearon tres tipos de fichas que se detallan más adelante con el método de análisis.
- La sala de cata: se cató en el laboratorio de prácticas Área de Nutrición y Bromatología en una época en la que no se empleaba para otro fin.

4.2.6.2.- Selección de los miembros del panel de cata

a) Los Jueces

El panel de cata está constituido por 11 miembros:

- 8 personas del Área de Nutrición y Bromatología de la Universidad de Sevilla (2 integrantes carecían de toda experiencia al cata y 6 habían realizado previamente varios cursos de cata y además contaban con experiencia en cata de diversos alimentos, 4 de ellas están muy familiarizados con el vinagre).
- 3 personas de una bodega productora de vinagre con gran experiencia en la cata del mismo.

Los jueces ejercen la cata de forma voluntaria sin remuneración alguna y dependiendo de la disponibilidad que permita su trabajo.

b) Disoluciones

Se preparan las disoluciones para la identificación de los 6 sabores básicos como se indica en la Tabla 13. La prueba de los sabores básicos ayuda al organizador de la cata a llevar a cabo la clasificación previa de los jueces. También se pueden utilizar estos ensayos para el control periódico de la sensibilidad gustativa de los jueces ya integrados en jurados de análisis sensorial.

Tabla 13. Umbrales de sabores básicos (UNE 87003. 1991)

Sustancia de referencia	Sabores	Concentración g/L
Ácido cítrico cristalizado (monohidratado)	ácido	0.43
Cafeína cristalizada (monohidratado)	amargo	0.195
Cloruro de sodio anhidro	salado	1.19
Sacarosa	dulce	5.76
Glutamato de sodio monohidratado	umami	0.595
Sulfato de hierro (II) heptahidratado	metálico	0.00475

Las disoluciones preparadas se reparten en una serie de copas. Las muestras se presentan a los jueces en una secuencia aleatoria que puede tener algunos sabores repetidos y se introduce entre las disoluciones con sabor uno o dos recipientes que contienen sólo agua; por ejemplo, se presentan dos de sabor ácido, uno de agua, dos de salado, dos de amargo, uno de agua, dos de umami, dos de metálico, uno de dulce. Hay que codificar todas las muestras con la ayuda de una clave de 3 dígitos que conoce sólo el organizador de los ensayos. Se dispone de una jarra de agua para que los jueces se enjuaguen la boca.

Este agua es la misma que la empleada para la preparación de las disoluciones.

Cada juez prueba sucesivamente el contenido de cada recipiente, tomando un trago de aproximadamente 15 mL de cada uno de ellos siguiendo el orden de presentación sin volver a las muestras previamente probadas. Después de cada degustación, el juez aportará su juicio en el formulario de respuesta adjunto (Figura 17).

Nombre:		Fecha:					
Código	Sabor no identificado	Ácido	Amargo	Salado	Dulce	Umami	Metálico
415							
178							
965							
332							
547							
Poner una cruz en la columna apropiada							

Figura 17. Ficha para la selección del panel de cata (identificación de sabores).

4.2.6.3.- Entrenamiento

Tiene por objeto incrementar la sensibilidad, percepción y concordancia del panel al objeto de conseguir un bloque homogéneo y exacto. Los objetivos del entrenamiento son: aprender a evaluar el producto, familiarizarse con los tests, con las muestras, emitir juicios objetivos, equiparar el vocabulario del grupo, comparar intensidades, mejorar la repetibilidad.

El entrenamiento del panel se realizó durante un período de tres meses. Las sesiones se repartieron en una sola sesión por semana para las pruebas de sabores y dos sesiones, para el resto de las pruebas, con el objeto de evitar la fatiga de los participantes y debido también a su disponibilidad horaria. El panel fue entrenado en aquellos atributos que mejor pueden describir un vinagre y fueron previamente elegidos por consenso. Se tomaron los descriptores más característicos de las muestras: sensación punzante debida al ácido acético, olor a acetato de etilo, olor a compuestos volátiles cedidos por la madera, (coco, clavo y vainilla) y olor a vino.

a) Disoluciones

Para el entrenamiento se emplean concentraciones crecientes del atributo a entrenar. La prueba elegida consiste en la ordenación de las muestras en función de la intensidad del descriptor constituyendo una escala ordinal. La prueba permite extraer más información que la simple ordenación, ya que permite estimar la importancia de las propiedades o la preferencia de las mismas.

Sensación punzante

La sensación punzante de los vinagres, de la que es responsable el ácido acético, fue entrenada empleando disoluciones cuyas concentraciones se establecieron en función del grado acético de los vinagres. Los jueces deben ordenar las 6 disoluciones en una escala definida como no perceptible, perceptible, débil, moderado, fuerte y muy fuerte (Figura 18). Cada disolución se codifica con números de tres dígitos aleatoriamente elegidos.

No perceptible: 0% ácido acético.

Perceptible: 4% ácido acético con agua.

Débil: 6% ácido acético con agua.

Moderado: 7% ácido acético con agua.

Fuerte: 8% ácido acético con agua.

Muy fuerte: 10% ácido acético con agua.

Olor a acetato de etilo

El objetivo de este entrenamiento se centra en detectar el olor a acetato de etilo, compuesto que aparece frecuentemente en vinagres envejecidos y que se describe como el típico olor a pegamento. A su vez, los jueces aprenden a ordenarlo en concentraciones crecientes.

Las disoluciones se prepararon con acetato de etilo (en concentraciones similares a las encontradas en los vinagres (Morales, 1999). Como la elevada concentración en ácido acético dificulta la percepción del resto de sensaciones, las disoluciones de entrenamiento contenían 7 grados acéticos (concentración de acético habitual en vinagre de Jerez) para que los jueces aprendieran a distinguir ambas sensaciones. En total, se prepararon 6 disoluciones de 100 mL que se dispusieron en frascos de 125 mL para que cada juez los catara y juzgara por separado (Figura 18).

No perceptible: ácido acético al 7% en agua mineral

Perceptible: 0.5g/L acetato de etilo + ácido acético al 7%

Débil: 1.5 g/L acetato de etilo + ácido acético al 7%

Moderado: 2.0 g/L acetato de etilo + ácido acético al 7%

Fuerte: 2.5 g/L acetato de etilo + ácido acético al 7%

Muy fuerte: 3.0 g/L acetato de etilo + ácido acético al 7%

Olor a vino

Para la preparación de las disoluciones utilizamos un vino oloroso viejo. Se preparan en medio acético.

No perceptible: 6.65 mL de ácido acético + agua hasta 100 mL

Perceptible: 6.65 mL de ácido acético + 20 mL de vino + agua hasta 100 mL

Débil: 6.65 mL de ácido acético + 40 mL de vino + agua hasta 100 mL

Moderado: 6.65 mL de ácido acético + 60 mL de vino + agua hasta 100 mL

Fuerte: 6.65 mL de ácido acético + 80 mL de vino + agua hasta 100 mL

Muy fuerte: 6.65 mL de ácido acético + vino hasta 100mL

Olor a coco

Se prepara una solución madre con una concentración de 476 mg/L de β -metil- γ -octalactona, para favorecer la solubilización añadimos 3mL de ácido acético glacial y enrasamos con agua hasta un volumen total de 100 mL.

Las disoluciones que se catan presentan un contenido final de 7° acéticos y fueron preparadas de la siguiente forma:

No perceptible: 6.65 mL de ácido acético + agua hasta 100mL

Perceptible: 1.5 mL de solución madre de β -Metil- γ -octalactona + 6.60 mL de ácido acético + agua hasta 100 mL

Débil: 3.5 mL de solución madre de β -Metil- γ -octalactona + 6.54 mL de ácido acético + agua hasta 100 mL

Moderado: 5.6 mL de solución madre de β -Metil- γ -octalactona + 6.54 mL de ácido acético + agua hasta 100 mL

Fuerte: 7.8 mL de solución madre de β -Metil- γ -octalactona + 6.41 mL de ácido acético + agua hasta 100 mL

Muy fuerte: 12 mL de solución madre de β -Metil-y-octalactona + 6.29 mL de ácido acético + agua hasta 100 mL

Olor a vainilla

Para entrenar al panel de cata en el olor a vainilla el compuesto que utilizamos es la vainillina Preparamos una solución madre con una concentración de 0.2 g/100 mL y a partir de ella las siguientes disoluciones:

No perceptible: 6.65 mL de ácido acético + agua hasta 100 mL

Perceptible: 5 mL de solución madre de vainillina + agua hasta 100 mL

Débil: 10 mL de solución madre de vainillina + agua hasta 100 mL

Moderado: 20 mL de solución madre de vainillina + agua hasta 100 mL

Fuerte: 32 mL de solución madre de vainillina + agua hasta 100 mL

Muy fuerte: 45 mL de solución madre de vainillina + agua hasta 100 mL

Olor a clavo

El olor a clavo está asociado a la presencia de eugenol, así para entrenar al panel de cata en dicho aroma preparamos una solución madre con 50 μ L de eugenol, 3 mL de ácido acético para su solubilización y enrasamos hasta 100 mL con agua destilada. La concentración final es de 535 mg /L de eugenol. A partir de ella obtuvimos la siguiente serie de disoluciones para la cata:

No perceptible: 6.65 mL de ácido acético + agua hasta 100 mL

Perceptible: 1.8 mL de solución madre de eugenol + 6.59 mL de ácido acético + agua hasta 100 mL

Débil: 3.7 mL de solución madre de eugenol + 6.55 mL de ácido acético + agua hasta 100 mL

Moderado: 7.5 mL de solución madre de eugenol + 6.43 mL de ácido acético + agua hasta 100 mL

Fuerte: 15 mL de solución madre de eugenol + 6.2 mL de ácido acético + agua hasta 100 mL

Muy fuerte: 22.5 mL de solución madre de eugenol + 5.98 mL de ácido acético + agua hasta 100 mL

b) Procedimiento

En cada sesión de cata se pidió a los jueces que ordenaran las disoluciones del atributo objeto de entrenamiento según su intensidad de 4 menor a mayor. Se realizaron un máximo de 3 ordenaciones por sesión y dos sesiones a la semana.

Descriptores	Escala					
	No perceptible (0)	Perceptible (1)	Débil (2)	Moderado (3)	Fuerte (4)	Muy fuerte (5)
Olor a acetato de etilo						
Olor a vainilla						
Olor a clavo						
Olor coco						
Sensación punzante (acético)						
Olor a vino						

Figura 18. Ficha de entrenamiento de panel de cata.

4.2.6.4.- Validación del panel de cata

Después de realizar los ejercicios de entrenamiento descritos anteriormente, era preciso decidir si los integrantes del panel de cata estaban en condiciones de juzgar las muestras de vinagre o si por el contrario debían seguir con el entrenamiento hasta que su capacidad fuera adecuada. Se diseñaron sesiones para la validación del panel que consistían en una serie de pruebas triangulares (pruebas discriminatorias) (Figura 19) al objeto de comprobar si eran capaces de distinguirlos.

a) Disoluciones

A continuación se detallan las diferentes disoluciones empleadas en las distintas sesiones de validación del panel. Se presentaron de forma aleatoria.

Juego nº 1

A Vinagre joven enriquecido con vainillina con concentración que se ha identificado en el entrenamiento como débil.

B. Vinagre envejecido en virutas.

Juego nº 2

A. Vinagre joven enriquecido con eugenol con concentración que se ha identificado en el entrenamiento como débil.

B. Vinagre envejecido en virutas.

Juego nº 3

A. Vinagre joven enriquecido con β -Metil-y-octalactona con concentración que se ha identificado en el entrenamiento como débil.

B. Vinagre envejecido en virutas.

Juego n° 4

A. Vinagre joven.

B. Vinagre envejecido en virutas.

b) Procedimiento

Los vinagres se presentan en copas de cata codificadas por números de tres dígitos. Para evitar la diferencia potencial del color de las muestras se usaron copas oscuras o copas normales cubiertas con papel de aluminio. Asimismo, para minimizar la pérdida de los compuestos volátiles las copas se tapan con vidrio de reloj durante la realización de los análisis. Entre cata y cata los jueces guardan un descanso de un minuto. Las muestras se huelen inclinando las copas con respecto a la nariz unos 45° para captar mejor los aromas y sus intensidades. El volumen de la prueba se mantiene igual en todas las copas (50 mL). Se realizaron un máximo de cuatro pruebas al día para evitar la fatiga debida a la fuerte sensación punzante del vinagre. Los replicados de los ensayos se realizaron en diferentes días de idéntica manera. El orden de cata de las muestras fue el mismo para todos los jueces.

Muestra: Vinagre		Nombre:	
		Fecha:	
Examine las tres muestras. Rodee con un círculo la clave de la muestra que considera distinta.			
Juego N°	Clave (Izquierda)	Clave (Media)	Clave (Derecha)
1	115	876	321
2	333	564	678
3	527	356	879
4	180	230	240

Figura 19. Ficha de cata para la prueba triangular.

4.2.6.5.- Análisis sensorial de las muestras de vinagre

Las muestras de vinagre de la presente memoria se han evaluado con dos propósitos. El primero comprobar si se podían discriminar sensorialmente muestras de vinagre sometidas a distintas técnicas de envejecimiento acelerado y el segundo describir el perfil sensorial de los vinagres producidos. Así se ha evaluado el efecto de los distintos tratamientos ensayados en el envejecimiento acelerado. Se comparan las muestras elaboradas con distintos tipos de virutas (tostadas y mojadas-tostadas), vinagres de partida con distintos grado alcohólicos y vinagres con distintos tiempos de maceración.

a) Muestras

- La finalidad de esta prueba era determinar si se encuentran diferencias entre el vinagre elaborado por un procedimiento de envejecimiento acelerado (vinagre con 1º alcohólico macerado

durante 15 días en virutas tostadas) y vinagres elaborados por un método tradicional (vinagres de Jerez Reserva y vinagre de Jerez Gran Reserva cedidos por el Consejo Regulador de la Denominación de Origen).

Tabla 14. Muestras para diferenciar el envejecimiento acelerado del tradicional.

muestras	codificación
Vinagre con 1º de alcohol residual y macerada en virutas de roble tostadas durante 15 días	VE1T
Vinagre de Jerez Reserva 1	R1
Vinagre de Jerez Reserva 2	R2
Vinagre de Jerez Reserva 3	GR

Se presentaron a los jueces los siguientes juegos, al azar repitiéndose las pruebas por duplicado (Tabla 15).

Tabla 15. Juegos que se presentan a los jueces.

Juego nº 1	Juego nº 2	Juego nº3
A. VE1T	A. VE1T	A.VE1T
B. R1	B. R2	B. GR

- Vinagre macerado durante 1 año con virutas tostadas y vinagres del mercado. Las muestras empleadas aparecen en la tabla 16.

Tabla 16. Muestras para el test triangular.

muestras	codificación
Vinagre con 1º de alcohol residual y macerada en virutas de roble tostadas durante 1 año	VE1T -365
Vinagre de Jerez Reserva 1	R1
Vinagre de Jerez Reserva 2	R2
Vinagre de Jerez Reserva 3	GR

Se presentaron a los jueces los siguientes juegos, al azar y siempre por duplicado (Tabla 17).

Tabla 17. Juegos que se presentan a los jueces.

Juego nº 1	Juego nº 2	Juego nº3
A. VE1T-365	A. VE1T-365	A. VE1T-365
B. R1	B. R2	B. GR

Al tratarse de pruebas triangulares se emplea el mismo modelo de ficha de cata detallado en la Figura 19.

- Asimismo, se realizaron pruebas triangulares con muestras de vinagre maceradas en dos tipos de madera, roble francés y roble americano, y distintos porcentaje de cada uno de ellas:

Vinagre macerado con virutas de roble francés al 1% p/v y vinagre macerado en virutas de roble francés al 2% p/v.

Vinagre macerado con viruta de roble francés al 1% p/v y vinagre macerado en virutas de roble americano al 1% p/v.

Vinagre macerado con virutas de roble americano al 1% p/v y vinagre macerado en virutas de roble americano al 2% p/v.

b) Procedimiento

Se han realizado pruebas triangulares Pruebas discriminatorias), el procedimiento para llevarlas a cabo y la ficha de cata empleada han sido los mismos que los utilizados en la validación del panel de cata (4.2.6.4 b) procedimiento)

Test descriptivo

Para describir el perfil sensorial de las muestras problema se emplea ficha con escala no estructurada (Figura 20). Es una recta que tiene 10 cm de longitud, con los términos descriptivos colocados en cada extremo. Los catadores hacen una señal en la recta para indicar la intensidad de cada atributo, los valores extremos del segmento corresponden a pobre o no presenta y excelente o muy fuerte. Midiendo la distancia en centímetros entre la señal hecha por el catador y el extremo izquierdo de la recta, se obtiene un valor numérico (UNE87-017-92) (Tsfaye et al., 2003).

El test descriptivo se llevó a cabo con dos tipos de fichas de cata. En una primera aproximación los descriptores que van a definir el perfil aromático de las muestras de vinagre son: intensidad aromática, riqueza en matices aromáticos, olor a acetato de etilo, olor a madera, olor a vino, sensación punzante e impresión general (Figura 22).

Código: _____ **Fecha:** _____
Nombre: _____

Marque una línea vertical sobre la línea de base para describir la intensidad de aroma que recibe para cada muestra según los siguientes atributos

Atributo

Intensidad aromática	-----
	<i>Poco aromático</i> <i>Muy aromático</i>
Riqueza en matices Aromáticos	-----
	<i>Muy desagradable</i> <i>Muy agradable</i>
Olor a acetato de Etilo	-----
	<i>Ausente</i> <i>Muy pronunciado</i>
Olor a madera	-----
	<i>Ausente</i> <i>Muy pronunciado</i>
Olor a vino	-----
	<i>Ausente</i> <i>Muy pronunciado</i>
Sensación punzante	-----
	<i>Ausente</i> <i>Muy pronunciado</i>
Impresión general	-----
	<i>Muy mala</i> <i>Excelente</i>

Figura 20. Ficha para el perfil aromático de las muestras problema.

Una vez que el panel de cata fue entrenado en los descriptores de la madera (vainilla, coco y eugenol), la descripción de las muestras se realizó con la siguiente ficha de cata (Figura 23) en la que se recoge intensidad aromática, riqueza en matices aromáticos, olor a acetato de etilo, olor a clavo, olor a vainilla, olor a coco, olor a vino, olor a madera, sensación punzante e impresión general.

Esta ficha de cata se completa con un apartado “notas de interés” que sirve para dar la oportunidad a los jueces de describir otras apreciaciones ya sean positivas o negativas que observen en la muestra (Figura 21).

Código:

Fecha:

Nombre:

Marque una línea vertical sobre la línea de base para describir la intensidad de aroma que percibe para cada muestra según los siguientes atributos

Atributo

Intensidad aromática	-----
	<i>Poco aromático</i> <i>Muy aromático</i>
Riqueza en matices Aromáticos	-----
	<i>Muy desagradable</i> <i>Muy agradable</i>
Olor a acetato de Etilo	-----
	<i>Ausente</i> <i>Muy pronunciado</i>
Sensación punzante	-----
	<i>Ausente</i> <i>Muy pronunciado</i>
Olor a vino	-----
	<i>Ausente</i> <i>Muy pronunciado</i>
Olor a vainilla	-----
	<i>Ausente</i> <i>Muy pronunciado</i>
Olor a clavo	-----
	<i>Ausente</i> <i>Muy pronunciado</i>
Olor a coco	-----
	<i>Ausente</i> <i>Muy pronunciado</i>
Olor a madera	-----
	<i>Ausente</i> <i>Muy pronunciado</i>
Impresión general	-----
	<i>Muy mala</i> <i>Excelente</i>

Notas de Interés:

POSITIVAS

Dulce

Frutos secos

Especificar: _____

NEGATIVAS

Mohoso/humedad

Virutas de lápiz

Otros (especificar): _____

Figura 21. Ficha para el perfil aromático y notas de interés de las muestras problema.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1.- Extracto Seco

El Extracto Seco total de un vinagre se define como el conjunto de todas las sustancias que en condiciones fijas determinadas no se volatilizan (Ministerio de Sanidad y Consumo, 1985). La riqueza en componentes del sustrato vínico que va a dar origen al vinagre, el procedimiento de elaboración empleado y el envejecimiento van a condicionar el valor final del extracto seco de un vinagre (Troncoso y Guzmán, 1988). La glicerina, el ácido tartárico (ácido fijo) y los compuestos nitrogenados son los principales responsables del extracto seco en vinos finos (Martínez de la Ossa et al., 1987). En menor extensión también contribuyen el potasio, los sulfatos y otros elementos minerales además de los compuestos polifenólicos.

Durante el envejecimiento en barriles de madera el extracto seco de los vinagres aumenta debido a las pérdidas de agua por difusión y evaporación a través de los poros de la madera, lo que supone una concentración de todas las sustancias. La evolución del extracto seco se siguió durante 1 año de envejecimiento en botas de 16.6 L de capacidad, midiéndose un aumento de un 25% del valor inicial al cabo de 1 año de envejecimiento (Tesfaye et al., 2004).

En nuestro estudio, el envejecimiento acelerado se ha llevado a cabo en recipientes de cristal cerrados; por tanto, no se produce el fenómeno de evaporación que tiene lugar en el envejecimiento en botas. Así pues, los incrementos en el extracto seco se deberán, principalmente, a la cesión de compuestos por parte de las virutas al vinagre. El extracto seco (% p/v) de las muestras de vinagre envejecidas con las condiciones estudiadas (grado alcohólico, tostado de las virutas) durante tres meses se muestran en la Tabla 18.

Tabla 18. Evolución de Extracto seco (%p/v) en vinagre sintético y en muestras de vinagre.

Muestras de vinagre	Tiempo de envejecimiento (días)				
	0	15	30	60	90
VE0MT	0.155 ± 0.001	0.153 ± 0,001	0.163 ± 0,002	0.165 ± 0,002	0.165 ± 0,001
VE0T	0.155 ± 0.099	0.149 ± 0,001	0.153 ± 0,002	0.166 ± 0,004	0.161 ± 0,011
VE1MT	0.155 ± 0.001	0.152 ± 0,001	0.154 ± 0,003	0.159 ± 0,002	0.158 ± 0,002
VE1T	0.155 ± 0.001	0.154 ± 0,003	0.167 ± 0,003	0.154 ± 0,001	0.146 ± 0,002
VE2MT	0.155 ± 0.098	0.149 ± 0,001	0.158 ± 0,003	0.159 ± 0,008	0.153 ± 0,014
VE2T	0.155 ± 0.099	0.166 ± 0,009	0.155 ± 0,001	0.153 ± 0,003	0.159 ± 0,009
SMT	0.003 ± 0.001	0.056 ± 0,003	0.058 ± 0,004	0.059 ± 0,004	0.057 ± 0,006
ST	0.003 ± 0.001	0.052 ± 0,001	0.052 ± 0,007	0.065 ± 0,007	0.067 ± 0,007

Como se observa en la Tabla 18, el extracto seco aumenta a lo largo del tiempo constatándose la cesión de sustancias de la madera. Se aprecia que a los 60 días se alcanza el valor máximo.

El análisis de varianza demostró que no existen diferencias significativas entre vinagres envejecidos con los diferentes tipos de virutas ni con distintos grados alcohólicos.

El extracto seco aumenta en 2.79% sobre el valor inicial al cabo de 60 días de envejecimiento. Se observa también que para el vinagre sintético existe un aumento 21 veces superior sobre el valor inicial.

5.2.- Fenoles Totales

Los cambios en la composición fenólica durante el envejecimiento son muy complejos debido a la gran variedad de factores involucrados (Fabios et

al., 2000). Las botas de madera sirven como soporte de la extracción de compuestos fenólicos y los productos envejecidos como el vinagre se enriquecen con estos compuestos con el tiempo (Rous y Alderson, 1983; Chatonnet et al., 1992; Millar et al., 1992; Pocock et al., 1994; Fernandez de Simón et al., 1996; Monedero et al., 1998).

La evolución del índice de polifenoles totales durante el envejecimiento acelerado se muestra en la Tabla 19

Tabla 19. IPT (mg/L) en vinagre sintético y en muestras de vinagre.

Muestras de vinagre	Tiempo de envejecimiento (días)				
	0	15	30	60	90
VE0MT	43 ± 0.084	708 ± 0.919	697 ± 0.678	697 ± 0.961	713 ± 0.678
VE0T	43 ± 0.197	327 ± 0.961	425 ± 0.593	376 ± 0,169	354 ± 0.636
VE1MT	43 ± 0.353	392 ± 0.197	394 ± 0.212	452 ± 0.056	428 ± 0.961
VE1T	43 ± 0.396	422 ± 0.707	413 ± 1.470	407 ± 0.155	409 ± 0.070
VE2MT	43 ± 0,197	318 ± 0.523	380 ± 1.060	383 ± 0.056	730 ± 0.636
VE2T	43 ± 0,452	346 ± 0.106	417 ± 0.240	400 ± 0.381	432 ± 0.593
SMT	0 ± 0,000	86 ± 0.452	178 ± 0.961	203 ± 0.212	318 ± 0.070
ST	0 ± 0,000	148 ± 0.961	247 ± 1.428	281 ± 0.707	239 ± 0.919

Podemos observar que los cambios más acusados del IPT ocurren durante los primeros 15 días, produciéndose un incremento medio de 300 mg/L. Para las muestras tomadas a los 30, 60 y 90 días, si bien siguen aumentando, este incremento es más ligero, llegando a resultar cercano al 10% del valor alcanzado a los 15 días. Para vinagres en botas de 16.6 L de capacidad, el incremento que experimenta el IPT es de 125 mg/L al cabo de 1 año (Tesfaye et al., 2002). De esta manera, mediante la adición de virutas al 2% p/v se consigue un aumento superior al doble en sólo 15 días.

Según Kadim y Mannheim (1999) la cinética de la extracción de compuestos fenólicos durante el proceso de envejecimiento depende de

muchos factores. Un aumento del contenido en polifenoles al principio del proceso de envejecimiento se explica por la disolución rápida de estos compuestos de la superficie interna de la bota.

Una vez este proceso de lavado ha concluido, el siguiente paso será la penetración del líquido en el interior de la madera y la solubilización de los polifenoles debido a la extracción por medio de la difusión. A este nivel, la extracción resulta prácticamente uniforme y a su vez, lenta. En primer lugar, el líquido tiene que pasar al interior de la madera seca y rellenar los poros y solubilizar los fenoles. Finalmente, los fenoles solubilizados pasan hacia la superficie de contacto madera-líquido mediante gradiente de concentración. De éste modo, los mismos autores confirman que el factor limitante para la extracción de los fenoles es la velocidad de penetración del líquido en la madera seca; en lugar de la difusión de los fenoles, como se creía anteriormente.

EL tamaño de las virutas utilizadas para la maceración está comprendido entre 5-10 mm, de modo que en este caso la cesión de los fenoles debe ser por solubilización. La madera se impregna de líquido en un período muy breve de tiempo, el gradiente de difusión es muy pequeño. Los fenoles totales obtenidos corroboran que el factor limitante es la impregnación de la madera. La rapidez de la extracción observada implica que el proceso de solubilización y difusión transcurren en un solo paso.

No se observa en los datos analizados una influencia del tipo de tratamiento ensayado o de los distintos grados alcohólicos. En la bibliografía se ha descrito que a mayor grado alcohólico de la mezcla en la que se maceran las virutas el IPT es mayor (Monedero et al, 1998). No obstante hay que considerar que este estudio se realiza con disoluciones hidroalcohólicas con el 60% de alcohol, valor este muy lejano a nuestro ensayo. Sin embargo, los valores de IPT obtenidos por estos autores son muy similares a los

nuestros en condiciones que son perfectamente comparables (cantidad de virutas, tipos y tostado).

5.3.- Compuestos Volátiles

El aroma del vinagre es una fracción compleja que contiene muchos componentes con un amplio margen de volatilidad, polaridad y concentración (Blanch et al., 1992). Estos compuestos volátiles responsables del olor del vinagre tienen muy diferentes orígenes formándose algunos durante la fermentación de mostos y vinos (fermentación alcohólica producida por las levaduras o fermentación maloláctica producida por las bacterias lácticas) a los que se denominan aromas fermentativos. Entre estos compuestos destacan los alcoholes superiores, ésteres ligeros y aldehídos de bajo peso molecular. Los ésteres son beneficiosos para el aroma, mientras que algunos alcoholes superiores y aldehídos resultan perjudiciales para la calidad sensorial de los vinos (Cañete, 1994).

Durante los procesos fisicoquímicos de conservación y envejecimiento del vino, los aromas se enriquecen considerablemente. Se forman ésteres, generalmente de alto peso molecular, por la condensación entre los alcoholes y los ácidos orgánicos. A estos se les denomina aromas postfermentativos (Cañete, 1994).

Además de los compuestos volátiles que proceden del vino, el vinagre contiene otros compuestos volátiles que se forman bien durante la acetificación o durante el envejecimiento o maduración de los vinagres. El contenido en sustancias volátiles, aunque muchas de ellas puedan aparecer en el vino de partida, está íntimamente relacionado con las características genuinas del vinagre, que inciden sobre su apreciación organoléptica y, en definitiva, sobre la calidad del vinagre. Nieto et al (1993) utilizan algunos de los compuestos volátiles del vinagre (metanol, 1-propanol, 3-metil-1-butanol,

acetoína) junto a otros componentes de éste, para discriminar entre vinagres de calidad y vinagres defectuosos.

Los compuestos volátiles del vinagre se clasifican en cuatro grupos según sus características químicas o grupos funcionales: compuestos carbonílicos, alcoholes, ésteres y lactonas (Morales, 1999).

Las concentraciones de los compuestos volátiles, obtenidos durante el proceso de maceración de vinagre en virutas de madera de roble sometidas a dos tipos distintos de tratamiento se muestran en la Tabla 20.

Tabla 20. Compuestos volátiles (mg/L).

	Tiempo envejecimiento (días)	Acetaldehído	Acetato de metilo	Acetato de Etilo	Metanol	Etanol
VE0MT	15	0.56±0.04	16.19±0.16	320.62±0.90	5.52±0.01	0.54±0.01
	30	0.52±0.01	16.22±0.25	325.10±0.01	5.74±0.05	0.54±0.01
	60	0.83±0.05	16.40±0.32	327.58±0.45	6.34±0.03	0.53±0.01
	90	1.56±0.07	16.92±0.25	334.47±0.43	7.03±0.03	0.53±0.01
VE0T	15	0.49±0.03	16.13±0.37	314.78±0.28	5.9±0.05	0.53±0.01
	30	0.56±0.02	16.18±0.27	321.77±0.29	6.04±0.03	0.54±0.02
	60	0.81±0.06	16.05±0.17	319.53±0.33	6.38±0.06	0.53±0.02
	90	1.32±0.05	16.96±0.25	326.23±0.37	6.53±0.03	0.53±0.01
VE1MT	15	0.88±0.06	16.05±0.35	550.77±0.56	5.66±0.04	1.1±0.10
	30	2.93±0.04	16.34±0.43	590.12±0.15	5.16±0.03	1.09±0.12
	60	3.48±0.10	16.63±0.40	625.34±0.85	6.11±0.06	1.12±0.10
	90	3.95±0.13	16.82±0.45	651.83±0.37	5.67±0.08	1.14±0.09
VE1T	15	0.42±0.01	16.26±0.46	524.76±0.56	5.65±0.04	1.2±0.05
	30	3.12±0.16	16.30±0.36	579.63±0.34	6.82±0.06	1.12±0.04
	60	4.05±0.22	16.62±0.38	660.09±0.48	5.67±0.07	1.15±0.05
	90	4.87±0.25	16.79±0.54	659.71±0.54	5.32±0.07	1.10±0.06
VE2MT	15	2.74±0.15	15.98±0.25	798.22±0.18	5.22±0.05	2.43±0.10
	30	4.12±0.18	16.03±0.35	810.30±0.15	5.9±0.06	2.32±0.12
	60	5.32±0.26	16.64±0.42	1028.33±0.32	6.22±0.07	2.35±0.15
	90	6.61±0.34	16.81±0.38	1066.47±0.44	6.41±0.06	2.42±0.16
VE2T	15	1.35±0.09	15.72±0.38	723.48±0.65	5.02±0.06	2.44±0.12
	30	4.20±0.20	16.40±0.65	850.05±0.45	6.01±0.05	2.39±0.10
	60	5.75±0.35	17.29±0.80	1028.33±0.35	5.72±0.04	2.39±0.09
	90	6.81±	16.54±	1066.47±	5.19±	2.45±

Tabla 20. Compuestos volátiles (mg/L) (Continuación).

	Tiempo envejecimiento (días)	2-Metil-1-butanol	3-Metil-1-butanol	Acetoína	Hidroxiacetona	Gamma-butirolactona
VE0MT	15	6.06±0.08	0.013±0.001	55.93±0.20	1.29±0.05	
	30	6.29±0.04	0.022±0.001	60.52±0.25		
	60	6.98±0.09		57.44±0.18		
	90	6.08±0.13		56.84±0.18		45.17±0.27
VE0T	15	6.24±0.10		58.84±0.10	1.29±0.03	
	30	6.13±0.09		60.34±0.15		
	60	6.07±0.20	0.048±0.001	59.34±0.16		
	90	6.16±0.15		50.04±0.13		45.04±0.32
VE1MT	15	6.08±0.15		58.40±0.21	1.29±0.05	
	30	3.18±0.18	1.56±0.05	86.57±0.20		
	60	4.82±0.10		59.71±0.22		
	90	6.09±0.12		59.65±0.25		45.71±0.22
VE1T	15	6.08±0.15		59.19±0.26	6.42±0.18	
	30	5.54±0.10	0.092±0.006	55.18±0.15		
	60	4.85±0.16		60.12±0.10		
	90	6.22±0.14		58.06±0.12	5.43±0.12	45.13±0.25
VE2MT	15	6.2±0.10		55.86±0.13		
	30	5.9±0.15		58.35±0.16		
	60	4.27±0.18		57.56±0.13		
	90	6.26±0.16	0.0186±0.003	58.21±0.10		
VE2T	15	5.93±		59.19±	6.73±	
	30	5.20±		60.78±		
	60	5.35±		58.44±		
	90	6.15±		56.60±	4.99±	44.98±

El **acetaldehído o etanal**, es el principal aldehído en vinagres. Este compuesto está presente en el vino antes de la acetificación y procede de la descarboxilación del piruvato mediada por la enzima piruvato-deshidrogenasa. En los vinos en crianza biológica es un indicador positivo del aroma y bouquet típico de estos (Navascués y cols., 1995) y es el punto de partida de importantes reacciones químicas y bioquímicas (Casa Lucas, 1985; García Maiquez, 1988; Bravo, 1995). La presencia de etanal puede ser

también producto de la oxidación química del etanol o aparecer como metabolito intermedio en la conversión oxidativa del etanol a ácido acético de donde deriva la mayor parte del acetaldehído presente en vinagres.

A lo largo del período de envejecimiento acelerado se observa un aumento de este compuesto en todos los tratamientos estudiados. Aunque el incremento es más acusado para muestras con 2 grados alcohólicos ya que está relacionado con la oxidación química del etanol.

Para obtener vinagres normalmente se parte de vinos jóvenes que no han sufrido crianza biológica; Durante el envejecimiento estático por el sistema tradicional, los valores de acetaldehído tienden a disminuir; así, en un estudio llevado a cabo en nuestro grupo, los niveles descienden de 100 mg/L a 10 mg/L al año de envejecimiento para vinagres que presentaban 2° alcohólicos (Morales, 1999). El valor encontrado en nuestras muestras de vinagres con 2 grados alcohólicos con independencia del tratamiento dado a las virutas está entre 6.61-6.81mg/L valores muy próximos a los encontrados para el envejecimiento tradicional (Morales, 1999).

La **acetoína** forma parte del aroma de bebidas alcohólicas procedentes de la fermentación (Llaguno y Polo, 1991b). Este compuesto se encuentra tanto en el vino como en el vinagre en un intervalo amplio de concentración que varía desde los valores mínimos de 60-150 mg/L hasta valores de 800 mg/L en productos alterados (Mecca y cols., 1979). Se han encontrado niveles de acetoína de 200 a 600 mg/L para vinagres vínicos andaluces, entre los que se analizaron algunos eran artesanales (Troncoso y Guzmán, 1987^a). Durante la acetificación se acumula la acetoína, así este compuesto está íntimamente relacionado con la calidad de los vinagres (Llaguno y Polo, 1991b). Cuando un vinagre vínico no contiene acetoína, hay que sospechar de su origen. Es un parámetro que sirve para diferenciar los vinagres de fermentación de aquellos elaborados con acético de síntesis (Yamada y

Kurono, 1972). El tipo de fermentación influye significativamente en la cantidad de acetoína formada; parece ser que en las fermentaciones con cultivo sumergido se forma en pequeña cantidad (Hadrón y Beetschen, 1965).

La concentración de acetoína en nuestras muestras no se ve afectada ni por el tiempo de maceración, ni el contenido alcohólico, ni el tratamiento dado a las virutas. El valor oscila entre 55.93-60.78 mg/L. El envejecimiento no modifica la concentración inicial de acetoína.

EL **etanol** no sufre variación en un sistema de envejecimiento cerrado y no poroso.

Los **alcoholes isoamílicos (2-metil, 1-butanol y 3-metil, 1-butanol)** son consumidos por las bacterias acéticas. En un proceso de fermentación rápida metabolizan más rápidamente el 3-metil, 1-butanol que el 2-metil, 1-butanol. El vinagre de partida utilizado en nuestro trabajo procede de fermentación rápida, que explica el mayor contenido de 2-metil, 1-butanol.

El 2-metil, 1-butanol, está en mayor concentración en los vinagres que en muestras de vinagre sintético. Su valor se mantiene a lo largo de período de maceración o envejecimiento acelerado, sin influir ni el contenido alcohólico de la muestra ni el tratamiento dado a las virutas.

El **acetato de metilo** incrementa su valor a los 15 días de envejecimiento acelerado con respecto al valor inicial de la muestra de vinagre. Posteriormente se mantiene a lo largo de todo el período de envejecimiento acelerado, sin influir el grado alcohólico, ni el tratamiento dado a las virutas.

El **acetato de etilo**, éster característico del vinagre, se forma en cantidades importantes que superan los 1000 mg/L cuando las cantidades de

alcohol residual son altas. Debe tenerse en cuenta que este compuesto posee un umbral de percepción bajo, como la mayoría de los ésteres (17 mg/L en solución hidroalcohólica) (Peynaud, 1987). Así pues cantidades elevadas de este compuesto proporcionan mayor fragancia a los vinagres y por ello se relaciona con la calidad de éstos (Troncoso, 1986). EL acetato de etilo va aumentando a lo largo del período de envejecimiento, tanto más cuanto mayor es el contenido de alcohol residual que tiene la muestra. El aumento de este compuesto es importante. El mayor incremento se produce a los 15 días de envejecimiento, valor que permanece constante en muestras que carecen de contenido alcohólico (Figura 22). Las muestras con un contenido alcohólico entre 1-2, la concentración de acetato de etilo sigue incrementándose hasta los 60 días, alcanzando su valor máximo.

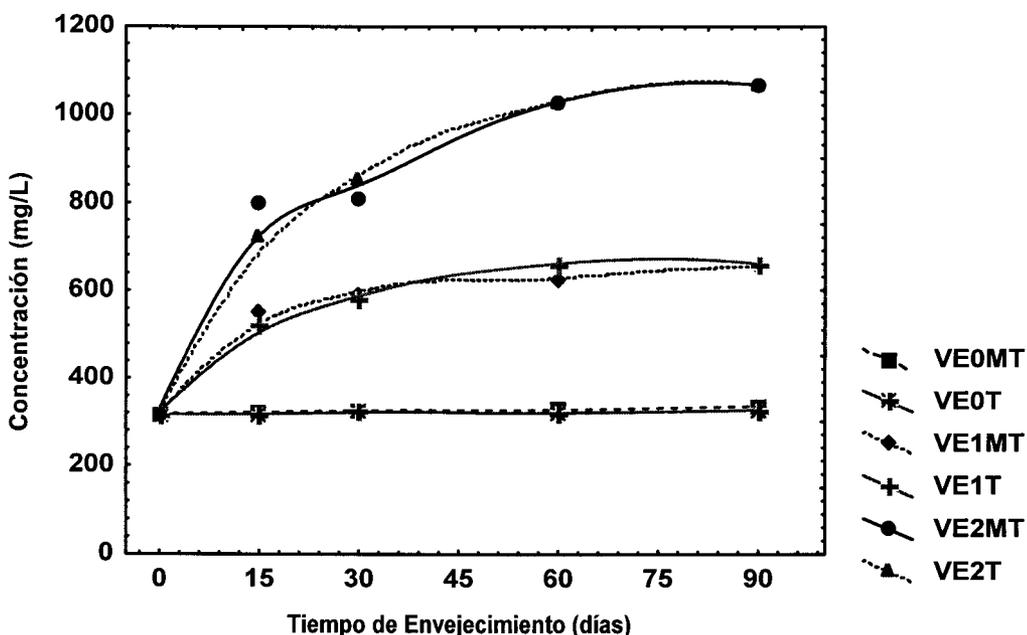


Figura 22. Evolución de la concentración de acetato de etilo en muestras de vinagres frente al tiempo de envejecimiento.

Lactato de Etilo y Succinato de dietilo son dos compuestos mayoritarios característicos de los vinos de Jerez y vinos de la uva palomino (Webb y Noble, 1976). EL lactato de etilo aparece a los 15 días de envejecimiento en las muestras con mayor contenido alcohólico, después de este tiempo el valor permanece prácticamente invariable para estas muestras.

Sin embargo el succinato de dietilo no fue detectado. De igual modo otros compuestos volátiles como γ -butirolactona, acetato de 2-feniletanol, 3-metil 1-butanol, 2-feniletanol tampoco fueron detectados en estas muestras.

5.4.- Compuestos Volátiles Procedentes de la Madera

5.4.1.- Selección y puesta a punto del método de extracción en fase sólida (EFS)

El método de extracción en fase sólida (EFS) se ensayó utilizando dos tipos de cartuchos diferentes, y estudiándose los porcentajes de recuperación de los compuestos volátiles siguientes a partir de las muestras eluidas: 2-furfural, 5-metilfurfural, alcohol furfurílico, guayacol, trans- β -metil- γ -octalactona, cis- β -metil- γ -octalactona, eugenol, y vainillina. El cartucho Bond Elut ENV permite detectar compuestos furánicos tales como 2-furfural, 5-metilfurfural, alcohol furfurílico, mientras que el resto de compuestos no son detectados. Por el contrario, cuando se utilizó el cartucho LiChrolut EN, se detecta todo el abanico de compuestos volátiles procedentes de la madera y que podemos encontrar en vinagres envejecidos en botas de roble o en madera. La tabla 21 nos muestra los porcentajes de recuperación obtenidos empleando el cartucho tipo LiChrolut EN.

Tabla 21. Resultados de ensayos de recuperación con cartucho LiChrolut EN.

Compuestos volátiles	Añadido (mg/L)	Recuperación (%)	Media recuperación \pm DS
2-Furfural	0.267	59.0	60.1 \pm 2.4
	0.545	62.8	
	0.812	58.4	
5-Metilfurfural	0.254	87.4	88.1 \pm 3.4
	0.519	91.8	
	0.774	85.0	
Alcohol Furfurílico	0.260	62.6	63.1 \pm 3.4
	0.532	66.7	
	0.792	60.0	
Guayacol	0.255	90.1	87.7 \pm 3.0
	0.522	89.0	
	0.777	84.4	
trans- β -Metil- γ -octalactona	0.207	105.7	101.7 \pm 3.9
	0.423	101.4	
	0.630	98.0	
cis- β -Metil- γ -octalactona	0.231	84.2	81.4 \pm 2.6
	0.472	80.9	
	0.702	79.0	
Eugenol	0.246	91.9	89.1 \pm 2.9
	0.503	89.4	
	0.749	86.0	
Vainillina	0.230	79.2	79.1 \pm 7.4
	0.470	86.4	
	0.700	71.7	

Towey y Waterhouse (1994) indican que la extracción de compuestos volátiles sigue una curva en la cual la relación de extracción es inicialmente alta, debido a la diferencia de concentración considerable entre la madera y el sustrato, pero decrece cuando la madera y el sustrato se van equiparando en

concentración. En nuestro caso, durante los primeros 15 días de macerado con virutas de roble difunden la mayoría de los compuestos volátiles, excepto el furfural, que no incrementa su concentración de forma considerable hasta los 90 días. La cinética de difusión del furfural es lenta y su concentración se incrementa gradualmente. A los 90 días el valor del furfural se ha doblado. Las virutas tienen un tamaño medio entre 5-10 mm, por lo cual el líquido penetra y las empapa en su totalidad, esto hace que el proceso de difusión de compuestos de la madera al líquido en contacto con ella sea fácil. En las botas o barriles sólo las capas más cercanas al líquido son empapadas por éste.

El análisis de compuestos volátiles procedentes de la madera se lleva a cabo en muestras de vinagres maceradas a los 15 días y a los 90 días de envejecimiento. Los resultados se muestran en la Tabla 22.

Vainillina. A los 15 días de envejecimiento se detecta un incremento medio de vainillina de 12.6 mg/L con independencia del grado alcohólico y del tratamiento dado a las virutas. Este valor se mantiene constante a los 90 días de envejecimiento.

Si comparamos el contenido de vainillina de las muestras de envejecimiento acelerado con muestras de vinagres de Jerez sometidos al envejecimiento tradicional durante 180 días (6 meses) en botas de roble encontramos que la concentración en las primeras es 5 veces superior a las segundas (Morales et al., 2004).

Numerosos autores, señalan que el tostado de los barriles puede incrementar hasta 50 veces la concentración de vainillina procedente de la madera (Chatonnet et al., 1989; Maga, 1989b; Nishimura et al., 1983). Spillman., et al 1997 encuentran que el contenido de vainillina procedente de la madera puede depender de la penetración de calor, y de la intensidad del

Tabla 22. Compuestos volátiles de la madera en muestras de vinagre.

Muestras de vinagre	Tiempo de envejecimiento (días)	Compuestos volátiles (mg/L)					
		2-Furfural	5-Metilfurfural	Alcohol furfurílico	trans- β -Metil- γ -octalactona	cis- β -Metil- γ -octalactona	Vainillina
V	0	1.46 \pm 0.02	n.d.	0.227 \pm 0.004	0.102 \pm 0.003	0.207 \pm 0.012	0.66 \pm 0.01
VE1MT	15	4.73 \pm 0.09	0.364 \pm 0.004	0.300 \pm 0.02	0.128 \pm 0.000	0.325 \pm 0.008	12.0 \pm 0.1
	90	8.67 \pm 0.03	0.324 \pm 0.010	0.192 \pm 0.003	0.128 \pm 0.007	0.309 \pm 0.002	12.6 \pm 0.2
VE1T	15	2.68 \pm 0.01	0.297 \pm 0.023	0.273 \pm 0.014	0.271 \pm 0.012	1.38 \pm 0.03	11.8 \pm 0.4
	90	5.85 \pm 0.05	0.219 \pm 0.014	n.d.	0.256 \pm 0.005	1.35 \pm 0.04	12.0 \pm 0.1
VE2MT	15	2.15 \pm 0.01	0.274 \pm 0.004	0.594 \pm 0.006	0.115 \pm 0.002	0.280 \pm 0.008	14.5 \pm 0.7
	90	8.39 \pm 0.01	0.525 \pm 0.033	0.285 \pm 0.008	0.125 \pm 0.003	0.288 \pm 0.004	15.4 \pm 0.2
VE2T	15	5.42 \pm 0.02	0.434 \pm 0.002	0.571 \pm 0.008	0.279 \pm 0.008	1.43 \pm 0.01	13.0 \pm 0.1
	90	0.7 \pm 0.06	0.438 \pm 0.009	0.275 \pm 0.012	0.285 \pm 0.005	1.47 \pm 0.00	14.7 \pm 0.1

n.d.: no detectado;

Tabla 23. Compuestos fenólicos en vinagre sintético y muestras de vinagre

tostado. En el tostado de los barriles sólo se afectan las capas más superficiales, mientras que en el tostado de las virutas el calor penetra completamente y conduce al aumento en la formación de vainillina.

El **2-Furfural** presenta una tendencia a aumentar a medida que aumenta el tiempo de envejecimiento y el grado alcohólico. Las muestras de vinagres con 1 grado alcohólico y maceradas en virutas sometidas a distinto tipo de tratamiento presentan un incremento similar (3.5mg/L), mientras que este incremento se duplica cuando se duplica el grado alcohólico.

El **alcohol furfurílico** se forma por reducción enzimática de los aldehídos furánicos análogos (Towey & Waterhause, 1996b). La concentración detectada en el vinagre inicial se mantiene a lo largo del período de envejecimiento.

El **5-metilfurfural** se forma en la madera durante el proceso de tostado, por ello no fue detectado en la muestra inicial, para el tiempo 0 de envejecimiento. A los 15 días de permanencia con virutas se miden valores similares para vinagres sometidos a ambos tipos de tratamiento.

No se detectan ni el **guayacol** ni el **eugenol** en ninguno de los vinagres estudiados.

La extracción de isómeros de **β -metil- γ -lactona** muestra tendencias diferentes. La *trans* - β -metil- γ -octalactona alcanzó concentraciones altas en muestras de vinagre envejecidas con virutas en contraposición a lo que ocurre en vinagres envejecidos en botas de roble donde se observa que el isómero que sufre un aumento mayor es el *cis*- β -metil- γ -octalactona (Morales et al., 2004). La relación *cis/trans* fue 2-5 y 9-12, respectivamente. Algunos autores consideran que la relación *cis/trans* es característica de las clases de madera (Guichard, Fournier, Masson, & Puech, 1995; Masson, Guichard,

Fournier, & Puech, 1995; & Waterhouse & Towey, 1994). La relación *cis/trans* en vinos envejecidos en barriles de roble americano es mayor de 5, mientras que la relación en vinos envejecidos en barriles de roble europeo es de 2 o menos (Towey & Waterhouse, 1996b).

Se ha comprobado que la concentración de los isómeros de β -metil- γ -octalactona depende en gran medida del pretratamiento aplicado a las virutas de roble. Las muestras de vinagres maceradas con virutas de roble sometidas al tratamiento de tostado experimentan un incremento en su concentración alrededor del 60% para el isómero *trans* y del 85% para el isómero *cis*, para un tiempo de envejecimiento de 15 días. Estos valores permanecen constantes con independencia del tiempo de envejecimiento y del grado alcohólico.

Respecto al pretratamiento de virutas de roble, la clase de pretratamiento a la que fueron sometidas las virutas de roble determina el contenido de los isómeros *trans* y *cis*. La ratio de los isómeros *cis/trans* fue algo diferente: 5 para las virutas tostadas y 2 para virutas hervidas y tostadas, lo cual soporta la hipótesis de Towey y Waterhouse (1994): la deshidratación incrementaría los niveles de whisky lactona de roble especialmente el isómero *cis*.

El grado alcohólico residual de los vinagres influye considerablemente en el contenido final de compuestos volátiles, fundamentalmente acetato de etilo (Morales et al., 2002). Este factor no influye en la extracción de compuestos volátiles de la madera. Los resultados revelan que no es significativo excepto para la vainillina (Tabla 22). Cuando se construye la matriz de correlación con todas las variables, la correlación entre el contenido de etanol residual y la concentración de vainillina en vinagres envejecidos con virutas fue alta ($r=0.87$).

5.5.- Compuestos Fenólicos

Se ha estudiado la evolución de los compuestos fenólicos en dos experiencias. En la primera se determinó la composición fenólica de vinagres con 0°, 1° y 2° alcohólicos macerados con virutas sometidas a los dos tipos de tratamiento y a lo largo de los tres meses de envejecimiento. En la segunda experiencia, se determinaron los compuestos fenólicos en muestras de 1° alcohólico al cabo de 1 año de envejecimiento, ya que en el mercado los vinagres reservas, a los que irían destinados estos procesos, no presentan mayor contenido alcohólico. Por otra parte el IPT, indicador orientativo, no mostraba que las muestras de diferente contenido alcohólico tuvieran un comportamiento sustancialmente diferente.

La Tabla 23 nos muestra la concentración de los compuestos fenólicos en vinagre sintético y en muestras de vinagre sometidas ambas al proceso de maceración con virutas.

En la primera experiencia han identificado los ácidos fenólicos: gálico y vainílico; y los aldehídos fenólicos: siringaldehído, coniferaldehído, sinapaldehído, el aldehído vainílico (vainillina). Además se incluye el 5-Hidroximetilfurfural (5HMF) que aunque no sea un compuesto fenólico está relacionado con el envejecimiento en madera de los vinagres y con las características sensoriales. La presencia de 5HMF en vinagres comerciales se debe a que el color de los vinagres se ajusta con caramelo de mosto que contiene altas cantidades de 5-hidroximetilfurfural.

A diferencia de otras experiencias similares de envejecimiento acelerado (Monedero et al, 1998), no se ha detectado en nuestras muestras ni ácido cinámico ni ácido protocatéquico ni p-hidroxibenzoico. No obstante sí se han identificado el ácido vainílico y el coniferaldehído. Las concentraciones obtenidas para siringaldehído y vainillina son muy similares a

Tabla 23. Compuestos fenólicos en vinagre sintético y muestras de vinagre

Muestras de vinagre	Tiempo de envejecimiento (días)	Compuestos fenólicos (mg/L)						
		Ácido gálico	5-hidroximetil-2-furfuraldehído	Ácido vainílico	Siringaldehído	coniferaldehído	Sinapaldehído	Vainillina
VE1	0	6.6±0.66	14.06±1.27	—	—	—	—	—
VE1BT	15	10.5±0.02	10.1±0.06	11.4±0.54	25.3±1.15	4.89±0.05	18.6±0.56	—
	30	10.8±0.10	9.93±0.57	8.88±0.05	24.9±0.98	4.11±0.09	15.5±0.39	—
	60	12.1±0.33	10.1±0.08	10.4±0.35	28.5±0.75	4.88±0.12	15.9±0.28	—
	90	12.1±0.56	10.2±0.35	10.5±0.24	25.3±1.56	3.28±0.23	15.8±0.17	—
VE1T	15	12.0±0.22	10.7±0.87	11.2±0.03	21.1±1.11	4.72±0.56	16.9±0.78	—
	30	12.4±0.65	10.6±0.53	10.6±0.11	22.8±1.54	3.18±0.08	19.2±0.98	—
	60	12.4±0.98	10.2±0.13	9.57±0.98	23.0±0.86	4.96±0.03	17.6±0.12	—
	90	14.7±0.76	11.1±0.36	11.9±0.87	24.9±0.91	5.49±0.06	21.9±1.12	—
S	0	—	—	—	—	—	—	—
SBT	15	0.73±0.02	0.76±0.01	6.97±0.54	26.4±0.89	1.90±0.02	11.5±0.33	—
	30	1.05±0.05	0.86±0.003	6.49±0.34	24.8±1.13	2.24±0.03	13.5±0.25	—
	60	1.21±0.03	0.92±0.009	5.22±0.13	27.0±0.65	1.80±0.00	12.3±0.11	—
ST	15	2.8±0.01	1.04±0.025	5.88±0.07	23.8±0.97	3.68±0.02	18.2±0.05	—
	30	3.4±0.15	1.22±0.031	6.51±0.07	27.4±0.04	4.66±0.02	20.0±0.09	—
	60	4.9±0.05	1.18±0.041	7.32±0.09	27.4±0.08	3.85±0.01	15.4±1.20	—

las descritas para muestras de elevado contenido alcohólico maceradas con virutas tostadas a 180°C durante 15 días.

En general, la evolución cuantitativa de las concentraciones de compuestos fenólicos es similar al IPT: el aumento más considerable se produce a los 15 días. A partir de ahí, si bien las concentraciones siguen aumentando los incrementos son del orden del 5%.

El **siringaldehído** alcanza a los 15 días un valor comprendido entre 21.1 mg/L-25.3 mg/L. En muestras envejecidas durante 2 años su concentración fue de 12.45 mg/L (Tesfaye et al., 2002). Estas concentraciones de siringaldehído son muy cercanos a las valores descritas para los Grandes Reservas que oscilaban entre 23 y 27 mg/L (García-Parrilla et al., 1999).

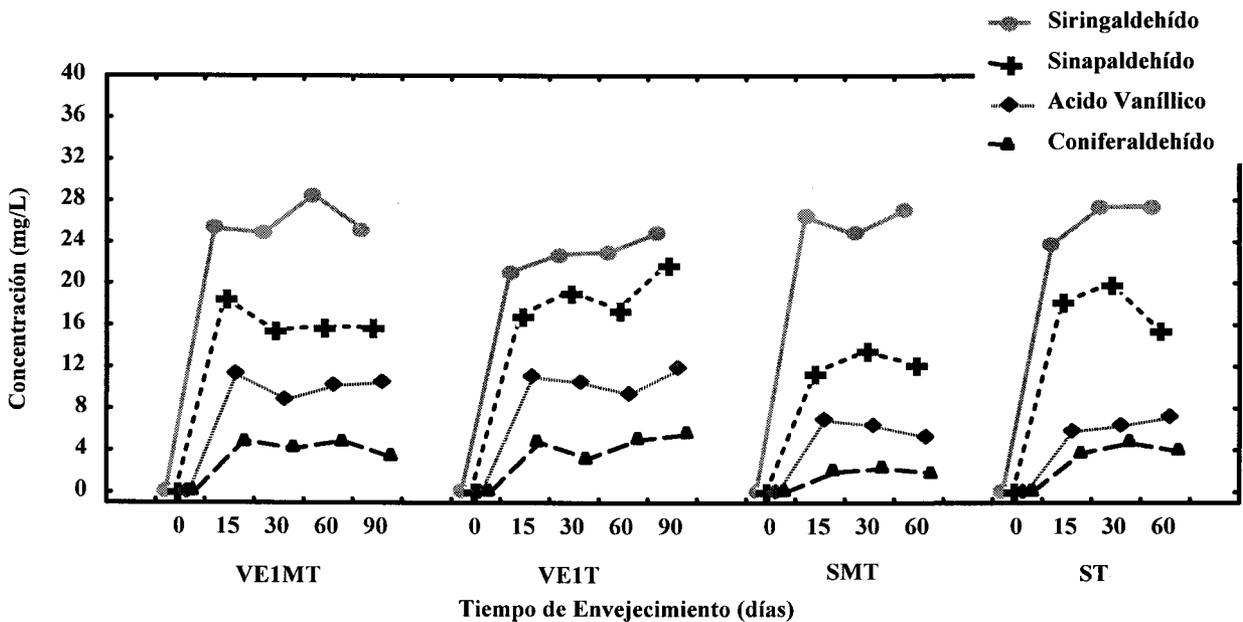


Figura 23.

En la segunda experiencia, el envejecimiento con virutas se prolongó durante un año. Esta situación no tiene aplicación práctica inmediata pues se requiere un tiempo excesivo; pero sí resulta interesante para conocer la cantidad de compuestos fenólicos que aún se pueden extraer o si algunos de los compuestos no detectados en las muestras envejecidas durante 90 días aparecería si se prolongara el envejecimiento.

La Tabla 24 nos muestra la evolución de compuestos fenólicos en vinagre sintético y en muestras de vinagre sometidas ambas al proceso de maceración durante 1 año. En general la diferencia más importante con respecto a la experiencia anterior es que se detecta ácido siríngico que no se detectaba en las muestras a los 90 días de envejecimiento.

Los aldehídos fenólicos identificados han sido el aldehído vainílico, siringaldehído y sinapaldehído. El **siringaldehído** presenta unos valores similares tanto para el vinagre sintético como para las muestras de vinagre y oscilan entre 28.27 y 43.53 mg/L. En esta experiencia se puede observar que el mayor contenido alcohólico consigue extraer más contenido de siringaldehído aunque, estadísticamente, no es significativo. La concentración de siringaldehído aumenta al cabo del año. Los vinagres envejecidos en botas durante 2 años, y con 2º alcohólicos tienen una concentración entre 9.4 y 12.5 mg/L. (Tesfaye, 2001).

El **aldehído vainílico** presenta una tendencia similar en las muestras estudiadas y las diferencias encontradas no son estadísticamente significativas entre muestras con distinto grado alcohólico, ni entre los tratamientos dados a las virutas. Para los vinagres envejecidos en botas la concentración de aldehído vainílico aumenta a lo largo del tiempo con independencia del grado alcohólico hasta una concentración de 6.8 mg/L (Tesfaye, 2001).

Tabla 24. Compuestos fenólicos en muestras de vinagre maceradas en virutas de roble durante 1 año.

Muestras de vinagre	Compuestos fenólicos (mg/L)						
	Ac. gálico	Furfural	Ac.vainílico	Ac. Siríngico	Aldehído vainílico	Siringaldehído	Sinapaldehído
VE0T	8.56±1.14	29.52±0.21	9.54±2.19	17,57±1,54	4.23±0.75	34,648±0,36	8,35±0,41
VE0MT		11.91±1.58	9.17±2.93	12,21±3,48	7.52±1.62	28.27±7,69	5.34±1,05
VE1T	14,10±5,01	19.61±2.53	10.47±0.11	15,46±1,51	7.91±3.98	30.83±1,92	5,85±0,35
VE1MT	13,08±6,03	6.76±1.43	13.38±3.92	17,59±4.10	8.57±3.00	36,79±8,95	4,03±1,150
VE2T	11.64±1.14	7.58±0.13	12.03±1.42	21.02±0,57	9.61±1.32	42,96±2,96	n.i.
VE2MT	13.86±1.26	7.58±0.14	11.53±1.10	20,73±0,94	9.67±1.00	43,53±2,29	n.i.
ST	0.00±0.00	4.15±2.73	9.56±2.73	18,16±1.13	7.68±1.65	39,52±6,24	4,78±0,96

El **sinapaldehído** se ha detectado tanto en la muestra de vinagre sintético como en las muestras de vinagres sometidas al proceso de maceración durante 1 año excepto para vinagres con 2º alcohólicos. Ni el contenido alcohólico, ni el tratamiento dado a las virutas, afectan a las variaciones encontradas en la concentración final que no son estadísticamente significativas.

El sinapaldehído no se ha detectado en vinagres envejecidos en botas por el procedimiento tradicional (García Parrilla et al., 1999).

Los ácidos fenólicos encontrados han sido el ácido gálico, ácido vainílico y ácido siríngico. El **ácido gálico** no se ha identificado en la muestra de vinagre sintético y sí en las muestras de vinagre con distinto grado alcohólico maceradas en virutas y sometidas a los dos tipos de tratamiento. Se comprobó que la concentración final de ácido gálico es estadísticamente diferente en muestras con distinto grado alcohólico. Muestras con mayor contenido en alcohol presentan una mayor extracción de ácido gálico.

En vinagres envejecidos en botas por el sistema tradicional la concentración de ácido gálico aumenta fundamentalmente al año de envejecimiento valor que se mantiene después de dos años de envejecimiento (Tesfaye, 2001). El valor obtenido para estas muestras es similar (14-16 mg/L) al obtenido en muestras de vinagres maceradas en virutas de robles y con distintos grados alcohólicos (13.8-14.1 mg/L).

Dado que el roble contiene solamente pequeña cantidad de ácido gálico libre (0.9-2.0 mg/g, Virost et al., 1993) el aumento se puede explicar por la posible hidrólisis de galotaninos.

El **ácido vainílico** se ha identificado tanto en la muestra de vinagre sintético como en muestras de vinagres sometidas ambas al proceso de

maceración. Los pequeños incrementos encontrados en vinagres macerados en virutas mojadas y tostadas y sólo tostadas y con distinto grado alcohólico 1 y 2 estadísticamente no son significativos.

Se ha identificado el ácido vainílico en vinagres envejecidos en botas por el método tradicional (Tesfaye, 2001) pero en concentraciones diez veces inferiores a la concentración final de ácido vainílico en muestra de vinagre sintético y vinagres ambas sometidas al proceso de maceración durante 1 año.

EL **ácido siríngico** se ha identificado tanto en la muestra de vinagre sintético como en muestras de vinagres sometidas ambas al proceso de maceración. La extracción es mayor para muestras con mayor contenido alcohólico. EL estudio estadístico nos pone de manifiesto que existen diferencias significativas para muestras con 2 grados alcohólicos con independencia del tratamiento realizado a las virutas.

EL ácido siríngico no se detecta en vinagres sometidos a un envejecimiento tradicional en botas.

El **5-Hidroximetilfurfural** no se ha detectado ni en muestra de vinagre sintético ni en muestras de vinagres sometidas ambas al proceso de maceración.

El **Furfural** presenta un incremento notable para muestras con mayor contenido alcohólico. Si aplicamos el test de Anova encontramos que: muestras de vinagres maceradas en virutas tostadas presenta diferencia significativa para muestras de contenido alcohólico entre 1°-2° y entre 0°-2°. Para muestras con distintos grado alcohólico y sometidas a maceración en virutas hervidas y tostadas la diferencia es significativa para muestras entre 0° -2° de contenido alcohólico.

Los vinagres sometidos a un envejecimiento tradicional en botas presentan una tendencia al aumento de la concentración final de furfural a lo largo de su período de envejecimiento, siendo esta mayor cuando aumenta en contenido de alcohol residual de los vinagres (Teskaye et al., 2002).

Aunque la madera no tratada térmicamente contiene pequeñas cantidades de furfural y alcohol furfurílico, es después de someter a la madera de roble a un quemado, cuando se observa una importante formación y posterior presencia de los aldehídos furfural, 5-metilfurfural y 5-hidroximetilfurfural en los aguardientes envejecidos, siendo el furfural el que se origina en mayor proporción mientras que el 5-metilfurfural y el 5-hidroximetilfurfural se forman en mucha menor cuantía (Boidron et al., 1998).

Los resultados obtenidos indican que se puede obtener un producto con un perfil fenólico similar al descrito para vinagres de Jerez envejecidos de modo tradicional y con sistemas de criaderas y soleras.

El tratamiento aplicado a las virutas de madera no influye en la composición del producto envejecido.

Los cambios de interés suceden en los 15 primeros días consiguiéndose aumentar la velocidad del proceso de extracción de los compuestos fenólicos con respecto al envejecimiento tradicional.

Hay que señalar que las concentraciones de aldehído vainílico, siringaldehído, sinapaldehído, son 4 veces superiores a las descritas para vinagres tradicionales (Teskaye et al., 2002). Quizás resulte una concentración final de polifenoles en el producto excesiva, por lo cual se puede proponer disminuir la cantidad de virutas empleada de un 2% a una proporción de 0.5% p/v incrementándose así el rendimiento económico.

5.6.- Análisis Sensorial

5.6.1.- Selección del panel de cata: discriminación de sabores

En primer lugar es necesario comprobar que los integrantes del panel de cata perciben adecuadamente los sabores. Se plantearon diferentes ejercicios de acuerdo a las normas UNE. En el primer ejercicio cada juez realizó la identificación de los 6 sabores básicos (ácido, amargo, dulce, salado, umami y metálico) y agua como sabor no perceptible. En este ejercicio cada copa pertenecía a un posible sabor.

En la segunda prueba, a diferencia del primer ejercicio, cada juez realizó la identificación de los sabores después de probar 13 copas. Se han repetido algunos sabores en el orden que se indica a continuación:

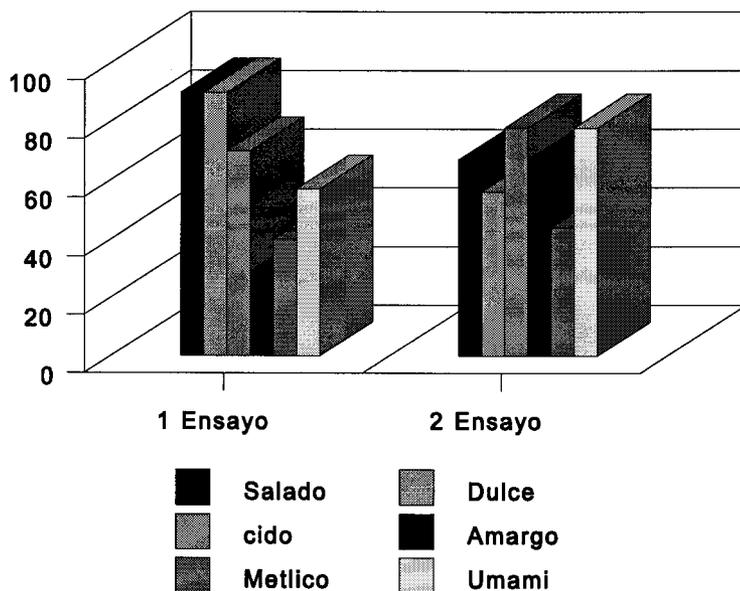
salado; agua; umami; umami; agua; ácido; amargo; amargo;
agua; metálico; metálico; agua y dulce.

Aunque en el primer ejercicio hubo un porcentaje de aciertos del 90% para el sabor salado y dulce, en la segunda prueba el mayor acierto fue para el sabor ácido y umami. El sabor metálico sigue teniendo un acierto mínimo (Figura 22).

Los participantes que no tenían experiencia en cata acertaron 2 y 3 sabores siendo los de menor porcentaje de aciertos. Los jueces manifestaron al final de la prueba que el sabor amargo y el metálico habían sido difíciles de percibir y requieren mayor concentración (el umbral de identificación para la mayoría de los catadores supera a este cantidad). Esta dificultad en parte se

atribuye al orden de cata en que fueron presentados, pues las primeras disoluciones correspondían a sabores menos usuales y ello contribuyó a disminuir la confianza de los participantes en su capacidad.

Figura 22. Porcentaje de aciertos en la identificación de sabores.



En estas concentraciones y condiciones el 50% de los jueces sin experiencia deben ser capaces de detectar el sabor correspondiente (UNE 87-003-95). En nuestro caso la capacidad de detectar estos sabores básicos ha sido satisfactoria y ha permitido la incorporación de los nuevos jueces como miembros del panel de cata. Hay que tener en cuenta que la capacidad de detección de sabores aumenta con el entrenamiento.

5.6.2.- Entrenamiento del panel de cata: aprendizaje de olores

Se han llevado a cabo dos sesiones de entrenamiento en las que se presentan a los catadores disoluciones con concentraciones crecientes de las sustancias que van a definir los descriptores siguientes: sensación punzante (disoluciones de ácido acético), olor a acetato de etilo, carácter vinoso (disoluciones de vino oloroso), olor a vainilla (disoluciones de vainillina), olor a coco (disoluciones de β -metil- γ -octalactona), olor a clavo (disoluciones de eugenol).

Los porcentajes de aciertos de cada uno de los descriptores evaluados sensorialmente aparecen en la Figura 23, En ella observamos que en contra de lo esperado, los porcentajes de aciertos fueron mayores en las primeras sesiones de entrenamiento que en la segundas a excepción del olor a vainilla.

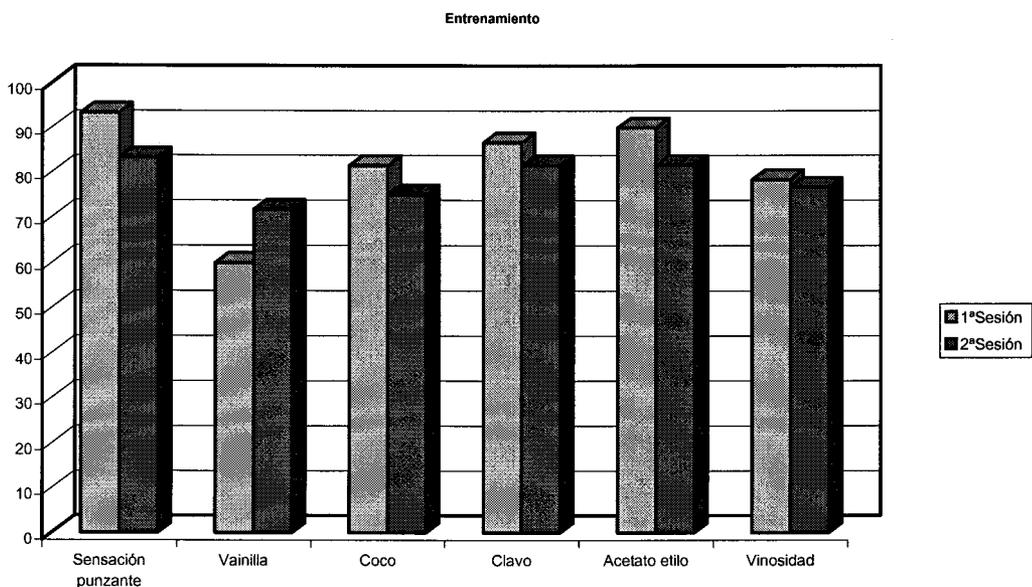


Figura 23. Porcentaje de aciertos del panel de cata en el entrenamiento de aprendizaje de olores.

5.6.2.1.- Sensación punzante

La sensación punzante se entrenó con disoluciones de ácido acético de diferente concentración tal como se describe en la sección 4.2.6.2 de Material y Métodos. El porcentaje medio de aciertos de ambas sesiones fue aproximadamente del 90%. Es el atributo que presenta frente a los demás el mayor porcentaje de aciertos en ambas sesiones (Figura 23).

5.6.2.2.- Acetato de etilo

Se obtienen elevados porcentajes de aciertos tanto en la primera como en la segunda sesión (Figura 23). En la primera sesión el porcentaje de aciertos va siendo menor a medida que aumentan la concentración en acetato de etilo, en cambio, en la segunda sesión los catadores cometen mayor número de errores al ordenar las concentraciones intermedias.

5.6.2.3.- Carácter vinoso

Aunque este atributo del vinagre es difícil identificar se alcanzaron, tanto en en la primera sesión como en la segunda sesión, porcentajes de aciertos alrededor del 75%.(Figura 23). Es el atributo que presenta resultados muy similares tanto en la primera como en la segunda sesión de entrenamiento.

5.6.2.4.- Descriptores de la madera

Se ha entrenado el panel de cata en aromas relacionados con la madera tales como vainilla, coco y clavo. Las disoluciones empleadas para cada uno de ellos se describen en la sección 4.2.6.2. de Material y Métodos.

Al diseñar el entrenamiento de estos nuevos descriptores para vinagre surge la duda si las diferencias crecientes entre las concentraciones son suficientes para que los catadores puedan ordenarlas adecuadamente y por tanto el entrenamiento sea válido. Para comprobar si la ordenación de las muestras por los catadores coincide con el orden natural de las mismas se aplicó la prueba de Page a los resultados obtenidos en la primera sesión de entrenamiento (Page, 1963); se concluyó que los incrementos de concentraciones de los distintos compuestos presentadas a los catadores eran sensorialmente diferentes (para niveles de significación $\alpha= 0.01$).

A) Olor a vainilla

El porcentaje de aciertos fue inferior en la primera sesión, produciéndose un incremento del 11% de aciertos en la 2ª sesión. Como puede observarse en la Figura 24 los catadores diferencian mejor las disoluciones con concentraciones altas de vainillina en la primera sesión. En la segunda sesión se observa cómo los catadores familiarizados con este aroma comienzan a discriminar mejor las concentraciones más bajas.

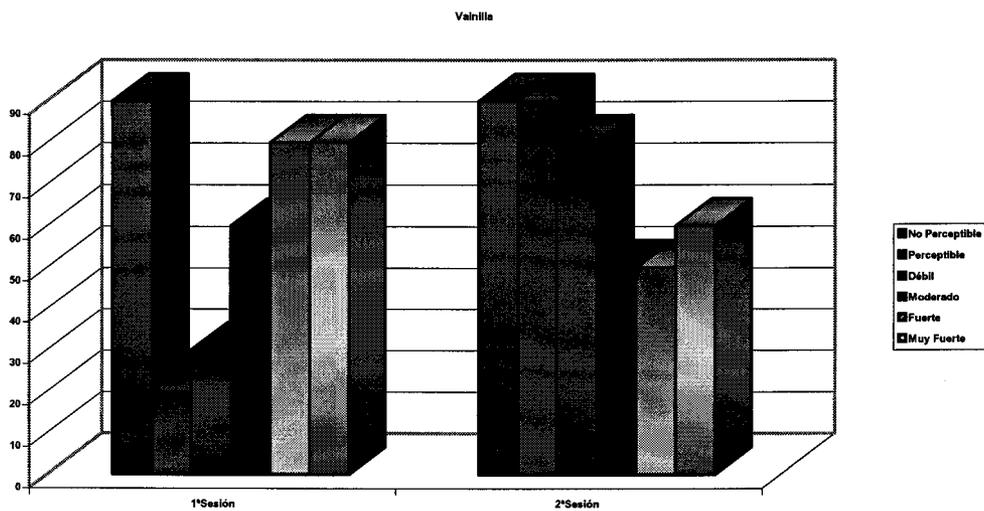


Figura 24. Entrenamiento del descriptor vainilla: Porcentaje de aciertos

B) Olor a coco

Presenta un porcentaje de aciertos elevado para ambas sesiones. La mayor dificultad para ordenar las distintas disoluciones la encuentran los catadores entre las muestras con concentraciones de moderado a fuerte (27 mg/L-37 mg/L) (Figura 25).

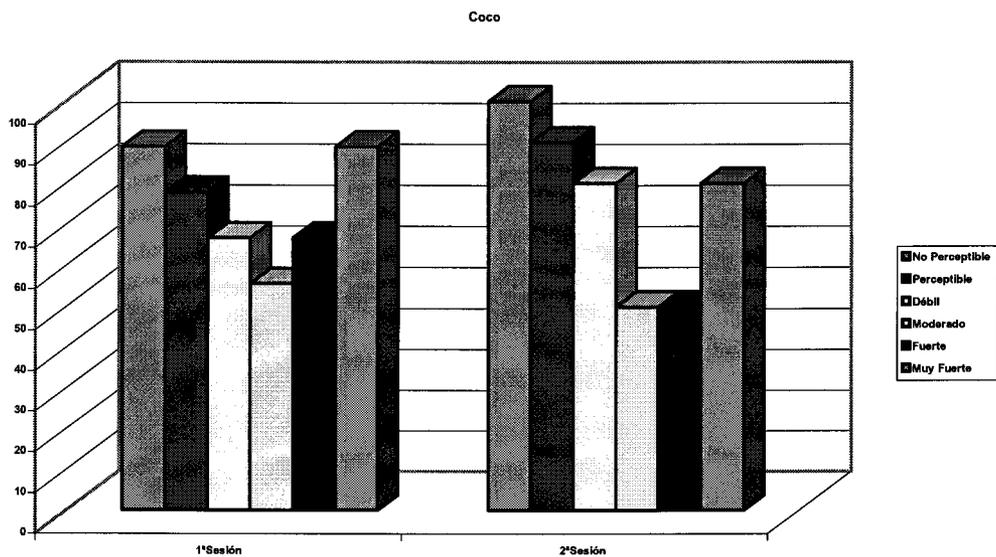


Figura 25. Entrenamiento del descriptor coco: Porcentaje de aciertos

C) Olor a clavo

A pesar de que los catadores no se habían enfrentado antes al aroma de clavo en muestras de vinagre, en la primera sesión fueron capaces de ordenar correctamente las disoluciones de no perceptible a débil (100% de aciertos) (Figura 26).

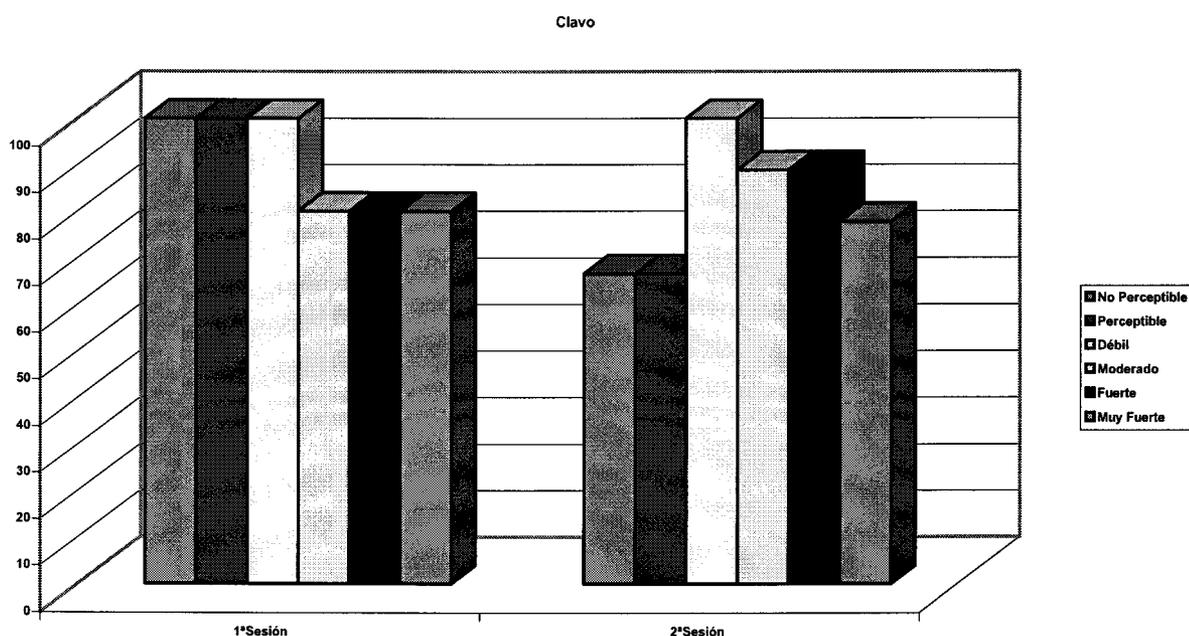


Figura 26. Entrenamiento del descriptor clavo: Porcentaje de aciertos.

5.6.3.- Validación del panel de cata

La validación del panel de cata se lleva a cabo en dos sesiones en las que se realizan un total de ocho pruebas triangulares. Las muestras empleadas se describen en el apartado 4.2.6.3. de "Material y Métodos". El porcentaje de aciertos alcanza un nivel de significación 0.1% en todos los ensayos (Tabla 25). La prueba se ha concluido con éxito y los jueces están suficientemente entrenados para realizar catas de vinagres distinguiendo los atributos seleccionados. Por tanto, los resultados obtenidos señalan que el

panel de cata es apto para acometer el análisis sensorial de las muestras objeto de este estudio.

Tabla 25. Porcentaje de aciertos en ensayos para la validación del panel de cata.

Muestras	Jueces	Aciertos	Nivel de signif.
Vinagre joven –Vinagre envejecido con virutas	14	11	0.1%
Vinagre joven enriquecido con vainilla–Vinagre envejecido con virutas	14	14	0.1%
Vinagre joven enriquecido con β -metil- γ -octalactona –Vinagre envejecido con virutas	14	14	0.1%
Vinagre joven enriquecido con eugenol–Vinagre envejecido con virutas	14	13	0.1%

5.6.4.- Análisis sensorial de las muestras de vinagres

5.6.4.1.- Pruebas discriminatorias: Pruebas triangulares

A) Muestras de envejecimiento acelerado

Las primeras pruebas triangulares se llevaron a cabo con el objeto de evaluar las posibles diferencias sensoriales en función de las variables

tiempo, grado alcohólico y tratamiento dado a las virutas. Para ello se compararon los vinagres obtenidos en los distintos ensayos de envejecimiento acelerado realizados (muestras descritas en el apartado 4.1.1 de “Material y Métodos”).

Los resultados obtenidos muestran que los dos tratamientos aplicados a las virutas son equivalentes desde el punto de vista sensorial ya que el panel de cata no fue capaz de diferenciar las muestras maceradas con los distintos tipos de virutas. Sin embargo, el contenido en etanol residual marca una diferencia sustancial en las muestras. Así salvo en dos casos, las muestras fueron diferenciadas con un nivel de significación del 0.1% por los catadores (Tabla 26). Los dos casos en los cuales la diferencia resultó no ser significativa corresponden a la comparación de las dos muestras con menor tiempo y menor contenido alcohólico y la comparación de las muestras con mayor tiempo y mayor contenido alcohólico.

Tabla 26. Nivel de significación del efecto del etanol en pruebas triangulares en muestras de envejecimiento acelerado.

	VE0-15	VE1-15	VE0-30	VE1-30	VE0-90	VE1-90
VE1-15	n.s					
VE2-15	0.1	0.1				
VE1-30			0.1			
VE2-30			0.1	0.1		
VE1-90					0.1	
VE2-90					0.1	n.s.

Cuando se aborda el efecto del tiempo de maceración a nivel sensorial se observa que, está condicionado por el contenido alcohólico de las muestras. Los catadores no fueron capaces de diferenciar las muestras con distintos tiempos de maceración cuando su contenido en alcohol residual

era 0. Tampoco las muestras con 1 grado alcohólico y una diferencia de tiempo de maceración de 15 días (Tabla 27).

Tabla 27. Nivel de significación para el efecto del Tiempo en pruebas triangulares de muestras de envejecimiento acelerado.

	VE0-30	VE0-90	VE1-30	VE1-90	VE2-30	VE2-90
VE0-15	n.s.	n.s.				
VE0-30		n.s.				
VE1-15			n.s.	0.1		
VE1-30				5		
VE2-15					5	0.1
VE2-30						1

Por tanto, podemos concluir que la variable que más afecta a nivel sensorial en las muestras es el contenido alcohólico, seguido de tiempo de maceración. El tipo del tratamiento al que se someten las virutas no aporta ninguna diferencia.

B) Muestras de envejecimiento acelerado y comerciales

Las pruebas triangulares descritas en este apartado tienen por objeto estudiar la similitud entre las muestras sometidas a envejecimiento acelerado (15 días maceradas en virutas tostadas y 1 grado alcohólico) y los vinagres del mercado. Los resultados se muestran en la Tabla 28 en la que se observa que presenta características organolépticas diferentes. Los posteriores análisis descriptivos pondrán de manifiesto si estas muestras superan en calidad a las del mercado, y en qué atributos se diferencian.

Tabla 28. Test triangular en muestras de vinagre acelerado y comerciales.

Muestras	Jueces	Aciertos	Nivel de signif.
Vinagre envejecido con virutas- Vinagre Gran Reserva	12	12	0.1%
Vinagre envejecido con virutas- Vinagre Reserva B (7°)	12	9	1%
Vinagre envejecido con virutas- Vinagre reserva C (8°)	12	12	0.1%

De igual modo se han comparado las muestras de envejecimiento acelerado tras un año de maceración con las muestras comerciales. Los catadores fueron capaces de diferenciarlas también con un nivel de significación del 0.1% en todos los casos.

C) Muestras de envejecimiento acelerado: roble francés y roble americano

Con esta prueba se pretende diferenciar vinagres macerados con virutas de roble francés y roble americano a distinta proporción. Los resultados se muestran en la Tabla 29 . En ella se pone de manifiesto una gran similitud entre las muestras de vinagres maceradas en roble francés al 1% y roble francés al 2% y entre las muestras de roble francés y roble americano al 2%. Sin embargo el panel de cata es capaz de diferenciar muestras de vinagres macerados en roble americano al 1% y roble francés al 1%, así como muestras de vinagres maceradas en roble americano a distinta proporción (1% y 2%).

Tabla 29. Test triangular envejecimiento acelerado: roble francés y roble americano.

Muestras	Jueces	Aciertos	Nivel de signif.
Vinagre envejecido con virutas de roble francés 1%- Vinagre envejecido con virutas de roble francés 2%	12	6	n.s.
Vinagre envejecido con virutas de roble americano 1%- Vinagre envejecido con virutas de roble americano 2%	11	8	1%
Vinagre envejecido con virutas de roble francés 1%- Vinagre envejecido con virutas de roble americano 1%	13	10	1%
Vinagre envejecido con virutas de roble francés 2%- Vinagre envejecido con virutas de roble americano 2%	11	5	n.s.

5.6.4.2.- Perfil sensorial: test descriptivo.

Si bien las pruebas triangulares permiten diferenciar muestras, a través del perfil sensorial podemos conocer en base a qué atributos dichas muestras son diferentes y cuantificar dichas diferencias. Para ello se representa mediante gráfica de tela de araña la puntuación media otorgada por los catadores en el test descriptivo de cada muestra y que denominamos perfil sensorial.

Se comparó el perfil sensorial de muestras de vinagres de idéntico grado alcohólico maceradas durante 15 días con: virutas de roble francés al 1% p/v; virutas de roble francés al 2% p/v; virutas de roble americano al 1%; virutas de roble americano al 2% (Figura 23).

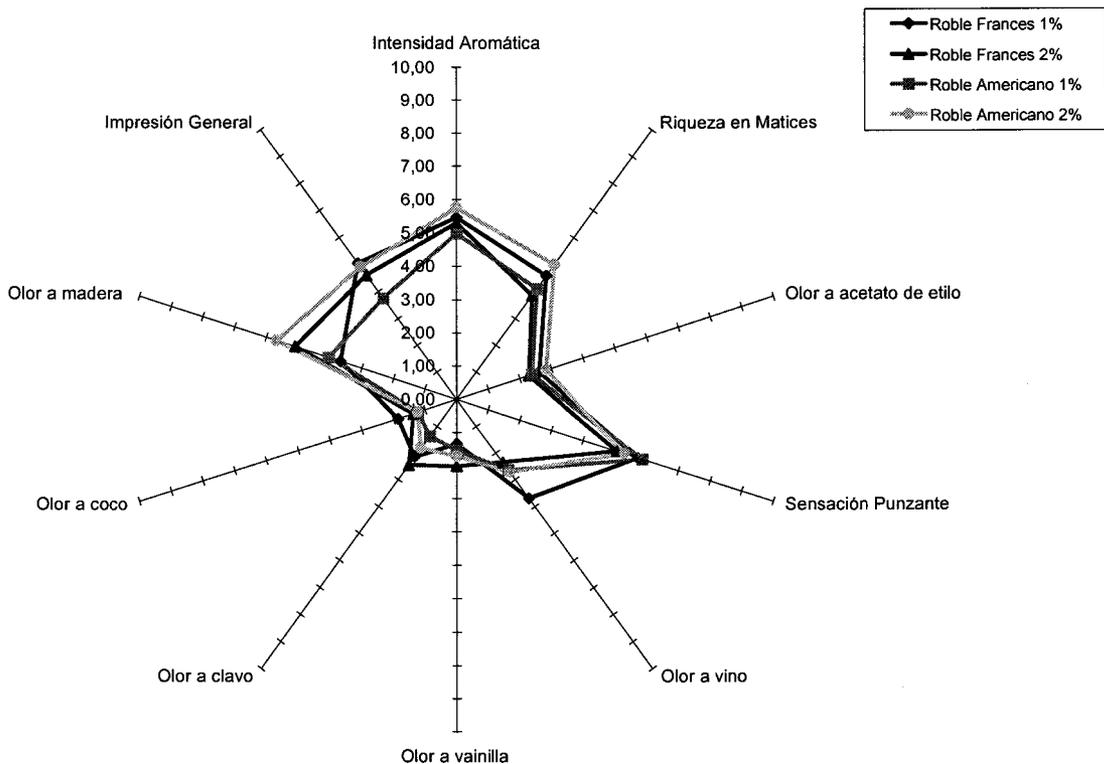


Figura 23. Gráfica de tela de araña resultante del análisis descriptivo de las muestras de vinagres maceradas durante 15 días con: virutas de roble francés al 1% p/v; virutas de roble francés al 2% p/v; virutas de roble americano al 1%; virutas de roble americano al 2%.

En ella se observa un perfil aromático muy similar para todos los descriptores a excepción del descriptor olor a madera, en él se aprecia que las muestras que tienen mayor intensidad de aroma a madera son las maceradas en roble americano 2%.

Los descriptores olor a coco, olor a clavo y olor a vainilla son los que el panel de cata, percibe en menor intensidad para todas las muestras estudiadas. De las puntuaciones de la impresión general se observa que la peor puntuación corresponde a las muestras maceradas en virutas de roble americano al 1%.

Asimismo, al superponer el perfil sensorial de las muestras de vinagre sometidas a envejecimiento acelerado con muestras comerciales.(Figura 24) la mayor diferencia observada corresponde al descriptor olor a acetato de etilo, alcanzando la puntuación máxima el vinagre Gran Reserva debido a su mayor contenido alcohólico.

Se observan marcadas diferencias para los descriptores olor a vino, percibiéndose una intensidad creciente a medida que aumenta la concentración alcohólica de las muestras estudiadas. Es de destacar que para la puntuación del descriptor olor a madera es igual para la muestra sometida a envejecimiento acelerado 15 días en madera de roble americano y las muestras sometidas al envejecimiento tradicional en botas de madera.

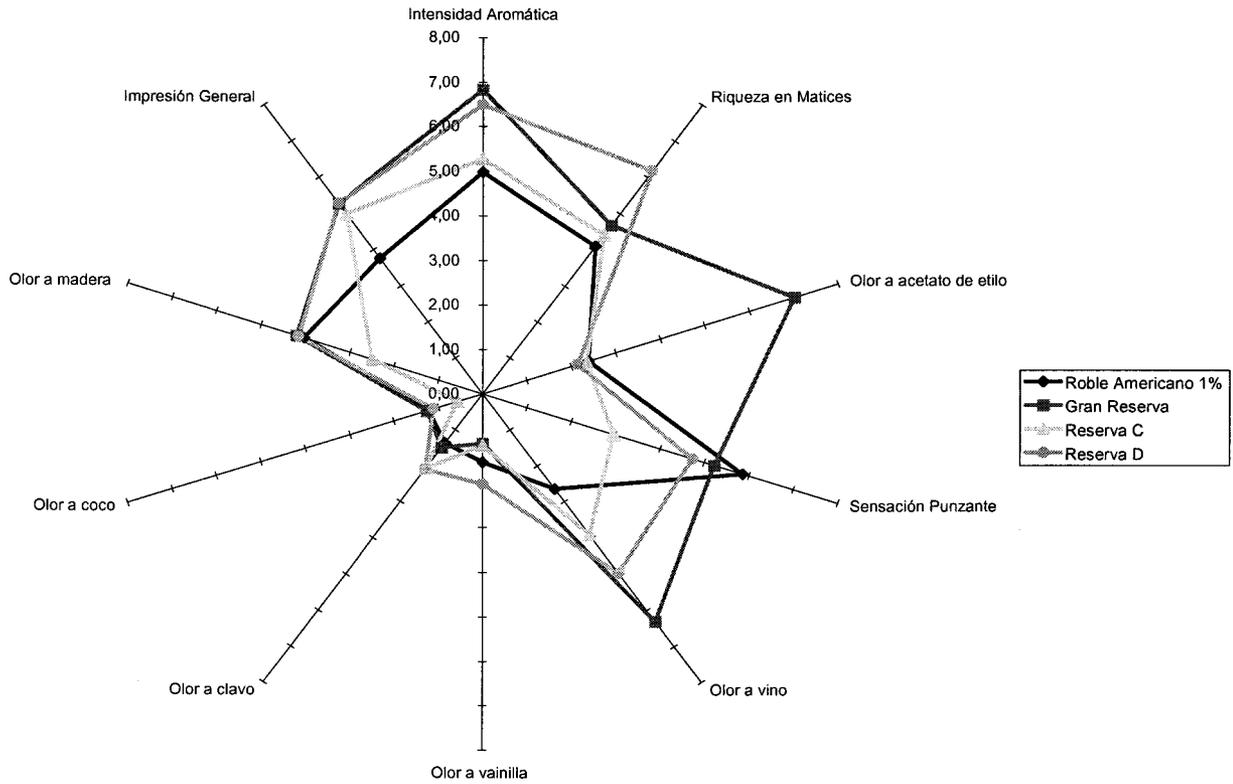
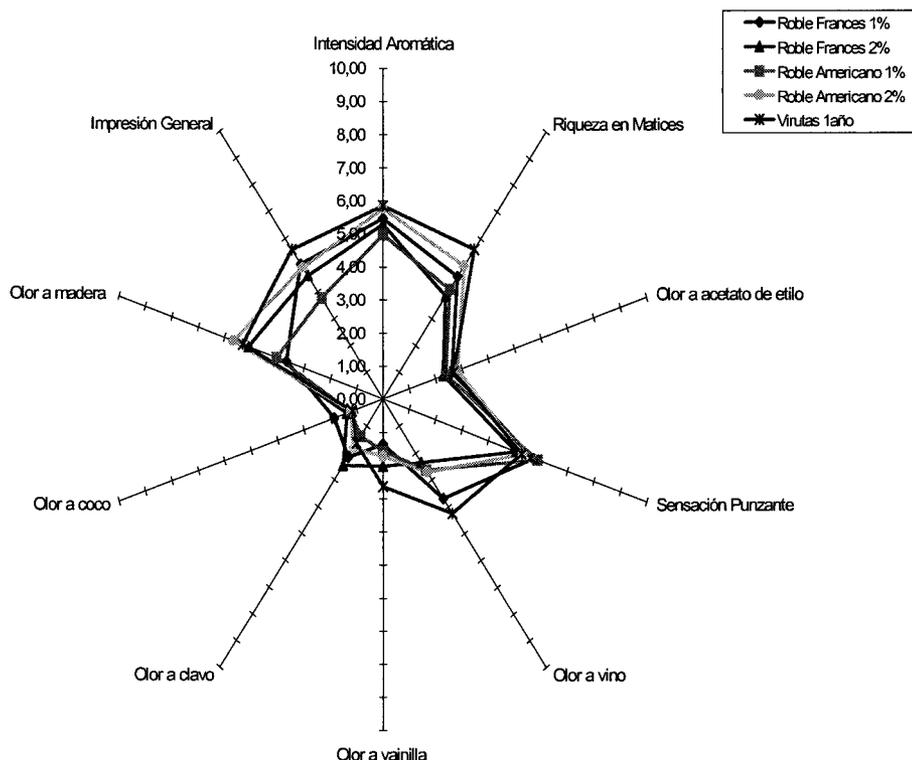


Figura 24. Gráfica de tela de araña resultante del análisis descriptivo de las muestras de vinagres de Jerez comerciales (Reserva y Gran Reserva) con un vinagre envejecido con virutas de roble americano al 1% p/v (15 días).

La Figura 25 nos muestra el análisis descriptivo de muestras de vinagres (con el mismo grado alcohólico) maceradas durante 15 días con: virutas de roble francés al 1% p/v; virutas de roble francés al 2% p/v; virutas de roble americano al 1% p/v; virutas de roble americano al 2% p/v y vinagre



macerado en virutas de roble americano al 2% durante un año.

Figura 25 gráfica de tela de araña resultante del análisis descriptivo de las muestras de vinagres maceradas durante 15 días con: virutas de roble francés al 1% p/v; virutas de roble francés al 2% p/v; virutas de roble americano al 1%; virutas de roble americano al 2% y vinagre macerado en virutas de roble americano al 2% durante un año.

En ella se refleja un perfil sensorial muy similar para todas las muestras estudiadas, si bien la muestra macerada en virutas de roble americano durante 1 año presenta puntuación más alta para todos los descriptores aunque los incrementos no resultan significativos. Desde el

punto de vista sensorial, no se obtiene incremento significativo en la calidad al prolongar el tiempo de contacto con virutas.

6. CONCLUSIONES

6.-CONCLUSIONES

Se ha evaluado la efectividad del envejecimiento acelerado con virutas de madera aplicado a vinagres de Jerez. Las condiciones idóneas de envejecimiento acelerado fueron: virutas de roble americano al 2%, grado alcohólico del vinagre (0,1,2) y tratamiento de las virutas (tostadas y hervidas y tostadas). Se estudiaron los cambios más relevantes en la composición química son:

Extracto seco

Se incrementa en un 2.79% sobre el valor inicial al cabo de 60 días de envejecimiento, a pesar de haberse realizado en recipientes de cristal cerrado que evitan las pérdidas de agua propias de los sistemas tradicionales. Así pues este incremento se produce por la cesión de compuestos a partir de las virutas.

Indice de Polifenoles Totales (IPT)

La adición de virutas al 2% p/v produce en sólo 15 días un aumento superior al doble del que tiene lugar en el envejecimiento tradicional en un período de un año.

Compuestos Volátiles

En este sistema no se pueden producir mermas y por tanto el fenómeno de concentración de agua no tiene lugar. Los cambios en los compuestos volátiles se deben a la formación por reacción de los compuestos como la esterificación y oxidación, entre otros. Así pues, se ha comprobado como los ésteres acetato de metilo y acetato de etilo alcanzan su concentración máxima a los 15 y 60 días de envejecimiento respectivamente.

Para el acetaldehído, a los 90 días de envejecimiento encontramos valores muy similares a los encontrados en vinagres envejecidos por el sistema tradicional.

Compuestos volátiles de la madera

El cambio más relevante con respecto a estos compuestos es el aumento de vainillina.

Compuestos fenólicos

Los resultados obtenidos indican que se puede obtener un producto con un perfil fenólico similar al descrito para vinagres de Jerez envejecidos de modo tradicional y con sistemas de criaderas y soleras.

Los cambios de interés suceden en los 15 primeros días consiguiéndose aumentar la velocidad del proceso de extracción de los compuestos fenólicos con respecto al envejecimiento tradicional.

Hay que señalar que las concentraciones de aldehído vainílico, siringaldehído, sinapaldehído, son 4 veces superiores a las descritas para vinagres tradicionales (Tesfaye et al., 2002). Quizás resulte una concentración final de polifenoles en el producto excesiva, por lo cual se puede proponer disminuir la cantidad de virutas empleada de un 2% a una proporción de 0.5% p/v incrementándose así el rendimiento económico.

El tratamiento aplicado a las virutas de madera no influye ni en el extracto seco ni en el IPT ni en la composición fenólica del producto envejecido.

Las diferencias en grado alcohólico residual tienen influencia en la concentración de compuestos volátiles. A mayor grado alcohólico mayor formación de ésteres; El acetaldehído producida a partir de etanol aumenta como cabe esperar y también se produce un aumento en la extracción de compuestos volátiles de la madera como la vainillina y el 2-furfural.

Análisis sensorial

Muestras de envejecimiento acelerado

Los resultados obtenidos muestran que los dos tratamientos aplicados a las virutas son equivalentes desde el punto de vista sensorial ya que el panel de cata no fue capaz de diferenciar las muestras maceradas con los distintos tipos de virutas. El contenido en etanol residual hace que el panel de cata puede discriminar los vinagres con un nivel de significación de 0.1%.

Muestras de envejecimiento acelerado y comerciales

Los catadores fueron capaces de diferenciarlas en todos los casos con un nivel de significación del 0.1%.

Muestras de envejecimiento acelerado: roble francés y roble americano

El panel de cata es capaz de diferenciar muestras de vinagres macerados en roble americano al 1% y roble francés al 1%, así como muestras de vinagres maceradas en roble americano a distinta proporción (1% y 2%).

Perfil descriptivo

Se comparó el perfil sensorial de muestras de vinagres de idéntico grado alcohólico maceradas durante 15 días con: virutas de roble francés al 1% p/v; virutas de roble francés al 2% p/v; virutas de roble americano al 1%; virutas de roble americano al 2%

En ella se observa un perfil aromático similar para todos los descriptores (olor a vainilla, olor a coco, olor a clavo, intensidad aromática, riqueza en matices, olor a acetato de etilo, sensación punzante, olor a vino, impresión general) a excepción del descriptor olor a madera, en el que se aprecia que las muestras que tienen mayor intensidad de aroma a madera son las maceradas en roble americano al 2%.

Respecto al perfil sensorial de las muestras de vinagre sometidas a envejecimiento acelerado frente a las comerciales se observa que el descriptor acetato de etilo alcanza un valor superior en el vinagre Gran Reserva que en los producidos por envejecimiento acelerado. El mayor contenido alcohólico del Gran Reserva determina esta característica sensorial. Igualmente, este mayor contenido alcohólico está vinculado con una mayor puntuación del carácter vinoso.

Finalmente, es de destacar que la puntuación para el descriptor olor a madera es idéntica en la muestra sometida a envejecimiento acelerado 15 días (roble americano) y las muestras sometidas al envejecimiento tradicional en botas de madera.

7. BIBLIOGRAFIA

7. BIBLIOGRAFÍA

ABDI H (2002). What can cognitive psychology and sensory evaluation learn from each other?. *Food Quality and preference*, 13: 445-451.

AENOR (1997). Recopilación norma UNE. Análisis sensorial. Tomo 1 Alimentación. AENOR S.A., Madrid.

AIKEN, J. W.; NOBLE, A. C. (1984). Composition and sensory properties of Cabernet Sauvignon wine in French versus American oak barrels. *Vitis*, 23,27-36.

ARTAJONA, J. (1991). Caracterización del roble según su origen y grado de tostado, mediante la utilización de GC y HPLC *Viticultura y Enología Profesional.*, N° 14: 61 - 72.

BETES SAURA (1996)

BOIDRON, J. N.; CHATONNET, P.; PONS, M. (1988). Influence du bois sur certaines substances odorantes des vins. *Conn. Vigne Vin.*, 22 (4), 275 - 294.

BRICOUT, J. (1971). Analyse de quelques constituants dérivés du chêne dans les vieilles eaux-de-vie d'Armagnac. *Ann. Technol. Agric.*, 20 (3), 217-223.

CANTAGREL, R.; LURTON, L.; VIDAL, J. P.; GALY, B. (1995). From wine to cognac. En: *Fermented Beverage Production*, Capítulo 8, Lea, A. G.H., Piggot, J. R., Eds. Blackie Academic and Professional, London.

Cantero 1996

CARDWELL, T. J.; CATTRALL, R. W.; CROSS, G. J.; O'CONNEL, G. R.; PETTY, J. D.; SCOLLARY, G. R. (1991). Determination of titratable acidity of wines and total acidity of vinegars by discontinuous flow analysis using photometric end-point detection. *Analyst* 116, 1051-1054.

CARR, J. G. (1968). Methods for identifying acetic acid bacteria. *Identification Methods for Microbiologists*. B. M. Gibbs, D. A. Shapton Eds., Academic Press, London.

CAUL JF (1957). The profile method of flavour analyses. *Advances in Food Research*, 7:1.

CEE (1970). Reglamento CEE 816/70. Anexo II. Consejo del 28 de Abril de 1970.

CHATONNET, P.; BOIDRON, J. N.; PONS, M. (1989). Incidence du traitement thermique du bois de chêne sûr la composition chimique. 2^a partie. Évolution de certains composés en fonction de l'intensité de brûlage. *Conn. Vigne Vin.*, 23. N°4: 223 - 250.

CHATONNET (1991)

CHATONNET, P.; DUBOURDIER, D.; BOIDRON, J. N. (1992). Incidence des conditions de fermentation et d'élèrage des vins blancs secs en barriques sûr leur composition en substances cédées par le bois de chêne. *Sci. Aliments* 122, 665 - 685.

CHATONNET (1995)

CHATONNET (1999)

CHEN, C. L. (1970). Constituents of *Quercus alba*. *Phytochem.*, (9): 1149.

CHIAVARO, 1998

CLARK 1990

CLIFFORD, M. N.; SCALBERT, A. (2000). Review, Ellagitannins-nature, occurrence and dietary burden. *J. Sci. Food Agric.*, 80, 1118-1125.

CODEX ALIMENTARIUS MUNDI (1985). Decisión de la 16^a Sesión de la Comisión del "*Codex Alimentarius*", Ginebra.

CONNER, J. M.; PATERSON, M. A.; PIGGOTT, J. R. (1992). Analysis of lignin from oak casks used for the maturation of Scotch whiskey. *J.*

Sci. Food Agric. 60, 349-353.

CONSEJERÍA DE AGRICULTURA Y PESCA (2000). Reglamento de la Denominación de Origen "Vinagre de Jerez" y de su Consejo Regulador. Boletín Oficial de la Junta de Andalucía de 18 de Marzo de 2000, vol.33, 4015.

CUTZACH, I.; CHATONNET, P.; DUBOURDIEU, D. (2000). Influence of storage conditions on the formation of some volatile compounds in white fortified wines (vins doux naturels) during the aging process. *J. Agric. Food. Chem.*, 48, 2340-2345.

DE LEY, J.; GILLIS, M.; SWINGS, J. (1984). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 9ª edición, pp 267-278. The Williams and Wilkins co., Baltimore.

DJANPOLADYAN, L. M.; PETROSYAN, T. S. L. (1957). Réactions d'oxidation dans la maturation de l'eau-de-vie. *Vino del vinograd*, 31, 26-29.

DUDDINGTON, C. L. (1961). *Microorganisms as Allies*. Chap. I. Ed. MacMillan, New York.

Duran L, Calvo C (1982). Calidad de alubias blancas en conserva. I. Selección de los parámetros que definen su calidad sensorial. *Rev Agroquím Tecnol Aliment*, 22(2): 271-281

FENGEL, D.; WEGENER, G. (1984). *Wood, Chemistry, Ultrastructure, Reactions*. Walter de Gruiter, Berlin.

FERNÁNDEZ DE BOBADILLA, V. (1995). Añejamiento. *El Brandy de Jerez*. pp 62-77. Simpei, S.L. Madrid.

FERNÁNDEZ-IZQUIERDO, M. E. (1998). Determinación de cumarinas en bebidas alcohólicas añejadas en barriles de roble y su incidencia como marcadores de envejecimiento. *Tesis Doctoral*. Departamento de Nutrición y Bromatología. Facultad de Farmacia. Universidad de Granada.

FEUILLAT, M.; RADIX, P.; DUBOIS-DEKIMBE, J. (1981). Elevage des vins de Bourgogne en fûts de chêne. *Vignes vins*, 299, 5-10.

FERREIRA (2004)

FRANCIS, I.; SEFTON, M. A.; WILLIAMS, P. J. (1992). A study by sensory descriptive analysis of the effects of oak origin, seasoning and heating on the aromas of oak model wine extracts. *Am.J. Enol. Vitic.* 43, 23-30.

FRATEUR, J. (1950). Essai sur la systématique des Acetobacters. *La Cellule*, 53,287.

GARCÍA-PARRILLA, M. C.; HEREDIA, F. H.; TRONCOSO, A. M. (1998). The influence of the acetification process on the phenolic composition of wine vinagers. *Sciences des aliments*, 18, 211-221.

GARCÍA-PARRILLA, M. C.; HEREDIA, F. H.; TRONCOSO, A. M. (1999). Sherry wine vinegars: phenolic composition changes during aging, *Food Res. Inter.* 32, 433-440.

GARDE, RODRIGUEZ Y ANCÍN 2000a

GIUDICI, P.; ALTIERI, C.; CAVALLI, R. (1992). Aceto balsámico tradizionale: preparazione del fermentato di base. *Industrie delle Bevande XXI*, 478-483.

GIUDICI, P. (1993). Acido glucónico: criterio di genuinità dell'aceto balsámico tradizionale. *Industrie delle Bevande XXII*, 123-125.

GÓMEZ, J. M.; ROMERO, L. E.; CARO, I ; CANTERO, D. (1993). Optimización de un Sistema de Fermentación Acética con Reutilización de aire. *Alimentación, Equipos y Tecnología* 10, 55-59.

GUERRERO, M. I.; HEREDIA, F. J.; TRONCOSO, A. M. (1994). Characterization and differentiation of wine vinegars by multivariate analysis. *J. Sci. Food Agric.*, 66, 209-212.

GUILLAMÓN 2003

GUYMON, J. F. (1972). Influence of warehouse temperatures on the aging

of California brandy. *Wine and vines* 54(1), 36-38.

GUYMON, J. F.; CROWELL, E. A. (1970). Brandy aging, some comparisons of American and French oak cooperage. *Wines and Vines* 51(1), 23-25.

GUYMON, J. F.; CROWELL, E. A. (1972). GC-Separated brandy components derived from french and american oaks. *Am. J. Enol. Viticult.*, 23, N° 3: 114 - 120.

HALE, McCAFFERTY, LARNIE, NEWTON Y SWUAN, 1999

HASLAM, E. (1998). Maturation - changes in astringency. *Practical polyphenolics. From structure to molecular recognition and physiological action*. Cambridge University Press, pp 226-261. Cambridge. U.K.

HIGUCHI, T. (1985). Biosynthesis of lignin. En: *Biosynthesis and Biodegradation of wood components*, pp 141-160, Ed. Higuchi, T. Academic Press, London, UK.

ISO. 1991 (Norma UNE 87003-95). Análisis sensorial. Metodología. Método de investigación de la sensibilidad gustativa. ISO standard 3972.

ISO. 1983 (Norma UNE 87-005-92). Análisis sensorial. Prueba de comparación por parejas. ISO standard 5495.

ISO. 1983 (Norma UNE 87-006-92). Análisis sensorial. Metodología. Prueba triangular. ISO standard 4120.

ISO. 1985 (Norma UNE 87008-92). Análisis sensorial de alimentos. Metodología. Guía general. ISO standard 6658.

ISO. 1983 (Norma UNE 87-016-86). Análisis sensorial. Metodología. Prueba "A" -"No A". ISO standard 39024.

ISO. 1985 (Norma UNE 87-17-92). Análisis sensorial. Metodología. Método para establecer el perfil olfato-gustativo. ISO standard 6564.

ISO. 1987 (Norma UNE 87-020-93) . Análisis sensorial. Metodología.

Evaluación de los productos alimentarios por métodos que utilizan escalas. ISO standard 4121.

ISO 1977 STANDARD 3591

ISSANCHOU S, HOSSENLOPP J (1992). Les mesures hédoniques : méthodes, portées et limites. En : Plaisir et préférences alimentaires. Giachetti, I (Ed). polytechnica, París.

ISSANCHOU, S.; LESSCHAEVE, I.; KÖSTER, E. P. (1995). Screening individual ability to perform descriptive analysis of food products: basic statements and application to a Camembert cheese descriptive panel. *J. Sens. Stud.*, 10, 349-368.

JOSEPH, E.; MARCHE, M. (1972). Contribution a l'étude du vieillissement du Cognac-identification de la scopolétine, de l'aesculétine, de l'ombelliférone, de la β -metil-ombelliférone, de l'aesculine, et de la scopoletine, hétérosides provenant du bois. *Conn. Vigne Vin.*, (6): 273-330.

□ **KADIM, D.; MANNHEIM, C.H. (1999).** Kinetics of phenolic extraction during aging of model wine solution and white wine in oakbarrels. *Am. J. Enol. Vitic.*, 50 (1), 33 - 39.

KEPNER ET AL 1972

KÜTZING, F.T. (1837). Mikroskospische Untersuchungen, *J. F. Pract. Chemie* 11 (7), 385-409.

LAFONT, J. (1971). Problèmes actuels technologie et de vieillissement des eaux- de-vie de vin et de marc de raisin. *Bull. OIV* 482, 339-59.

LASZLAVIK, M.; GAL, L.; MISIK, S.; ERDEI, L. (1995). Phenolic compounds in two Hungarian red wines matured in *Quercus robur* and *Quercus petrea* barrels: HPLC analysis and diode array detection. *Am. J. Enol. Vitic.* 46, 67-74.

LEBRUN, L. (1991). Used barrels and resulting aromas. The Australian Grapegrow. *Winemaker*, July, 21-22.

LEIFSON, E. (1954). The flagellation and taxonomy of species of *Acetobacter*. *Antoine van Leeuwenhoek*, 20,102.

LISDIYANTI ET AL 2002

LLAGUNO , C. (1987). El vinagre de vino. Antecedentes históricos. *Alim. Equip. Technol.* 6, 259-264.

LLAGUNO, C. (1991). Antecedentes históricos. *El Vinagre de Vino*. Llaguno, C. y Polo, M. C. Eds., pp. 1-23. Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid.

LLAGUNO, C.; POLO, M. C. (1991). La composición química de los vinagres vínicos. *El Vinagre de Vino*. Llaguno, C. y Polo, M. C. Eds., pp. 105-132. Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Madrid.

LOPEZ (2002)

MAGA, J. A. (1985). Flavor contribution of wood in alcoholic beverages. En: *Progress in Flavour Research - Proceedings of the 4th Weurman Flavor Research Symposium*. Ed. Adda, J. pp 409-416. Elsevier Science pub., Amsterdam.

MAGA 1984

MAGA 1989 a

MANGAS, J. J.; RODRÍGUEZ, R.; MORENO, J.; SUÁREZ, B.; BLANCO, D. (1996). Evolution of aromatic furanic coongeners in the maturation of cider brandy: A contribution to its characterization. *J. Agric. Food chem.* 44, 3303- 3307.

MANGAS, J. J.; RODRÍGUEZ, R.; MORENO, J.; SUÁREZ, B.; BLANCO, D. (1997). Furanic and phenolic composition of cider brandy. A chemometric study. *J. Agric. Food Chem.*, 45, 4076 - 4079.

MARTÍNEZ DE LA OSSA, E.; CARO, I.; BONAT, M.; PÉREZ, L.; DOMECCQ,

B. (1987). Dry extract in Sherry and its evolution in the aging process. *Am. J. Enol. Vític.* 38(4), 321 - 325.

MATSUSHITA 1985

MECCA, F.; ANDREOTTI, R.; VERONELLI, L. (1979). *L'Aceto*. Aeb. Brescia.

□ **MEILGAARD, M.C.; CIVILLE, G. V.; CARR, B. T.** (1991). *Sensory evaluation techniques*, 2nd Edition. CRC press Inc., Boca Raton. Florida.

MILLER, D. P.; HOWELL, G. S.; MICHAELIS, C. S.; DICKMANN, D. I. (1992). The content of phenolic acid and aldehyde flavor components of white oak as affected by site and species. *Am. J. Enol. Vític.* 43, 333 - 338.

MILLER, I. J.; REEDY, F. E. (1990). Quantification of fungiform papillae and taste pores in living human subjects. *Chem. Senses* 15, 281-294.

MINISTERIO DE LA PRESIDENCIA (1993). Reglamentación técnico-sanitaria para la elaboración y comercialización de los vinagres. *Boletín Oficial del Estado del 8 de diciembre*. Madrid.

MINISTERIO DE SANIDAD Y CONSUMO (1985). *Análisis de alimentos. Métodos oficiales y recomendados por el CICC*. Ed. Servicio de publicaciones de Ministerio de Sanidad y Consumo, Madrid.

MONEDERO, L.; OLALLA, M.; QUESADA, J. J.; LÓPEZ, H.; LÓPEZ, M. C. (1998). Exhaustion techniques in the selection and description of phenolic compounds in Jerez wine extracts obtained by accelerated aging techniques. *J. Agric. Food Chem.* 46, 1754 - 1764.

MONEDERO, L.; OLALLA, M.; MARTÍN-LAGOS, F.; LÓPEZ, H.; LÓPEZ, M. C. (1999). Application of chemometric techniques in obtaining macerates with phenolic compounds content similar to that of wines from the Jerez-Sherry region subjected to oxidative aging. *J. Agric. Food Chem.*, 47, 1836-1844.

MORALES, M. L. (1999). Cambios fisicoquímicos en las distintas etapas de

producción de vinagres de Jerez. *Tesis Doctoral*. Área de Nutrición y Bromatología. Facultad de Farmacia. Universidad de Sevilla.

MOSEDALE, J. R.; PUECH, J. L. (1998). Wood maturation of distilled beverages. *Trends in Food Science and Technology*, 9, 95-101.

MOSEDALE 1999

MOURGUES, J.; JOURET, C.; MOUTOUNET, M. (1973). Détermination du taux d'oxygène dissous et du potentiel oxydo-réducteur des eaux de vie d'Armagnac au cours de leur maturation. *Ann. Technol. Agric.* 22(2), 75-90.

MOUTOUNET, M.; RABIER, P.; PUECH, J. L.; VERETTR, E.; BARILLERE, M. (1989). Analysis by HPLC. of extractable substances of oak wood-application to a chardonnay wine. *Sciences des Aliments.*, 9, 35-51.

NIETO, J.; GONZÁLEZ-VIÑAS, M. A.; BARBA, P.; MARTÍN-ALVAREZ, P. J.; ALDAVE, L.; GARCÍA-ROMERO, E.; CABEZUDO, M. D. (1993). Recent progress in wine vinegar R & D and some indicators for the future. *Food flavours, ingredients and composition*. Ed. G. Charalambous, Elsevier Science Publishers B.V. pp 469- 500, New York.

NISHIMURA, K.; OHNISHI, M.; MASUDA, M.; KUNIMASA, K.; MATSUYAMA, R. (1983). Reactions of wood components during maturation. En: Piggott JR. Distilled beverage flavour: origin and development. Ellis Horwood, Chichester, 241-255.

NYKANEN 1983

ONISHI, M.; GUYMON, J. F.; CROWELL, E. A. (1977). Changes in some volatile constituents of brandy during aging. *Am. J. Enol. Vitic.* 28, 192 - 198.

ORMAECHEA, A. R. (1991). Proceso industrial de fabricación del vinagre. *El vinagre de vino*. Llaguno, C. y Polo, M. C. Eds., pp. 49-64. Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid.

OTSUKA, K.; ZENIBAYASHI, Y. (1974). On the determination of scopoletin

- in aged distilled liquors. *Agr. Biol. Chem.*, 38 (5), 1079-1080.
- PASTEUR, L.** (1864). "Memoire sur la fermentation acetique". *Annales Scientifiques de l'Ecole Normale Superieure*, 113-158.
- PENG, S.; SCALBERT, A.; MONTIES, B.** (1991). Insoluble Ellagitannins in *Castanea sativa* and *Quercus petraea* woods. *Phytochemistry*, 30, 775 - 778.
- PEREZ-COELLO ET AL** 1999
- PERSOON, G. H.** (1822). *Mycologia Europea* 42 (1), 96.
- PEVSNER J, REDD RR, FEINSTEIN PG, SYNDER SH (1988).** Molecular cloning of odorant-binding protein: member of a ligand carrier family. *Science*, 241: 336-339.
- PAGE, E.B.** (1963). Ordered hypoyheses for multiple treatments: a significance test for liner ranks. *Journal of the American Stadistical Association* 58 (1963) 216-230.
- PEYNAUD, E.; DOMERCQ, S.** (1961). *Critical Reviews Academy of Science* 252, 3343.
- PEYNAUD, E.** (1999). Maduración y envejecimiento de los vinos. En: *Enología practica, conocimiento y elaboración del vino*. pp 269-278. Mundi-Prensa. Madrid.
- PLESSI, M.; MONZANI, A.; COPPINI, D.** (1988). Determination of the monosaccharide and alcohol content of balsamic and other vinegars by enzymatic methods. *Agric. Biol. Chem.* 52 (1), 25-30.
- PLESSI, M.; MONZANI, A.; COPPINI, D.** (1989). Quantitative determination of acids and derivatives in balsamic and other vinegars. *Sci. Aliment.* 9, 179-183.
- POCOCK, K. F.; SEFTON, M. A.; WILLIAMS, P. J.** (1994). Taste thresholds of phenolic extracts of French and American oak wood: the influence of oak phenols on wine flavor. *Am. J. Enol. Vitc.* 45, 429 - 434.
- PONTALLIER, P.; SALAGOÏTY-AUGUSTE, M. H.; RIBÉREAU-GAYON, P.**

- (1982). Intervention du bois de chêne dans l'évolution des vins rouges. *Connaiss. Vigne vin.*, 16, 45-61.
- PONTALLIER, P.** (1992). The intervention of oak wood in the making of great red wines. *J. Wine Res.* 3, 241-247.
- POLLNITZ ET AL** 1999
- PRESIDENCIA DEL GOBIERNO** (1977). Orden de 31 de enero de 1977, sobre Métodos Oficiales de Análisis de productos derivados de la uva, *Boletín Oficial del Estado núm. 178, de 27 de junio*, Madrid.
- PRESIDENCIA DEL GOBIERNO** (1993). Real Decreto 2070/1993 de 26 de Noviembre por el que se aprueba la Reglamentación Técnico-Sanitaria para la elaboración y comercialización de los vinagres. B. O. E. Núm. 293, de 8 de diciembre, Madrid.
- PUECH, J. L.; JOURET, C.; DEIBNER, L.; ALBERT, G.** (1977). Substances phénoliques des eaux-de-vie d'Armagnac et de rhum. *Industries Alimentaries et Agricoles*, (5): 483-493.
- PUECH, J. L.**(1981). Extraction and evolution of lignin products in Armagnac matured in oak. *Am. J. Enol. Vitic.*, 32, 111- 114.
- PUECH, J. L.; LEAUTÉ, R.; CLOT, G.; NOMDEDEU, L., MONDIÉS, H.; CASTAGNET, P.; LAURICHESSE, D.** (1984). Évolution de divers constituants volatils et phénoliques des eaux de vie de cognac au cours de leur vieillissement. *Sci. Aliment.*, 4, 65 - 80.
- PUECH, J. L.** (1987). Extraction of phenolic compounds from oak wood in model solutions and evolution of aromatic aldehydes in wines aged in oak barrels. *Am. J. Enol. Vitic.*, 38 (3), 236 - 238.
- PUECH, J. L.**(1988). Phenolic compounds in oak wood extracts used in the ageing of brandies. *J. Sci. Food Agric.* 42, 165 - 172.
- PUECH, J. L.; MOUTOUNET, M.** (1988). Liquid chromatographic determination of scopoletin in hydroalcoholic extract of oak wood and in matured distilled alcoholic beverages. *J. Assoc.off Anal. Chem.*, 71(3), 512-514.

- PUECH, J. L.; RABIER, P.; MOUTOUNET, M.** (1988). Preparative separation by high performance liquid chromatography of an extract of oak wood and determination of the composition of each fraction. *J. Chromatogr.*, 457, 431- 436.
- PUECH, J. L.; MOUTOUNET, M.** (1992). Phenolic compounds in a ethanol-water extract of oak wood and in a brandy. *Lebensm. Wiss. U. Technol.*, 25, 350-352.
- **PUECH, J. L.; MOUTOUNET, M.** (1993). Barrels. *Encyclopaedia of Food Sci. Food Technol. Nutr.*, 312-317.
- PUECH, J. L.; FEUILLAT, M., BOULET, J. C.; FEUILLAT, F.; KELLER, R., MASSON, G.; MOUTOUNET, M.; NAUDIN, R.; PEYRON, D.** (2000a). Crianza de los vinos. En: *Enología: Fundamentos científicos y tecnológicos*. Vicente, A.M. Eds. pp 608-642. Mundi-Prensa. Madrid.
- PUECH, J. L.; LÉAUTÉ, R.; MOSEDALE, J. R.; MOURGUES, J.** (2000b). Barrica y envejecimiento de los aguardientes. En: *Enología: Fundamentos científicos y tecnológicos*. Vicente, A.M. Eds. pp 677-697. Mundi-Prensa. Madrid.
- REAZIN, G. H.** (1981). Chemical mechanisms of whiskey maturation. *Am. J. Enol. Vitic.*, 32, 283 - 289.
- REAZIN, G. H.** (1983). Chemical analysis of whisky maturation. Flavour of distilled beverages. *Am. J. Enol. Vitic.*, 32, 283 - 289.
- RIBÉREAU-GAYON, I.** (1931). Contribution à l'étude des oxydations et réductions dans les vins. Thèse Delmas éd. Bordeaux.
- RIBÉREAU-GAYON, J.; PEYNAUD, E.** (1961). *Traité d'œnologie*. Tome 2. Béranger, Paris.
- ROGGERO, J. P.; COEN, C.; ARCHIER, P.** (1990). Wine phenolics: Optimization of HPLC analysis. *J. Liq. Chromatog.* 13 (13), 2593 - 2603.
- ROMERO, L. E.; GÓMEZ, J. M.; CARO, I.; CANTERO, D.** (1994). A Kinetic model for growth of *Acetobacter aceti* in submerged culture. *Chem.*

Eng. J. 54, B15-B24.

ROUS, C.; ALDERSON, B.(1983). Phenolic extraction curves for white wine aged in French and American oak barrels. *Am. J. Enol. Vitic.* 34, 211 - 215.

SANCHO J, BOTA E, CASTRO JJ (1999). Introducción al análisis sensorial de los alimentos. Ediciones Universitat de Barcelona, Barcelona.

SARNI, F.; RABIER, P.; MOUTOUNET, M. (1990a). Fabrication des barriques et thermotraitement: relevé des températures. *Rev Fr Oenol*, 123:53-58.

SARNI, F.; MOUTOUNET, M.; PUECH, J. L.; RABIER, P. (1990b). Effect of heat treatment of oak wood extractable compounds. *Holzforsch*, 44 (6):461-466.

SAUVAGEOT Y FEUILLAT 1999

SAUVAGEOT, F. (1982). L'évaluation sensorielle des denrées alimentaires. CDIUPA, Massy.

SAUVAGEOT, F. (1990). La construction d'un profil sensoriel. Biometrie et qualité. Journées de statistique. ENSA Rennes, Tour, marzo.

SAUVAGEOT, F. (1991a). Principes des techniques d'analyse. II. Techniques d'analyse et de contrôle dans les Industries Agro-Alimentaires. Ediciones Lavoisier-Tec & Doc, Paris.

SAUVAGEOT, F. (1991b). Techniques d'Analyse et de Contrôle dans les Industries Agro-Alimentaires. Principes des techniques d'analyse (Vol II). Paris, Lavoisier-Tec & Dcc.

SCALBERT, A.; MONTIES, B.; FAVRE, J. M. (1988). Polyphenols of *Quercus robur*. Adult tree and in vitro grown calli and shoots. *Phytochemistry* 27, 3483-3488.

SCALBERT, A.; MONTIES, B.; JANIN, G. (1989). Tannins in Wood: Comparison of different estimation methods. *J. Agric. Food Chem.*, 37, 1324- 1329.

SCALBERT, A.; HERVE DU PENHOAT, C. L. M.; MICHON, V. M. F.; PENG, S.; VIROT, C. (1991). Structure elucidation of new dimeric

ellagitannins from *Quercus robur* L. Roburins A-E. *J. Chem. Soc. (Perkin Trans. I)*, pp. 1653-60.

SCHMALE H, HOLTGREVE-GREZ H, CHRISTIANSEN H (1990). Possible role for salivary gland protein in taste reception indicated by homology to lipophilic-ligand carrier proteins. *Mature*, 343: 366-369.

SCHUETZ, R. C. (1986). Humidity effects on evaporation and penetration in American and French white oak and its ethanol extract. pp. 54. M. S. Research Report. Univ. Calif., Davis.

SCHUMACHER, T. (1911). Definition of vinegar. *Z. Nahr. Genussm.* 22, 104.

SCHUTZ, H. G. (1964). A matching-standards method for characterizing odour qualities. *Ann. New York Acad. Sci.* 116: 517-526.

SEFTON, FRANCIS, POCOCK Y WILLIAMS 1993

SEIKEL, M.; HOSTETTLER, F.; NIEMANN, G. (1971). Phenolics of *Quercus rubra* wood. *Phytochem*, 10: 2249- 2251.

SEMENENKO, N. T.; FRLOVA, An. N.; KROLENKO, V. F. (1982). Improvement of the brandy maturing process. *Sadovod. Vinograd. Vinodel. Mold.*, 37, 29-31.

SEIDEMANN 1996

SHIMWELL, J. L.; CARR, J. G. (1960). Support for differentiation of *Acetobacter* and *Acetomonas*. *Antonie v. Leeuw.* 26, 430.

SMITH D, MARLGOSKEE R (2001). Le sens du goût. *Pour la Science*, 283 :36-43.

SINGLETON, V. L.; SULLIVAN, A. R.; KRAMER, C. (1971). Analysis of wine to indicate aging in wood or treatment with wood chip or tannic acid. *Am. J. Enol. Vitic.*, 22, 161-166.

SINGLETON, V. L. (1995). Maturation of wines and spirits: Comparisons, facts, and hypotheses. *Am. J. Enol. Vitic.*, 46(1), 98-115.

SOUMALAINEN Y NYKANEN 1970

SPILLMAN ET AL 1988

SPILLMAN 1977

STACCHINI 1990

STONE, H.; SIDEL, J. I. (1993). Sensory evaluation practices. Academic Press. Londres.

SUÁREZ LEPE, J. A.; ÍÑIGO LEAL, B. (1990). Vinagre de Vino y Vinagre de Orujo. *Microbiología Enológica*, pp. 381-399. Mundi-Prensa, Madrid.

SUOMALAINEN Y NYKANEN 1970

TESFAYE 2001

THORNGATE, J. H. (1997). The physiology of human. Sensory response to wine: A review. *American Journal of Enology and Viticulture*, 48 (3), 271- 279.

TOWEY, J. P.; WATERHOUSE, A. L. (1996). Barrel-to-barrel variation of volatile oak extractives in barrel-fermented Chardonnay. *Am. J. Enol. Vitic* 47:17-20.

TOWEY (1994)

TRESGUERRES JAF (1999). Fisiología humana. 2º edición. McGraw-Hill Interamericana, Madrid.

TRONCOSO, A. M. (1986). Estudios de vinagres Andaluces. *Tesis Doctoral*. Área de Nutrición y Bromatología. Facultad de Farmacia. Universidad de Sevilla.

TRONCOSO, A. M.; GUZMÁN, M. (1988). Determinación de extracto seco, acidez y cenizas en muestras de vinagres de Andalucía occidental. *Anal. Bromatol.* XL (1), 187 - 195.

TURTURA Y BORTOLOTTI 1991

UNE 87001:1994. Análisis sensorial. Vocabulario (ISO 5492 :1992).

UNE 87003 :1991

UNE 87017 :1992. Análisis sensorial. Metodología. Método para establecer el perfil olfato-gustativo (ISO 6564:1985).

UNE 87020 :1993. Análisis sensorial. Metodología. Evaluación de productos alimentarios por métodos que utilizan escalas (ISO 4121:1987)

UNE 87025 :1996. Análisis sensorial. Metodología. Perfil de textura (ISO 1036:1994).

URDAPILLETA I (2001). Les épreuves descriptives et discriminatives. En: *Traité d'évaluation sensorielle*. Urdapilleta I, Ton Un C, Saint Denis C, Huon de Dermadec F (Eds). Dunod, París.

VELEZ C, IZQUIERDO L, COSTELL E (1990). Análisis sensorial del aroma de los zumos de frutas. *Rev Agroquím Technol Aliment*, 30 (1): 23-40.

VILLALÓN, M. M.; GARCÍA DE SERRANA, H. L.; MARTÍNEZ, C. L. (1991). The influence of oak on the furanic aldehyde contents of distillates subjected to aging. *J. Liq. Chromatogr.* 14, 3615 -3621.

VIROT, C.; SCALBERT, A.; LAPIERRE, C.; MOUTOUNET, M. (1993). Ellagitannins and lignins in aging of spirits in oak barrels. *J. Agric. Food Chem.* 41, 1872-1879.

VIVAS Y GLORIES 1993

WEIL-BARAIS A (1993). *L'homme cognitif*. PUF. París.

WATHERHOUSE

WHISTLER, R. L.; DANIEL, J. R. (1993). Carbohidratos. *Química de los alimentos*. Fennema O.R. Eds., Vol. 2, pp. 81 - 143. Acriba, S.A. Zaragoza. España.

WILDENRADT, H.; SINGLETON, V. L. (1974). The production of aldehydes as a result of oxidation of polyphenolic compounds and its relation to wine aging. *Am. J. Enol. Vitic.*, 25, 119 - 126.

XANDRI-TAGUEÑA, J. M. (1977). Vinagrería Vínica. *Fermentaciones Vínicas, Iniciación a la Cervecería y Vinagrería Vínica*, pp. 265-310, Universidad Politécnica, Madrid.

YAMAGUCHI S, NINOMIYA K (2000). Umami and food palatability. *J Nutr*, 130: 921s-926s.

YAMADA ET AL 1997

YAMADA ET AL 2000

BENITA BENTEZ BELLIDO
ELABORACIÓN Y ENDESECIMIENTO ACCELERADO DE
VINAGRES OBTENIDOS A PARTIR DE VINOS DE
SEREZ.

SUBRESALIENTE con Pende

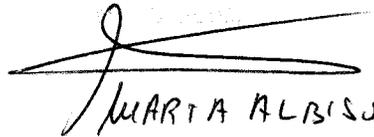
PT UNANIMIDAD
13

ENERO

2006



El Presidente,
Isidro Parra



MARTA ALBISU

