



---

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

**ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR  
DE INGENIERÍAS AGRARIAS**

**Grado en Enología**

**Efecto de la crianza sobre lías tratadas  
con ultrasonidos en la calidad de vinos  
tintos**

**Alumno/a: Isabel Navarro Hernández**

**Tutor/a: Encarna Fernández Fernández**

**Cotutor/a: José Manuel Rodríguez Nogales**

**Julio 2022**

Copia para el tutor/a

# Índice

Resumen.....	3
1. Introducción.....	4
2. Objetivo y plan de trabajo .....	6
3. Materiales y métodos.....	7
3.1. Levadura y vino modelo .....	7
3.3. Tratamiento de las lías de levaduras con ultrasonidos .....	7
3.4. Crianza sobre lías del vino base.....	7
3.5. Análisis fisicoquímico.....	8
3.6. Análisis sensorial.....	9
3.7. Análisis de datos .....	10
4. Resultados y discusión.....	10
5. Conclusiones.....	20
6. Bibliografía.....	20

## Resumen

La elaboración del vino base es fundamental para obtener vinos espumosos tintos de calidad. Para ello hay que partir de una vendimia que se realice de manera anticipada. El problema radica en que si se vendimia antes de su maduración óptima la uva presentará baja concentración de antocianos y alto contenido en taninos verdes, lo que se traducirá en vinos base con poca intensidad de color, desequilibrados, con notas demasiado amargas y astringentes, y la estructura en boca no será la adecuada. Este problema se puede mitigar, entre otras técnicas, realizando una crianza sobre lías del vino base. En este proceso las lías propias de la fermentación se adicionan al vino para que aporten al mismo, compuestos que mejoran la estabilidad colorante, reduciendo la astringencia y aumentando el cuerpo y la untuosidad en boca. El mayor inconveniente de este proceso es que requiere bastante mano de obra y puede conllevar un largo periodo de tiempo para lograr los efectos deseados, por lo que se han planteado otras técnicas alternativas como el uso de ultrasonidos para reducir el tiempo de crianza sobre lías aumentando la concentración de los compuestos de interés. El objetivo de este trabajo es estudiar el efecto de la crianza sobre lías tratadas con ultrasonidos sobre los parámetros químicos y sensoriales de un vino base tinto destinado a la elaboración de un vino espumoso. Para ello, a partir de un vino base elaborado con uvas de la variedad Tempranillo que ha permanecido en contacto con lías tratadas con ultrasonidos durante 4 meses se realizará en cada uno de los lotes (2 controles + 3 tratamientos con ultrasonidos a distintas frecuencias), un análisis químico y sensorial con un panel de catadores entrenado. Todos los análisis se realizarán por duplicado. Finalmente, se realizará un tratamiento de los datos utilizando diferentes técnicas estadísticas. Los resultados obtenidos muestran desde el punto de vista tanto fisicoquímico como sensorial apenas diferencias entre las muestras. Sin embargo, se han aumentado ciertos atributos sensoriales. Por lo que se deben realizar más estudios.

## Abstract

The preparation of the base wine is essential to obtaining high-quality red sparkling wines. To do so, it is necessary to start from a harvest that is made in advance. The problem is that if it is harvested before its optimal ripening, the grapes will present a low concentration of anthocyanins and high content of green tannins. As a result, we will obtain base wines with little intensity of colour, unbalanced, with bitter and astringent notes, and the structure in the mouth will not be adequate. This problem can be mitigated, among other techniques, by making aging on the lees of the base wine. In this process, the lees of fermentation are added to the wine to provide the wine compounds that improve colouring stability, by reducing astringency and increasing body and smoothness in the mouth. The major drawback of this process is that it requires a lot of manpower and it can take a long time to achieve the desired effects, so other alternative techniques have been proposed such as the use of ultrasound to reduce the aging time on lees by increasing the concentration of the compounds of interest. This work aims to study the effect of aging on lees treated with ultrasound on the chemical and sensory parameters of a red base wine intended to produce sparkling wine. To do this, a base wine made with grapes of the Tempranillo variety that has remained in contact with lees treated with ultrasound for 4 months will be conducted in each of the lots (2 controls + 3 treatments with ultrasound at different frequencies), and a chemical and sensory analysis with a trained panel of tasters. All analyses will be undertaken in duplicate. Finally, the data will be processed using different statistical techniques. The results obtained show

few differences between the samples from a chemical or sensory point of view. However, certain sensory attributes have been increased. So, more studies need to be done.

## 1. Introducción

La elaboración de los vinos tintos espumosos es una vinificación complicada desde el punto de vista de la vendimia, ya que esta tiene que adelantarse para obtener un bajo grado alcohólico, una alta acidez y unas características sensoriales correctas. Si se adelanta la vendimia de la uva tinta nos podemos encontrar con una uva con un bajo contenido de antocianidinas y alto contenido de taninos verdes, lo que conducirá a elaborar un vino con una baja intensidad de color, desequilibrado, sin una buena estructura en boca y con un aporte de notas amargas (Peña & Delgado, 2001).

La elaboración de los vinos espumosos por el método tradicional o *champenoise* se realiza en dos partes. En la primera fermentación se consigue un vino tranquilo que denominamos vino base, y en la segunda fermentación se produce el gas carbónico, que debe realizarse en condiciones específicas. El vino base se elabora según los criterios de un vino tranquilo, con la peculiaridad de poseer un bajo grado alcohólico y una alta acidez. La segunda fermentación se lleva a cabo por la adición del licor de tiraje con levaduras de segunda fermentación, que debe contener una concentración de azúcares suficiente para conseguir 6 atm de presión dentro de la botella. Cuando esta fermentación termina tiene lugar una crianza sobre lías más o menos prolongada produciéndose una autólisis de las levaduras debido a las enzimas propias de la levadura. Una vez que se concluye el proceso de crianza sobre lías, se procede al removido y degüelle para la eliminación de las lías y se añade el licor de expedición cuya cantidad y composición dependerá de las características finales deseadas (Hidalgo, 2019a, 2019b).

Para mitigar los problemas que puede conllevar una vendimia anticipada se pueden aplicar diferentes técnicas en la elaboración del vino base, agrupadas en cuatro grupos: técnicas vitícolas, técnicas prefermentativas, técnicas biotecnológicas y técnicas post-fermentativas. Las técnicas vitícolas se basan en la gestión óptima del viñedo, por ejemplo, haciendo una buena poda en invierno y recortando los brotes después de enero se puede disminuir el contenido de alcohol y aumentar la acidez. Respecto a las técnicas prefermentativas se puede aplicar la nanofiltración o la dilución por adición de agua, aunque esta última está prohibida en algunos países, con estas prácticas conseguiremos eliminar el exceso de azúcar o reducir los grados Brix. En relación con las técnicas biotecnológicas se pueden usar organismos modificados genéticamente, aunque no está permitido en todos los países, con los que se puede conseguir desviar el flujo metabólico de la vía de síntesis de etanol a la producción de otros metabolitos como el glicerol o ácido acético, o levaduras no-*Saccharomyces* cuya inoculación produce modificaciones del contenido de alcohol, en el perfil aromático, en la acidez volátil, en la acidez total y en el contenido de glicerol. Finalmente, las técnicas post-fermentativas emplean sistemas de membrana, como la nanofiltración y la ósmosis inversa con las que conseguimos la eliminación de parte del etanol (Teslić et al., 2018), o un proceso de crianza sobre lías (del Fresno et al., 2018).

La crianza sobre lías está ampliamente instalada en la elaboración de vinos tintos (del Fresno et al., 2019a); es una técnica interesante en la elaboración de estos vinos ya que suaviza la fracción fenólica, disminuye la astringencia y lleva a cabo un efecto protector del color y de los aromas varietales (Palomero et al., 2007). Durante la crianza sobre lías se produce la autólisis de las levaduras; en este proceso de degradación se ocasiona un enriquecimiento de los compuestos volátiles aromáticos, un incremento de la densidad del vino por la liberación de polisacáridos de alto peso molecular, principalmente manoproteínas y glucanos, que proceden de las paredes celulares lisadas, una interacción de las manoproteínas liberadas con los compuestos fenólicos mejorando la estabilización del color, disminuyendo la astringencia, una estimulación de la fermentación maloláctica aumentando el crecimiento bacteriano y un aporte de notas aromáticas más complejas y persistentes. Además, se produce un consumo de oxígeno por parte de estas lías que puede ser una solución para la disminución de la cantidad de sulfuroso que se añade al vino (del Fresno et al., 2018).

El problema de la crianza sobre lías es el tiempo que se emplea en este proceso ya que es de al menos 3 meses. Para disminuir el tiempo de crianza sobre lías se pueden aplicar diferentes técnicas como puede ser ultrasonidos (US), microondas, campos eléctricos pulsados, adición de enzimas hidrolíticas exógenas como  $\beta$ -glucanasas y acidificación. Se ha descrito que las microondas alteran las estructuras celulares de las levaduras llegando incluso a romper las paredes celulares, además se puede combinar con tratamientos complementarios como calentamiento, agitación y abrasión para irrumpir aún más en las estructuras de las levaduras (Liu et al., 2016). Con respecto a los campos eléctricos pulsados, se ha observado que inducen la electroporación de las membranas mejorando la difusión de solutos y la inactivación microbiana (García Martín & Sun, 2013). Referente a la adición de enzimas hidrolíticas, entre ellas las  $\beta$ -glucanasas, facilita la liberación de compuestos intracelulares interesantes para el vino (Cacciola et al., 2013). Por último, en relación a la acidificación, se ha estudiado su uso tanto en solitario como con la adición de enzimas  $\beta$ -glucanasas y pectinasas observándose una mayor liberación de manoproteínas y polisacáridos (Fernández et al., 2011).

Los US son ondas de presión cuya frecuencia es superior a la capacidad de la audición humana, es decir, más de 20 kHz. Las ondas se propagan a través de la mayoría de los materiales y las superficies, cuya velocidad depende de la naturaleza de la onda y del material por el que se está propagando. Sus efectos se cree que se debe a pequeñas cavidades, de unas 100 micras, que implosionan, creando abundante calor (5000 K) y presión (1000 atm), ondas de choque y aceleración de partículas. A este proceso se le conoce como cavitación y sus consecuencias son fundamentalmente mecánicas en frecuencias de hasta 20 kHz y químicas a frecuencias más elevadas. La aplicación de US en la industria alimentaria puede dividirse en dos rangos de frecuencia: US de alta frecuencia (100 kHz-1 MHz) y US de potencia (16-100 kHz). La primera se utiliza como técnica analítica y la segunda para alterar las propiedades de los alimentos tanto física como químicamente. En enología su aplicación se ha dirigido sobre todo a la desinfección de barricas o la extracción de proteínas de células de levadura (Cacciola et al., 2013).

Se ha demostrado que la aplicación de US tiene efectos significativos en la obtención de una rápida extracción de macromoléculas de las lías, útil en la evolución

aromática y de coloides del vino, teniendo un efecto más significativo comparando con el envejecimiento tradicional de las lías (Cacciola et al., 2013).

También, la aplicación de US puede ser una vía para reducir los costes asociados a la crianza sobre lías por la reducción de tiempo de dicha crianza (García et al., 2013), además de poder reducir la dosis de sulfuroso al disminuir el riesgo de contaminación microbiológica (del Fresno et al., 2018). Además, puede haber un aumento de la capacidad antioxidante de las lías tratadas con ultrasonidos, debido al bajo contenido de oxígeno disuelto. También, se ha descrito una mejora en el proceso de clarificación (del Fresno et al., 2019a).

Sin embargo, habría que mejorar la técnica para minimizar la pérdida de parámetros enológicos importantes si se aplica los US directamente al vino con lías (del Fresno et al., 2019a). El tratamiento con US puede conllevar pérdidas de antocianidinas y compuestos volátiles, pero sobrelleva un aumento en la liberación de polisacáridos. Sin embargo, algunos autores, en cuanto a las características sensoriales, no han detectado ninguna diferencia respecto al control, a excepción de la intensidad aromática, esto podría ser porque los cambios que producen tienen naturaleza transitoria, es decir, que sean reversibles en el tiempo (Liu et al., 2016). Se ha descrito que los vinos que han sufrido un envejecimiento natural son semejantes a los vinos tratados con US porque se produce una serie de cambios químicos y estructurales en la composición de estos (Kulkarni et al., 2015).

Se ha observado también que los US combinados con  $\beta$ -glucanasas y enzimas pectolíticas aumentan la liberación de los polisacáridos de bajo peso molecular, que son componentes con importancia enológica (del Fresno et al., 2018).

Además, esta técnica de US también se ha aplicado como pretratamiento para aumentar el rendimiento de extracción de las antocianidinas adsorbidas a las lías procedentes de la fermentación de un vino tinto (Romero-Díez et al., 2019, Osete-Alcaraz et al., 2022). Asimismo, en busca de nuevas técnicas alternativas más respetuosas con el medio ambiente se han aplicado en conjunto los US con la técnica NADES (*Natural Deep Eutectic Solvents*) para optimizar la extracción de las antocianidinas en estas lías (Bosiljkov et al., 2017).

Sin embargo, existe poca información referente a la aplicación de US sobre levaduras para provocar la lisis de estas y que posteriormente se van a introducir en vino tinto para realizar una crianza sobre lías (Fresno et al., 2019a). Sin embargo, sí que hay más información relacionada con la aplicación de ultrasonidos en mezclas hidroalcohólicas con lías (García et al. 2013; García & Sun 2013).

## 2. Objetivo y plan de trabajo

El objetivo de este Trabajo Fin de Grado (TFG) es estudiar el efecto de la crianza sobre lías tratadas con ultrasonidos sobre los parámetros químicos y sensoriales de un vino base tinto destinado a la elaboración de un vino espumoso.

Por lo que se ha seguido el siguiente plan de trabajo:

- Aplicación de los US a levaduras comerciales de *Saccharomyces cerevisiae* para provocar la lisis con diferentes amplitudes (30, 60 y 90 %) durante 10 minutos.
- Crianza sobre lías del vino base tinto con las lías tratadas con US, lías de *Saccharomyces cerevisiae* sin tratar con US y un vino sin lías durante 4 meses.
- Entrenamiento de un panel de catadores, paralelamente a la crianza.
- Caracterización fisicoquímica y sensorial de los distintos vinos, y obtención de resultados.

### 3. Materiales y métodos

#### 3.1. Levadura y vino modelo

La levadura utilizada fue una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* comercializada como levadura seca activa, LALVIN EC1118 (Lallemand S.A., Canadá).

La composición del vino modelo fue la siguiente: etanol (10 % v/v), ácido málico (3 g/L), ácido acético (0,1 g/L), ácido tartárico (4 g/L), sulfato potásico (0,1 g/L) y sulfato magnésico (0,025 g/L). El pH se ajustó a 3 con hidróxido de sodio 1 M (Pueyo et al., 2020).

#### 3.2. Lisis de levaduras sin tratamiento de US

La lisis de las levaduras se realizó de acuerdo con Pueyo et al. (2020) en el vino modelo a una dosis de levaduras de 0,8 g/L a 30 °C durante 64 horas con agitación en un centrifugador orbital a 100 rpm. Transcurridas las 64 horas, se centrifugaron las muestras, se retiró el sobrenadante y se obtuvieron las lías.

#### 3.3. Tratamiento de levaduras con US

La sonicación se realizó por medio de un procesador ultrasónico UP400S (400W y 24kHz) (Hielscher Ultrasonics, Teltow, Alemania) que cuenta con un sonotrodo S24d22D de titanio (22 mm de diámetro y sumergido a 30 mm) aplicando un 80 % de pulso.

Un volumen de 330 mL de vino modelo con 0,8 g/L de levaduras fue tratado por US a 25 °C (Ferraretto et al., 2013). Se utilizaron tres niveles de amplitud diferentes: 30 %, 60 % y 90 % con un tiempo de procesamiento de 10 minutos.

#### 3.4. Crianza sobre lías del vino base

Se utilizó un vino base tinto de la variedad Tempranillo de la vendimia del 2021, cuya analítica básica fue la siguiente: etanol (11,4% v/v), acidez volátil (0,16 g/L), acidez total (7,36 g/L), sulfuroso total (25,7 mg/L) y (sulfuroso libre (0,13 mg/L). El vino fue sulfitado antes de la crianza sobre lías (30 g/L se sulfuroso libre), a continuación fue dividido en cinco depósitos de acero inoxidable de 20 L, por duplicado, en donde permaneció en contacto con las lías tratadas con los tres tratamientos de ultrasonidos descritos anteriormente, lías de *Saccharomyces cerevisiae* y un control sin lías durante 4 meses (Tabla 1). Durante ese periodo los distintos depósitos se agitaron de forma manual una vez a la semana durante 1 min.

Tabla 1: Vinos experimentales y códigos

Muestra experimental		Código
Control sin lías		C
Control con lías sin tratamiento de US		SC
Tratamiento de US de amplitud	30 % durante 10 min	30 %
	60 % durante 10 min	60 %
	90 % durante 10 min	90 %

### 3.5. Análisis fisicoquímico

Se realizaron una serie de análisis fisicoquímicos a los distintos vinos base por duplicado, a excepción de las determinaciones de taninos totales, antocianos totales, nitrógeno fácilmente asimilable, proteínas solubles y polisacáridos neutros que se realizaron por triplicado. A continuación, se indican los análisis realizados:

- pH: se mide la diferencia de potencial entre dos electrodos sumergidos en el líquido sometido a ensayo (International Organization of Vine and Wine, 2011).
- Grado alcohólico: se empleó el método por ebullición que se basa en la diferencia de los puntos de ebullición del agua y el etanol tomando como referencia el agua en condiciones ambientales (García, 1990).
- Acidez volátil: determina los ácidos grasos como acético que están presentes en una muestra (García, 1990).
- Acidez total: es la suma de sus acideces titulables cuando se valora a pH 7 frente a una solución alcalina estándar (International Organization of Vine and Wine, 2015)
- Índice de polifenoles totales: se fundamenta en la absorción en el ultravioleta de los anillos bencénicos característicos de los compuestos fenólicos con un máximo próximo a 275-280 nm (García, 1990) .
- Ácidos hidroxicinámicos: mediante espectrofotometría se mide la absorción que tiene la muestra a 320 nm (Betés-Saura et al., 1996).
- Flavonoles: mediante espectrofotometría se mide la absorción que presenta la muestra a 365 nm (Betés-Saura et al., 1996).
- Taninos totales: en un medio ácido y altas temperaturas donde se liberan antocianidinas, por rotura de los enlaces intermonoméricos, las cuales se miden en el espectrofotómetro a 550 nm (Bate-smith, 1981).

- Antocianos totales: basado en la decoloración con bisulfito de sodio, esta decoloración es proporcional a la concentración de antocianos libres (Ribéreau-Gayon & Stonestreet, 1965).
- Nitrógeno fácilmente asimilable: el nitrógeno amino libre y el nitrógeno amónico se hacen reaccionar con formaldehído y posteriormente se valora con NaOH (Shively & Henick-Kling, 2001).
- Proteínas solubles: se basa en la capacidad de unión del colorante azul brillante Coomassie con las proteínas. Cuando se produce la unión la absorbancia máxima cambia de 465 nm a 595 nm, lo que conlleva un cambio de color de naranja a azul (Murphey et al., 1989).
- Polisacáridos neutros: a la muestra se le añade ácido sulfúrico, en su presencia los polisacáridos se degradan y forman complejos coloreados con fenol que se miden en el espectrofotómetro a 485 nm (Lindner & Shomer, 1984).
- Características cromáticas según Glories: en vinos tintos las características cromáticas se deducen de su espectro de absorción cuyo mínimo es 420 nm y máximo a 520 nm, permitiendo definir su intensidad colorante y su tonalidad (García, 1990).

### 3.6. Análisis sensorial

Se entrenó un panel de catadores según la Norma UNE-EN ISO 3972:2013. El entrenamiento contó con tres partes diferenciadas:

- Entrenamiento básico con disoluciones con agua de: sacarosa, cloruro sódico, cafeína, ácido cítrico y ácido tánico en diferentes concentraciones y aleatorizadas, además de agua sin adulterar para identificar los sabores principales, a excepción del ácido tánico que se utilizaba para identificar la astringencia.
- Entrenamiento específico con disoluciones con vino: el vino se adulteraba con cafeína, ácido cítrico y ácido tánico para reconocer las sensaciones en boca de cada componente.
- Entrenamiento en la ficha de cata con vinos comerciales: el panel de catadores realizó en primer lugar catas comentadas de vinos comerciales utilizando una ficha de cata de 12 descriptores que evaluaban en una escala no estructurada de 10 cm. Posteriormente, se evaluó la eficacia del panel de catadores: capacidad discriminativa, reproducibilidad individual y concordancia del grupo.

Finalmente, los 10 catadores entrenados y eficaces evaluaron los vinos experimentales por duplicado, puntuando cada uno de los descriptores de la ficha de cata en una escala no estructurada de 10 cm, es decir, mediante análisis sensorial descriptivo cuantitativo (Stone & Sidel, 2004). Los 12 descriptores de la ficha de cata estaban divididos en tres fases: fase visual (tonalidad e intensidad de la capa), fase olfativa (intensidad del olor, afrutado, vegetal o herbáceo y láctico) y fase gustativa (alcohólico, amargo, astringente, volumen en boca, intensidad y persistencia).

Durante las sesiones se utilizaron copas normalizadas según la Norma UNE 87022:1992 en las que se servían 15 mL a una temperatura de  $16\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Las muestras se presentaron de forma aleatoria a cada catador con códigos de tres dígitos, utilizando un diseño de bloques completo, es decir, todos los catadores han probado todas las muestras.

### 3.7. Análisis de datos

Se ha utilizado el método estadístico de Análisis de Componentes Principales (ACP) utilizando el programa Statgraphics Centurion 19. Para realizar este análisis se ha realizado una combinación lineal de los parámetros fisicoquímicos (parámetros de color, IPT, ácidos hidroxicinámicos, flavonoles, acidez total, pH, acidez volátil, grado alcohólico, antocianos, polisacáridos neutros, proteínas solubles, nitrógeno fácilmente asimilable y taninos) y parámetros sensoriales (tonalidad, intensidad de capa, intensidad de olor, afrutado, vegetal o herbáceo, láctico, alcohólico, amargo, astringente, volumen en boca, intensidad y persistencia) para obtener los componentes principales (CP).

Asimismo, se han realizado tablas de los valores promedios con las desviaciones estándares de cada uno de los parámetros para cada muestra de vino.

## 4. Resultados y discusión

En las Tablas 2 y 3 se presentan los valores medios y la desviación estándar de los parámetros fisicoquímicos y sensoriales, respectivamente, analizados en cada uno de los vinos experimentales una vez finalizados los 4 meses de crianza sobre lías.

Con el ACP hemos conseguido caracterizar cada uno de los vinos que se han elaborado en relación con las características fisicoquímicas y sensoriales que más representa a cada uno, véase Figura 1.

En el ACP se extrajeron 4 CP. El CP1 y CP2 explicaron el 41,8 % y el 29,5 % de la variación en el conjunto de datos, respectivamente, que representa una varianza acumulada del 71,3 %. Asimismo, el CP3 explicó un 15,7 % adicional. El restante 12,9 % lo explica el CP4.

El CP1 presenta altos pesos positivos para los parámetros intensidad colorante, antocianos, astringencia, índice de polifenoles totales, taninos, % rojo e intensidad en boca, y altos pesos negativos para los parámetros tonalidad, % amarillo, vegetal, flavonoles y ácidos hidroxicinámicos (Tabla 4). El CP2 se caracteriza por altos pesos positivos para grado alcohólico, intensidad de capa y de olor, alcohólico, amargo, volumen en boca y persistencia y altos pesos negativos para acidez total, acidez volátil y nitrógeno fácilmente asimilable (Tabla 4).

Tabla 2. Composición fisicoquímica de los vinos bases tintos experimentales.

Parámetros		Control sin lías	Control con lías SC	Tratamiento de US 30% durante 10 min	Tratamiento de US 60% durante 10 min	Tratamiento de US 90% durante 10 min
		C	SC	30%	60%	90%
% Amarillo	%Am	30,06 ± 0,33	30,05 ± 0,35	30,04 ± 0,21	30,29 ± 0,08	30,05 ± 0,34
% Rojo	%R	54,31 ± 0,65	54,42 ± 0,60	54,60 ± 0,84	53,92 ± 0,20	54,77 ± 1,22
% Azul	%Az	15,63 ± 0,32	15,53 ± 0,26	15,36 ± 0,63	15,79 ± 0,12	15,18 ± 0,88
Intensidad colorante	IC	0,55 ± 1,43	0,55 ± 1,39	0,55 ± 2,58	0,56 ± 0,17	0,55 ± 2,78
Tonalidad	TON	12,30 ± 0,01	12,64 ± 0,01	12,33 ± 0,01	10,96 ± 0,00	12,60 ± 0,02
Índice de polifenoles totales (280 nm)	IPT	7 ± 0	7 ± 1	7 ± 1	6 ± 0	7 ± 1
Ácidos hidroxicinámicos (280 nm)	AHC	20,55 ± 1,41	21,5 ± 1,9	20,8 ± 1,1	22,1 ± 2,6	21,1 ± 2,2
Flavonoles (280 nm)	Flav	6,88 ± 0,53	7,13 ± 0,74	6,93 ± 0,53	7,40 ± 1,20	7,05 ± 1,06

Tabla 2 (continuación). Composición fisicoquímica de los vinos bases tintos experimentales.

Parámetros		Control sin lías	Control con lías SC	Tratamiento de US 30% durante 10 min	Tratamiento de US 60% durante 10 min	Tratamiento de US 90% durante 10 min
		C	SC	30%	60%	90%
Acidez total (g/L)	AT	5,3 ± 0,0	5,3 ± 0,1	5,3 ± 0,2	5,3 ± 0,1	5,5 ± 0,1
pH	pH	3,39 ± 0,04	3,50 ± 0,08	3,37 ± 0,26	3,35 ± 0,37	3,37 ± 0,03
Grado alcohólico (% v/v)	GA	11,4 ± 0,3	11,4 ± 0,0	11,5 ± 0,0	11,4 ± 0,0	11,4 ± 0,2
Acidez volátil (g/L)	AV	0,44 ± 0,06	0,42 ± 0,04	0,43 ± 0,05	0,47 ± 0,05	0,50 ± 0,03
Antocianos (mg/L)	ANT	190 ± 44	195 ± 52	176 ± 69	138 ± 19	197 ± 61
Polisacáridos neutros (g/L)	PN	2,64 ± 0,33	2,11 ± 0,51	2,18 ± 0,39	2,03 ± 0,06	2,46 ± 0,43
Proteínas solubles (g/L)	PS	0,40 ± 0,04	0,39 ± 0,02	0,35 ± 0,02	0,35 ± 0,02	0,38 ± 0,02
Nitrógeno fácilmente asimilable (mg/L)	NFA	92 ± 5	96 ± 4	93 ± 4	96 ± 10	100 ± 7
Taninos (g/L)	TAN	2,00 ± 0,26	2,23 ± 0,56	2,29 ± 0,58	1,70 ± 0,15	1,89 ± 0,27

Tabla 3 Análisis sensorial de vinos bases tintos experimentales.

Descriptores		Control sin lías	Control con lías SC	Tratamiento de US 30% durante 10 min	Tratamiento de US 60% durante 10 min	Tratamiento de US 90% durante 10 min
		C	SC	30%	60%	90%
Tonalidad	Tona	6,8 ± 2,1	6,3 ± 2,3	6,4 ± 2,5	6,1 ± 2,7	6,2 ± 2,3
Intensidad de capa	Icapa	6,5 ± 1,8	6,9 ± 1,5	6,9 ± 1,4	6,4 ± 1,8	5,8 ± 1,8
Intensidad del olor	Iolor	4,5 ± 2,0	4,8 ± 1,6	5,0 ± 1,3	5,1 ± 1,6	4,1 ± 1,6
Afrutado	Afru	3,6 ± 1,5	3,4 ± 1,3	4,0 ± 1,3	3,9 ± 1,6	3,9 ± 1,3
Vegetal (Herbáceo)	Vege	3,8 ± 1,7	3,3 ± 1,4	3,5 ± 1,6	4,1 ± 1,8	3,6 ± 1,7
Láctico	Lact	3,8 ± 1,8	3,4 ± 1,5	3,2 ± 1,4	3,8 ± 1,7	3,2 ± 1,2
Alcohólico	Alco	3,7 ± 1,3	3,7 ± 1,1	4,1 ± 1,6	3,9 ± 1,6	3,3 ± 1,4
Amargo	Amar	3,0 ± 1,5	3,5 ± 2,0	3,1 ± 1,4	3,0 ± 1,2	2,7 ± 1,2
Astringente	Astr	2,9 ± 1,4	3,3 ± 1,5	2,7 ± 1,8	2,4 ± 1,3	3,0 ± 1,4
Volumen en boca	Vol	3,6 ± 1,1	3,8 ± 0,9	3,6 ± 1,1	3,2 ± 1,1	3,2 ± 0,7
Intensidad	Iboca	4,0 ± 1,1	3,9 ± 1,2	3,9 ± 1,4	3,4 ± 1,1	3,5 ± 1,0
Persistencia	Pers	3,5 ± 1,1	3,9 ± 1,1	4,1 ± 1,6	3,6 ± 1,2	3,7 ± 1,5

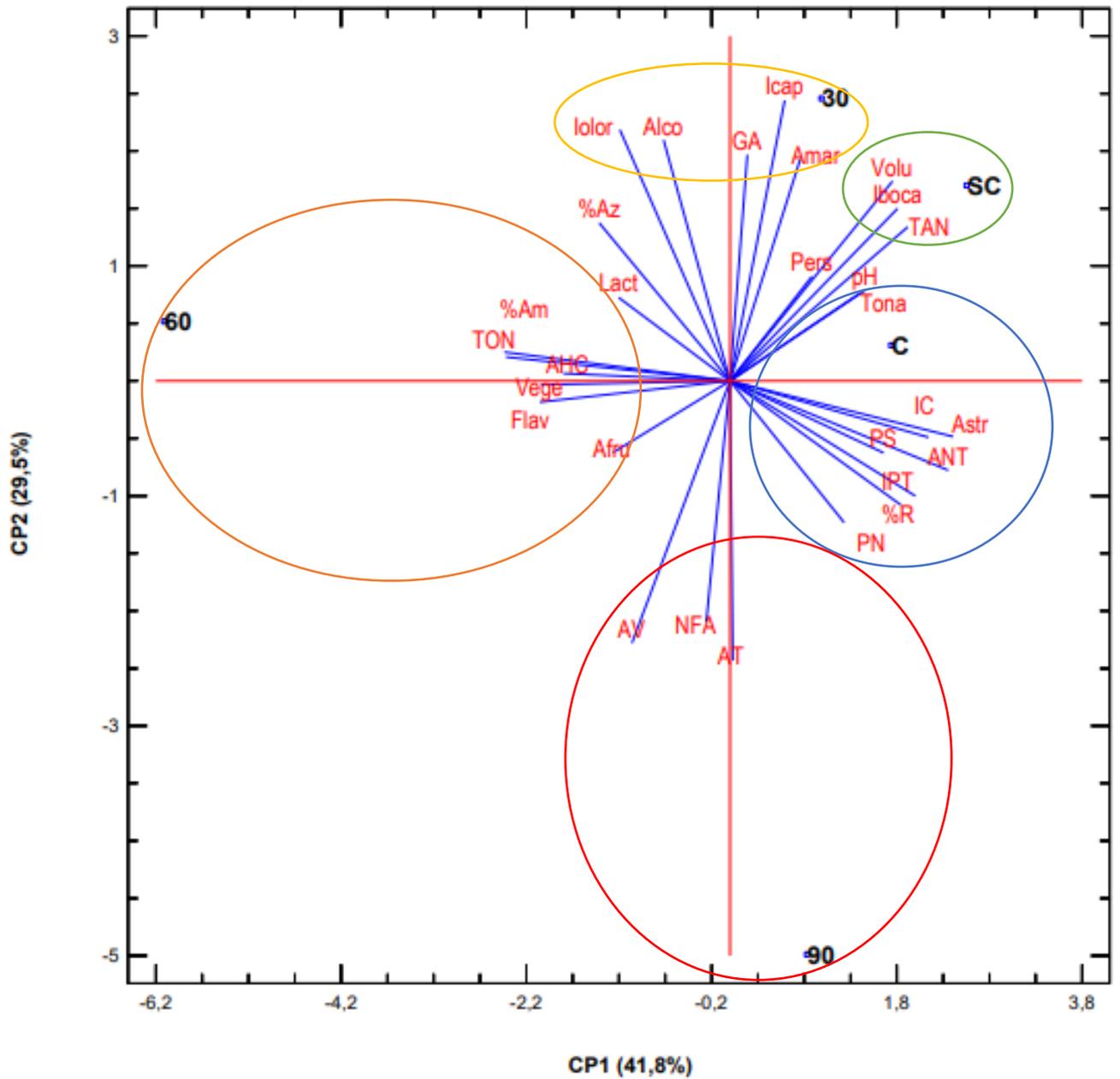


Figura 1. Representación de las muestras y los parámetros fisicoquímicos y sensoriales en función de los CP1 y CP2. En las tablas 2 y 3 se encuentra el significado de las abreviaturas utilizadas en este gráfico.

En primer lugar, en la Figura 1 se puede observar que la muestra control (C) se caracteriza por los parámetros sensoriales tonalidad (Tona), y astringencia (Astr). Desde el punto de vista fisicoquímico por intensidad de color (IC), antocianos (ANT), proteínas solubles (PS), IPT, % rojo (%R) y polisacáridos neutros (PN).

La muestra SC, es decir, la muestra que tiene lías de *Saccharomyces cerevisiae*, se caracteriza por los descriptores sensoriales volumen (Volu) e intensidad en boca (Iboca), y el parámetro fisicoquímico taninos (TAN).

En relación con las muestras tratadas con ultrasonidos, la muestra 30 % se caracteriza por los atributos sensoriales intensidad de capa (Icapa) y amargo (Amar), seguido del parámetro fisicoquímico grado alcohólico (GA), y nuevamente por los descriptores sensoriales alcohólico (Alco) e intensidad de olor (Iolor).

La muestra tratada con el 60 % de ultrasonidos se caracteriza desde el punto de vista fisicoquímico por tonalidad (TON), % amarillo (%Am), a continuación, por los atributos sensoriales vegetal (Vege), y de nuevo por los parámetros fisicoquímicos contenido en flavonoles (Flav) y en ácidos hidroxicinámicos (AHC). Por último, por el descriptor sensorial afrutado (Afru).

En cuanto a la muestra tratada al 90 % de amplitud se caracteriza únicamente por los parámetros fisicoquímicos acidez total (AT), nitrógeno fácilmente asimilable (NFA) y acidez volátil (AV).

Como vemos en la Figura 1, los vinos C, SC y 30 % son más similares entre sí, encontrándose en la parte positiva de los CP1 y CP2. Al contrario que los vinos 60 % y 90 % que se encuentran totalmente opuestos en el gráfico.

Según del Fresno et al. (2018) durante la autólisis de las levaduras en un vino con crianza sobre lías, los compuestos que en mayor proporción se liberan son los polisacáridos y, en concreto, las manoproteínas, componentes principales de los polisacáridos de las paredes celulares de las levaduras. En este estudio se aplicó un tratamiento intenso de US al vino tinto que contenía lías, observándose una concentración superior de polisacáridos en este vino que en el vino control, si bien, el tratamiento directo de los US en el vino afectó negativamente al contenido en antocianos y a su composición volátil. En cambio, nuestros resultados señalan que el vino con mayor contenido en polisacáridos neutros fue el control (2,64 g/L) (Tabla 2 y Figura 1). Estas diferencias en los resultados pueden deberse principalmente al modo de aplicación de los US, ya que en el estudio del Fresno et al. (2018) se aplican directamente al vino con lías, sin embargo, en nuestro trabajo se han aplicado a las levaduras para provocar la lisis de las mismas y posteriormente se han añadido al vino tinto. Además, también puede deberse al tiempo de aplicación de los US, ya que en los trabajos de estos autores se aplicaron durante 5 semanas 5 minutos por hora, dos veces por semana, y después, 15 minutos dos veces por semana hasta acumular 170 minutos de tratamiento. Sin embargo, en nuestro estudio se aplicaron 10 minutos de tratamiento para lisar las levaduras (véase apartado 3.2).

Tabla 4. Pesos de los componentes del ACP (I).

		<b>CP1</b>	<b>CP2</b>
<b>%Amarillo</b>	<b>%Am</b>	-0,279297	0,028019
<b>%Rojo</b>	<b>%R</b>	0,212833	-0,144914
<b>%Azul</b>	<b>%Az</b>	-0,163037	0,184731
<b>Intensidad colorante</b>	<b>IC</b>	0,277995	-0,0651283
<b>Tonalidad</b>	<b>TON</b>	-0,281345	0,0339303
<b>Índice de Polifenoles Totales</b>	<b>IPT</b>	0,230619	-0,134374
<b>Ácidos Hidroxicinámicos</b>	<b>AHC</b>	-0,207885	0,00878541
<b>Flavonoles</b>	<b>Flav</b>	-0,235778	-0,00429103

Tabla 4 (cont). Pesos de los componentes del ACP (II).

		<b>CP1</b>	<b>CP2</b>
<b>Acidez total</b>	<b>AT</b>	0,0033271	-0,326604
<b>pH</b>	<b>pH</b>	0,168263	0,106085
<b>Grado alcohólico</b>	<b>GA</b>	0,0215163	0,264446
<b>Acidez volátil</b>	<b>AV</b>	-0,1224	-0,306128
<b>Antocianos</b>	<b>ANT</b>	0,271901	-0,104215
<b>Polisacáridos neutros</b>	<b>PN</b>	0,142087	-0,165383
<b>Proteínas solubles</b>	<b>PS</b>	0,19142	-0,083936
<b>Nitrógeno Fácilmente Asimilable</b>	<b>NFA</b>	-0,0298121	-0,281238
<b>Taninos</b>	<b>TAN</b>	0,221398	0,180023

Tabla 4 (cont). Pesos de los componentes del ACP (III).

		<b>COMPONENTE</b>	
		<b>CP1</b>	<b>CP2</b>
<b>Tonalidad</b>	<b>Tona</b>	0,162832	0,103305
<b>Intensidad de capa</b>	<b>Icapa</b>	0,0678115	0,327922
<b>Intensidad de olor</b>	<b>Iolor</b>	-0,13753	0,293531
<b>Afrutado</b>	<b>Afru</b>	-0,145443	-0,0834595
<b>Vegetal</b>	<b>Vege</b>	-0,237092	-0,0245933
<b>Láctico</b>	<b>Lact</b>	-0,138857	0,0974047
<b>Alcohólico</b>	<b>Alco</b>	-0,0826776	0,281704
<b>Amargo</b>	<b>Amar</b>	0,087351	0,258777
<b>Astringente</b>	<b>Astr</b>	0,247323	-0,0658736
<b>Volumen en boca</b>	<b>Vol</b>	0,202507	0,233516
<b>Intensidad</b>	<b>Iboca</b>	0,208639	0,201605
<b>Persistencia</b>	<b>Pers</b>	0,101994	0,122287

En el trabajo del Fresno et al. (2019b) al comienzo del proceso de la crianza sobre lías, no se observaron diferencias significativas para la concentración de polisacáridos entre las muestras de una solución hidroalcohólica con y sin lías tratadas con ultrasonidos durante 20 min, si bien, después de 30 días las muestras con lías sonicadas presentaron mayor concentración de polisacáridos. En este estudio la duración del tratamiento de US fue más elevada que el nuestro (20 minutos) y, además, no se indicaba la concentración de levaduras empleadas, que probablemente fue muy superior a la utilizada en nuestro estudio (0,8 g/L); únicamente señalan que emplearon levaduras *S. cerevisiae* hidratadas, siendo lo habitual una hidratación al 1:10 (levaduras:líquido de hidratación).

Al igual que los anteriores autores, los trabajos realizados por García et al. (2013) y García & Sun (2013) empleando vinos modelo, y los de Kulkarnit et al. (2015) y Liu et al. (2016) con una aplicación directa de los US al vino con lías, indicaron que se producía una liberación de polisacáridos después del tratamiento de US.

Según García et al. (2013) después de 48 h de tratamiento de US en un vino modelo con lías, se consiguió un incremento de 34,4 mg/L de proteínas respecto al control. Sin embargo, los resultados no son totalmente comparables con los nuestros, ya que la concentración de levadura fue muy alta (5 g/L), al igual que la intensidad del tratamiento aplicado directamente al vino. En cuanto a Cacciola et al. (2013), en estudios realizados en una solución hidroalcohólica con un 50 % de lías, las muestras que mayor contenido de proteínas presentaban eran las tratadas con US al 90 % de amplitud durante 3 minutos.

Se ha descrito una degradación de los antocianos debido al tratamiento de los US directamente en el vino con lías, debido a la cavitación por la formación, crecimiento y colapso de pequeñas burbujas (Kulkarnit et al. (2015)). En nuestro estudio se observa que los vinos tratados con un 30 % y 60 % de amplitud obtuvieron un menor contenido en antocianos (176 y 138 mg/L, respectivamente) en comparación de 190 mg/L que presenta el control (Tabla 2), si bien este comportamiento no puede explicarse por un efecto de cavitación ya que en nuestro estudio los US se aplicaron a las levaduras para lisarlas que se añadieron posteriormente al vino. Asimismo, del Fresno et al., (2019a) sostienen que el tratamiento de US disminuye la adsorción de los pigmentos al modificarse la pared celular de la levaduras.

Respecto a los taninos hay pocos estudios que se ocupen del efecto de los ultrasonidos en ellos. Se ha descrito una disminución del contenido en taninos tras la aplicación del tratamiento de ultrasonidos en el vino en contacto con aire y oxígeno (García & Sun, 2013). En nuestro estudio, se aprecia una disminución del contenido en taninos para las muestras 60 % y 90 % con 1,70 y 1,89 g/L respectivamente. Sin embargo, en la muestra 30 % se observa un aumento con una concentración de 2,29 g/L en comparación con el control (C) que presenta 2,00 g/L (Tabla 2).

En lo relativo a los parámetros enológicos básicos según García & Sun (2013), el pH y acidez total no se vieron influidos por el tratamiento ultrasónico, al igual que en el presente trabajo. El grado alcohólico sufrió un ligero descenso, esto podría deberse al tiempo de tratamiento (1 semana) o a las frecuencias utilizadas (20 kHz, 40 kHz y 1,6 MHz), ya que en nuestro estudio no se ve influenciado. Finalmente, la acidez volátil sufrió un ligero aumento en las muestras 60 % y 90 % (Tabla 2), sin

embargo, según del Fresno et al. (2019a) afirman que no hay un notable incremento asociado al tratamiento de ultrasonidos.

Centrándonos en los parámetros de color, según del Fresno et al. (2018) la intensidad de color (IC) es algo mayor en el control que el vino con lías tratado con US, pero sin presentar cambios significativos, al igual que ocurre en Kulkarnit et al. (2015) que observan una tendencia ascendente de IC. Sin embargo, Liu et al. (2016) señalan que se produce una disminución de IC, además de una disminución final del % Amarillo y un aumento del % Rojo, con lo que se puede concluir que los US no aceleran el proceso de oxidación del vino. A pesar de todo esto, nuestro estudio no muestra apenas diferencias entre los vinos (Tabla 2). En cuanto a la tonalidad, del Fresno et al. (2018) señalan un incremento de esta en las muestras sonicadas, sin embargo, en nuestro trabajo no observamos cambios.

Respecto al Índice de Polifenoles Totales (IPT) autores como del Fresno et al. (2019b) y Liu et al. (2016) señalan que se produce un descenso de estos en las muestras sonicadas, por la capacidad de las levaduras de retener compuestos fenólicos. Asimismo, Kulkarnit et al. (2015), observan un pequeño aumento de IPT, pero seguido de una disminución progresiva. Sin embargo, en nuestro estudio no se presentan fluctuaciones en este parámetro (Tabla 2). Estos resultados pueden ser debidos al tiempo de aplicación de ultrasonidos ya que en Liu et al. (2016) se aplica US 1 hora al día 4 veces por semana durante dos meses, y en del Fresno et al. (2018) y del Fresno et al. (2019b), como se ha indicado anteriormente, aplican durante 5 semanas dos veces a la semana 5 minutos por hora, y después hasta acumular 170 minutos de tratamiento se aplican dos veces por semana 15 minutos. Además, en Kulkarnit et al. (2015) sugieren que el aumento puede deberse a la actividad enzimática de las levaduras *No-Saccharomyces* ya que después de la autólisis se pueden liberar enzimas y absorber compuestos fenólicos que puede modificar la fracción fenólica.

Según García & Sun (2013) no se ha encontrado información sobre cómo se ven afectados los flavonoles por los ultrasonidos. Nosotros observamos pequeños cambios en las muestras respecto al control, caracterizándose los vinos con un 60 % de amplitud por un alto contenido en flavonoles con valores de 7,40 (Tabla 2).

Relativo al análisis sensorial, del Fresno et al., (2018) afirman que la calidad global de los vinos es mayor sin la aplicación del US, disminuyendo la intensidad de color, pero aumentando el volumen en boca, resultado similar al que encontramos en este TFG, en donde la muestra SC presenta mayor volumen en boca, y la muestra C mayor tonalidad, aunque esta última también es astringente (Tabla 3), es decir, las muestras sin tratamiento US. Además, el panel de catadores utilizado en García & Sun (2013) asegura la aparición de un sabor “quemado” en los vinos con 1 hora de US. Sin embargo, en el estudio del Fresno et al. (2019a) mantienen que la sonicación de lías antes de la adición al vino no tuvo efectos negativos adicionales sobre el perfil sensorial. Asimismo, Liu et al. (2016) señalan una pérdida de compuestos aromáticos debido a la cavitación, a pesar de esto confirman que no afecta a la calidad sensorial de los vinos. También, en este TFG se ha encontrado que los vinos con tratamiento de US al 60 % presentan mayor intensidad del atributo vegetal y los de 30 % son más alcohólicos desde el punto de vista sensorial (Tabla 3).

## 5. Conclusiones

Los parámetros fisicoquímicos de color no se ven muy influenciados por el tratamiento US, por lo tanto, no vemos que este tratamiento acelere la oxidación.

Sin embargo, no se ha conseguido la liberación de los compuestos de interés como polisacáridos y proteínas, sino que estos parámetros se han visto reducidos en las muestras tratadas con US.

Aunque, desde el punto de vista sensorial, se ha potenciado la persistencia, sobre todo en el tratamiento 30 %, además de atributos como alcohólico o vegetal en las muestras tratadas con US. Se aprecia una mayor disminución en el tratamiento de amplitud 90 % en la mayoría de los descriptores.

Por todo ello, se deben de realizar más estudios sobre la aplicación de US en lías para mejorar la calidad de los vinos bases tintos.

## 6. Bibliografía

- Bate-Smith, E. C. (1981). Astringent tannins of the leaves of *Geranium* species. *Phytochemistry*, *20*(2), 211–216. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0031-9422\(81\)85095-9](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0031-9422(81)85095-9)
- Betés-Saura, C., Andrés-Lacueva, C., y Lamuela-Raventós, R. M. (1996). Phenolics in white free run juices and wines from Penedès by high-performance liquid chromatography: changes during vinification. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *44*(10), 3040–3046. <https://doi.org/10.1021/jf9601628>
- Bosiljkov, T., Dujmić, F., Cvjetko, M., Hribar, J., Vidrih, R., Brnčić, M., Zlatic, E., Radojčić Redovniković, I., & Jokić, S. (2017). Natural deep eutectic solvents and ultrasound-assisted extraction: Green approaches for extraction of wine lees anthocyanins. *Food and Bioprocess Processing*, *102*, 195–203. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2016.12.005>
- Cacciola, V., Batllò, I. F., Ferraretto, P., Vincenzi, S., & Celotti, E. (2013). Study of the ultrasound effects on yeast lees lysis in winemaking. *European Food Research and Technology*, *236*(2), 311–317. <https://doi.org/10.1007/s00217-012-1893-6>
- del Fresno, J. M., Loira, I., Morata, A., González, C., Suárez-Lepe, J. A., & Cuerda, R. (2018). Application of ultrasound to improve lees ageing processes in red wines. *Food Chemistry*, *261*, 157–163. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.04.041>
- del Fresno, J. M., Morata, A., Escott, C., Loira, I., Cuerda, R., & Suárez-Lepe, J. A. (2019a). Sonication of yeast biomasses to improve the ageing on lees technique in red wines. *Molecules*, *24*(3). <https://doi.org/10.3390/molecules24030635>
- del Fresno, J. M., Morata, A., Ricardo-da-Silva, J. M., Escott, C., Loira, I., & Lepe, J. A. S. (2019b). Modification of the polyphenolic and aromatic fractions of red wines aged on lees assisted with ultrasound. *International Journal of Food Science and Technology*, *54*(9), 2690–2699. <https://doi.org/10.1111/ijfs.14179>

- Fernández, O., Martínez, O., Hernández, Z., Guadalupe, Z., & Ayestarán, B. (2011). Effect of the presence of lysated lees on polysaccharides, color and main phenolic compounds of red wine during barrel ageing. *Food Research International*, *44*(1), 84–91. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.11.008>
- Ferraretto, P., Cacciola, V., Batllo, I. F., & Celotti, E. (2013). Ultrasounds application in winemaking: grape maceration and yeast lysis. *Italian Journal of Food Science*, *25*(2), 160-168.
- García, J. (1990). *Técnicas analíticas para vinos*. Ed. GAB Sistemática Analítica. Barcelona.
- García Martín, J. F., & Sun, D. W. (2013). Ultrasound and electric fields as novel techniques for assisting the wine ageing process: The state-of-the-art research. *Trends in Food Science & Technology*, *33*(1), 40–53. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tifs.2013.06.005>
- Hidalgo J. (2019a). *Tratado de enología: tomo I*. Ed. Mundi-Prensa. Madrid.
- Hidalgo J. (2019b). *Tratado de enología: tomo II*. Ed. Mundi-Prensa. Madrid.
- International Organization of Vine and Wine. (2011). *Compendium of international methods of analysis-OIV. Total acidity*.
- International Organization of Vine and Wine. (2015). Method OIV-MA-AS313-01. Total Acidity. *Compendium of International Methods of Analysis - OIV*.
- Kulkarni, P., Loira, I., Morata, A., Tesfaye, W., González, M. C., & Suárez-Lepe, J. A. (2015). Use of non-Saccharomyces yeast strains coupled with ultrasound treatment as a novel technique to accelerate ageing on lees of red wines and its repercussion in sensorial parameters. *LWT- Food Science and Technology*, *64*(2), 1255e, 1262-1262. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.07.046>
- Lindner, P., & Shomer, I. (1984). Interference of azide in assays of carbohydrates. *Food Chemistry*, *14*(2), 141–153. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0308-8146\(84\)90053-0](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0308-8146(84)90053-0)
- Liu, L., Loira, I., Morata, A., Suárez-Lepe, J. A., González, M. C., & Rauhut, D. (2016). Shortening the ageing on lees process in wines by using ultrasound and microwave treatments both combined with stirring and abrasion techniques. *European Food Research and Technology*, *242*(4), 559–569. <https://doi.org/10.1007/s00217-015-2566-z>
- Murphey, J. M., Powers, J. R., & Spayd, S. E. (1989). Estimation of soluble protein concentration of white wines using Coomassie brilliant blue G-250. *American Journal of Enology and Viticulture*, *40*(3), 189. <http://www.ajevonline.org/content/40/3/189.abstract>
- Osete-Alcaraz, A., Bautista-Ortín, A. B., Pérez-Porras, P., & Gómez-Plaza, E. (2022). The application of ultrasound and enzymes could be promising tools for recovering polyphenols during the aging on lees process in red winemaking. *Foods*, *11*(1), 19. <https://doi.org/10.3390/foods11010019>
- Palomero, F., Morata, A., Benito, S., González, M. C., & Suárez-Lepe, J. A. (2007). Conventional and enzyme-assisted autolysis during ageing over lees in red wines: Influence on the release of polysaccharides from yeast cell walls and

on wine monomeric anthocyanin content. *Food Chemistry*, 105(2), 838–846. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.01.062>

- Peña, P. M., & Delgado, R. (2001). Evolución de la composición de las uvas tintas durante la maduración. *Alimentaria: Revista de Tecnología Higiene de Los Alimentos*, 326, 139–145.
- Ribéreau-Gayon, P., & Stonestreet, E. (1965). Determination of anthocyanins in red wine. *Bulletin de la Societe Chimique de France*, 9, 2649—2652. <http://europepmc.org/abstract/MED/5848688> (acceso el 22 de 05 de 22)
- Romero-Díez, R., Matos, M., Rodrigues, L., Bronze, M. R., Rodríguez-Rojo, S., Cocero, M. J., & Matias, A. A. (2019). Microwave and ultrasound pre-treatments to enhance anthocyanins extraction from different wine lees. *Food Chemistry*, 272, 258–266. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.08.016>
- Shively, C. E., & Henick-Kling, T. (2001). Comparison of two procedures for assay of free amino nitrogen. *American Journal of Enology and Viticulture*, 52(4), 400. <http://www.ajevonline.org/content/52/4/400.abstract> (acceso el 11 de 04 de 22)
- Stone, H., & Sidel, J. L. (2004). Descriptive analysis. En: *Sensory evaluation practices*. Ed. Academic Press, San Diego, 201-245.
- Teslić, N., Patrignani, F., Ghidotti, M., Parpinello, G. P., Ricci, A., Tofalo, R., Lanciotti, R., & Versari, A. (2018). Utilization of 'early green harvest' and non-*Saccharomyces cerevisiae* yeasts as a combined approach to face climate change in winemaking. *European Food Research and Technology*, 244(7), 1301–1311. <https://doi.org/10.1007/s00217-018-3045-0>
- UNE 87022 (1992). Análisis sensorial. Utensilios. Copa para la degustación de vinos.