



---

**Universidad de Valladolid**  
**Campus de Palencia**

**ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR  
DE INGENIERÍAS AGRARIAS**

**Titulación de Grado en Enología**

**Diálisis por membrana para la  
obtención de vinos blancos con  
contenido alcohólico reducido**

**Alumno: Rubén David Zapatero García**

**Tutor: José Ignacio Calvo Díez**

**Cotutor: Encarnación Fernández Fernández**



Copia para el tutor/a

**Septiembre de 2020**

## Índice

1. Resumen .....	3
2. Introducción .....	3
2.1. Diálisis por membrana .....	5
3. Justificación .....	7
4. Objetivos .....	8
5. Material y métodos .....	8
5.1. Vinos empleados .....	8
5.2. Sistema de diálisis .....	9
5.2.1. Membranas .....	10
5.3. Métodos de análisis químicos .....	12
6. Resultados y discusión .....	15
6.1. Diálisis con vino sintético .....	15
6.1.1. Membrana X25 SPECTRA/POR 1 .....	16
6.1.2. Membrana X25 SPECTRA/POR 2 .....	17
6.1.3. Membrana PLGC 15005 .....	18
6.2. Diálisis con vino real .....	19
6.3. Análisis químicos .....	21
7. Conclusiones .....	24
8. Agradecimientos .....	25
9. Bibliografía .....	25

## 1. Resumen

El trabajo de investigación ha consistido en reducir parcialmente el contenido alcohólico de un vino blanco usando para ello la técnica de diálisis por membrana. Primero se hizo un ensayo de diversas membranas comerciales utilizando un vino sintético. Posteriormente, se hizo una prueba con vino real, a partir de la información obtenida en los test previos. Finalmente, se analizaron químicamente los vinos testigo y dializado, observando los distintos resultados. A la vista de los resultados se concluye que la membrana PLGC 15005 es la más adecuada a este proceso, ya que consigue una reducción aceptable del contenido en alcohol con el menor tiempo posible y con pocos cambios significativos en la analítica de los vinos resultantes.

## 2. Introducción

Se está observando que las temperaturas están subiendo en la mayoría de las regiones que producen cambios en la naturaleza. Esto repercute en la maduración de los frutos haciendo que los mostos obtenidos de estos pierdan acidez, presenten una alteración en la concentración de los polifenoles, tengan excesivo pH y el contenido de azúcar sea mayor (Jones et al., 2005).

Hay estudios que muestran que un aumento en la acumulación de los azúcares implica altas graduaciones en vinos siguiendo un proceso de fermentación alcohólica llegando a concentraciones de 15% vol. (Gooden, 2000).

Cada vez más, las bodegas adelantan la fecha de vendimia por la maduración de los frutos. Esto es provocado porque se acorta el periodo que existe entre el desborre y la maduración del fruto, las altas temperaturas, veranos cada vez más secos y la demanda de agua que existe por parte de las plantas (Duchêne et al., 2005). Por tanto, no coincide la madurez tecnológica con la madurez fenólica resultando descompensadas. Así, una uva que tiene azúcares, acidez y pH óptimos, todavía le falta desarrollar la parte fenólica. Interesa obtener vinos con contenidos alcohólicos moderados y que no presenten “verdores” en los análisis organolépticos.

Por tanto obliga a buscar otras alternativas, ya que los vinos que se producen son vinos que vienen aquejados de un cierto “verdor” y escasez de aromas debido a la falta de madurez fenólica; así como un contenido alcohólico mayor y una acidez menor, rechazándolos los consumidores, como muestran estudios similares (Kontoudakis et al., 2011).

La población también demanda vinos con menor graduación debido a la cada vez más restrictiva legislación sobre las tasas de alcohol permitidas en la conducción, tanto para conductores profesionales como particulares. Una excesiva graduación de los vinos también repercute en los impuestos asociados a la exportación de los vinos, dificultando su competitividad en mercados ya de por sí muy saturados y frente a consumidores con poca apetencia tradicionalmente por los vinos de alta graduación.

Por otro lado, si se logra reducir parcialmente el contenido alcohólico de los vinos, se podría dejar la uva más tiempo en la cepa para que la maduración fenólica sea mejor, obteniendo vinos más equilibrados, con menor astringencia, mejores aromas y seguramente mejor valorados por un mercado cada vez más exquisito.

Para reducir el contenido alcohólico de los vinos se pueden emplear diferentes técnicas, pero siempre ateniéndose al reglamento que regula la desalcoholización parcial de los vinos mediante técnicas físicas separativas (CE 606/2009). Los puntos a cumplir para poder llevar a cabo la desalcoholización parcial son:

- La disminución del grado alcohólico volumétrico adquirido no puede ser superior al 2% vol. y el grado alcohólico volumétrico adquirido del producto final se debe ajustar a la definición de vino.
- Los vinos tratados deben ser aptos para el consumo humano directo y no deben tener defectos organolépticos.
- Si se han realizado operaciones de aumento de grado alcohólico en uno de los productos vitivinícolas utilizados en la elaboración del vino considerado, no podría procederse a la eliminación de alcohol.

En el año 2010, la Organización Internacional de la Viña y el Vino (OIV) sugirió los siguientes casos en los que se podría realizar una desalcoholización parcial del vino por técnicas basadas en procesos de membrana como microfiltración, ultrafiltración, nanofiltración, contactores de membrana, ósmosis inversa y electromembranas:

- Elaborar vinos con características organolépticas equilibradas.
- Solucionar defectos organolépticos, efectos del cambio climático o condiciones climáticas adversas.
- Aumentar las técnicas que se pueden usar para obtener productos que demandan los consumidores.

Existen diversos trabajos que muestran resultados satisfactorios en cuanto a la desalcoholización parcial en vinos o a la menor formación de etanol durante la fermentación alcohólica, aunque muchos de ellos se han mantenido en la etapa de estudio experimental sin llegar a su utilización en producción comercial.

Estudios desarrollados en el campo de la vitivinicultura muestran estrategias para actuar sobre las técnicas del cultivo de la vid (gestión del riego, gestión del canopio de la planta y de la fotosíntesis), evitando así la acumulación excesiva de azúcar (Novello and De Palma, 2013). Incluso existen técnicas que se realizan antes de la fermentación alcohólica, como la adición de enzimas glucosa-oxidasa y catalasa (Röcker et al., 2016).

Muchos estudios también han evaluado la aptitud de cepas de levaduras *no-Saccharomyces* y *Saccharomyces cerevisiae* que podrían evitar la formación de etanol en la fermentación alcohólica (Ehsani et al., 2009; Kutyna et al., 2010; Varela et al., 2012; Gonzalez et al., 2013; Contreras et al., 2014; Tilloy et al., 2014).

En cuanto a técnicas utilizadas para la desalcoholización parcial de vinos, podemos mencionar trabajos que estudian la nanofiltración, destilación osmótica y columna de conos rotatorios (Pickering, 2000; Aguera et al., 2010; Schmidtke et al., 2012).

Las técnicas más utilizadas en la desalcoholización de bebidas alcohólicas en general son el tratamiento térmico o bien, los procesos basados en membranas (Brányik et al., 2012). Estos últimos procesos incluyen la ósmosis inversa (Labanda et al., 2009; Pilipovik et al., 2005), la pervaporación (Vatai, 2007), la nanofiltración y la diálisis (Petkovska et al., 1997).

Entre las diversas técnicas mencionadas aparecen varias que utilizan membranas como elemento separador durante el proceso. Una membrana es un material natural o sintético que separa dos disoluciones (alimentación y permeado) y es permeable a un cierto/s componente/s en la alimentación de partida. Algunas tecnologías de separación

de membrana (a partir de ahora nos ceñiremos únicamente a las membranas sintéticas) incluyen la microfiltración, ultrafiltración, ósmosis inversa y nanofiltración. En todas ellas, se utiliza un gradiente de presión como fuerza impulsora. También existen procesos basados en diferencias de potencial eléctrico (electrodiálisis) o potencial químico y presión de vapor (pervaporación) (Wee et al., 2008).

Así, ciñéndonos a la aplicación de procesos de membrana en la desalcoholización parcial de vinos, podemos indicar que existen estudios interesantes a partir del uso de la nanofiltración, cuyo objetivo es reducir la concentración de azúcar en mostos, consiguiendo de esta forma vinos con menor graduación. Esta línea ha venido siendo el hilo conductor de diversas investigaciones realizadas en el Grupo de Superficies y Materiales Porosos (SMAP), perteneciente al Instituto de Procesos Sostenibles de la Universidad de Valladolid (UVa) (García-Martín et al., 2009; García-Martín et al., 2011; Salgado et al., 2014; Salgado et al., 2015).

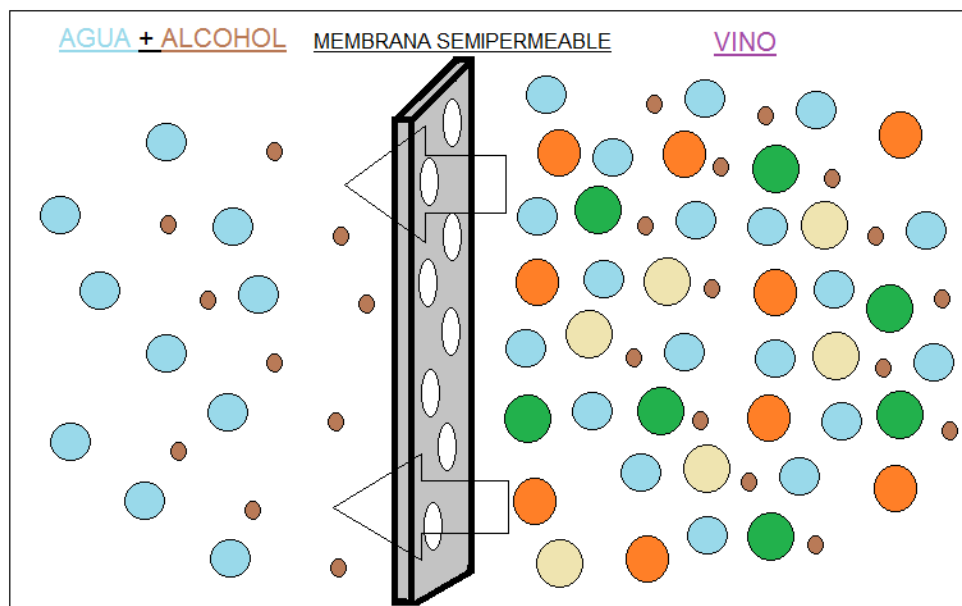
Para conseguir vino y cerveza de baja graduación se utilizan técnicas como la destilación por membrana mediante vacío (García-Martín et al., 2011) o diálisis (Liguori et al., 2015). También se han usado procesos de pervaporación y nanofiltración para la elaboración de vinos blancos con bajo contenido alcohólico (Salgado et al., 2017).

Varios Trabajos de Fin de Grado realizados en la Escuela Técnica Superior de Ingenierías Agrarias de Palencia (ETSIAA) en colaboración con el Grupo de Superficies y Materiales Porosos de la Universidad de Valladolid (SMAP), muestran diversas posibilidades del uso de técnicas de separación por membranas para reducir el alcohol de vinos ya elaborados como: pervaporación en combinación con nanofiltración (Sainz Escudero, 2017); únicamente pervaporación (Asensio de la Riva, 2018) o el más novedoso uso de diálisis (Huerta Merino, 2019).

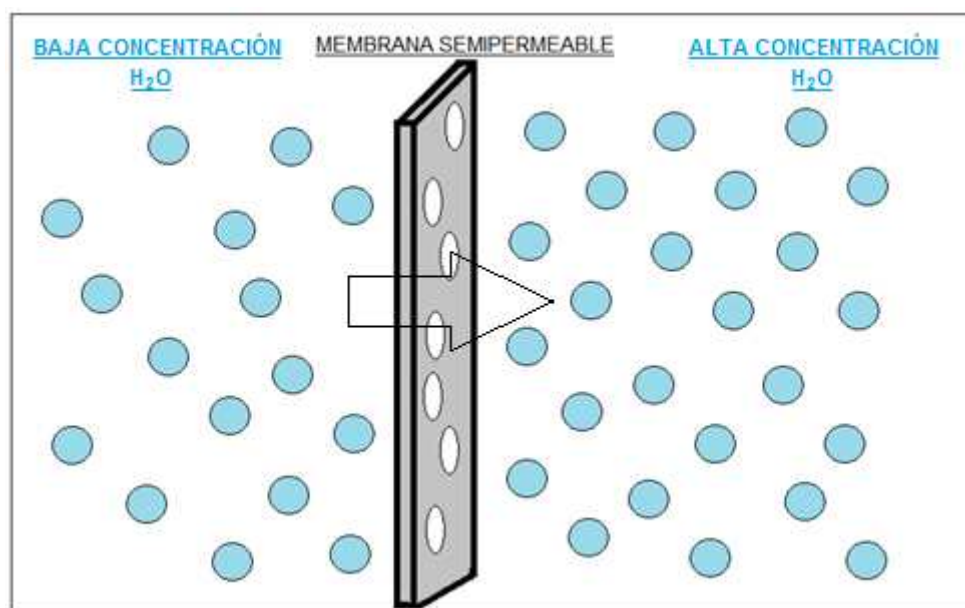
El presente trabajo desarrolla la técnica de diálisis para la obtención de vinos parcialmente desalcoholizados, utilizando membranas de características diferentes a trabajos anteriores (Huerta Merino, 2019), previsiblemente más adecuadas para mejorar el rendimiento del dializado. El objetivo será obtener mejores resultados de desalcoholización y realizar un análisis químico del vino dializado y del vino testigo. A continuación se describirán brevemente las características del proceso de diálisis.

## 2.1. Diálisis por membrana

La diálisis por membrana es un proceso artificial que pretende simular la función que hacen los riñones en nuestro organismo. Es un procedimiento tecnológico que elimina moléculas de sustancias que nosotros deseamos de un fluido (en nuestro caso vino) mediante una membrana semipermeable. La diálisis se lleva a cabo mediante la combinación simultánea de dos mecanismos de transporte a través de la membrana conocidos como ósmosis y difusión. La difusión es el traspaso de solutos de una solución con mayor concentración a una solución de menor concentración a través de una membrana semipermeable. En la difusión, sólo pueden pasar moléculas de menor tamaño que el del poro de la membrana (**Figura 1**). La ósmosis es el movimiento de agua de una zona de baja concentración a otra de alta concentración a través de una membrana semipermeable y con ayuda de un agente osmótico (**Figura 2**). En bebidas se suele dializar en temperaturas comprendidas entre los 1-6°C, evitando entre otras cosas, pérdidas de aromas.



**Figura 1.** Diagrama de difusión a través de una membrana.



**Figura 2.** Diagrama de ósmosis a través de una membrana.

Los riñones están compuestos por cerca de un millón de filtros macroscópicos denominados nefronas y su misión esencial consiste en filtrar la sangre eliminando agua y toxinas u otros restos del metabolismo no necesarios, de manera que estos pasen a formar la orina excretándose al exterior.

En el proceso de diálisis por membrana, este comportamiento filtrante de las nefronas se sustituye por la labor de una membrana generalmente obtenida a partir de un material polimérico (en muchos casos a base de polisulfona u otros polímeros similares) que se coloca en un módulo adecuado para filtros de diálisis. Las membranas comerciales de diálisis se diseñan en haces de fibras huecas (alrededor de 10.000 fibras huecas) a fin de obtener la máxima superficie filtrante en el menor espacio posible. En nuestro caso, y dado que pretendemos únicamente demostrar la fiabilidad del proceso y no su

escalado industrial, utilizaremos membranas semipermeables planas compuestas generalmente por celulosa regenerada. Las muestras seleccionadas se introducen en una celda, por un lado de la membrana pasa el vino a dializar, mientras que por el otro lado de la membrana y en sentido equicorriente circula otro fluido que no contiene alcohol (generalmente agua). El objetivo es que, debido a la diferencia de concentración y usando un mecanismo de difusión a través del material polimérico, pasen las moléculas de alcohol del vino por la membrana al fluido (agua) que circula por la otra cara de la membrana, obteniendo así en el lado inicial un vino parcialmente desalcoholizado. La razón de utilizar la misma dirección de flujo en ambos lados de la membrana (se podría haber trabajado a contracorriente, aumentando así la transferencia de masa entre ambos sistemas) es evitar descompensaciones en la presión a ambos lados de la membrana que puedan producir abombamientos en la misma y, consecuentemente, una peor efectividad del proceso.

### 3. Justificación

Como se ha explicado en la introducción, el cambio climático ha llegado a nuestros territorios y, en particular, a nuestros viñedos. El aumento de la temperatura es un hecho que ya nadie discute. Estos cambios de patrones del clima (lluvias erráticas, inundaciones, aumento de la temperatura) repercuten en la maduración de la uva, dando lugar a un desequilibrio entre la madurez tecnológica y fenólica. Como resultado, obtenemos mostos muy ricos en azúcares, y por lo tanto muy ricos en alcohol cuando fermenta.

Por ello, debemos introducir nuevas técnicas en vinificación acorde con la legislación que permitan disminuir el grado alcohólico para hacer vinos más equilibrados que demanda el mercado y, por lo tanto, disminuir el efecto del cambio climático en los vinos.

Técnicas físicas como la nanofiltración, destilación osmótica y columna de conos rotatorios no han llegado a usarse de forma frecuente por diversas razones. En algunos casos porque son muy difíciles de realizar y muy caras, mientras que otros procesos como la nanofiltración pueden modificar componentes volátiles del vino (Liguori et al., 2013).

En el uso de nanofiltración en combinación con pervaporación se ha observado que el vino resultante tiene diferencias organolépticas importantes respecto al vino testigo, posiblemente por un escaso dimensionado del equipo, que obligó a alargar enormemente la filtración y consecuentemente, aumentó la oxidación del vino debido al proceso de bombeo (Sainz Escudero, 2017).

Mediante la utilización exclusiva de la pervaporación se experimentó que, aunque se consiguiese una reducción razonable de la graduación alcohólica del vino, este tenía una menor persistencia, menor intensidad aromática y mayor oxidación (Asensio de la Riva, 2018).

La técnica de diálisis es un proceso poco agresivo para los fluidos a tratar (no precisa de presiones de trabajo altas, de hecho se realiza idealmente en condiciones de presión transmembrana nula) y que es muy específico, ya que actúa solo sobre las moléculas volátiles del vino, especialmente el alcohol. Este proceso también nos permite controlar el vino dializado, disminuyendo más o menos grado alcohólico del vino dependiendo el



tiempo que esté actuando el proceso. Esta técnica podría ser la que llevara a mejores resultados dentro de la línea de investigación del SMAP sobre desalcoholización parcial de vinos, recordemos que solo podemos llegar a una reducción máxima del 2% vol. del contenido en alcohol.

Este trabajo pretende continuar las interesantes perspectivas abiertas por un TFG previo sobre el uso de diálisis, demostrando mejor posibilidad de ofrecer garantías de éxito que trabajos anteriores basados en otro tipo de procesos (Huerta Merino, 2019).

## 4. Objetivos

El objetivo de este trabajo es demostrar la posibilidad de utilizar el proceso de diálisis por membrana para la reducción apreciable del grado alcohólico en un vino blanco producido en la ETSIIAA del campus de Palencia, uno de los cuatro campus que conforman la UVa.

Para ello, primero se ha dializado un vino sintético compuesto por agua y alcohol para medir la efectividad de diferentes membranas. Posteriormente, las membranas que han dado un mejor resultado, se han sometido a un proceso de diálisis con una cantidad suficiente de vino blanco experimental. El vino resultante del permeado, ha sido analizado desde el punto de vista químico. Los resultados del análisis químico se han comparado estadísticamente con los realizados al vino testigo de partida a fin de comprobar que, además de la reducción de alcohol buscada en el vino, este mantiene los parámetros químicos similares al vino testigo.

Los resultados que se obtengan de dicho trabajo, se discutirán de manera minuciosa y se obtendrán unas conclusiones, considerando las incidencias que hay que corregir y la posible aplicación industrial del proceso. Este trabajo profundiza en estudios previos y da las líneas a seguir por posibles trabajos futuros que se puedan realizar en el ámbito de la enología, conducentes a una aplicación industrial del proceso.

## 5. Material y Métodos

### 5.1. Vinos empleados

En este apartado debemos distinguir entre el vino sintético que utilizamos para testar las membranas primeramente, y el vino real que utilizamos en el proceso de diálisis con los mejores resultados obtenidos de las membranas probadas con el vino sintético.

- El vino sintético es un vino que se elabora en el laboratorio SMAP de la UVa (Facultad de Ciencias, Campus Miguel Delibes, Valladolid), que es donde se realiza el proceso de diálisis. El vino, está compuesto por alcohol al 96% vol. y mayoritariamente agua destilada (88,6% vol., para una graduación final aproximada de 11,4% vol.). Este vino sintético, se utiliza, como he comentado anteriormente, para probar los diferentes tipos de membranas y el proceso diseñado en el laboratorio. Así, podemos comprobar la cantidad de alcohol que



es dializado en un tiempo determinado y, en base a dichos resultados, determinar cuál o cuáles son las muestras más aptas para el proceso.

- Por otro lado, tenemos el vino real. Este vino procede de una elaboración experimental en el marco de los estudios del Grado en Enología de la ETSIIAA y se ha obtenido de la bodega de la Escuela. Es un vino blanco de la variedad Verdejo de la añada 2018. De este vino, se recogieron 8 botellas que estaban en una sala a 15°C y se homogenizaron. La homogenización se hace necesaria porque cada botella tiene una evolución diferente. Otro objetivo de homogenizar es precipitar toda materia que puede estar en suspensión y puede dificultar el proceso de diálisis. Así pues, la mezcla homogenizada se dejó durante 24 horas en unas condiciones de temperatura de 5°C en una cámara frigorífica.

Una vez estabilizado, se embotellaron de nuevo las 8 botellas, depositándolas posteriormente en la cámara frigorífica a 5°C hasta que se realizase el proceso de diálisis. De las 8 botellas, 2 botellas permanecieron como vino testigo para realizar el análisis químico. El resto, 6 botellas, se llevaron a Valladolid para someterlas al proceso de diálisis y posteriormente, volver a embotellar el vino resultante de la diálisis para poder analizarlo químicamente.

Este vino dializado, será el que nos permita elucidar la eficiencia de la membrana comercial más eficaz del conjunto mediante el análisis temporal del proceso y su comparación analítica con el vino testigo inicial del que partíamos.

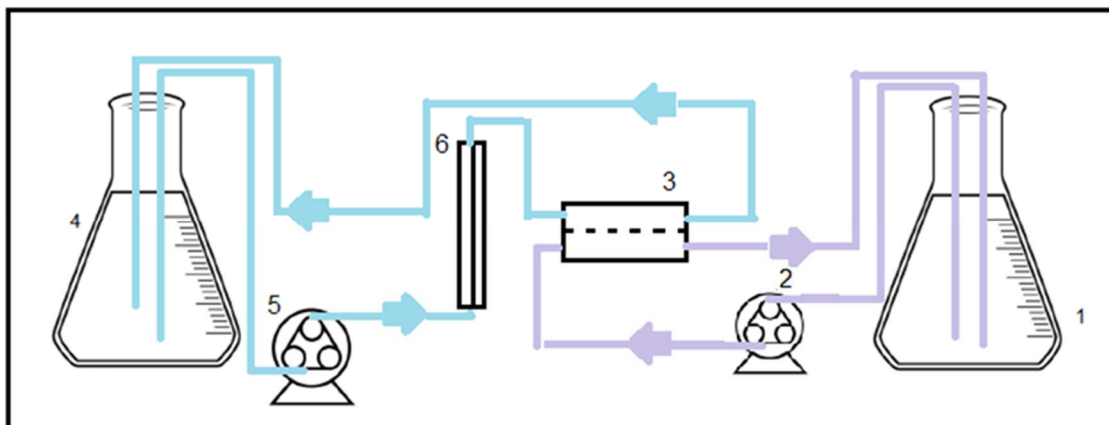
## 5.2. Sistema de diálisis

Como he comentado, este trabajo se realizó durante varias semanas en el laboratorio de Procesos de Membrana que el SMAP tiene en la Facultad de Ciencias de la Universidad de Valladolid.

Para poder probar los diferentes tipos de membranas comerciales, primero se utilizó vino sintético en el proceso de diálisis. Posteriormente, se utilizó vino real con las mejores membranas. Se midieron las condiciones del laboratorio y del vino.

El sistema de diálisis por membrana y los objetivos están descritos en el apartado “2.1. Diálisis por membrana”.

Una vez montado el equipo (**Figura 3**), se recircula agua y se comprueba que funcione correctamente. El caudal del sistema que utilizamos para testar las membranas es de 2,2 l/min en todas las pruebas.



**Figura 3. Esquema de diálisis.** 1. Matraz con vino; 2. Bomba de alimentación del vino; 3. Celda con membrana de diálisis; 4. Matraz con fluido complementario; 5. Bomba de alimentación del fluido complementario; 6. Caudalímetro.

El equipo está formado por una bomba peristáltica Eheim (modelo 1048) que hace aspirar el vino (1,4 l) desde el Erlenmeyer de 2 l de capacidad hasta la celda que contiene la membrana de diálisis. Después vuelve al Erlenmeyer inicial, de forma que recircula en un tiempo determinado.

Por otra parte, otro matraz Erlenmeyer contiene 1,4 l de un líquido complementario (en nuestro caso se utilizó agua destilada y desionizada) que es aspirado por una bomba peristáltica igual a la anterior descrita, lo hace pasar en sentido equicorriente por la celda que contiene la membrana y recoge el alcohol dializado del vino.

Ambos Erlenmeyer se tapan con Parafilm® para evitar oxidaciones y pérdidas de aromas y alcohol del vino sintético y real. De este modo, reducimos un error por pérdidas que puedan suceder durante el proceso.

### 5.2.1. Membranas

Hasta ahora hemos hablado del proceso de diálisis y el objetivo de elegir la mejor membrana, pero las membranas comerciales que se testaron tienen unas características físicas y químicas que pasamos a describir en los siguientes párrafos.

#### - Membrana tipo PLGC 15005:

La empresa que lo comercializa se llama Merck. Es un tipo de membrana empleada en ultrafiltración compuesta por celulosa regenerada de bajo "binding". Posee un valor de peso molecular nominal de 10.000 Da y se presenta en forma de discos con un diámetro de 150 mm.

La microestructura hidrófila y fuertemente apretada (con muy pocos intersticios y de muy pequeño tamaño) asegura una mayor retención posible con la menor adsorción de proteínas, ADN u otras macromoléculas.

Esta membrana se utiliza en la purificación de proteínas, concentración de proteínas, I+D de ciencias biológicas. Además tiene otras aplicaciones como desalar soluciones o intercambio de tampones.

- **Membranas tipo X25 SPECTRA/POR:**

En nuestro caso vamos a probar 2 membranas diferentes de este tipo.

La empresa que lo comercializa se llama Fisher Scientific. Estas membranas se presentan en forma de planchas planas compuestas por celulosa regenerada para usar con equipos de diálisis.

Las ventajas que poseen estas membranas son que tienen buena compatibilidad con ácidos y bases fuertes diluidas o ácidos y bases débiles concentrados, muchos alcoholes y compuestos orgánicos. Al tener buena compatibilidad con muchos alcoholes, son interesantes para nuestro trabajo, ya que trabajaremos con la desalcoholización parcial del vino. Otros puntos fuertes son el rango de pH para trabajar que está comprendido entre 2-12 y la temperatura de trabajo comprendida entre 4-121°C.

Las aplicaciones de estas membranas son varias. Se utilizan para ensayos de diagnóstico personalizados, estudios de equilibrio, desalación, purificación de proteínas, separación molecular, estudios de unión a proteínas, eliminación de electrolitos. Por tanto, es interesante testar este tipo de membranas para la desalcoholización parcial del vino, ya que nos interesa eliminar parte del alcohol que tiene el vino y al trabajar a temperaturas bajas podemos evitar pérdida de componentes volátiles.

Los diferentes tipos de membranas son:

- X25 SPECTRA/POR 1 6-8KD MWCO 240X240MM SHEET.

Posee un peso molecular nominal de corte (MWCO) comprendido entre 6.000-8.000 Da, y se presentan como hojas planas de una longitud de 240 mm y una anchura de 240 mm.

- X25 SPECTRA/POR 2 12-14KD MWCO 200X200MM SHEET.

Posee un MWCO comprendido entre 12.000-14.000 Da, también en forma de hojas planas de 200 mm de longitud y 200 mm de anchura.

Así, podemos concluir que en estas membranas, la diferencia más reseñable está en el límite de peso molecular nominal, aparte de sus diversas presentaciones en cuanto a dimensiones (longitud y la anchura de las membranas).

En la siguiente tabla (**Tabla 1**), se indican todas las características más importantes de las membranas descritas anteriormente.

**Tabla 1.** Características de las membranas de diálisis.

Membrana	Fabricante	Dimensiones	MWCO	Rango pH	Temperatura de trabajo
PLGC 15005	Merck	150mm	10KDa	2-12	4-121 °C
X25 SPECTRA/POR 1	Spectrum Labs	240x240mm	6-8KDa	2-12	4-121 °C
X25 SPECTRA/POR 2	Spectrum Labs	200x200mm	12-14KDa	2-12	4-121 °C

### 5.3. Métodos de análisis químicos

En el laboratorio SMAP se han realizado análisis que determinaron si el proceso era efectivo o no en cuanto a la desalcoholización parcial del vino sintético. No olvidemos que debemos comprobar en este mismo laboratorio qué membrana es efectiva y cuál no en cuanto a la desalcoholización. Posteriormente, al final del experimento, se analizará el vino testigo y el vino dializado mediante el método de ebulloimetría que es más preciso en cuanto a la determinación del grado alcohólico.

Por tanto, se utiliza un refractómetro modelo ABBE-REF 1 para medir el vino dializado basado en la determinación in situ del índice de refracción y su posterior conversión en contenido alcohólico mediante las tablas adecuadas.

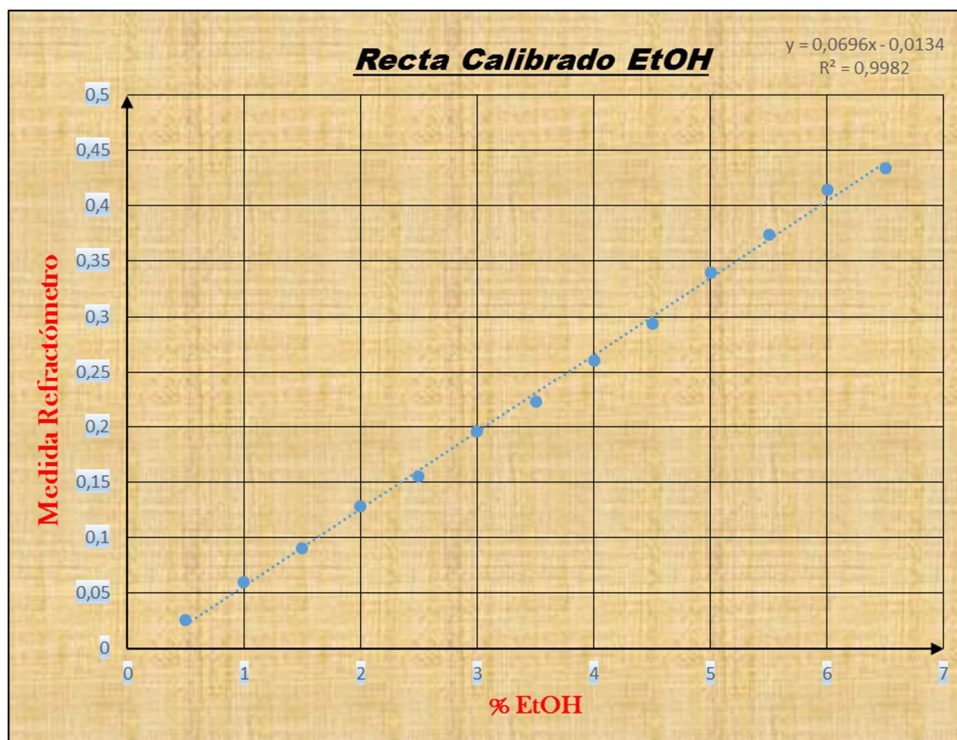
También en el laboratorio SMAP se realizan unos análisis más precisos que consisten en determinar la cantidad de alcohol que ha sido recuperada y la concentración en el vino dializado de una forma más precisa que la anterior. Estos resultados se obtienen mediante un refractómetro diferencial ATAGO modelo DD-5. Con él y un baño que lo mantiene a 20°C (para que los resultados no sean afectados por la temperatura y correspondan fielmente a la curva de calibrado previamente realizada), podemos saber la cantidad de alcohol que se recupera del vino y podemos saber qué membrana es más efectiva para el proceso de desalcoholización.

Para poder obtener los resultados, es necesario primero realizar un calibrado cuyos resultados vienen presentados en la siguiente tabla (**Tabla 2**) creada a partir de una serie de muestras con varias concentraciones de alcohol en matraces de 100ml. Se relaciona el índice de refracción con el porcentaje de alcohol. Posteriormente se realiza una recta de calibrado (**Gráfica 1**). Hay que tener en cuenta que la máxima medición se realiza para una concentración de alcohol equivalente al 6,5% vol. Este valor corresponde al fondo de escala (valor máximo medible) en el refractómetro. Por tanto, si queremos saber la concentración de un vino que está en torno a 12% vol., debemos realizar diluciones al 50% con agua destilada en un matraz aforado.

Como se puede observar en la gráfica (**Gráfica 1**), la recta de calibrado es suficientemente precisa, con un grado de correlación superior a 0,998.

**Tabla 2.** Datos del calibrado del refractómetro diferencial.

Recta Calibrado EtOH													
V EtOH (mL)	0,5	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4	4,5	5	5,5	6	6,5
% EtOH (v/v)	0,5	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4	4,5	5	5,5	6	6,5
Medida Refractómetro	0,026	0,060	0,090	0,128	0,155	0,196	0,222	0,260	0,294	0,340	0,374	0,415	0,434



**Gráfica 1.** Recta de calibrado del refractómetro diferencial.

Por otro lado, debemos considerar un conjunto de parámetros analíticos, además del grado alcohólico, que tienen ambos vinos (dializado y testigo), para poder concluir si el proceso de diálisis es efectivo o interviene en la composición del vino. Todos estos análisis fueron realizados por duplicado en cada una de las muestras (vino dializado y vino testigo) en el laboratorio de la ETSIIAA del campus de Palencia. Los parámetros analizados y materiales utilizados fueron los siguientes:

- **Acidez Volátil (Método García Tena):** Se utiliza un volatímetro de la marca GAB System. También se usan una bureta de 10 ml, fenolftaleína y una solución de NaOH 0,01N.  
En el matraz de destilación de 60 ml, se introducen 11 ml de vino y se lleva a ebullición calentándolo. El destilado se recupera en dos probetas de 5,1 ml y 3,2 ml. La primera, se desecha por contener ácidos más volátiles que el ácido acético ( $\text{SO}_2$  y  $\text{CO}_2$ ). La segunda probeta (3,2 ml) se mantiene para posterior valoración por estimar que ha pasado  $\frac{1}{3}$  del ácido acético que contiene el vino. En la valoración, el contenido de la probeta de 3,2 ml se echa en un vaso de precipitados de 25 ml, se echan unas gotas de fenolftaleína y se va añadiendo NaOH 0,01N. Así se conoce la acidez volátil real expresada en g/l de ácido acético.
- **Grado Alcohólico:** Por el método de ebulloimetría que se describe a continuación.  
El grado alcohólico se determina mediante un ebulómetro de la marca GAB System. Se realizan 2 medidas: medida del agua y medida del vino.
  - o En la medida del agua se determina la temperatura de ebullición del agua destilada, que se tomará como referencia en la regla de cálculo móvil. Esta temperatura de ebullición del agua se hace coincidir con el cero de la escala fija y se bloquea la regla.

- En la medida del vino se sigue el mismo procedimiento que para la medida del agua. Se obtiene la temperatura de ebullición del vino.

Sabiendo la diferencia de temperaturas de ebullición del agua y del vino, se puede obtener el dato del grado alcohólico que tiene el vino.

- **Índice de Polifenoles Totales (IPT) (Método de Índice Ultravioleta):** Se utiliza un espectrofotómetro de la marca LAN OPTICS serie 2000, con espectro visible y ultravioleta. También se necesita un matraz aforado de 50 ml y una pipeta de 5 ml.

Primero, se diluye la muestra de vino en proporción 1:10 utilizando la pipeta y el matraz aforado. A continuación, se hace un blanco en el espectrofotómetro con agua destilada echándolo en la cubeta de cuarzo de 1 cm. Por último, se añade parte de la dilución del matraz en la cubeta de cuarzo de 1 cm y se introduce en el espectrofotómetro midiendo la absorbancia del vino a una longitud de onda de 280 nm.

- **Índice de Color (IC) (Método de Glories):** Se utiliza un espectrofotómetro UV-VIS de la marca LAN OPTICS serie 2000. Como se necesita una menor sensibilidad, se utiliza una cubeta de vidrio óptico de 1 cm en lugar de una cubeta de cuarzo.

En la determinación, primero se prepara la muestra eliminando el CO<sub>2</sub> y clarificando la muestra por centrifugación. Luego se hace un cero para tomar como referencia con agua destilada y, una vez que se echa la muestra de vino en la cubeta de vidrio de 1 cm, se mide la absorbancia de la muestra directamente a una longitud de onda de 420 nm. Por último, se debe tener en cuenta que las medidas pueden estar influenciadas por el contenido en sulfuroso y acidez y que sólo se mide a una longitud de onda de 420 nm, porque al ser vino blanco, el color es entre amarillo verdoso y amarillo dorado, lo que tiene un rango de absorción de 400-480 nm.

- **pH:** Como instrumento se utiliza un pH-metro de la marca CRISON modelo Basic 20+. También se utiliza un vaso de precipitados de 150 ml y las muestras de vino.

Se debe calibrar el electrodo del pH-metro con unas soluciones tampón de pH 4 y pH 7 a 20°C. Seguidamente, se miden las muestras de vino a una temperatura también de 20°C con el objetivo de que los resultados sean lo más exactos.

- **Acidez Total (Método Potenciométrico):** Como instrumento también se utiliza un pH-metro de la marca CRISON modelo Basic 20+. También se usan un vaso de precipitados de 150 ml, una solución de NaOH 0,1 N.

Primero se quita el CO<sub>2</sub> del vino por centrifugación. Como está calibrado el pH-metro anteriormente, no se calibra. Luego, se cogen 20 ml de vino y se lleva a un vaso de precipitados, se introduce el electrodo, se asegura de que está midiendo y se va añadiendo NaOH hasta llegar a pH=7. Por último, se determina la acidez total de la muestra con el volumen que se ha gastado de NaOH expresada en g/l.



- **Sulfuroso Libre y Total (Método Ripper Sencillo):** Para llevar a cabo este análisis, se utilizó una bureta de 5 ml, un matraz Erlenmeyer de 100 ml, pipetas de 1, 5 y 10 ml, una solución de  $I_2$  0,002N, una solución de NaOH 1N, una solución de  $H_2SO_4$  al 16% y almidón al 1%.
  - o Determinación del sulfuroso total: Se añaden 10 ml de NaOH y 10 ml de vino en el Erlenmeyer de 100 ml, se tapa y se espera 20 minutos. Posteriormente, se añaden 5 ml de ácido sulfúrico al 16% y 1 ml de almidón. Por último, se valora con  $I_2$  0,02N, hasta que la disolución se torne a color azul-violeta durante unos 15 segundos. Con el volumen de lodo gastado (ml) se determina el  $SO_2$  total de la muestra expresado en mg/l.
  - o Determinación del sulfuroso libre: se ponen los 10 ml de vino en el Erlenmeyer de 100 ml, se añaden 5 ml de ácido sulfúrico al 16%, 1 ml de almidón y se valora con  $I_2$  0,02N hasta que la disolución se torne a color gris/morado. Así se puede determinar el  $SO_2$  libre de la muestra expresado en mg/l.

Por último, una vez recopilados todos los datos obtenidos de los análisis químicos, se procedió a la realización de un tratamiento estadístico mediante análisis de varianza (ANOVA), con la intención de comprobar si existen diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes tipos de vinos. Para ello, se ha utilizado el programa Statgraphics Centurion XVIII (StatPoint Technologies, Inc., Warrenton, USA).

## 6. Resultados y discusión

A continuación, se hace una exposición de los resultados obtenidos de los vinos a testar (sintético y real) mediante la técnica de diálisis. Posteriormente, se muestran los resultados químicos del vino testigo y dializado.

### 6.1. Diálisis con vino sintético

En la siguiente tabla (**Tabla 3**), se muestran datos obtenidos de condiciones en las que se ha realizado el ensayo para el vino sintético.

**Tabla 3.** Condiciones del ensayo.

CONDICIONES DEL ENSAYO CON VINO SINTÉTICO	
Caudal diálisis	2,2 l/min
Temperatura baño refractómetro diferencial	20°C
Temperatura del agua destilada	20,8°C
Temperatura del vino dializado	24,5°C
Temperatura de la sala	23°C



En este caso, debemos tener en cuenta que el caudal al que trabajan las bombas es de 2,2 l/min, es decir, inferior al máximo que pueden trabajar que es de 5 l/min. Las condiciones de caudal y temperatura se mantienen constantes durante todo el proceso de diálisis.

También se puede observar como el proceso de diálisis se realiza a una elevada temperatura de 24,5°C, por tanto, puede influir en pérdidas de componentes volátiles del vino que afectan organolépticamente.

El vino sintético está compuesto, como hemos explicado en el apartado “5.1. Vinos empleados” por alcohol y agua destilada. La concentración inicial aproximada en los ensayos fue de 11,4% vol. con el objetivo de hacer un fluido lo más parecido, en cuanto a concentración de alcohol se refiere, al vino blanco que posteriormente íbamos a tratar. Las demás condiciones, se prevén que sean lo más parecidas a las condiciones de ensayo que se realizará más adelante con vino real.

El montaje del equipo para la realización del ensayo, sigue el esquema explicado en el apartado “2.1. Diálisis por membrana” figura 3. Los ensayos con las diferentes membranas, se realizan durante un tiempo máximo de 21 h. Los datos se toman cada hora durante las 4 primeras horas y un dato final cuando lleva 21 h el proceso. El objetivo es ver la diferencia entre los resultados que se obtienen con el proceso en un corto periodo de tiempo de 4 horas y en un periodo más largo de 21 horas.

Posteriormente, procedimos a realizar los ensayos con los diferentes tipos de membranas.

### 6.1.1. Membrana X25 SPECTRA/POR 1

Como he comentado antes, es una membrana con un peso molecular nominal de corte 6-8 KDa. De todas las membranas probadas, es la más selectiva, por lo que el dato de % vol. dializado es el más bajo. En un matraz se colocó el vino sintético, en otro matraz se colocó agua destilada. El sistema se llenó con volumen de los matraces y se dejó un total de 1.260 min. Los resultados están detallados en la tabla (**Tabla 4**).

**Tabla 4.** Datos de diálisis con la membrana X25 SPECTRA/POR 1.

Fecha: 03/03/2020. Membrana SPECTRA/POR 1 (6-8kDa)						
Hora	Matraz EtOH+H <sub>2</sub> O			Matraz H <sub>2</sub> O		
	n*	Refrac. Dif** Dilución 50%	%EtOH	n*	Refrac. Dif**	%EtOH
11:00	1,334	0,382	11,4	1,331	0,000	0,000
12:00	1,334	0,374	11,1	1,333	0,008	0,307
13:00	1,333	0,368	11,0	1,332	0,012	0,365
14:00	1,332	0,365	10,9	1,333	0,018	0,451
15:00	1,333	0,364	10,8	1,331	0,023	0,523
8:00 (04/03/2020)	1,333	0,310	9,29	1,331	0,105	1,701
n*: Dato del índice de refracción. / Refrac. Dif**: Dato de refractómetro diferencial						

Como se puede observar en la tabla, para ser una membrana con baja capacidad de transmisión, es una membrana capaz de dializar 1,7% vol. (1,701-0,000), eso sí durante un periodo de tiempo prolongado. En un periodo más corto y asequible de 4 horas, pensando en la posibilidad de un proceso industrial, la membrana es capaz de transmitir 0,523% vol. (0,523-0,000), lo que supone un valor bajo desde nuestro punto de vista. También debemos tener en cuenta que es un vino sintético, lo que implica que si se realiza con un vino real, el resultado quizás sea peor al tener muchos más componentes que interfieran en la permeabilidad de la membrana y provocar también una posible oxidación por la recirculación del vino. Por tanto, se decide no utilizarla para la experiencia con el vino real durante un tiempo prolongado.

Desde el punto de vista de la graduación del vino, vemos como baja 0,6% vol. (11,4-10,9) en 4 horas y 2,11% vol. (11,4-9,29) en 21 horas. Esta mayor bajada de alcohol respecto al permeado por la membrana, se puede deber a una volatilización de alcohol en el Erlenmeyer provocada por la alta temperatura de proceso de diálisis, recirculación del vino, etc.

En cuanto al valor del índice de refracción obtenido con el refractómetro ABBE, vemos que da valores aproximados y no se toman en consideración.

### 6.1.2. Membrana X25 SPECTRA/POR 2

Esta membrana tiene valores nominales de MWCO entre 12-14 KDa, es decir, es la que tiene una mayor capacidad de transmisión entre todas las membranas. De todas las membranas probadas, es la menos selectiva, se podría pensar que el dato de % vol. dializado es el más alto, pero como veremos posteriormente no es así. En un matraz se colocó el vino sintético, en otro matraz se colocó agua destilada. El sistema se llenó con volumen de los matraces y se dejó un total de 1.260 min. Los resultados están detallados en la tabla (**Tabla 5**).

**Tabla 5.** Datos de diálisis con la membrana X25 SPECTRA/POR 2.

Fecha: 04/03/2020. Membrana SPECTRA/POR 2 (12-14kDa)						
Hora	Matraz EtOH+H <sub>2</sub> O			Matraz H <sub>2</sub> O		
	n*	Refrac. Dif** Dilución 50%	%EtOH	n*	Refrac. Dif**	%EtOH
10:45	1,333	0,385	11,4	1,331	0,000	0,000
11:45	1,334	0,371	11,0	1,331	0,009	0,322
12:45	1,334	0,372	11,1	1,331	0,016	0,422
13:45	1,334	0,365	10,9	1,332	0,022	0,509
14:45	1,334	0,362	10,8	1,332	0,028	0,595
8:00 (05/03/2020)	1,333	0,305	9,15	1,332	0,119	1,902
n*: Dato del índice de refracción. / Refrac. Dif**: Dato de refractómetro diferencial						

En el caso de esta membrana, se puede observar como los valores del índice de refracción realizados con el refractómetro ABBE son poco variables, por lo que

decidimos no tomarlos en consideración. Estos valores los tomamos para tener un punto de vista aproximado de la graduación alcohólica y compararlos con los valores del refractómetro diferencial.

Desde el punto de vista de la permeabilidad de la membrana, observamos que los valores de la concentración de alcohol del matraz con agua, son bastante similares a la anterior membrana. Se observa que en 4 horas es capaz de dializar aproximadamente 0,6% vol. (0,595-0,000) y en 21 horas 1,9% vol. (1,902-0,000). Este dato empieza a ser interesante desde un punto de vista industrial, ya que somos capaces de recuperar 1,9% vol. de alcohol en 21 horas. Sabiendo que según la legislación el máximo que se puede desalcoholizar es de un 2% vol., este resultado es bastante cercano al límite. Como inconvenientes si se utiliza vino real, se puede pensar en que para llegar hasta ese punto, el vino tiene que recircular durante 21 horas, lo que conllevaría una oxidación del color, pérdida de sustancias volátiles y una posible pérdida de volumen en boca.

Desde el punto de vista del matraz con el vino, vemos como en 4 horas ha bajado 0,6% vol. (11,4-10,8) y en 21 horas ha bajado 2,25% vol. (11,4-9,15), lo que significa como en el caso anterior, que existe una pérdida parcial de alcohol que se volatiliza debido a la recirculación del vino o a la alta temperatura del proceso. Como he explicado anteriormente, se podría aconsejar recircular el vino durante el menor tiempo posible y bajar la temperatura del proceso de diálisis a un intervalo comprendido entre 1-6°C.

### 6.1.3. Membrana PLGC 15005

Esta membrana, siempre según el fabricante, tiene un valor de corte (MWCO) de 10 KDa. De todas las membranas probadas, es la que está en un término medio. Pertenece a otra casa comercial y quizás por ser de bajo "binding", es decir, que las partículas no se quedan retenidas en la superficie, es con la que se ha obtenido el dato de % vol. dializado más alto. En un matraz se colocó el vino sintético, en otro matraz se colocó agua destilada. El sistema se llenó con volumen de los matraces y se dejó un total de 1.260 min. Los resultados están detallados en la tabla (**Tabla 6**).

**Tabla 6.** Datos de diálisis con la membrana PLGC 15005.

Fecha: 05/03/2020. Membrana PLGC15005 (10kDa)						
Hora	Matraz EtOH+H <sub>2</sub> O			Matraz H <sub>2</sub> O		
	n*	Refrac. Dif** Dilución 50%	%EtOH	n*	Refrac. Dif**	%EtOH
11:00	1,334	0,384	11,4	1,331	0,000	0,000
12:00	1,333	0,368	11,0	1,331	0,022	0,509
13:00	1,334	0,352	10,5	1,331	0,035	0,695
14:00	1,333	0,344	10,3	1,332	0,049	0,897
15:00	1,333	0,340	10,2	1,331	0,060	1,055
8:00 (06/03/2020)	1,333	0,245	7,43	1,333	0,228	3,468
n*: Dato del índice de refracción. / Refrac. Dif**: Dato de refractómetro diferencial						

La prueba realizada con esta membrana es la que mejores resultados ha obtenido. Se puede observar como los valores del índice de refracción obtenidos con el refractómetro ABBE son, como en casos anteriores, indeterminantes. Se decide considerarlos solo para tener un valor aproximado, por lo que pasaremos a discutir los resultados obtenidos por el refractómetro diferencial.

Desde el punto de vista de la permeabilidad de la membrana, se observa que los valores de la concentración de alcohol del matraz con agua, son bastante buenos. En sólo 4 horas es capaz de dializar aproximadamente 1% vol. (1,055-0,000) y en 21 horas 3,5% vol. (3,468-0,000). Sabiendo que según la legislación el máximo que se puede desalcoholizar es de un 2% vol., estos resultados obtenidos son muy interesantes. Para la utilización desde un punto de vista industrial, habría que adecuar el área de intercambio que tiene la membrana en la celda con los litros de vino que queremos dializar, el tiempo que vamos a tener el proceso en funcionamiento y la temperatura a la que se va a realizar el proceso que sería un óptimo entre 1-6°C.

Desde el punto de vista del matraz con el vino, vemos como en 4 horas ha bajado 1,2% vol. (11,4-10,2) y en 21 horas ha bajado 3,97% vol. (11,4-7,43), lo que significa como en casos anteriores, que existe una pérdida de alcohol que se volatiliza debido a la recirculación del vino o a la alta temperatura del proceso.

Como inconvenientes, se puede pensar en la recirculación del vino como en casos anteriores, con la pérdida de alcohol por la volatilidad y la oxidación que produce. Otro posible inconveniente sería la pérdida de volumen en boca provocado por el propio proceso de diálisis. Además tendríamos que modificar la temperatura de proceso, intentando en el posterior ensayo con vino real bajar la temperatura a 1-6°C para evitar pérdidas de componentes volátiles. Por tanto, esta membrana se decide probarla y llevarla al posterior ensayo con vino real e intentar desalcoholizar un 2% vol.

## 6.2. Diálisis con vino real

Para empezar, en la siguiente tabla (**Tabla 7**), se muestran los datos de las condiciones en las que se realizó el proceso de diálisis con vino real.

**Tabla 7.** Datos de las condiciones del ensayo con vino real.

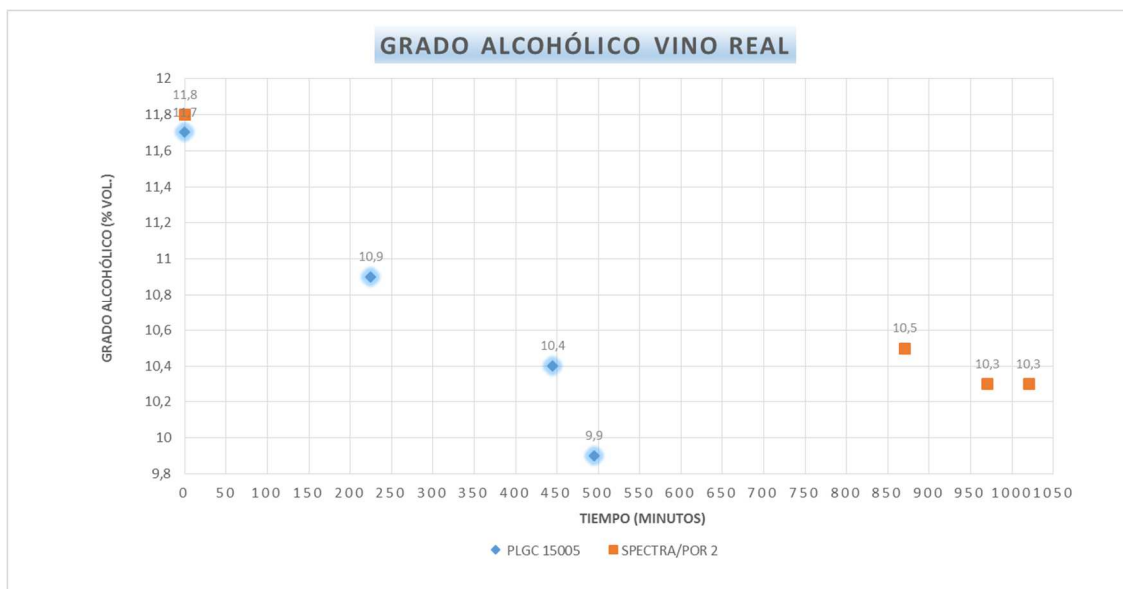
CONDICIONES DEL ENSAYO CON VINO REAL	
Temperatura baño refractómetro diferencial	20°C
Temperatura del vino dializado	23,2°C
Temperatura de la sala	22°C

Posteriormente realizamos los ensayos con vino real y con las 2 membranas que obtuvieron un mejor resultado con vino sintético (SPECTRA/POR 2 y PLGC 15005). El matraz del proceso de diálisis que contiene vino real se llenó con 1750 ml.

A continuación, se muestran gráficas con los resultados que obtuvimos en el propio laboratorio del SMAP acerca del grado alcohólico. Como veremos posteriormente cuando comparemos los resultados obtenidos en el laboratorio con los análisis finales, los contenidos en alcohol determinados en Valladolid resultan ser bastante elevados.

Evidentemente la medición con el refractómetro diferencial no es un método oficial de determinación del grado alcohólico y, por lo tanto, los valores a considerar como fiables son los del posterior análisis en la ETSIIAA. No obstante, estos datos son interesantes dado que nos permiten deducir las tendencias de la reducción de alcohol y ver como evoluciona con el tiempo de dializado.

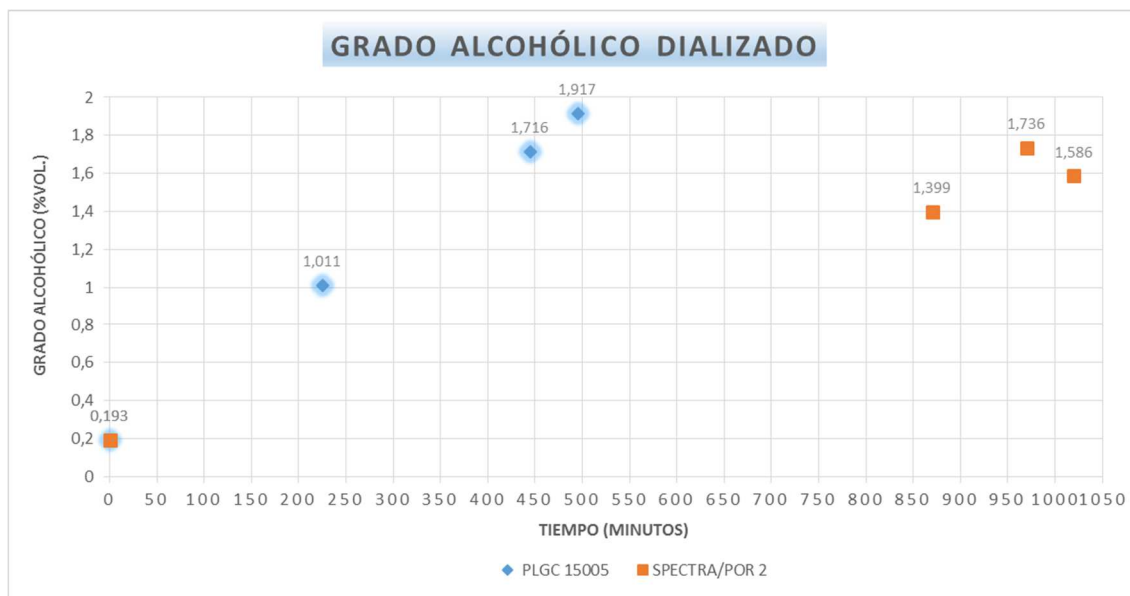
En la gráfica (**Gráfica 2**), aparece la comparativa de las 2 membranas en cuanto a la reducción del grado alcohólico para un mismo vino real.



**Gráfica 2.** Grado alcohólico que contiene el vino real a lo largo del tiempo.

Se puede observar como la membrana SPECTRA/POR 2 ha conseguido reducir el contenido alcohólico del vino en un mayor tiempo, reduciendo el contenido alcohólico desde los 11,8% vol. hasta los 10,3% vol. Sin embargo, la membrana PLGC 15005 ha obtenido los resultados más satisfactorios al reducirse el contenido de alcohol del vino desde los 11,7% vol. hasta los 9,9% vol. y todo ello en menos tiempo. La reducción del contenido alcohólico en 2% vol. tardaría en alcanzarse cuando el proceso lleva más de 495 min (8h 15min) en funcionamiento cuando se prueba la membrana PLGC 15005, o se alcanzaría cuando el proceso lleva más de 1020 min (17h) en funcionamiento cuando se prueba la membrana SPECTRA/POR 2.

En la gráfica (**Gráfica 3**), aparece la comparativa de las 2 membranas en cuanto se refiere al alcohol capaz de dializar cada membrana.



**Gráfica 3.** Alcohol que es capaz de dializar cada membrana.

Si observamos los resultados en la anterior gráfica, la membrana PLGC 15005 logra unos resultados mejores en la reducción del contenido alcohólico del vino que la membrana SPECTRA/POR 2 en un menor tiempo. Si nos fijamos en el resultado de la membrana SPECTRA/POR 2 en el minuto 970 (16h 10min), nos damos cuenta que sale un resultado mayor que en el minuto 1020 (17h). Esto puede ser debido a un error porque se hizo una dilución cuando no se tenía que haber hecho para comprobar el grado alcohólico que había en el matraz que contenía el etanol dializado.

Se puede observar, si se comparan las dos gráficas por cada tipo de membrana, que se dializa una cantidad mayor de alcohol (**Gráfica 3**) si lo comparamos con la reducción del grado alcohólico del vino (**Gráfica 2**). La cantidad de alcohol que se dializa es mayor porque existe un error de calibración del refractómetro diferencial de 0,193% vol.

Por otro lado, en la gráfica anterior (**Gráfica 3**), se observa que el valor del etanol acumulado crece a lo largo del tiempo, de forma más evidente para la membrana PLGC 15005, por lo que se puede deducir que no existen colmataciones en las membranas que den lugar a una saturación del proceso.

Una vez descritas las gráficas, si se quiere reducir el alcohol del vino en torno al 2% vol. (según los análisis que se hicieron en el SMAP) desde un punto de vista industrial, el vino tratado con la membrana PLGC 15005 es el que ofrece mejores resultados al estar en tratamiento un total de 495 min (8h 15min) en comparación con los 1020 min que estuvo en tratamiento la membrana SPECTRA/POR 2.

Una vez terminado el proceso de diálisis, se procedió a embotellar el vino resultante (esto es, el contenido del matraz 1 de la Fig. 3, o retenido) y se trasladó a Palencia. Se guardó en una cámara frigorífica a 5°C hasta su posterior análisis químico. Se obtuvieron 2 botellas de 750 ml de vino por cada membrana testada.

### 6.3. Análisis químicos

Para cada muestra (vino testigo, vino filtrado A-Membrana PLGC 15005 y vino filtrado B-Membrana SPECTRA/POR 2), se realizan dos repeticiones de cada parámetro.

Una vez realizados los análisis químicos, en la tabla (**Tabla 8**) se muestran la media y la desviación estándar de los resultados obtenidos, así como los resultados del tratamiento estadístico mediante análisis de varianza (ANOVA).

El objetivo es comprobar si existen diferencias estadísticamente significativas entre cualquier par de medias con un nivel de confianza del 95% para cada parámetro químico entre los vinos testigo, filtrado A y filtrado B. Por ello, los superíndices con letras a y b que aparecen en las casillas de resultados de la siguiente tabla (**Tabla 8**), indican si existen diferencias estadísticamente significativas entre las tres muestras de vino o no. Es decir, en cada muestra de vino para un parámetro químico dado, existe una letra en el superíndice (a o b). Si las letras de los superíndices de las muestras que se comparan para cada parámetro químico son iguales, entonces no hay diferencias estadísticamente significativas entre las muestras que se comparan. Por el contrario, si las letras de los superíndices de las muestras que se comparan para cada parámetro químico son diferentes, entonces se puede decir que diferencias en el parámetro químico son estadísticamente significativas entre las muestras que se comparan.

**Tabla 8.** Resultados y desviación estándar de los análisis químicos.

	VINO TESTIGO	VINO FILTRADO A (Membrana PLGC 15005)	VINO FILTRADO B (Membrana SPECTRA/POR2)
<b>pH</b>	3,18 ± 0,04 <sup>a</sup>	3,15 ± 0,01 <sup>a</sup>	3,17 ± 0,01 <sup>a</sup>
<b>Acidez total (g/l ácido tartárico)</b>	5,0 ± 0,14 <sup>b</sup>	4,3 ± 0,07 <sup>a</sup>	4,5 ± 0,07 <sup>a</sup>
<b>Grado alcohólico (% vol.)</b>	10,45 ± 0,07 <sup>b</sup>	8,95 ± 0,07 <sup>a</sup>	8,95 ± 0,07 <sup>a</sup>
<b>IPT (Índice de Polifenoles Totales)</b>	6 ± 0,00 <sup>a</sup>	6 ± 0,00 <sup>a</sup>	6 ± 0,00 <sup>a</sup>
<b>Color</b>	0,081 ± 0,001 <sup>a</sup>	0,078 ± 0,001 <sup>a</sup>	0,082 ± 0,004 <sup>a</sup>
<b>Acidez volátil (g/l ácido acético)</b>	0,29 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,32 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,36 ± 0,01 <sup>b</sup>
<b>Sulfuroso libre (mg/l)</b>	26 ± 0,71 <sup>b</sup>	21 ± 0,71 <sup>a</sup>	20 ± 0,71 <sup>a</sup>
<b>Sulfuroso total (mg/l)</b>	88 ± 3,54 <sup>a</sup>	93 ± 3,54 <sup>a</sup>	85 ± 1,41 <sup>a</sup>

\*Superíndices con letras distintas ( $x^a$ ,  $x^b$ ) en la misma línea indican diferencias estadísticamente significativas entre las muestras de vino ( $p < 0.05$ , LSD de Fisher).

En la tabla (**Tabla 8**), se observa que se han encontrado diferencias estadísticamente significativas entre las tres muestras de vino (testigo, vino filtrado A-Membrana PLGC 15005 y vino filtrado B-Membrana SPECTRA/POR 2) para cuatro parámetros químicos de los ocho analizados. En concreto para la acidez total, grado alcohólico, acidez volátil y sulfuroso libre.

Con respecto a la acidez total se han encontrado diferencias significativas entre el vino testigo y los dos vinos filtrados, observándose un descenso de acidez total en estos últimos. A pesar de que entre los dos vinos filtrados no se han encontrado diferencias



significativas, sí se observa que el vino filtrado con la membrana PLGC presenta menor acidez total.

En cuanto al sulfuroso libre se observa lo mismo, es decir, se han encontrado diferencias significativas entre el vino testigo y los dos vinos filtrados, observándose también un descenso en los vinos filtrados. Esto puede ser debido a la ligera oxigenación que sufre el vino durante el proceso de diálisis, porque hay que tener en cuenta que dicho proceso no se ha realizado bajo atmósfera inerte, Sin embargo, es el vino filtrado con la membrana SPECTRA/POR 2 el que presenta menor valor en el sulfuroso libre.

En el otro parámetro en el que se han encontrado diferencias estadísticamente significativas, acidez volátil, se observa que es el vino filtrado con la membrana SPECTRA/POR 2 el que presenta valores significativamente más elevados y el que se diferencia de los otros dos.

Evidentemente en esta discusión debemos tratar aparte el grado alcohólico, ya que la existencia de diferencias entre vino tratado y vino sin tratar era, de hecho, el objetivo del trabajo. Así, en cuanto al grado alcohólico, si comparamos estos análisis realizados por ebullometría con los análisis realizados con el refractómetro diferencial, se puede observar una diferencia en la graduación alcohólica del vino testigo y de los vinos dializados. Por consiguiente, consideramos que los resultados más fiables son los obtenidos a partir del análisis por ebullometría al ser un método más preciso. La membrana PLGC 15005 es la que ofrece mejores resultados al conseguir reducir el grado alcohólico un 1,5% vol. en un menor tiempo (8h 15min), aunque desde el punto de vista analítico no se han observado diferencias significativas entre los dos tipos de membranas para el grado alcohólico. Por tanto, los resultados del proceso parecen prometedores si en un futuro se quiere realizar de forma industrial, ya que se puede realizar una desalcoholización parcial en un tiempo razonable (una jornada de trabajo en bodega es de 8h).

Sin embargo, utilizando la membrana PLGC 15005, no se encuentran diferencias significativas en los parámetros químicos (pH, IPT, color, acidez volátil y sulfuroso total) respecto al vino testigo. Puede ser que la bajada de la acidez total no sea significativa en la subida del pH. Esto podría hacer indicar que aunque la bajada de la acidez tenga diferencias significativas respecto al vino testigo, el pH no tenga esas diferencias porque la acidez del vino filtrado A baja ligeramente y, posiblemente, los cambios organolépticos no se produzcan si se compara el vino filtrado A con el vino testigo.

En cuanto al color e IPT no existen diferencias significativas respecto al vino testigo, lo que parece indicar que el vino filtrado A no sufre pardeamientos u oxidaciones.

Por último, en cuanto a la acidez volátil, sufre ligeras diferencias, pero no son significativas. Esas diferencias pueden ser causadas debido a que existe una oxigenación durante el proceso, además de una temperatura de diálisis elevada (23,2°C).

Por otro lado, si se utiliza la membrana SPECTRA/POR 2, los parámetros químicos permanecerían como en el caso del vino filtrado A-Membrana PLGC 15005, salvo una diferencia significativa que existe en la acidez volátil respecto al vino testigo. Esto puede ser debido a la temperatura e iluminación que sufre el vino durante diferentes procesos, como han mostrado otros estudios similares (Pérez-Coello et al., 2003). En este parámetro, la clave está en el tiempo. Una diálisis que se alarga más en el tiempo como es el caso del vino filtrado B, provoca una mayor exposición del vino con una elevada temperatura de diálisis, el oxígeno y la luz, aumentando así la acidez volátil.

## 7. Conclusiones

Una vez acabado este trabajo de investigación, se pueden obtener diversas conclusiones relacionadas con los objetivos iniciales del mismo.

De entre las membranas testadas con vino real, una de ellas (PLGC 15005, que también había mostrado las mejores posibilidades en la filtración de vino sintético) es capaz de reducir un 1,5% vol. el contenido alcohólico de un vino blanco variedad Verdejo en un tiempo máximo de tratamiento de 495 min (8h 15 min). Ciertamente para la otra membrana testada con vino real, también se pudo alcanzar una reducción de alcohol similar, pero el tiempo necesario resulta claramente excesivo. Por otro lado, aunque el proceso se terminó al alcanzar una diferencia aproximada de 1,5% vol., se podría seguir alargando el proceso hasta reducir el contenido alcohólico del vino en 2% vol., que es lo máximo permitido legalmente, según la OIV.

Se considera por tanto que la diálisis es un método que se podría utilizar en la industria del vino en un futuro cercano. Las ventajas que dispone este método podrían ser que cuentan con bajo impacto ambiental, es un proceso barato, efectivo y fácil de aplicar.

En cuanto a los análisis químicos, el vino filtrado A (membrana PLGC 15005) puede obtener unos resultados parecidos al vino testigo. Esto podría hacer indicar que, desde un punto de vista organoléptico, sucedería lo mismo que desde un punto de vista químico. Así, el vino tratado con la membrana PLGC 15005 se parecería más al vino testigo (menos en la graduación alcohólica) que el vino tratado con la membrana SPECTRA/POR 2.

Sin embargo, un punto crítico que considero que existe en este proceso es el área de intercambio que existe en la celda que contiene la membrana. En nuestro caso, el trabajo se ha realizado con membranas planas y con un volumen de vino a dializar en torno a los 1750 ml. Si se piensa reproducir a escala industrial en una bodega para un volumen en torno a los 10.000 litros o más, se podría pensar utilizar membranas con formas que ocupen menos espacio y que haya un área de intercambio mayor para desalcoholizar parcialmente el vino en un tiempo menor. En este sentido la industria de membranas ofrece, como ya se comentó en la introducción, alternativas interesantes para aumentar significativamente el volumen de vino tratado sin necesidad de alargar los tiempos. En este sentido, la alternativa posiblemente más recomendable, sería la utilización de fibras huecas. De esta forma se consiguen grupos de varios centenares de fibras de pequeño diámetro interno (1-2 milímetros) que, conectadas en haces, permiten aumentar enormemente el área de membrana disponible y, consecuentemente, la cantidad de vino que sería sometida a diálisis. Con ello, perjudicaríamos organolépticamente lo menos posible al vino tratado. El caudal en el proceso de diálisis, también lo considero importante.

Además, si la diálisis del vino se realizara con un proceso termostático a una temperatura inferior a los 6°C podríamos evitar: pérdidas de componentes volátiles, aumento de la acidez volátil o la oxidación del vino.

Por último, aunque es posible materia de trabajos posteriores, creo que los resultados podrían ser más satisfactorios si se realizaran cambios en el proceso como:

- Primero realizar una pervaporación. Extraemos los aromas al ser más volátiles que el alcohol. El punto crítico sería saber el momento óptimo de parar la extracción.
- Posteriormente se realizara una diálisis con la membrana PLGC 15005 a baja temperatura entre 1-6°C. Evitaría oxidaciones, pardeamientos y pérdidas de compuestos volátiles. Implicaría que tanto los dos matraces como la membrana, estuviesen en un baño termostatzado a una temperatura entre 1-6°C.
- Por último habría que devolver los aromas al vino en forma líquida tras su condensación criogénica.

Este método podría resultar mejor que lo realizado en este trabajo, pero tendría puntos críticos que habría que mejorar y controlar de forma exhaustiva.

No obstante, queda por comprobar que la conclusión anteriormente esbozada es cierta, esto es, que el vino filtrado A no ha sufrido cambios organolépticos considerables si se compara con el vino testigo. Esto es materia de un trabajo posterior. En nuestro caso, debido al poco tiempo del que hemos dispuesto y complicaciones derivadas del virus COVID-19, ha sido imposible realizar un análisis organoléptico para determinar la aceptabilidad del vino filtrado A en comparación con el vino testigo. Es evidente que dicho estudio organoléptico, habría permitido validar las conclusiones obtenidas del análisis del proceso. Desafortunadamente, las complicaciones de la pandemia, impiden realizar de momento dicho estudio, que estaba incluido en nuestro planteamiento inicial. Por ello, considero que cualquier estudio que pretenda continuar esta línea de trabajo, debería asegurar la posibilidad de realizar un estudio de análisis sensorial adecuadamente diseñado para comprobar que la influencia del proceso en los parámetros organolépticos sea la mínima posible.

## 8. Agradecimientos

Agradezco todos los apoyos recibidos por parte de las personas que han colaborado para realizar este trabajo. A Silvia Teresa Gallego del laboratorio SMAP de la UVa por ayudar durante todo el ensayo experimental. A Miguel Ángel García Esteban por colaborar en los análisis químicos realizados en la ETSIIAA. Sobre todo, a mi tutor José Ignacio Calvo Díez y a mi cotutora Encarnación Fernández Fernández que siempre me han guiado y ayudado para la elaboración de este trabajo.

## 9. Bibliografía

Aguera, E., Bes, M., Roy, A., Camarasa, C., Sablayrolles, J.-M. *Partial removal of ethanol during fermentation to obtain reduced-alcohol wines*. Am. J. Enol. Viticult. 61 (2010) 53-60.

Asensio de la Riva, J. *Uso de pervaporación en la desalcoholización de vinos blancos* [Internet]. Uvadoc.uva.es. 2018 [cited 11 August 2020]. Available from: <http://uvadoc.uva.es/handle/10324/31725>.

Brányik, T., Silva, D.P., Baszczyn, M. *A review of methods of low alcohol and alcohol-free beer production*. J. Food Eng. 108 (2012) 493-506.

Código Internacional de prácticas enológicas [Internet]. OIV.int. 2020 [cited 11 August 2020]. Available from: <http://www.oiv.int/es/normas-y-documentos-tecnicos/practicas-enologicas/codigo-internacional-de-practicas-enologicas>.

Contreras, A., Hidalgo, C., Henschke, P.A., Chambers, P.J., Curtin, C., Varela, C. *Evaluation of non-Saccharomyces wine yeast in controlled multistarter fermentations with Saccharomyces cerevisiae*. Food Microbiol. 28 (2014) 873-882.

Duchêne, E., Schneider, C. *Grapevine and climatic changes a glance at the situation in Alsace* [Internet]. Hal.archives-ouvertes.fr. 2005 [cited 11 August 2020]. Available from: <https://hal.archives-ouvertes.fr./hal-00886271/>

Ehsani, M., Fernandez, M.R., Biosca, J.A., Julien, A., Dequin, S. *Engineering of 2,3-butanodiol dehydrogenase to reduce acetoin formation by glicerol-overproducing, low-alcohol Saccharomyces cerevisiae*. Appl. Environ. Microbiol. 75 (2009) 3196-3205.

García-Martín, N., Palacio, L., Prádanos, P., Hernández, A., Ortega-Heras, M., Pérez-Magariño, S., et al. *Evaluation of several ultra- and nanofiltration membranes for sugar control in winemaking*. Desalination. 245 (2009) 554-558.

García-Martín, N., Perez-Magariño, S., Ortega-Heras, M., González-Huerta, C., Mihnea, M., González-Sanjosé, M.L., et al. *Sugar reduction in white and red musts with nanofiltration membranes*. Desalin. Water Treat. 27 (2011) 167-174.

Gonzalez, R., Quirós, M., Morales, P. *Yeast respiration of sugars by non-Saccharomyces yeast species: a promising and barely explored approach to lowering alcohol content of wines*. Trends Food Sci. Technol. 29 (2013) 55-61.

Gooden, P. *Persistent wine instability issues*. Aust. N.Z. Grapegrow. Winemak. 443 (2000) 10-14.

Huerta Merino, S De. *Estudio del Sistema de diálisis para la desalcoholización parcial de vinos blancos* [Internet]. Uvadoc.uva.es. 2019 [cited 11 August 2020]. Available from: <http://uvadoc.uva.es/handle/10324/36709>

Jones, G.V., White, M.A., Cooper, O.R., Storchmann, K. *Climate change and global wine quality*. Clim. Change. 73 (2005) 319-343.

Kontoudakis, N., Esteruelas, M., Fort, F., Canals, J.M., De Freitas, V., Zamora, F. *Influence of the heterogeneity of grape phenolic maturity on wine composition and quality*. Food Chem. 124 (2011) 767-774.

Kutyna, D.R., Varela, C., Henschke, P.A., Chambers, P.J., Stanley, G.A. *Microbiological approaches to lowering ethanol concentration in wine*. Trends Food Sci. Technol. 21 (2010) 293-302.

Labanda, J., Vichi, S., Llorens, J., Lo, E. *Membrane separation technology for the reduction of alcoholic degree of a white model wine*. Food Sci. Technol. 42 (2009) 1390-1395.

Liguori, L., Francesco, G De., Russo, P., Perretti, G., Albanese, D., Di, M. *Food and Bioproducts Processing Production and characterization of alcohol-free beer by membrane process*. Food Bioprod. Process. 98 (2015) 196-200.

Liguori, L., Russo, P., Albanese, D., Di Matteo, M. *Evolution of quality parameters during red wines dealcoholization by osmotic distillation*. Food Chem. 140 (2013) 68-75.

Novello, V., De Palma, L. *Viticultural strategy to reduce alcohol levels in wine. 1st Oenoviti Int. Symp. Alcohol Level Reduct. Wine Bordx. Fr* (2013) pp. 3-8.

Pérez-Coello, M.S., González-Viñas, M.A., García-Romero, E., Díaz-Maroto, M.C., Cabezudo, M.D. *Influence of storage temperature on the volatile compounds of young white wines*. Food Control. 14 (2003) 301-306.

Petkovska, M., Leskos, I. *Analysis of mass transfer in beer polysulfone membranes*. Food Bioprod. Process. 75 (1997) 247-252.

Pickering, G.J. *Low-and reduced-alcohol wine: a review*. J. Wine Res. 11 (2000) 129-144.

Pilipovik, M.V., Riverol, C. *Assessing dealcoholization systems based on reverse osmosis*. J. Food Eng. 69 (2005) 437-441.

Röcker, J., Schmitt, M., Pasch, L., Ebert, K., Grossmann, M. *The use of glucose oxidase and catalase for the enzymatic reduction of the potencial etanol content in wine*. Food Chem. 210 (2016) 660-670.

Sainz Escudero, D. *Aplicación de nanofiltración por membrana y pervaporación para la desalcoholización de vinos comerciales y recuperación de aromas* [Internet]. Uvadoc.uva.es. 2017 [cited 11 August 2020]. Available from: <http://uvadoc.uva.es/handle/10324/26527>.

Salgado, C., Fernández-Fernández, E., Palacio, L., Carmona, F., Hernández, A., Prádanos, P. *Application of pervaporation and nanofiltration membrane processes for the elaboration of full flavored low alcohol white wines*. Food Bioprod. Process. 101 (2017) 11-21.

Salgado, C., Fernández-Fernández, E., Palacio, L., Hernández, A., Prádanos, P. *Alcohol reduction in red and white wines by nanofiltration of musts before fermentation*. Food Bioprod. Process. 96 (2015) 285-295.

Salgado, C., Palacio, L., Prádanos, P., Hernández, A., González-Huerta, C., Pérez-Magariño, S. *Comparative study of red grape must nanofiltration: Laboratory and pilot plant scales*. Food Bioprod. Process. 94 (2014) 610-620.

Schmidtke, L.M., Blackman, J.W., Agboola, S.O. *Production technologies for reduced alcoholic wines*. J. Food Sci. 77 (2012) 25-41.

Statgraphics Centurion XVIII. StatPoint Technologies, Inc., Warrenton, USA.

Tilloy, V., Ortiz-Julien, A., Dequin, S. *Reduction of etanol yield and improvement of glicerol formation by adaptative evolution of the wine yeast Saccharomyces cerevisiae under hyperosmotic conditions*. Appl. Environ. Microbiol. 80 (2014) 2623-2632.

Varela, C., Kutyna, D.R., Solomon, M.R., Black, C.A., Borneman, A., Henschke, P.A., et al. *Evaluation of gene modification strategies for the development of low.alcohol wine yeasts*. Appl. Environ. Microbiol. 78 (2012) 6068-6077.

Vatai, G., Takács, L., Korány, K. *Production of alcohol free wine by pervaporation*. J. Food Eng. 78 (2007) 118-125.

Wee, S., Tye, C., Bhatia, S. *Membrane separation process—Pervaporation through zeolite membrane*. Sep. Purif. Technol. 63 (2008) 500-516.