



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

**DESARROLLO DE ESPUMANTE DE
NARANJA-ESTUDIO DE LA FORMACIÓN DE
BURBUJAS APLICANDO ANÁLISIS DE
IMÁGENES**

TESIS DOCTORAL

Presentada por:
María Cristina Cayetano Arteaga

Dirigida por:
Dra. María Luisa Gras Romero
Dra. María del Carmen Schvab
Dr. Eduardo Boido

Noviembre de 2015

*A mis hijos,
que desbordan mis días
de energía y amor infinito,*

*A mi familia,
los que están aquí
y los que desde alguna estrella
me sonríen.*

Esta es la parte más grata del trabajo de tesis...después de tantos años llegar a la meta y mirar el camino recorrido para decir...

¡GRACIAS!

A María del Carmen, Marisa, y Eduardo,
por haber aceptado el desafío de orientarme y guiarme en este proyecto, porque siempre estuvieron atentos y disponibles cuando los requería, brindándome enseñanzas, consejos y aliento, ¡un orgullo haber sido dirigida por ustedes!

A Mercedes,
por tanta comprensión, compañía, sabias palabras y confianza

A Andreína,
porque encaramos este proyecto juntas, con muchas ganas y grandes dudas, compartimos charlas, logros y desvelos por los aromas y burbujas de los espumantes de naranja

A Carina y Rodrigo,
por tantas muestras analizadas y espumantes elaborados juntos

A Patricia y Vanessa y Claudia,
que con sus amables sonrisas siempre estuvieron dispuestas para hacer los ensayos

A Cristina, Liliana, Flavia, Patricia, Delia, Gabriela, Romina, Verónica, Evangelina, Jorge, Fabricio, Ricardo,
integrantes del panel sensorial que estuvieron cada viernes puntualmente y con la mejor disposición

Al Dr Fernando Zamora que gentilmente realizó determinaciones analíticas impensables de realizar en Argentina, y trasladó las muestras personalmente hasta su laboratorio en Catalunya

A Mercedes y Patricia por haber creído en mí y recomendarme para la beca

A las docentes del Departamento de Inglés por los *abstracts* y consejos

A las autoridades de la Facultad y de la Universidad, que realizaron las gestiones para acercarnos la posibilidad de realizar estos estudios

A todos los compañeros de trabajo de la Facultad de Ciencias de la Alimentación especialmente a Jorge, Claudio y Daniel, siempre dispuestos a colaborar

A la UNER por los fondos proporcionados para realizar esta tesis a través del proyecto de investigación

A las empresas de la región que colaboraron con materiales para las producciones

A todos los que nos acercaron botellas (vacías) para reutilizar en los espumantes de naranja

A mis amigos que estuvieron atentos, siempre con palabras de aliento y esperando el brindis

A Ricardo mi compañero de vida, que supo bancarse los cambios de ánimo y las ausencias por estudiar

A mis hijos Amparo, Sebastián, Eugenia y Micaela, este logro es por y para ellos, porque cada vez que la tarea me superaba al verlos entendía que la esperanza debe renovarse siempre

A mis sobrinos, especialmente Lucía, Nacho, Fede, Santi y Sofi, a Florencia, a mis hermanas Margarita, Ana e Isabel, a mi madre, a mi suegra, a mis cuñados y concuñadas, a mis tíos gracias por compartir mi alegría

¡GRACIAS a Dios por tantas bendiciones!

RESUMEN

En la región de Salto Grande el desarrollo de la citricultura es de una gran significación histórica, social y económica. Ligada a la producción citrícola se han generado emprendimientos relacionados a la producción primaria y a la industrialización. En la Facultad de Ciencias de la Alimentación se han estudiado las posibilidades de biotransformación de jugos de naranja, para generar productos innovadores con mayor valor agregado, y atractivos para los consumidores. Así se desarrolló el “espumante de naranja” obtenido a partir de vino base de naranja, adaptando el tradicional método “*champenoise*”. La característica de identidad y calidad de este producto es la formación y liberación de burbujas al servir una copa de espumante. Los objetivos planteados en esta tesis fueron desarrollar el producto “espumante de naranja”, describir la cinética de formación de burbujas aplicando técnicas de análisis de imágenes y analizar las características de calidad físicas, químicas y sensoriales del producto final, así como las condiciones de proceso, con la capacidad de formación de burbujas del producto “espumante de naranja”. Se estudió la influencia del tiempo de añejamiento de los espumantes en contacto con las borras, obteniendo espumantes de 9, 12 y 18 meses; y el efecto del agregado de chips de levaduras en el licor de tirage. Para caracterizar el producto final se realizaron determinaciones químicas básicas: graduación alcohólica, pH, acidez, contenido de azúcares, glicerol, anhídrido sulfuroso, y se midieron propiedades físicas: densidad, viscosidad, tensión superficial. Para evaluar sensorialmente el espumante se diseñó una ficha de cata y se entrenó un panel sensorial, haciendo énfasis en las características de la espuma y de las burbujas. Para observar la formación de burbujas y estudiar la cinética de desarrollo de las mismas, se analizaron videos digitales capturados durante el llenado de copas de cristal, con espumante de naranja, en condiciones similares a las de degustación. Los videos capturados se analizaron y procesaron con software Image J, programa de libre distribución, con licencia de dominio público. Los datos se procesaron utilizando software estadístico Statgraphic Centurion®. El espumante de naranja resultó un producto finamente gasificado, de coloración ligeramente amarillada, translúcido. La caracterización del espumante de naranja se realizó integrando diferentes técnicas analíticas, sensoriales y aplicando análisis de imágenes que resultaron complementarias para describir aspectos diferentes del producto. La combinación de variables de proceso permitió elaborar espumantes de naranja con características fisicoquímicas

comparables a los vinos espumantes comerciales, excepto por los valores de acidez total, levemente superior en los espumantes de naranja; los diferentes tiempos que se mantuvieron en contacto con las lías y la utilización de chips de levaduras en el licor de tirage, no afectaron significativamente la mayoría de las características fisicoquímicas estudiadas de estos espumantes. Los polisacáridos evolucionaron durante el añejamiento, aumentando los contenidos con ambas formulaciones de licor de tirage, mayores en el caso de los espumantes elaborados con agregado de chips de levaduras. Para analizar la influencia de los tiempos de añejamiento se deberían elaborar nuevos espumantes y observar su evolución en tiempos más cortos en contacto con las lías, para observar si el agregado de chips provoca un acortamiento efectivo de los tiempos de añejamiento, y se logran mejores características espumantes. Los resultados de la evaluación sensorial mostraron que la velocidad de ascenso de las burbujas es moderada así como la efervescencia en boca, resultando un producto con una valoración global satisfactoria. El análisis estadístico reveló que no se observaron diferencias significativas entre los diferentes tratamientos por lo que en base a estas conclusiones y las obtenidas del análisis fisicoquímico, se seleccionó el espumante con las mejores puntuaciones para realizar el procesamiento y análisis de imágenes. Del procesamiento de las imágenes obtenidas al filmar la evolución de la espuma generada al servir una copa de espumante, se calcularon características de la corona (persistencia, tamaño, radio crítico antes de colapsar); la frecuencia con que se generan y ascienden burbujas, y tasas de crecimiento de los trenes de burbujas durante su ascenso. En base a estos datos se calcularon valores casi instantáneos de los parámetros que definen el régimen de flujo (velocidad, aceleración) y aproximarse así al comportamiento local, microscópico del fluido. Utilizando esta técnica instrumental no destructiva, se pueden observar las propiedades espumantes en condiciones similares a las de degustación que experimenta un consumidor real, se lograron especificar parámetros que permiten describir las propiedades de las burbujas de espumante de naranja. El análisis de imágenes permitió obtener cuantitativamente valores de velocidad de ascenso de burbujas, frecuencia de generación, tasa de crecimiento, radios finales, tiempos de permanencia de la espuma que pueden relacionarse directamente con los atributos sensoriales velocidad de burbujas, efervescencia, tamaños de burbuja, corona, abundancia y persistencia de la espuma. De esta manera se podría evaluar de forma

integral la capacidad espumante de un producto. Las propiedades fisicoquímicas analizadas en combinación con los resultados obtenidos del análisis de imágenes posibilitaron describir la cinética de ascenso de las burbujas de espumante ajustando a un modelo que sigue la ley de Stokes modificada para champagne. Estos resultados permitirán avanzar en la descripción de la hidrodinámica que controla el ascenso de las burbujas, para lo que se deberán tomar como referencia los fundamentos de difusión molecular, fuerzas viscosas, inerciales y de tensión superficial.

ABSTRACT

Citrus production has had a great social, historic as well as economic impact in Salto Grande region and it has led to many developments related to primary production and industrialization. Many researches have been carried out in Faculty of Food Science on biotechnological transformations of orange juices, in order to generate innovative products, attractive for consumers, with added value. Thereby it has been developed the orange sparkling wine, obtained by second fermentation in bottle of a still orange wine, adjusting the traditional “champenoise” method. The main quality characteristic of this product is effervescence; bubbles form and ascend through the fluid mass when a bottle of sparkling wine is uncorked. The objectives of this thesis were to develop the “orange sparkling wine”, to describe the kinetics of bubbles released in a glass of wine applying image analysis and to analyse physical, chemical and sensory characteristics of the final product, as well as processing conditions, that could affect foaming properties. The influence of length of time in contact with yeasts was studied, orange sparkling wines were kept 9, 12 and 18 months aging on lees. In addition, the effect of authorised yeasts addition in the tirage liquor to enhance foaming properties was analysed. In order to describe the orange sparkling wine, chemical characteristics were determined: alcoholic degree, pH, acidity, sugar content, glycerol, sulphur dioxide. Physical properties such as density, viscosity, surface tension were measured.

A special test chart to describe effervescence, nucleation, ascend and collapse of bubbles was designed to develop sensorial description of foaming features. A sensorial panel was specially trained to evaluate these characteristics, focusing on foam and bubble trains. In order to study bubbles ascent kinetic, digital videos were captured in real time, after pouring a glass of sparkling wine in similar conditions to those that a consumer experiments. Videos were processed and analysed using Image J, free software. Data analyses were carried out with Statgraphic Centurion® statistical package.

The sparkling orange wines showed soft effervescence, and a transparent, brilliant, light amber colour. Analytical techniques were complemented with sensory evaluation and image analysis to describe final characteristics of this product. The combination of process conditions and factors involved, allowed us to obtain orange sparkling wine with similar physicochemical characteristics to commercial sparkling wines obtained from grapes, with the exception of acidity values that were always higher for orange sparkling wines. Different aging time in contact with lees did not affect significantly most of the physicochemical characteristics studied in these wines as neither did the addition of

autolysed yeast. Polysaccharides levels increased during aging time in both formulations of tirage liquor and they were also higher in all samples of sparkling wines with autolysed yeasts added. To deeply understand the influence of aging time on foaming properties, orange sparkling wine with shorter periods of time in contact with lees should be produced. Sensory evaluation results showed that effervescence is quite soft and the bubbles speed is moderate. All final products got a satisfactory global score. Statistical analysis showed there were no significant differences between samples obtained from different treatments. Both the physicochemical analysis values and the aforementioned results allowed the selection of the orange sparkling wine with the best characteristics to perform the digital analysis.

The images obtained from the videos caught from a glass of sparkling wine, were processed, thus it was possible to follow foaming evolution as well as many other parameters. Persistence, size and critical radius before collapse were calculated to describe the foam ring formed at the periphery of a flute poured with the wine, the collar height; frequency of bubbles nucleation, as well as growing rates, that characterized each bubbles train, were measured. Using these parameters values, it was possible to model kinetic flow regime at millimetric scale, and almost instant characteristics of speed and acceleration were estimated.

An instrumental non-destructive technique, enabled us to investigate effervescence and foaming features, in conditions much closer to the real ones that a consumer enjoy while tasting a sparkling wine. The image analysis allowed us to quantify speed, frequency, growing rates, final size and persistence of foam. All these results were related to qualitative sensory attributes: velocity of bubbles, frequency of bubbles formation, size of bubbles, foam stability, thus enabling a thorough assessment of foaming properties that characterized the orange sparkling wine obtained.

Image analysis results and the physicochemical determinations altogether allowed the thorough description of bubbles kinetic that fit a modified Stoke's law. These parameters will be used to describe the hydrodynamic of bubbles ascent, applying principles of molecular diffusion.

RESUM

En la regió de Salto Grande (Argentina) el desenrotllament de la citricultura és d'una gran significació històrica, social i econòmica. Lligada a la producció citrícola s'han generat emprendiments relacionats a la producció primària i a la industrialització. En la Facultat de Ciències de l'Alimentació s'han estudiat les possibilitats de biotransformació de suc de taronja, per a generar productes innovadors amb major valor agregat, i atractius per als consumidors. Així es va desenrotllar el "espumante de naranja" obtingut a partir de vi base de taronja, adaptant el tradicional mètode "champenoise". La característica d'identitat i qualitat d'este producte és la formació i alliberament de bombolles al servir una copa d'espumen-te. Els objectius plantejats en esta tesi van ser desenrotllar el producte "espumante de naranja", descriure la cinètica de formació de bombolles aplicant tècniques d'anàlisi d'imatges i analitzar les característiques de qualitat físiques, químiques i sensorials del producte final, així com les condicions de procés, amb la capacitat de formació de bombolles del producte "espumante de naranja". Es va estudiar la influència del temps d'envelliment dels espumants en contacte amb les borres, obtenint espumants de 9, 12 i 18 mesos; i l'efecte de l'agregat de xips de rents en el licor de tirage. Per a caracteritzar el producte final es van realitzar determinacions químiques bàsiques: graduació alcohòlica, pH, acidesa, contingut de sucres, glicerol, anhídrid sulfurós, i es van mesurar propietats físiques: densitat, viscositat, tensió superficial. Per a avaluar sensorialment l'espumen-te es va dissenyar una fitxa de tast i es va entrenar un panell sensorial, fent èmfasi en les característiques de la bromera i de les bombolles. Per a observar la formació de bombolles i estudiar la cinètica de desenrotllament de les mateixes, es van analitzar vídeos digitals capturats durant l'ompliment de copes de vidre, amb espumen-te de taronja, en condicions semblants a les de degustació. Els vídeos capturats es van analitzar i van processar amb programari Image J, programa de lliure distribució, amb llicència de domini públic. Les dades es van processar utilitzant programari estadístic Statgraphic Centurion®. L'espumen-te de taronja va resultar un producte finament gasificat, de coloració lleugerament ambarina, translúcid. La caracterització de l'espumen-te de taronja es va realitzar integrant diferents tècniques analítiques, sensorials i aplicant anàlisi d'imatges que van resultar complementàries per a descriure aspectes diferents del producte. La combinació de variables de procés va permetre

elaborar espumantes de taronja amb característiques fisicoquímiques comparables als vins espumantes comercials, excepte pels valors d'acidesa total, lleument superior en els espumantes de taronja; els diferents temps que es van mantindre en contacte amb les emboliques i la utilització de xips de rents en el licor de tirage, no van afectar significativament la majoria de les característiques fisicoquímiques estudiades d'estos espumantes. Els polisacàrids van evolucionar durant l'envelliment, augmentant els continguts amb ambdós formulacions de licor de tirage, majors en el cas dels espumantes elaborats amb aregado de xips de rents. Per a analitzar la influència dels temps d'envelliment s'haurien d'elaborar nous espumantes i observar la seua evolució en temps més curts en contacte amb les emboliques, per a observar si l'agregat de xips provoca un acurtament efectiu dels temps d'envelliment, i s'aconseguixen millors característiques espumantes. Els resultats de l'avaluació sensorial van mostrar que la velocitat d'ascens de les bombolles és moderada així com l'efervescència en boca, resultant un producte amb una valoració global satisfactòria. L'anàlisi estadística va revelar que no es van observar diferències significatives entre els diferents tractaments pel que basant-se en estes conclusions i les obtingudes de l'anàlisi fisicoquímica, es va seleccionar l'espumen-te amb les millors puntuacions per a realitzar el processament i anàlisi d'imatges. Del processament de les imatges obtingudes al filmar l'evolució de la bromera generada al servir una copa d'espumen-te, es van calcular característiques de la corona (persistència, grandària, ràdio crític abans de col·lapsar) ; la freqüència amb què es generen i ascendixen bombolles, i taxes de creixement dels trens de bombolles durant el seu ascens. Basant-se en estes dades es van calcular valors quasi instantanis dels paràmetres que definixen el règim de flux (velocitat, acceleració) i aproximar-se així al comportament local, microscòpic del fluid. Utilitzant esta tècnica instrumental no destructiva, es poden observar les propietats espumantes en condicions semblants a les de degustació que experimenta un consumidor real, es van aconseguir especificar paràmetres que permeten descriure les propietats de les bombolles d'espumen-te de taronja. L'anàlisi d'imatges va permetre obtindre quantitativament valors de velocitat d'ascens de bombolles, freqüència de generació, taxa de creixement, ràdios finals, temps de permanència de la bromera que poden relacionar-se directament amb els atributs sensorials velocitat de bombolles, efervescència, grandàries de bombolla, corona, abundància i persistència de la bromera. D'esta manera es podria avaluar de

forma integral la capacitat espumante d'un producte. Les propietats fisicoquímiques analitzades en combinació amb els resultats obtinguts de l'anàlisi d'imatges van possibilitar descriure la cinètica d'ascens de les bombolles d'espumante ajustant a un model que segueix la llei de Stokes modificada per a champagne. Estos resultats permetran avançar en la descripció de la hidrodinàmica que controla l'ascens de les bombolles, per al que s'hauran de prendre com a referència els fonaments de difusió molecular, forces viscoses, inercials i de tensió superficial.

INDICE

CAPÍTULO I	20
I.1 - La producción citrícola en la región de Salto Grande	21
I.1-1 Ubicación geográfica	21
I.1-2 Actualidad de la producción citrícola	22
I.1-3 El “vino de naranja”	23
I.1-4 Vinos espumantes a base de frutas	24
I.2 - Los espumantes	26
I.2-1 Definición	26
I.2-2 Métodos para obtener espumantes	28
I.3 Las burbujas de los espumantes	38
I.3-1 Físicoquímica de las burbujas.	39
I.3-2 Formación de una burbuja	42
I.3-2.i Nucleación	43
I.3-2.ii Ascenso de las burbujas	46
I.3-2.iii Ruptura de las burbujas	47
I.3-3 Factores que afectan la formación de burbujas	49
I.3-3.iv Factores intrínsecos	49
I.3-3.v Factores extrínsecos	50
I.4 Estudio de la espuma	53
I.4-1 Análisis de imágenes	53
I.4-2 Evaluación sensorial	59
I.4-3 Otros métodos para evaluar la espuma	62
CAPÍTULO II	64
CAPÍTULO III	67
III.1 Objetivos generales	68
III.2 Objetivos específicos:	68
III.3 Plan de trabajo	69
CAPÍTULO IV	72
IV.1 Obtención de espumante de naranja	73
IV.1-1 Obtención del vino base de naranja	73
IV.1-2 Proceso de segunda fermentación en botella	75
IV.1-2.i Preparación del licor de tirage	76
IV.1-2.ii Embotellado y segunda fermentación	77
IV.1-2.iii Envejecimiento sobre las borras	78
IV.1-3 Diseño experimental	79
	13

IV.2 - Caracterización fisicoquímica del espumante de naranja	80
IV.2-1 Toma de muestras	80
IV.2-2 Análisis físicos y químicos al vino base de naranja	80
IV.2-3 Análisis físicos y químicos a espumantes de naranja	81
IV.2-4 Análisis estadístico de los datos	83
IV.3 Evaluación sensorial de espumante de naranja	84
IV.3-1 Selección y Entrenamiento de los jueces	84
IV.3-2 Descripción de las copas	86
IV.3-3 Descripción de las sesiones de cata	87
IV.3-4 Análisis estadísticos de los datos sensoriales	89
IV.4 Estudio de la espuma por análisis de imágenes	90
IV.4-1 Descripción del dispositivo experimental elegido.	90
IV.4-2 Captura de las imágenes digitales	92
IV.4-3 Procesamiento de las imágenes digitales	93
IV.4-4 Datos obtenidos de las imágenes	95
IV.4-5 Análisis estadístico de los resultados	97
CAPÍTULO V	98
V.1 Resultados Físicoquímicos	99
V.1-1 Obtención del vino base de naranja	100
V.1-2 Caracterización fisicoquímica del vino base de naranja	100
V.1-3 Obtención del Espumante de naranja	103
V.1-4 Caracterización fisicoquímica de los espumantes de naranja	106
V.1-4.i Presión y CO ₂	106
V.1-4.ii Parámetros físicos	108
V.1-4.iii Composición química básica	112
V.1-4.iv Proteínas	115
V.1-4.v Polisacáridos	117
V.1-4.vi Color	120
V.1-5 Conclusiones de los resultados fisicoquímicos	121
V.2 Resultados sensoriales	122
V.2-1 Obtención del perfil sensorial de las características espumantes	123
V.2-1.vii Entrenamiento del panel	123
V.2-2 Caracterización sensorial de espumantes de naranja	131
V.2-3 Conclusiones	134
V.3 Caracterización de la espuma y formación de burbujas por análisis de imágenes	136
V.3-1 Descripción de la obtención de imágenes	137
V.3-1.viii Selección del espumante a caracterizar por análisis de imágenes	138
V.3-1.ix Aspectos estudiados en las imágenes	139
V.3-2 Evolución de la espuma	139
V.3-3 Descripción de la corona	142
V.3-4 Estabilidad de las burbujas en la corona	144
V.3-5 Frecuencia de formación y ascenso de burbujas	146
V.3-6 Análisis del ascenso de las burbujas.	152
V.3-6.x Análisis de un tren de burbujas	152

V.3-6.xi Análisis de dos trenes de burbujas que ascienden paralelos	155
V.3-6.xii Análisis de burbujas cerca de la interfaz	157
V.3-7 Descripción del tamaño de burbujas	159
V.3-8 Conclusiones del análisis de imágenes	162
V.4 Discusiones complementarias	163
V.4-1 Integrando resultados	164
V.4-2 De la formación de burbujas	165
V.4-2.xiii Sobresaturación y radio crítico de nucleación	167
V.4-3 Del ascenso de las burbujas	170
V.4-3.xiv Estimación de la cantidad de burbujas liberadas en una copa de espumante	170
V.4-3.xv Velocidad de ascenso de las burbujas	172
V.4-4 Del colapso de las burbujas	174
V.4-5 Conclusiones	176
CAPÍTULO VI	177
ANEXO	181
BIBLIOGRAFÍA	185

Indice de figuras

Figura I-1 Ubicación geográfica de la región de Salto Grande	21
Figura I-2 Esquema de destino de la producción de cítricos de la región de Salto Grande	23
Figura I-3 Consumo de vinos espumosos (Fuente: www.alimentosargentinos.gov.ar)	26
Figura I-4 Método Charmat (adaptado de http://www.vinosychampagne.com/champagnes/metodo-charmat/metodocharmat3/)	29
Figura I-5 Esquema de obtención de espumantes por el Método champenoise.	30
Figura I-6 Esquema de la glicosilación de las manoproteínas (a) O-glicosiladas; (b) N-glicosiladas. Asn=asparagina; GlcNAc=N-acetilglucosamina; Ser=serina; Thr=treonina; X=aminoácido; M= manosa (Blasco et al., 2011).	34
Figura I-7 Componentes celulares liberados al medio por autólisis durante la crianza sobre lías. (Morata et al, 1998)	35
Figura I-8 (a) Pupitres utilizados para el removido de las borras en la elaboración de espumantes por el método tradicional. (b) Evolución de la posición de las botellas en pupitre desde su posición inicial (1) hasta que quedan en punta (4).	36
Figura I-9 Representación gráfica de la ruptura del equilibrio termodinámico al destapar una botella de espumante, que se desgasifica hasta alcanzar un nuevo estado de equilibrio a presión atmosférica.	41
Figura I-10 Ciclo de formación de una burbuja por nucleación heterogénea (adaptado de Liger-Belair et al, 2002).	43
Figura I-11 Imagen de una fibra de celulosa con un bolsillo de gas atrapado en el lumen, actuando como sitio de nucleación (Voisin et al., 2005a).	45
Figura I-12 Variación del estado de la superficie de una burbuja durante su ascenso por acumulación de sustancias surfactantes en su parte posterior	47
Figura I-13 Esquema de una burbuja emergiendo en la superficie (adaptada de Liger-Belair, 2005).	48
Figura I-14 Esquema de gotas liberadas por explosión de una burbuja (adaptada de Liger-Belair, 2005)	48
Figura I-15 Formas de servir una copa de espumante:(1) Tipo cerveza. (2) Tipo champagne. (Fotografías adaptadas de Liger-Belair et al, 2010).	52
Figura I-16 Etapas del procesamiento de imágenes (Adaptado de Aguilera, 2007).	54
Figura I-17 Dispositivo utilizado para visualizar el gas liberado en una copa de champagne durante el proceso de servido, utilizando una cámara de video IR (Liger-Belair et al, 2012).	58
Figura I-18 Fotografía del sistema CAVE (Cilindre et al, 2010).	59
Figura I-19 Parámetros de la espuma determinados en Mosalux.	63
Figura IV-1 Diagrama de flujo correspondiente a la obtención del vino base de naranja.	73
Figura IV-2 Esquema seguido para la obtención de espumantes, adaptando método champenoise.	76
Figura IV-3 Opérculo y tapa corona. Cierre de las botellas de espumante para la segunda fermentación.(http://winemdq.blogspot.com.ar/2014/08/clinicas-premium-tasting-2014-espumoso.html .)	78
Figura IV-4 Definición de los atributos de la espuma	86
Figura IV-5 Copa flauta de cristal utilizada para análisis sensorial y análisis de imágenes de espumantes de naranja.	87
Figura IV-6 Dispositivo experimental montado para la captura de videos digitales de espumantes de naranja. (1) Cámara CCD Sony; (2) Cámara Panasonic Lumix; (3) Fuente de luz led; (4) Copa de cristal.	91
Figura IV-7 Vista de una imagen en pantalla en el programa ImageJ.	94
Figura IV-8 Vista de un tren de burbuja con forma seleccionada; se muestra en la barra de herramientas la opción que permite realizar mediciones elegidas previamente de la opción "Set measurements".	96

Figura IV-9 Mediciones de la altura de la corona, para estudiar su evolución en el tiempo.	97
Figura V-1 Medición de la presión con afrómetro que perfora tapa corona.	103
Figura V-2 Deposición de las borras finalizada la segunda fermentación.	104
Figura V-3 a) Pupitre de madera utilizado para la remoción de las borras. b) Botella “en punta” lista para proceder al degüelle.	105
Figura V-4 (a) Baño para congelar picos de las botellas y (b) momento del degüelle para eliminar borras congeladas depositadas en el opérculo.	105
Figura V-5 Fracciones y contenidos de polisacáridos en espumantes de naranja a los distintos tiempos de añejamiento en contacto con las borras y para las diferentes composiciones del licor de tirage.	119
Figura V-6 -Sesión de evaluación sensorial.	124
Figura V-7 Gráfica de línea de puntos de evaluación sensorial para muestra de espumante comercial Extra Brut.	128
Figura V-8 Gráfica de F para el atributo cantidad de espuma.	129
Figura V-9 Gráfica de CMe por atributos para una muestra. Cada barra de color representa a un panelista.	130
Figura V-10 Representación gráfica del análisis descriptivo mostrando los atributos relacionados a las características espumantes de los seis tipos de vinos producidos.	132
Figura V-11 Resultados de la evaluación sensorial del espumante de naranja EC1	135
Figura V-12 Imágenes de papel milimetrado para establecer las escalas respectivas y realizar mediciones sobre las imágenes, capturadas con: a) la cámara Sony; b) la cámara Panasonic. Los cuadrados tienen 1 mm de lado.	138
Figura V-13 Imagen de una copa de espumante (a) a los 30 segundos de servida, (b) a los 10 minutos.	140
Figura V-14 Evolución de la altura de la espuma en función del tiempo, registrada 30 segundos después de servida la copa.	141
Figura V-15 Collar de burbujas estable a los 10 minutos de servida una copa de espumante.	141
Figura V-16 Evolución de la corona con el tiempo. Secuencia de imágenes obtenidas en intervalos de 1 segundo (1:38 minutos de servida la copa).	143
Figura V-17 Distribución de tamaños de burbujas correspondientes a las observadas en la figura V.16.	143
Figura V-18 Histograma de radios de burbujas mostradas en la figura V.15.	144
Figura V-19 Corona de burbujas a los 3 minutos de servida una foto, destacando: (a) una burbuja antes (b) después colapsar. El intervalo de tiempo entre (a) y (b) es de 0,010 segundo.	145
Figura V-20 Medición de períodos de trenes de burbujas.	146
Figura V-21 Dos trenes de burbujas a) desde sus sitios de nucleación; b) durante su ascenso cercano a la superficie. (Imágenes tomadas a los tiempos 16:58 y 16:46 respectivamente)	147
Figura V-22 Sitios de nucleación múltiple (registrado al tiempo 17:46).	151
Figura V-23 Tren de burbujas desde su sitio de nucleación. (Observación a los=13:19 minutos)	152
Figura V-24 Gráficos de posición en función del tiempo de las cuatro burbujas superiores del tren mostrado en la figura V.23.	154
Figura V-25 Gráfico de velocidad de las burbujas del tren en función del tiempo. V1 es la velocidad de la burbuja más elevada en la figura (t=13:19 minutos)	154
Figura V-26 Gráficas de la posición en función del tiempo (a y b) para los trenes de burbujas (A y B) observados en las figura V.21 (Tiempo de observación=16:58)	155
Figura V-27 Gráficas de velocidad en función del tiempo para los trenes de burbujas A y B observados en las figuras V.21	156
Figura V-28 Gráficos de posición en función del tiempo (a y b) y velocidad en función del tiempo (c y d) de las burbujas Ay B de la figura V.21 (b)	157
Figura V-29 Burbuja ascendiendo en las proximidades de la interfaz espumante-aire (Tiempo observación= 13:49 minutos)	158

<i>Figura V-30 Gráfico del modelo ajustado de la tasa de crecimiento de una burbuja. Correspondiente al tren mostrado en la figura V.23.</i>	160
<i>Figura V-31 Representación de una copa de espumante indicando las etapas de la desorción de CO₂.</i>	164
<i>Figura V-32 Concentración de CO₂ en sitio de nucleación (adaptado de Liger-Belair et al, 2002)</i>	165
<i>Figura V-33 Nucleación "artificial" generada en microcavidades grabadas con láser en el fondo de una copa (Liger Belair, 2012).</i>	169
<i>Figura V-34 Representación de la velocidad en función de R2 para trenes de burbujas del EC1.</i>	173

Indice de Tablas

<i>Tabla I-1 Preferencias de consumo de los espumantes en Argentina. Datos correspondientes al año 2010. (www.alimentosargentinos.gov.ar)</i>	<i>27</i>
<i>Tabla I-2 Características de los vinos base y cava según la legislación BOE N°189278:37587-93 (Riu-Aumatell, 2005).</i>	<i>28</i>
<i>Tabla IV-1 Espumantes elaborados con dos composiciones del licor de tiraje y 3 tiempos de añejamiento en contacto con las lías</i>	<i>79</i>
<i>Tabla V-1 Características fisicoquímicas de los vinos base de naranja para la elaboración de espumantes (valores medios y desviación estándar de muestras por triplicado).</i>	<i>101</i>
<i>Tabla V-2 Resultados de color para vino base de naranja.....</i>	<i>102</i>
<i>Tabla V-3 Constante de la ley de Henry en función de la temperatura, para un champagne típico con 12,5%v/v de etanol y 10 g/l de azúcares. (adaptada de Liger-Belair et al, 2005)</i>	<i>107</i>
<i>Tabla V-4 Presión del espumante al descorchar y contenido de anhídrido carbónico calculado aplicando la ley de Henry (*valores medios y desviaciones estándar determinados en dos botellas).....</i>	<i>107</i>
<i>Tabla V-5 Parámetros físicos de los espumantes de naranja</i>	<i>108</i>
<i>Tabla V-6 Componentes químicos determinados en espumantes de naranja.....</i>	<i>111</i>
<i>Tabla V-7 Parámetros de color de los espumantes de naranja.</i>	<i>120</i>
<i>Tabla V-8 Frecuencias de liberación de burbujas en diferentes posiciones durante el ascenso. Valores medios y desviaciones estándar (n=8). Letras diferentes indican diferencias significativas entre las medias ($\alpha=0,05$).</i>	<i>149</i>
<i>Tabla V-9 Descripción de la velocidad en función del tiempo para los trenes de burbujas indicados en la tabla V.8.....</i>	<i>159</i>
<i>Tabla V-10 – Tasa de crecimiento de trenes de burbujas.....</i>	<i>161</i>

CAPÍTULO I

ANTECEDENTES

I.1- La producción citrícola en la región de Salto Grande

I.1-1 Ubicación geográfica

La región de Salto Grande abarca una región agro económica de 30 km (oeste – este) de suelos arenosos sobre la costa del río Uruguay, que se extiende sobre el río Uruguay (Figura I-1) desde el norte del departamento Colón en Entre Ríos, hacia el norte por los departamentos Concordia y Federación, siguiendo hasta el departamento Monte Caseros en la provincia de Corrientes; y en la República Oriental del Uruguay en los departamentos de Salto y Paysandú.



Figura I-1 Ubicación geográfica de la región de Salto Grande

En la región de Salto Grande la producción citrícola es una actividad económica muy relevante, que comenzó a desarrollarse en la década del 50 y actualmente representa el 42,77% de la actividad citrícola regional

I.1-2 Actualidad de la producción citrícola

Los actores principales en la cadena citrícola regional incluyen los viveristas, productores, empacadores (mercado interno y externo), las industrias de jugos y derivados. En otro nivel de análisis aparecen los proveedores de insumos, las empresas de servicio de cosecha y acondicionamiento, de cámaras de desverdizado, de fumigación, frío y transportistas, fábricas de envases (aserraderos, cajoneros), etc.

También existe un entramado institucional específico de apoyo a la cadena, como cámaras de productores y empacadores locales (Concordia, Federación, Chajarí, Villa del Rosario) nucleados a nivel provincial en la Federación de Citrus de Entre Ríos (Federcitrus); cámaras vinculadas a otros eslabones de la cadena y con jurisdicción mayor a la provincia como la Asociación de Viveristas de NEA y la Cámara de Exportadores del NEA.

Desde ciencia y tecnología se cuenta con INTA Estación Experimental Concordia (y sus Agencias de Extensión Rural de Chajarí y Concordia) y la Facultad de Ciencias de la Alimentación de la UNER que presenta cierta especialización en la actividad, que aportan en la investigación y servicios en temas como determinación de plaguicidas, recubrimientos comestibles, biotecnología, entre otros. A nivel interinstitucional el Polo Tecnológico de la Región de Salto Grande tiende a articular actividades de ciencia y tecnología y las actividades productivas (Díaz Vélez & Vera, 2010; Vera et al, 2007)

El objetivo principal de la citricultura de la provincia es la producción de fruta para consumo fresco, el destino a industria es secundario o más bien es un subproducto. El sector industrial cuyo principal componente es la producción de jugos concentrados y derivados, es complementario a la producción de fruta fresca, y habitualmente la fruta procesada en industria no supera el 20% del total de producción (Vera et al., 2007). El volumen de producción de cítricos en Entre Ríos, representa aproximadamente el 30% de la producción nacional. De la producción de cítricos de Entre Ríos, un 15-18% va destinado a exportación como fruta fresca. Existen en la región citrícola de Entre Ríos 14 empaques dedicados a exportación siendo el 14,5% del total del país mientras que hay 368 empaques que destinan su producción al mercado interno. Estos representan el 78,3% del total de empaques de mercado interno argentino (Federcitrus 2009). Estos

empaques de mercado interno integran gran parte de la cadena cítrica ya que los mismos actores son productores, empaques, transportistas y comercializadores en la etapa mayorista.

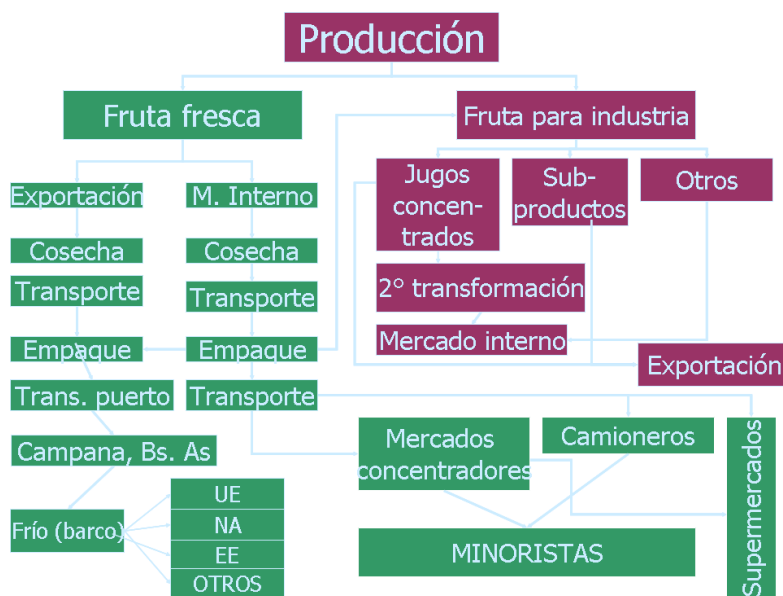


Figura I-2 Esquema de destino de la producción de cítricos de la región de Salto Grande

La noción de agregar valor se presenta como mecanismo de aumentar las rentas y de retenerlas en el ámbito de la economía local donde se encuentra la producción primaria (Wilkinson, 2003). La producción de *specialities*, productos diferenciados de alto valor unitario que son elaborados con técnicas apropiadas que en muchos casos resaltan su carácter personal y/o artesanal. En este tipo de productos, la competitividad se basa en poder ofrecer un producto casi único con el máximo nivel de calidad posible para su venta en canales apropiados y claramente identificados (Tito y Cattaneo, 2000).

I.1-3 El “vino de naranja”

Son conocidos los vinos de frutas desde hace mucho tiempo y en todas las culturas, ya que cualquier fruta que contenga niveles razonables de azúcar presenta la posibilidad de producir una bebida alcohólica, siempre y cuando en su jugo puedan actuar las levaduras fermentadoras.

Vino es exclusivamente la bebida que resulta de la fermentación alcohólica completa o parcial de la uva fresca, estrujada o no, o del mosto simple o virgen, con un contenido de alcohol adquirido mínimo de 7% (v/v a 20°C) (Reglamento Vitivinícola del MERCOSUR, MERCOSUR/GMC/RES No. 45/96). En términos menos restrictivos, se considera al vino como una bebida alcohólica obtenida generalmente por la fermentación del jugo natural de frutas maduras. Se admite tradicionalmente que el nombre vino sea reservado sólo para la bebida proveniente de la uva. Para bebidas producidas por fermentación alcohólica de mostos provenientes de otras frutas se debe indicar el nombre de la fruta, como en este caso vino de naranja

La producción de vinos de naranja, como productos regionales, son de elaboración artesanal y no se han registrado a nivel industrial nacional bebidas derivados de la biotransformación de jugo de naranja.

Ferreyra (2009) y Schvab (2006) desarrollaron una bebida alcohólica por biotransformación de jugo de naranja, investigaron el proceso de obtención, basados en procedimientos aplicados en enología tradicional, y caracterizaron detalladamente el producto así obtenido, llamado “vino de naranja”.

Ensayaron a nivel laboratorio diferentes alternativas modificando variedades de naranja y variables de procesos de elaboración: temperaturas de fermentación, pH, temperaturas de maduración y cepas de levaduras y caracterizaron los diferentes vinos de naranja a través de ensayos físicos, químicos y sensoriales.

I.1-4 Vinos espumantes a base de frutas

En noviembre de 2011 ha salido al mercado español un espumoso de naranja denominado “Burnarj”, “Burburjas de naranja”, vino espumoso similar al champán o al cava elaborado a base de zumo de naranja (<http://www.ecoticias.com/alimentos/57136/crean-un-vino-espumoso-de-la-fermentacion-del-zumo-de-naranja-natural>). Sus creadores, (Vegasud), una empresa cordobesa referente en la industria agroalimentaria. La materia prima es el zumo natural de naranjas que, en su primera fermentación, obtiene el grado alcohólico deseado para cada una de sus presentaciones: Nature o Semi Seco Light. La segunda fermentación se

produce en la botella, que es donde se crea la burbuja de forma natural, gas carbónico desprendido por el jugo fermentado. Se comercializa en sus versiones Brut Nature, Brut, Semiseco y semi-light.

I.2 - Los espumantes

I.2-1 Definición

El término “champagne” con Denominación de Origen Controlada (DOC) es una marca protegida legalmente por el Tratado de Madrid (1891), confirmado en el Tratado de Versalles después de la Primera Guerra Mundial y se refiere únicamente a vino espumoso producido en su región homónima, siendo sus estándares definidos por una Appellation d’Origine Controlée. Un vino espumante es definido como aquel en el cual el dióxido de carbono es producido exclusivamente por fermentación, y que es liberado cuando la botella se abre. En la Unión Europea, para ser considerado como tal, se exige una sobrepresión no menor a 3 bars. Los vinos espumantes de mejor calidad producidos en Europa son *Champagne*, *Cava* en zona del Penedés, Cataluña, (España) y *Talento* en Italia (Pozo-Bayón et al, 2009). Todos estos productos se obtienen aplicando el método tradicional conocido como *Méthode Champenoise*, que consiste en someter un vino base a una segunda fermentación en botella, seguido de un añejamiento en contacto con las lías, cuya duración no debe ser menor a 9 meses para los espumantes con denominaciones de origen. En España el producto obtenido aplicando con denominación de origen “Cava” es reglamentada por la norma BOE 189278:37587-93, 1991.

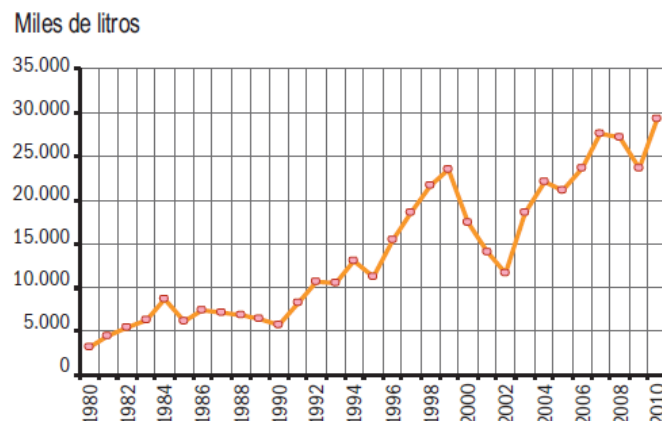


Figura I-3 Consumo de vinos espumosos (Fuente: www.alimentosargentinos.gov.ar)

El consumo en Argentina ha registrado un incremento muy significativo en los últimos 20 años, como se aprecia en la Figura I-3 que muestra el incremento en la demanda de vinos espumosos desde 1980 hasta 2010. Este aumento en la demanda se relaciona con cambios en las preferencias de los consumidores, como se observa en la Tabla I-1:

Tabla I-1 Preferencias de consumo de los espumantes en Argentina. Datos correspondientes al año 2010. (www.alimentosargentinos.gov.ar)

Variedad	Litros
Total Espumoso Demi - Sec	2.182.800
Total Espumoso Dulce	2.016.600
Total Espumoso Seco	22.606.700
Total Espumoso Frutado	2.389.900
Total	29.196.100
Fuente: Instituto Nacional de Vitivinicultura	

Las condiciones, exigencias y características para la champaña y los vinos espumosos se especifican en el Capítulo XIII en el Código Alimentario Argentino (Ley 18284/69 18284/69, Decreto 2126/71), Art. 1099-: *Vinos espumosos o espumantes: Son los blancos, tintos, rosados, obtenidos por una segunda fermentación en envase cerrado con el agregado o no de sacarosa o mosto concentrado. Debe expendirse con una presión no inferior a 4 atmósferas a 20°C*) y Art. 1101- *Champaña o Champagne: Son los obtenidos con vinos blancos o rosados, que previa adición de sacarosa y levaduras seleccionadas, se los somete a una segunda fermentación alcohólica en envase cerrado. Pueden ser adicionados del llamado Licor de expedición, constituidos por vinos licorosos y de coñac, para constituir los tipos: Secos (Sec), Semisecco (Demisec) y Dulce (Doux); reservándose las denominaciones de Bruto (Brut) y Natural (Nature) para distinguir el producto original. Deben expendirse con una presión de gas carbónico no inferior a 4 atmósferas a 20°.*

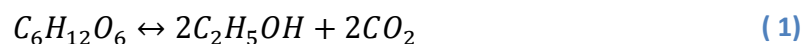
En el sentido estrictamente químico un vino espumoso o espumante es una solución hidroalcohólica sobresaturada en CO₂ que contiene una gran diversidad de moléculas desde las más sencillas hasta las más complejas. La Tabla I-2 muestra la composición química aproximada de un vino base apropiada para la elaboración del Cava según la normativa española:

Tabla I-2 Características de los vinos base y cava según la legislación BOE N°189278:37587-93 (Riu-Aumatell, 2005).

Parámetros de calidad	Vino base	Cava
Graduación alcohólica adquirida	9.5% - 11.5%	10.8% - 12.8%
Acidez total mínima (ácido tartárico)	5.5 g/L	5.5 g/L
Extracto seco no reductor	13 g/L - 22 g/L	13 g/L - 22 g/L
Acidez volátil real (ácido acético)	< 0.60 g/L	< 0.65 g/L
Anhídrido Sulfuroso total	< 140 mg/L	< 160 mg/L
Cenizas	0.7 g/L - 2 g/L	0.7 g/L - 2 g/L
PH	2.8 - 3.3	2.8 - 3.3
Sobrepresión mínima de CO ₂ (20°C)	-	3.5 bar

I.2-2 Métodos para obtener espumantes

Las levaduras consumen los azúcares fermentables para producir etanol y dióxido de carbono -ecuación (1)-, que al producirse en un envase cerrado durante la segunda fermentación, el gas formado se integra a la masa del líquido y aumenta la presión interna del recipiente.



La fermentación alcohólica, afortunadamente, es un proceso mucho más complejo. Al mismo tiempo que se produce esta reacción, ocurren numerosos procesos bioquímicos, químicos y fisicoquímicos que llevan a la transformación del mosto en vino (Zamora, 2009).

Durante el proceso de elaboración de un vino espumante ocurren estas transformaciones influidas por condiciones ambientales y variables de proceso: tipo de levaduras, temperatura, tiempo en contacto con las borras, uso de coadyuvantes o clarificantes, que dan origen a cambios en la composición química y propiedades físicas que definen el producto final. Se destacan las transformaciones relacionadas a cambios en la fracción proteica y coloidal, porque son las que afectan las propiedades tensoactivas y la capacidad espumante.

El *método de cuvée*, o *granvas*, consiste en fermentar el vino base en tanques herméticamente sellados, durante al menos 20 días antes de ser transferidos a las botellas; así se ahorran costosas manipulaciones. Algunos espumantes italianos, como Lambrusco y Asti se producen por este medio (Adolfo J. Martínez-Rodríguez & Pueyo, 2009).

En 1916 se ideó otro sistema para elaborar espumosos en grandes cantidades, este procedimiento llamado *Charmat*, se realiza en grandes recipientes o cubas, como se muestra en la Figura I-4:

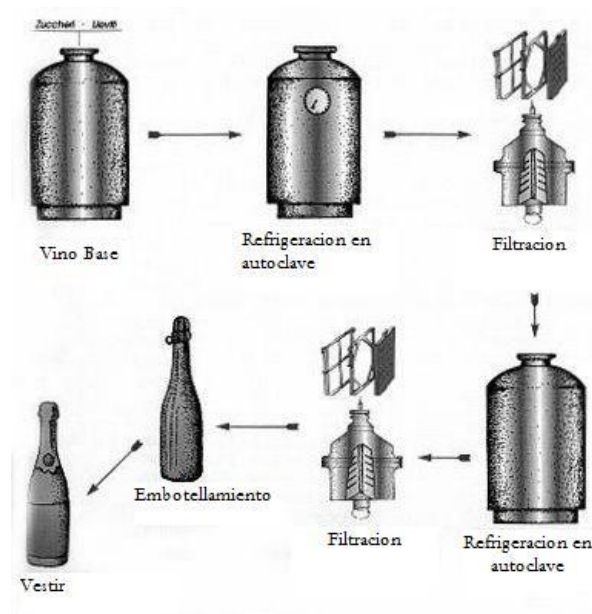


Figura I-4 Método Charmat (adaptado de <http://www.vinosychampagne.com/champagnes/metodo-charmat/metodocharmat3/>)

El vino base encubado en el primer recipiente, donde es envejecido artificialmente por calentamiento. Más tarde se trasvasa a una segunda cuba, donde se le añaden las levaduras y el licor azucarado para que fermente durante 10 o 15 días; en la tercera cuba se clarifica por refrigeración. Por último, desde la cuarta cuba, se filtra y se embotella, manteniendo todo el proceso en condiciones isobáricas para conservar el dióxido de carbono formado.

El proceso de elaboración según el método tradicional o *champenoise* mostrado en la Figura I-5, conduce a la obtención de los espumantes de reconocida mejor calidad. Se

suele realizar un prensado fraccionado (prensado champenoise), de manera que primero se aplican presiones suaves para obtener el mosto flor o *cuvée*. Previamente a la fermentación del mosto se realiza el sulfitado; el SO_2 actúa como antioxidante y como conservante, impidiendo fermentaciones no deseadas. La concentración a aplicar depende de la acidez del mosto; a mayor acidez menor concentración de sulfitos para controlar la fermentación, ya que el pH desplaza el equilibrio de ionización. A medida que aumenta el pH se forman bisulfitos (HSO_3^-) y sulfitos (SO_3^{2-}), que pueden reaccionar con los grupos carbonilos, como el del acetaldehído formando SO_2 ligado que no tiene actividad antimicrobiana.

Luego del sulfitado se realiza el desfangado del mosto para reducir los sólidos en suspensión desde valores aproximado de 1-2% a menos del 0,5%. Se puede realizar de forma dinámica (filtración) o estática (decantación refrigerada).

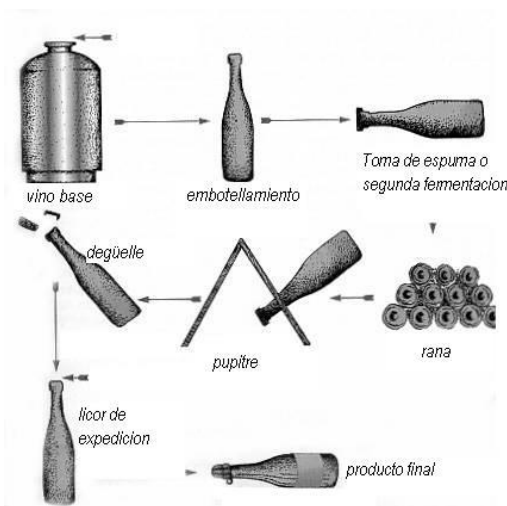


Figura I-5 Esquema de obtención de espumantes por el Método champenoise.

Las levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*) seleccionadas por la bodega, reúnen las siguientes características: alto rendimiento metabólico Azúcar/alcohol, no producen sulfuro de hidrógeno, baja producción de ácido acético, actividad fermentativa regular en el tiempo, resistencia a las bajas temperaturas (14-18°C), elevada capacidad de floculación y sedimentación, y se asegura una fermentación completa del mosto, sin generar productos organolépticos negativos (como podrían ser aromas de reducción de

tipos mercaptanos, acetato de etilo, ácido acético, etc.). Junto a las levaduras y correcciones se agregan también los clarificantes, todo esto constituye el “pie de cuba”.

La fermentación primaria que conduce a la obtención del vino base transcurre en aprox. 12-15 días. La clarificación del vino base es en general poco intensa, ya que no conviene eliminar todas las macromoléculas para evitar posteriores problemas de espuma en el espumante ya que estas actúan en la interfase de la emulsión aire-líquido. Además una clarificación muy intensa tampoco es necesaria ya que en la segunda fermentación la turbidez aumenta y es clarificado con los aditivos del tirage. Generalmente se realiza una clarificación física, por sedimentación y trasiego.

Una vez obtenido el vino base se procede a efectuar la operación llamada *tirage*. Consiste en la adición del licor de tirage a la mezcla de vinos base (*coupage*), formado por una biomasa de levaduras seleccionadas, azúcares y coadyuvantes de tirage (clarificantes, nutrientes para las levaduras, etc.); se mezclan todos los componentes hasta formar una suspensión homogénea. Después de la adición del licor de *tirage* se envasa en las botellas apropiadas para soportar las presiones que se desarrollarán, se tapan con un obturador de polietileno (opérculo o *bidulé*) y finalmente con una tapa corona que es la que asegura que la botella quede herméticamente sellada, capaz de resistir 6-8 atm de presión durante el tiempo de toma de espuma. Es fundamental que la fermentación se realice entre 13-15°C porque conduce a una mejor toma de espuma, es decir, una mejor integración del anhídrido carbónico (su solubilidad disminuye al aumentar la temperatura) en el líquido en el que se desprende, y por lo tanto, una mejora del “*perlage*”, observado por la finura de las burbujas y persistencia del fenómeno. Si se forman burbujas más gruesas en la copa, como es más inestable la unión del CO₂ con el vino, serán efímeras. Los aromas están muy influenciados por la temperatura a la que se realiza la fermentación que a su vez condiciona que la fermentación se desarrolle en un tiempo más prolongado que oscila entre 30 a 45 días.

Como la levadura es un elemento fundamental para elaborar el espumante se debe realizar una adecuada selección en base a sus diferentes propiedades, tanto fisiológicas como tecnológicas. Se suelen utilizar las del género y especie *Saccharomyces bayanus* u *S. oviformis*, y dentro de éstas, determinadas cepas especialmente adaptadas al

complejo proceso de champanización que cada empresa desarrolla. La utilización de levadura seca activa (LSA) se ha revelado de gran utilidad para bodegas de mediano y pequeño tamaño tanto por su facilidad de manejo como de puesta en marcha. Sin embargo, en su utilización como pie de cuba para tiraje de espumosos es necesario seguir de forma escrupulosa el protocolo de hidratación y de adaptación progresiva al medio. Existen sistemas de levaduras inmovilizadas (levaduras en cápsulas de alginato endurecida con formol) que permiten simplificar las operaciones de removido para eliminar las lías y conducen a la obtención de vinos espumantes de calidad similar a los tradicionales. Diferentes trabajos (Torresi, Frangipane, & Anelli, 2011) estudian el efecto de utilizar levaduras inmovilizadas para efectuar la segunda fermentación, con el fin de facilitar la etapa del removido. Estos estudios concluyen que se pueden obtener vinos espumosos similares sin alteración de la turbidez ni de las temperaturas de fermentación. Estas nuevas tecnologías requieren de gran especialización técnica, y de un tiraje en condiciones casi estériles para evitar el desarrollo de levaduras contaminantes que serían difíciles de eliminar. Todos estos requerimientos resultan caros y no aplicables a los procesos de elaboración estándar utilizados en las bodegas.

Una vez que se han llenado y tapado herméticamente las botellas con la mezcla del vino base y licor de tiraje, se depositan en la bodega “en rima” (horizontalmente), y así comienza a producirse la segunda fermentación. Las condiciones más adecuadas para que se produzca una segunda fermentación correcta son: temperatura controlada (no mayor a 15°C), ausencia de corrientes de aire y de olores extraños, protección de la luz (especialmente los rayos UV) y humedad relativa baja, condiciones que se registran generalmente en las bodegas.

Finalizada la segunda fermentación, que se controla midiendo la presión de botellas testigo mediante un afrómetro, las levaduras pierden viabilidad, se depositan en el fondo y mueren.

A partir de este momento empieza la fase de añejamiento o crianza en contacto con las borras o lías. Esta etapa en ambiente reductor, es conocida como **crianza sobre lías** o sobre **borras**. La definición de “lías” dada por la regulación EEC N° 337/79 establece que “...son los residuos que se forman en el fondo de los recipientes que contienen vino,

posteriormente a la fermentación, durante su almacenamiento...” (Pérez-Serradilla & de Castro, 2008).

La crianza sobre lías es una técnica de envejecimiento tradicional para la crianza de vinos blancos utilizada originalmente en las elaboraciones de vinos fermentados en barrica en Borgoña (usualmente a partir de la variedad Chardonnay) y en el envejecimiento en botella de los vinos espumantes (Champagne, Cava). En el caso de los vinos espumosos, esta etapa genera una reconocida mejoría de las características espumantes (Vanrell i Truyols, 2002).

Según la normativa para la obtención de los espumantes con Denominación de Origen Cava españoles, esta fase de rima debe tener una duración mínima de 9 meses, siendo este tiempo de hasta 5 años para las cavas de alta categoría. Las menciones “reserva” y “gran reserva” hacen referencia al tiempo en contacto con las lías. Los cavas que llevan la indicación Gran Reserva tienen un período de crianza de, al menos, 30 meses. En los 9 meses de permanencia mínima en bodega el cava no se desarrolla en su totalidad, y en los cavas jóvenes predominan todavía las características del vino base. Estos cavas tienen bastante aceptación en el mercado por su frescor, frutuosidad y menor precio.

Durante la crianza en contacto con las levaduras de la segunda fermentación se produce la ruptura y degradación de las estructuras celulares por su propia dotación enzimática que producen una serie de cambios de tipos fisicoquímicos y/o biológicos y la cesión de compuestos de las estructuras celulares productos de los fenómenos de autólisis. Numerosos autores han intentado describir y explicar el mecanismo de autólisis (Alexandre et al, 2006; Cebollero et al, 2005; Giovani et al, 2010; Pérez-Serradilla et al, 2008; Torresi et al, 2011). Las características generales del mecanismo propuesto son: primero debido a la degradación de las estructuras celulares internas, se liberan al espacio intracelular enzimas hidrolíticas que inicialmente están inhibidas por inhibidores citoplasmáticos específicos, que posteriormente son degradados provocando activación de estas enzimas proteolíticas. Luego, productos de hidrólisis generados por esta actividad enzimática intracelular sobre las macromoléculas, se acumulan. Cuando los poros de las paredes de las células son suficientemente grandes, los productos de

autólisis son liberados al ambiente extracelular y finalmente ocurre degradación de los polímeros de alto peso molecular en otros de menor peso molecular.

La pared celular de las *Saccharomyces cerevisiae* de aproximadamente 10 nm de espesor, está compuesta por polisacáridos (85%) y proteínas (15%); los polisacáridos incluyen principalmente glucanos, y manoproteínas (Giovani et al., 2010). Las manoproteínas son glicoproteínas, con un 5-20% de porción peptídica y un 80-95% fracción glicosilada, principalmente manosa (Ribéreau-Gayón et al, 2008); constituyen un 35-40% de la pared celular de las *Saccharomyces cerevisiae* ubicadas en la parte más externa de esta pared (Klis et al, 2002). Al pH de los vinos, las manoproteínas exhiben carga negativa (Caridi, 2006). Numerosos estudios han demostrado el efecto positivo de las manoproteínas en las propiedades sensoriales de los vinos y la mejora de las propiedades espumantes de los vinos espumosos (Quirós et al, 2012). En la Figura I-6 se representa el esquema de manoproteínas (a) *O*-glicosiladas; (b) *N*-glicosiladas (Blasco et al, 2011).

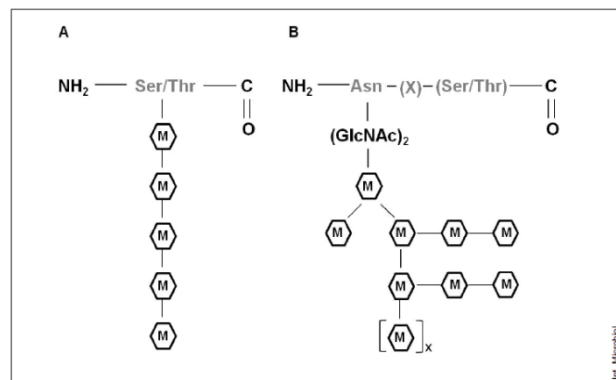


Figura I-6 Esquema de la glicosilación de las manoproteínas (a) *O*-glicosiladas; (b) *N*-glicosiladas. Asn=asparagina; GlcNAc=N-acetilglucosamina; Ser=serina; Thr=treonina; X=aminoácido; M= manosa (Blasco et al., 2011).

Las manoproteínas contienen cadenas de manosa unidas por asparagina (mediante un puente de di-N-acetil quitobiosa) o a residuos de treonina o serina; las *O*-glicosiladas tienen cadenas cortas generalmente formadas por 5 residuos de manosa (a); el resultado final es un manoproteínas con más de 200 residuos de manosa, *N*-glicosiladas unidas en cadenas de uniones 1,2- α manosa que finalizan en 1,3- α -residuos de manosa. Nuñez et al, (2005) reportaron que manosa es el principal componente de los

polisacáridos liberados por cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, y su presencia ha sido correlacionada con mejores propiedades espumantes.

La dotación enzimática que las levaduras poseen asociadas a la pared celular o alojadas en el espacio periplasmático, incluyen endo y exo- β -glucanasas del tipo 1,3 y 1,6, con actividad en las borras luego de la muerte celular, muchos meses después de finalizada la fermentación. Estas enzimas endógenas intervienen en los procesos de autodisolución de la pared celular (Ribéreau-Gayón et al., 2008), permitiendo la liberación de los componentes del interior celular al medio (Figura I-7). Factores ambientales tales como temperatura, fuente de carbono, niveles del contenido inicial de coloides en el medio, influyen en la cantidad de polisacáridos liberados al medio (Alexandre et al, 2006; Giovani et al., 2010).

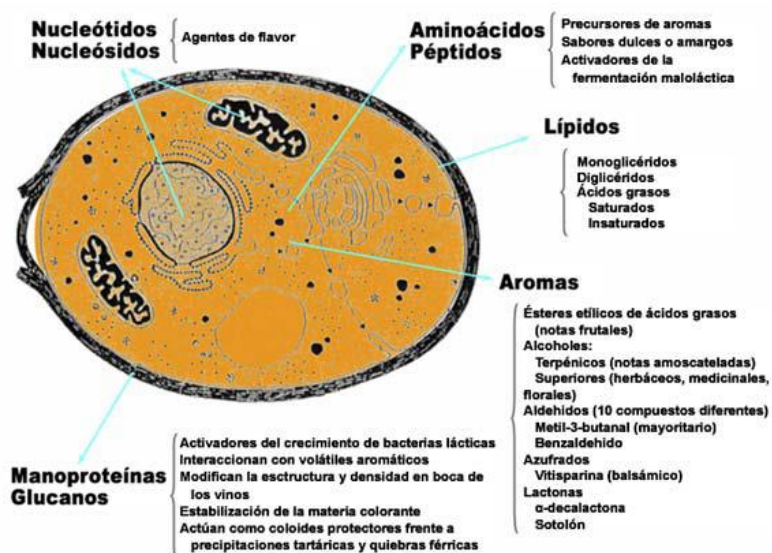


Figura I-7 Componentes celulares liberados al medio por autólisis durante la crianza sobre lías. (Morata et al, 1998)

La crianza sobre lías es una práctica onerosa y complicada ya que implica la inmovilización de los stocks y una importante dedicación de los recursos de la bodega (Zamora Martín, 2005), motivo por el cual las líneas de investigación en biotecnología están diseñando procesos que aceleren los procesos naturales de autólisis (Torresi et al, 2011).

Junto con la toma de espuma, el **removido** es una de las etapas más características del método *champenoise*. El removido tradicional se realiza de forma manual. Para ello se colocan las botellas en pupitres, que son tableros de madera horadados y articulados en la parte superior en forma de uve invertida (Figura I-8). El pupitre se desplaza paulatinamente de manera que las botellas finalmente quedan en punta (de cabeza) y los sólidos quedan acumulados en el pico de las mismas.

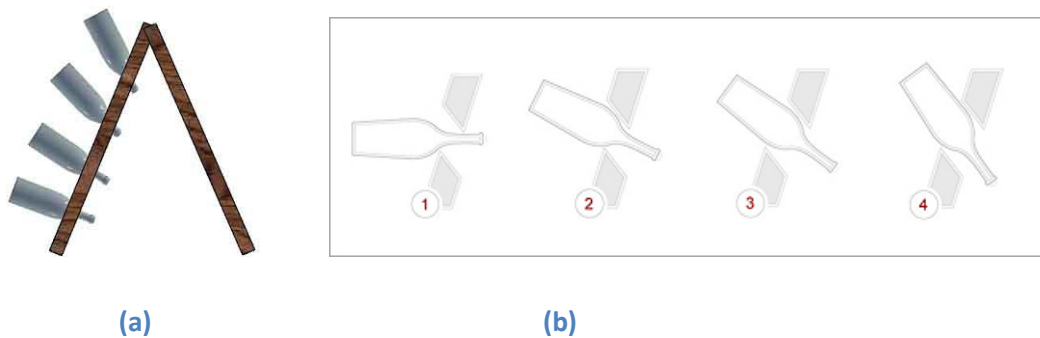


Figura I-8 (a) Pupitres utilizados para el removido de las borras en la elaboración de espumantes por el método tradicional. (b) Evolución de la posición de las botellas en pupitre desde su posición inicial (1) hasta que quedan en punta (4).

En los pupitres, como se visualiza en la figura I.8 (b) partiendo de una posición casi horizontal en el proceso tradicional, se le da cada día un octavo de vuelta mediante un giro manual; esta fase se considera completa cuando la botella en el avance hacia la verticalidad ha girado dos veces sobre su eje (en diferentes sentidos) produciendo el desplazamiento de los sólidos (levaduras inactivas y residuos de la segunda fermentación) hacia el cuello de la botella para ser eliminadas posteriormente.

Para eliminar los sólidos acumulados en el cuello de la botella en la fase de rima, se ejecutan un conjunto de operaciones que se conocen como **degüelle**: se congela el cuello, se elimina la tapa corona y el obturador de plástico (opérculo), de manera que la presión interna del espumante expulsa los sedimentos congelados. La presión interior del espumante disminuye. Es inevitable que se pierda algo de espumante en esta etapa, por lo que se completa el producto perdido en el degüelle con el “licor de expedición”. El licor de expedición en general contiene vino, SO_2 y azúcar. La cantidad de azúcar

residual que contenga el espumante define los diferentes tipos de vinos espumantes que se encuentran en el mercado (Resolución Nº C. 6/2013 Instituto Nacional de Vitivinicultura):

- a) Nature: menos de 3 g/l
- b) Brut Nature: menos de 7 g/l
- c) Extra Brut: menos de 11 g/l
- d) Brut: menos de 15 g/l
- e) Demi Sec: de 15 a 40 g/l
- f) Dulce: más de 40 g/l
- g) Extra Dulce: más de 60 g/l

Luego del llenado de las botellas se procede a su cierre definitivo, y para ello se debe utilizar un tapón que garantice las mínimas pérdidas de anhídrido carbónico y que sea prácticamente inerte, es decir, que no ceda sustancias extrañas. Se utilizan tapones de corcho por su bajo coeficiente de permeabilidad gaseosa y su gran elasticidad. Este tapón especial (llamado de expedición) es cilíndrico, tiene una longitud de casi 5 cm, se suele introducir en casi sus dos terceras partes y cuando se abre la botella para su consumo habrá adquirido una forma de seta con la base más grande.

Una vez separadas las levaduras y adicionado el licor de expedición comienza la vida comercial del espumante. Empíricamente los enólogos saben que el tiempo de vida comercial es un factor que juega en contra de la calidad organoléptica del producto, ya que las condiciones de almacenamiento y distribución no pueden ser controladas por la bodega.

Si un vino espumante se deja sobre sus lías después de que la autólisis haya finalizado, simplemente permanece más fresco que un vino que haya pasado por el degüelle antes, sin embargo, cuanto más tiempo permanezca así, más rápida será su evolución después del degüelle. Esto ocurre porque, cuanto más envejece un espumoso, más sensible se vuelve a ser expuesto al aire durante el proceso de degüelle (Ribéreau–Gayón et al., 2008).

I.3 Las burbujas de los espumantes

Las burbujas son, sin duda, LA característica distintiva de los espumantes.

La formación y liberación de burbujas al servir una copa de champagne fascina a los consumidores desde los tiempos de Dom Perignon. Otros aspectos como el sabor y el aroma desempeñan un papel muy importante, pero son la efervescencia y la persistencia de la espuma los atributos particulares de los vinos efervescentes y, por tanto presentan una importancia capital en su evaluación organoléptica (Maujean et al, 1990; Moreno-Arribas et al, 2000; Obiols et al, 1998; Pozo-Bayón et al., 2009). La formación de un collar estable de burbujas es considerada por los consumidores como un criterio de calidad fundamental (Brissonet & Maujean, 1993).

Por otro lado, la efervescencia y la espuma no son únicamente atributos visuales ligados a la belleza de un vino, sino que influyen de manera significativa sobre las sensaciones que se perciben en el paladar (Vanrell i Truyols, 2002); el tamaño de las burbujas puede afectar la liberación de aromas y la percepción en boca (Liger-Belair et al, 2006).

Una bebida refrescante gasificada, con una efervescencia tumultuosa y de grandes burbujas, origina en boca una sensación de agresividad. Del mismo modo, perderá rápidamente su efervescencia, a causa del rápido escape de gas observado en este tipo de productos (bebidas gasificadas). Por el contrario, un vino efervescente de calidad presentará en boca un agradable cosquilleo acompañado de una agradable sensación de untuosidad provocada por la espuma. Además, su efervescencia tendrá que ser suficientemente persistente para mantener estas sensaciones el tiempo necesario para degustar tranquilamente la copa.

Es fundamental conocer y comprender el proceso de formación de las burbujas al servir una copa de espumante, los fenómenos físicos que las originan, que provocan su liberación y ascenso en línea recta hacia la interfase, así como identificar los factores que afectan la formación de espuma, para decidir en el proceso de elaboración sobre las condiciones de proceso que favorezcan la obtención de los mejores espumantes.

I.3-1 Físicoquímica de las burbujas.

Gran parte del conocimiento generado en esta área es debida a los estudios desarrollados por Liger-Belair y su grupo de investigación, reportados en numerosos trabajos científicos, libros y publicaciones en revistas especializadas (M. Á. Pozo-Bayón, Martínez-Rodríguez, Pueyo, & Moreno-arribas, 2009).

Un espumante es un sistema de dos fases: una gaseosa dispersa en una líquida continua. Esta fase líquida es una solución acuosa compleja químicamente, conteniendo etanol y sustancias tensoactivas entre otras, que provocan interacciones y dan lugar a fenómenos físicos que afectan la formación, difusión y arrastre de las burbujas.

La fase gaseosa es el CO₂ producido durante la segunda fermentación en botella, por acción de las levaduras sobre la sacarosa agregada en el licor de tirage, que se acumula y progresivamente se integra a la masa de fluido. De acuerdo con la ley de Henry - ecuación (2)- la presión de vapor generada está directamente relacionada al contenido de dióxido de carbono:

$$c = k_H P_{CO_2} \quad (2)$$

c es la concentración de CO₂ disuelta, P_{CO_2} es la presión parcial del CO₂ en la fase vapor, y k_H es la constante de la ley de Henry, que para un gas determinado, depende de la temperatura, cuanto más baja la temperatura, mayor es la constante, y por lo tanto mayor la solubilidad (Liger-Belair et al, 2002). La solubilidad de un gas depende de la temperatura; empíricamente se encontró una relación del CO₂ disuelto en función de la temperatura y otros parámetros del vino, usada ampliamente por los elaboradores de champagne (Agabalianz, 1963). La constante de la ley de Henry k_H varía con la temperatura, como se muestra en la ecuación (3), por medio de la expresión tipo Van't Hoff:

$$k_H = k_{298} e^{\left[-\frac{\Delta H_{dis}}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{298}\right)\right]} \quad (3)$$

Donde k_{298} es la constante de Henry a la temperatura de referencia ($\approx 1,21 \text{ gl}^{-1}\text{bar}^{-1}$), ΔH_{dis} es la entalpía de disolución del CO₂ en el medio, R la constante general de los

gases y T la temperatura absoluta. Los datos obtenidos por Agabalianz ajustaron en la ecuación con un valor del $\Delta H_{dis} \approx 24800 \text{ Jmol}^{-1}$, comparada con la del agua pura que resulta 19900 Jmol^{-1} (Liger-Belair, 2012).

La ecuación de los gases ideales (4) aplicada dentro de la botella:

$$PV = nRT \quad (4)$$

Siendo P= presión; V=volumen; n= número de moles, R=constante de los gases; T= temperatura absoluta.

Combinando esta ecuación con la expresión de la ley de Henry, permite estimar el volumen de CO₂ liberado al descorchar una botella de espumante. Por lo tanto, una botella de 750 ml de espumante, contiene aproximadamente 9,0 g de CO₂ disueltos, representan 5 litros de gas que deben liberarse, prácticamente 6 veces su propio volumen. Este volumen resulta sorprendente y asumiendo que una copa típica de espumante tiene una capacidad de 0,1 l, entonces se liberarán de la copa 0,6 l de CO₂ gaseoso hasta alcanzar el equilibrio; considerando que las burbujas tienen un diámetro promedio de 500 μm , aproximadamente se formarán unas 10 millones de burbujas (Liger-Belair et al, 2005).

En el interior de la botella se establece un estado de equilibrio termodinámico entre el gas disuelto (a la presión de trabajo de aproximadamente 6 atmósferas en champagnes tradicionales), y la fase vapor en el espacio de cabeza bajo el corcho. Cuando se destapa la botella la presión del CO₂ cae abruptamente en la fase vapor y el sistema tiende a un nuevo estado de equilibrio (Figura I-9), por lo cual el espumante se desgasifica, generándose así la efervescencia que caracteriza los espumantes.

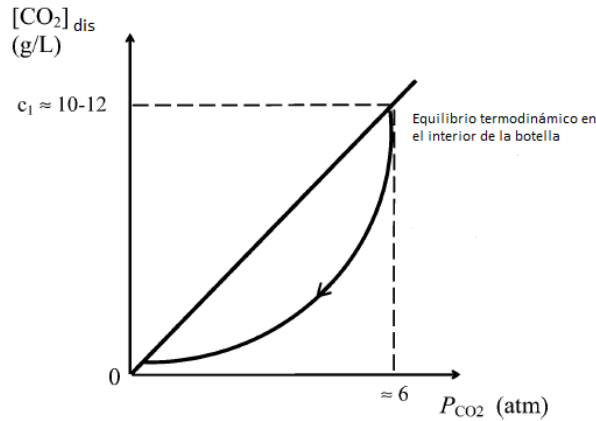


Figura I-9 Representación gráfica de la ruptura del equilibrio termodinámico al destapar una botella de espumante, que se desgasifica hasta alcanzar un nuevo estado de equilibrio a presión atmosférica.

Lubetkin y Blackwell (1988) definen la relación de supersaturación (s) mostrada en la ecuación (5):

$$s = \frac{C_E}{C_o} - 1 = \frac{P_E}{P_0} - 1 \quad (5)$$

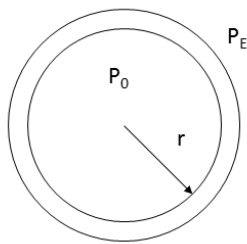
siendo C_E la concentración de CO_2 en el seno del líquido, y C_o la concentración en el equilibrio a la presión atmosférica; P_E y P_0 son las presiones en equilibrio en la fase de vapor, en la botella y cuando se destapa la misma, determinadas por la ley de Henry. Cuando $s > 0$, el medio está sobresaturado, por lo tanto se encuentra en equilibrio metaestable y debe desgasificarse para recuperar la relación de supersaturación igual a cero. En el caso de champagne y cava, después que se descorcha la botella, C_E es la concentración en equilibrio a una presión parcial aproximada de 6 atm, por lo tanto $\frac{C_E}{C_o} \approx 6$ y la relación de supersaturación es igual a 5.

La pérdida progresiva del gas carbónico (y de los compuestos orgánicos volátiles que arrastra) se produce por dos vías: a) difusión “invisible” a través de la interfaz plana, libre, en la parte superior de la copa y b) la formación de burbujas en el interior de la copa, la tan admirada “efervescencia”. Estudios recientes han comprobado que en una

copa clásica de cristal, solamente el 20% de las moléculas de CO₂ escapan en la forma de burbujas, mientras que el resto escapa directamente a través de la superficie libre del champagne (Liger-Belair et al, 2010).

I.3-2 Formación de una burbuja

Los líquidos tienen a adoptar formas que minimizan su superficie, de modo que el mayor número de moléculas en el interior de la fase están rodeadas por moléculas vecinas e interactúan con ellas. Una burbuja es una región en la cual el gas está atrapado por una delgada lámina; las burbujas poseen dos superficies, una de cada lado de la lámina (figura I.9). La presión del lado cóncavo de una interfase (P₀) siempre es mayor que la presión del lado convexo (P_E). Esta relación expresada en la ecuación (6) corresponde a la ley de Laplace (Atkins & De Paula, 2008):



$$\Delta P = P_0 - P_E = \frac{2\sigma}{r} \quad (6)$$

$$P_0 > P_E$$

Una burbuja en un medio líquido está en equilibrio cuando la tendencia de su superficie a disminuir (ya que tiende a la menor relación superficie/volumen) se equilibra con el aumento de la presión interna que ella produce.

La “vida” de una burbuja en un vino espumante pasa por varias etapas o ciclos: nacimiento, deadsorción, ascensión en el líquido y finalmente explosión en la superficie que se esquematizan en la Figura I-10:

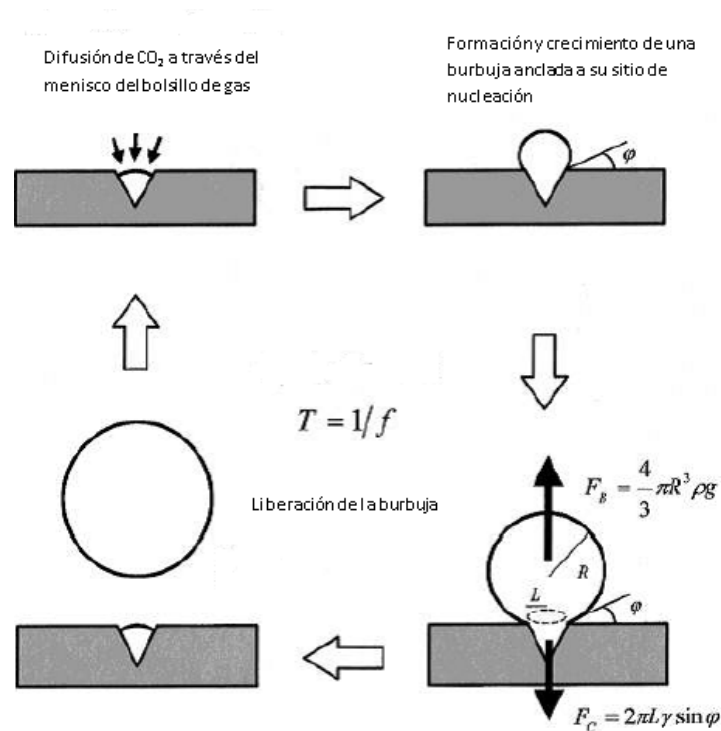


Figura I-10 Ciclo de formación de una burbuja por nucleación heterogénea (adaptado de Liger-Belair et al, 2002).

I.3-2.i Nucleación

La formación de una burbuja, o sea la generación de una interfase gas-líquido, requiere separar moléculas de gas superando la enorme fuerza de tensión superficial (Jones et al, 1999), para lo cual se requiere energía, según la ecuación (7):

$$dE = \sigma dA \quad (7)$$

Donde σ es la tensión superficial, cuyas dimensiones son obviamente, energía por unidad de superficie. Las moléculas en la superficie recién formada no están en situación de energía mínima y tienden a reducir su superficie tanto como sea posible (Voisin et al, 2005).

Combinando las expresiones de la ley de Henry (ecuación (2) la definición de la relación de supersaturación (ecuación (5) y la ley de Laplace (6), se obtiene la expresión

$$\Delta P = P_0 - P_E = k_H(C_0 - C_E) = P_E \left(\frac{C_0}{C_E} - 1 \right) = P_E S$$

$$\Delta P = \frac{2\sigma}{R} \text{ resulta: } P_{ES} = \frac{2\sigma}{R}$$

De esta forma podemos observar que el *radio crítico* para que se produzca nucleación, para cualquier relación de supersaturación en el medio, queda expresada por medio de la ecuación (8) :

$$R = \frac{2\sigma}{P_{ES}} \quad (8)$$

Jones et al, (1999) han propuesto una clasificación de los tipos de nucleación en cuatro áreas que abarcan: I) nucleación homogénea clásica; II) nucleación heterogénea clásica; III) nucleación pseudo clásica; IV) nucleación no clásica. Las dos primeras involucran sistemas completamente libres de cavidades de gas pre-existentes previos a la supersaturación del sistema, para que ocurra nucleación homogénea se requieren relaciones de sobresaturación muy elevadas, $s > 100$ o mayor (Wilt, 1986). El tercer tipo hace referencia a sistemas que cuando se vuelven supersaturados con cavidades de gas que presentan un radio de curvatura del menisco es menor que el radio crítico de nucleación, y el tipo IV se aplica a sistemas supersaturados con cavidades de gas cuyos radios de curvatura son mayores que un valor crítico, con probabilidad de actuar como sitios de nucleación. La formación de burbujas en líquidos con bajas relaciones de supersaturación ha sido clasificada como nucleación no clásica heterogénea de tipo IV por (Jones et al., 1999). En estos casos la nucleación ocurre en cavidades de gas preexistentes (Figura I-11), que se forman durante el llenado de las copas (Voisin, 2005). Cuando se sirve una copa con una bebida carbonatada, el líquido moja las paredes sólidas, numerosas partículas son capaces de “atrapar” burbujas de gas durante el llenado de las copas. La mayoría de estas partículas son fibras de celulosa, (más o menos cilíndricas que quedan adheridas a las paredes de las copas procedentes del proceso de secado o de la atmósfera) con una cavidad central (llamada lumen) donde queda atrapado el “bolsillo” de gas (Senee et al, 1998; Voisin, 2005). Ese sitio, ofrece una interfaz al CO₂ disuelto que difunde debido al gradiente de concentración hacia el bolsillo de gas (Figura I-10), haciendo crecer una burbuja, hasta alcanzar el extremo de la fibra (Liger-Belair et al., 2000).

Las fuerzas que actúan sobre la burbuja en formación que se muestran en la Figura I.10: la de empuje o flotación $F_E = \frac{4}{3}\pi r^3 \rho g$ y la de capilaridad $F_C = 2\pi L \sigma \cos \varphi$ Donde: r es el radio de la burbuja; ρ es la densidad del fluido; g es la aceleración de la gravedad σ es la tensión superficial y φ es el ángulo de contacto.

Cuando la fuerza de empuje supera a la componente vertical de la fuerza que mantiene anclada la burbuja a la cavidad, entonces se libera una burbuja

El bolsillo de gas que queda remanente retrocede hasta su posición inicial, y otra burbuja crece repitiendo el ciclo anterior.

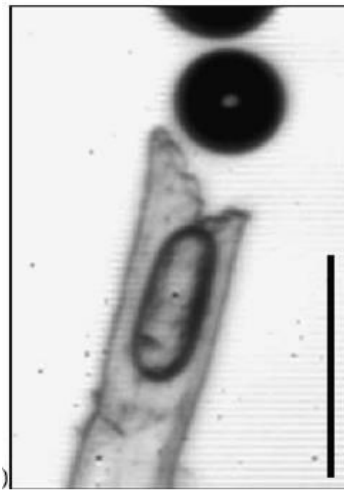


Figura I-11 Imagen de una fibra de celulosa con un bolsillo de gas atrapado en el lumen, actuando como sitio de nucleación (Voisin et al., 2005a).

Comienza así en estos sitios de nucleación la producción de burbujas, desprendimiento repetitivo y periódico de burbujas que ascienden en línea recta formando elegantes trenes. Cada sitio de nucleación se caracteriza por la frecuencia con que se liberan las burbujas, parámetro que depende de las características geométricas del sitio de nucleación así como de la relación de supersaturación (Liger-Belair et al., 1999). Al transcurrir el tiempo, la relación de supersaturación disminuye debido a la liberación de dióxido de carbono, por lo tanto el radio crítico de nucleación aumenta y cuando supera el tamaño del menisco de una microcavidad, cesa la nucleación en ese sitio (Jones et al., 1999).

En champagnes se ha observado una amplia distribución de frecuencias en una misma copa, registrándose frecuencias de hasta 30 Hz (Liger-Belair et al, 2001).

1.3-2.ii Ascenso de las burbujas

Ya en el siglo XVI Leonardo de Vinci estudió la velocidad de las burbujas en ascensión en función de su tamaño y en diferentes matrices líquidas.

Una vez liberada una burbuja, asciende hacia la superficie en línea recta, y mientras asciende se expande. Hay difusión de CO₂ desde el líquido hacia la fase vapor, a través de la interfaz. Como el proceso es periódico, una burbuja asciende en un tren, formado por burbujas que se han liberado a un ritmo constante que, como se explicó anteriormente, depende del sitio de nucleación.

Todo cuerpo inmerso en un fluido experimenta además de la fuerza de empuje, una fuerza de resistencia o de arrastre viscoso, $F_D = \frac{1}{2} C_D \rho v^2 A$ debido a los choques de las partículas de fluido, que es proporcional a la densidad de energía cinética del fluido y a la superficie expuesta de la burbuja: ρ densidad del fluido, A la superficie de la burbuja, v la velocidad de ascenso de la burbuja y C_D el coeficiente de arrastre viscoso. El coeficiente de difusión del CO₂ (C_D) puede estimarse a través de la ecuación de Stokes-Einstein: $C_D \approx \frac{k_B T}{6\pi\rho a}$; donde k_B es la constante de Boltzmann; T es la temperatura absoluta, ρ es la densidad del fluido y a es el orden de magnitud del radio hidrodinámico de las moléculas de CO₂ ($\approx 10^{-10}$ m).

Las predicciones teóricas sobre el flujo de burbujas en el seno de un líquido de baja viscosidad, no describen adecuadamente el ascenso de las burbujas de espumantes. Se ha reportado que en fluidos con sustancias surfactantes (etanol, proteínas, polisacáridos), que modifican la estabilidad de la interfase, se genera el “efecto Marangoni”, mencionado por primera vez en 1885, (Tadmor, 2009). Las sustancias con acción superficial se acumulan progresivamente en la parte posterior de las burbujas, generan un gradiente de tensión superficial entre la parte frontal y posterior que provoca cambios en las condiciones límites (Figura I-12) y la burbuja se mueve como si

tuviera una superficie sólida, suprimiendo el movimiento de la superficie, las burbujas se comportan más bien como esferas rígidas, debido a la influencia de los compuestos surfactantes (Liger-Belair, 2005; Voisin, 2005).

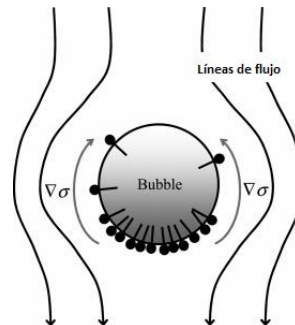


Figura I-12 Variación del estado de la superficie de una burbuja durante su ascenso por acumulación de sustancias surfactantes en su parte posterior

Este fenómeno provoca cambios en el régimen de flujo de las burbujas durante su ascenso, desde un comportamiento que podría describirse como el de una esfera rígida, hasta uno que se puede modelizar como de una esfera fluída (Liger-Belair et al, 2003; Liger-Belair, 2005; Voisin et al., 2005).

1.3-2.iii Ruptura de las burbujas

Una burbuja de champagne llega a la superficie con un tamaño que depende de la distancia recorrida y del sitio de nucleación donde se origina (Voisin et al., 2005a). La forma de la burbuja se verá afectada por el balance entre las fuerzas de empuje y las de capilaridad que tienden a mantenerla ligada a la fase líquida. En la Figura I-13 se visualiza como una burbuja emerge de la superficie, como un iceberg, manteniendo la mayor parte de su volumen dentro del líquido.

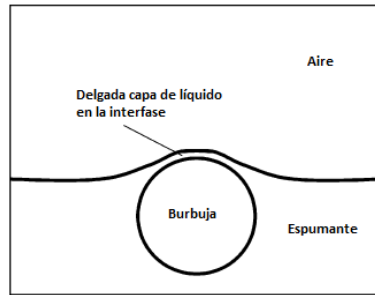


Figura I-13 Esquema de una burbuja emergiendo en la superficie (adaptada de Liger-Belair, 2005).

Las espumas correspondientes a dispersiones gas-líquido son sistemas inestables. En la destrucción de la espuma participan dos fenómenos: por un lado el drenado, porque la fuerza de gravedad hace descender al líquido contenido en la espuma hacia la masa de la solución; cuando se produce esta bajada adelgaza la película del líquido que separa a las burbujas y disminuye la resistencia de esta película. Por otro lado la coalescencia de las pequeñas burbujas de gas dan origen a burbujas de mayor tamaño después de la ruptura de la película (Flanzy, 2002).

La superficie de la burbuja de la parte que emerge, es una fracción semiesférica que se vuelve cada vez más fina por el drenaje de líquido, hasta que finalmente explota (Figura I-14). El vacío que se genera, provoca el colapso de la parte sumergida proyectando al aire gotitas en forma de chorro (Liger-Belair, 2005), varios centímetros por encima de la superficie líquida:

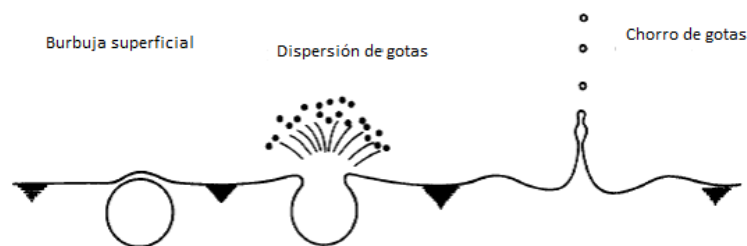


Figura I-14 Esquema de gotas liberadas por explosión de una burbuja (adaptada de Liger-Belair, 2005)

La efervescencia resultante se comporta como un verdadero revelador de aromas pues las burbujas contienen, junto con el dióxido de carbono, compuestos odoríferos (Marchal et al., 1996; Maujean et al., 1990) .

I.3-3 Factores que afectan la formación de burbujas

Una vez obtenido un espumante, muchos factores están implicados en la cinética de la efervescencia, factores intrínsecos, debidas al producto y factores externos debidos al ambiente y condiciones de degustación.

I.3-3.iv Factores intrínsecos

La estructura de la espuma depende de la constitución del vino base, de su poder espumante debido a su composición química, de las propiedades física, de las condiciones de proceso durante la toma de espuma y envejecimiento sobre lías, de la temperatura del vino (Peynaud & Blouin, 1997). Varios parámetros fisicoquímicos del espumante afectan la liberación progresiva del dióxido de carbono (Liger-Belair, 2012), entre ellos los factores que intervienen en la formación de las burbujas son viscosidad, tensión superficial y composición química.

Las primeras investigaciones en las propiedades espumantes de los vinos tipo champagne han establecido una correlación positiva entre el contenido de proteínas y la espumabilidad y estabilidad de la espuma (Malvy et al., 1994; Maujean et al., 1990).

La estabilidad de las interfases líquido/gas ya sea con aire (en la superficie) o CO₂ (en el seno del líquido) está ligada a la presencia de partículas coloidales en solución (Senee et al., 1998), que afectarán el aspecto global de la espuma. Los compuestos con propiedades tensioactivas que producen una disminución de la tensión superficial involucran a moléculas pequeñas, como el etanol, glicerol y algunos ácidos grasos y otras moléculas más grandes como aminoácidos, polisacáridos, proteínas, lipoproteínas y glicoproteínas. Todos estos compuestos presentan en sus estructuras, un grupo hidrofóbico y otro hidrofílico, que determinará su orientación en las interfases vino/gas. Numerosos estudios han vinculado la composición química del vino base y espumante

con la calidad de la espuma (Andres-Lacueva, et al., 1996; Dussaud, et al., 1994; López-Barajaset al., 1997; Malvy et al., 1994; Marchal et al., 2001; Maujean et al., 1990; Moreno-Arribas et al., 2000; Robillard et al., 1993; Pueyo et al., 1995).

Entre las sustancias activas sobre la espuma, las proteínas juegan un rol principal debido a sus propiedades superficiales (M.V. Moreno-Arribas et al., 2000). Las proteínas actúan como sustancias tensioactivas, permitiendo la estabilidad de la espuma y parecen contribuir a la elasticidad y firmeza del film (Malvy et al., 1994). Varios autores han encontrado una estrecha relación entre concentración de proteínas y estabilidad de la espuma en vinos espumantes (Brissonet & Maujean, 1993; Pueyo et al., 1995). Por su carácter hidrofóbico una proteína puede ser adsorbida en la interfase líquido-gas sobre la “piel de una burbuja” modificando la tensión superficial y estabilizando las mismas. Parece que las proteínas activas sobre la efervescencia poseen puntos isoeléctricos cercanos al pH de los vinos (de 2,5 a 3,9); esta característica no es favorable para la solubilidad pero aumenta así el carácter hidrofóbico” (Ribéreau-Gayón et al., 2008).

Las consecuencias comerciales de las propiedades de la espuma son muy importantes; el conocimiento de los factores que influyen en la formación de burbujas y en la estabilidad de la espuma permite tomar decisiones y actuar sobre el proceso de elaboración del espumante.

1.3-3.v Factores extrínsecos

Entre los factores externos que afectan la formación de espuma se destacan la temperatura del espumante, la forma de la copa, la forma de llenado de la copa.

El efecto de la temperatura sobre la solubilidad de un gas es fácilmente comprensible, recordando el efecto sobre la constante de la ley de Henry expresado en la ecuación.... A mayor temperatura del espumante menor la solubilidad del dióxido de carbono, que será liberado al ambiente de forma rápida y por lo tanto la espuma generada será abundante inicialmente pero efímera. La temperatura modifica la viscosidad del medio,

siguiendo un comportamiento de Arrhenius (Liger-Belair, Parmentier, & Cilindre, 2012) que se muestra en la ecuación (9) :

$$\eta(T) \approx 1,08 \times 10^{-4} e^{\left(\frac{2806}{T}\right)} \quad (9)$$

La viscosidad influye en la velocidad de desprendimiento de burbujas, un aumento de temperatura de 10 K (suponiendo de 278 a 288 K, rango aproximado de variación durante la degustación de una copa de espumante- incrementa la frecuencia teórica de formación de burbujas en un 50% (Liger-Belair, Polidori, & Jeandet, 2008).

Durante el proceso de llenado de una copa, la superficie libre aire/espumante aumenta considerablemente mientras el espumante fluye como una lengua líquida, en régimen altamente turbulento, exponiendo una enorme interfaz en poco volumen, atrapando aire que contribuye a la difusión del CO₂ disuelto hacia el ambiente (Liger-Belair, Villaume, Cilindre, & Jeandet, 2010a). El espumante es agitado y mezclado durante el proceso de servido, se forman remolinos de diferentes tamaños en la matriz líquida que contribuye también a las pérdidas del CO₂ disuelto.

Liger Belair et al (2010) han estudiado el impacto de las formas de llenado sobre la liberación del CO₂ comparando dos maneras de servir las copas (Figura I-15): la tradicionalmente usada en fiestas, bares y restaurants, “tipo champagne”, en las que el espumante se vierte verticalmente desde la botella, sobre la copa, apoyada sobre su base, de manera que el líquido golpea en el fondo de la copa y la modalidad que denominaron “tipo cerveza”, el espumante fluye sobre la pared de la copa inclinada, desde la botella que también se inclina sobre la copa mientras el eje de simetría de la copa lentamente recupera su posición vertical durante el servido. Obviamente, esta última forma de llenar las copas es menos turbulenta y genera menor cantidad de espuma. Según estos autores, cuando se sirve el espumante del modo “tipo champagne” se pierde la misma cantidad de CO₂ durante el llenado que durante los 10 minutos siguientes, por lo que resulta más apropiada para retener mayor cantidad de CO₂ durante la degustación y prolongar el período de formación de trenes de burbujas por más tiempo, optar por el modo de llenado tipo cerveza.

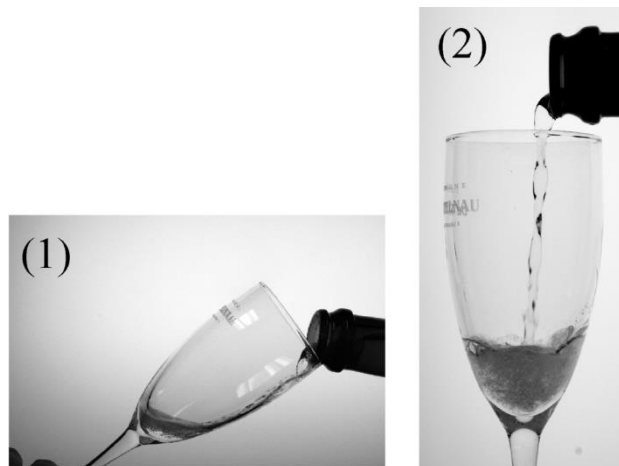


Figura I-15 Formas de servir una copa de espumante:(1) Tipo cerveza. (2) Tipo champagne. (Fotografías adaptadas de Liger-Belair et al, 2010).

El tipo de copa utilizada para la degustación también afecta la formación y liberación de burbujas. Durante años se han utilizado dos tipos de copas: la copa chata, que en festejos se colocaban una encima de la otra, y se servían desde la parte superior, en cascada, generando un espectáculo tipo “fuente” de alta turbulencia y generación de espuma. En las actuales copas utilizadas para el servicio de espumantes, la tipo flauta, el espectáculo consiste en observar la rítmica y prolongada formación de trenes de burbujas que ascienden hacia la superficie libre, arrastando compuestos orgánicos volátiles responsables del aroma y sabor que se liberan al colapsar y estallar en la superficie libre. Liger-Belair et al, (2012) han monitoreado el CO₂ y etanol sobre la superficie libre en ambos tipos de recipientes durante 15 minutos siguientes al llenado de las copas, utilizando cromatografía micro gaseosa (μ GC) y encontraron mayor concentración de dióxido de carbono por encima de la copa tipo flauta que la copa más baja, confirmado por una técnica de visualización basada en tecnología infrarroja.

I.4 Estudio de la espuma

Entre los componentes que le dan identidad y calidad a un alimento, están las burbujas de gas (Aguilera, 2005). Las espumas son extensamente utilizadas en novedosos productos alimenticios, entre los cuales se incluyen la amplia variedad de bebidas carbonatadas, sidras, cervezas y espumantes.

Diversos y variados métodos se han reportado para describir y cuantificar las espumas, basados en el análisis de imágenes, evaluación sensorial, entre otros métodos que se desarrollan para aplicaciones específicas, en función de las características particulares de la espuma alimentaria que se estudie.

I.4-1 Análisis de imágenes

El empleo de técnicas de procesamiento de imágenes para la evaluación de la calidad de alimentos y el estudio de la microestructura de alimentos ha cobrado relevancia en general en los últimos años y su uso se ha extendido; se han reportado aplicaciones en el control de calidad de frutas, pescados, granos, carnes, entre otros (Aguilera & Briones, 2000; Briones & Aguilera, 2005; Du & Sun, 2004, 2006; Zheng, Sun, & Zheng, 2006).

Una imagen es una función en dos dimensiones $f(x,y)$, donde (x,y) son las coordenadas planas y la amplitud de cada par de coordenadas se conoce como nivel o intensidad de gris de la imagen en ese punto. Cuando las coordenadas y f son cantidades discretas, se trata de una imagen digital, y se puede representar por una matriz de M filas y M columnas. Cada elemento de una imagen digital se llama píxeles; por lo tanto una matriz contendrá MxN píxeles (R. C. Gonzalez & Woods, 2011). Usualmente hay 256 niveles de grises en cada píxel, correspondiendo el valor 0 al color negro y 255 al blanco. La resolución espacial corresponde al nivel de detalle en el cual está representada la imagen; a mayor cantidad de píxeles se puede describir una imagen con mayor fidelidad (Aguilera, 2007).

El análisis de las imágenes digitales consiste en general de las etapas mostradas en la Figura I-16: adquisición (o transformación) de la imagen a un formato digital; operaciones

de preprocesamiento para mejorar la imagen, operaciones de segmentación, operaciones de reconocimiento de objetos, mediciones y cuantificaciones de las características de los objetos seleccionados, e interpretación de los rasgos extraídos de los objetos (Aguilera & Briones, 2000).

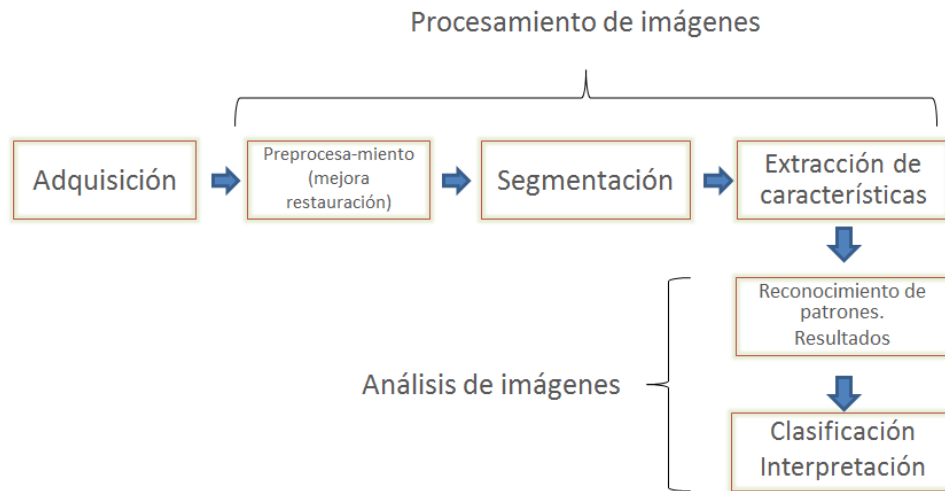


Figura I-16 Etapas del procesamiento de imágenes (Adaptado de Aguilera, 2007).

La adquisición o captura de imágenes se realiza a través de algún dispositivo analógico o digital, en el caso de ser un equipo analógico se debe disponer de un equipo que permita la transformación en formato digital de la información. Son condiciones fundamentales en esta etapa la adecuada iluminación de la muestra y la resolución del sistema de captura (Castillo Castañeda et al, 2006); imágenes logradas con alta calidad requieren tratamientos de pre-procesamiento sencillos, disminuyendo los costos y tiempos de trabajo (Aguilera, Cipriano, & Era, n.d.; Du & Sun, 2006).

Diversos sensores se han usado para obtener imágenes de productos alimenticios: cámaras con CCD (*charge coupled device*), para registrar atributos externos (tales como tamaño, forma, color, textura superficial y defectos externos) y sensores de ultrasonido, MRI (resonancia magnética por imágenes), CT (computed tomography) y ET (electrical tomography) tecnologías estas con potencial para estudiar atributos internos, tales como estructuras, distribución de agua, rupturas internas, etc. (Du & Sun, 2004).

Las cámaras con CCD pueden convertir luz en cargas eléctricas y crear imágenes de alta calidad, (alto número de píxeles) con bajo ruido, y excelente sensibilidad a la luz, libres de distorsiones geométricas y respuesta altamente lineal a la luz que perciben (Du & Sun, 2006).

Una vez capturadas, las imágenes se deben mejorar ya que generalmente están acompañadas de ruidos que pueden interferir en la detección de información. Por eso se realizan acciones de “preprocesamiento” que tienen como objetivo mejorar los datos que contienen la imagen, eliminar distorsiones o incrementar características deseadas, originando así una imagen más adecuada que la original para su posterior análisis (Du & Sun, 2004). En la etapa de preprocesamiento se pueden aplicar operaciones *puntuales* (realce, mejoramiento escalado o expansión) y/o operaciones *locales* (uso de filtros) (R. C. Gonzalez & Woods, 2011).

La siguiente etapa en el procesamiento de las imágenes (Figura I-16) es la segmentación, que consiste en dividir la imagen en regiones que pertenecen a una unidad estructural o distinguir objetos de interés para su estudio. Esta etapa es reconocida como una de las más complejas del proceso, ya que cuanto más precisa sea la segmentación mejor será el reconocimiento y medición de los atributos evaluados (R. C. Gonzalez & Woods, 2011). Las imágenes deben estar binarizadas para proceder a las operaciones que se pueden realizar en esta etapa, que incluyen: umbralización, detección de bordes, erosión, dilatación, “watershed” (entendido como “línea de unión de aguas”) (Aguilera, 2007).

La tercera etapa del procesamiento de las imágenes es la extracción y selección de características. Los parámetros a identificar se pueden clasificar en morfométricos y densitométricos. Los primeros cuantifican tamaño, formas, orientación; los métodos de medición están basados en el tamaño del píxel, referido a una escala apropiada para cuantificar estos parámetros. Los densitométricos cuantifican niveles de grises o parámetros derivados del nivel de gris (densidad óptica, intensidad, etc). La conversión de píxeles a otras escalas geométricas se realiza fácilmente calibrando con una imagen graduada apropiada al tamaño de las mediciones que se desean obtener.

Con los datos obtenidos del procesamiento de las imágenes, registrados en una planilla, se procede al análisis de las imágenes y se vuelcan a programas de cálculo para procesar los datos en forma estadística, realizar representaciones gráficas, etc. Para clasificar los datos obtenidos, se aplican tres métodos principales: estadística, lógica difusa, y redes neuronales (Du & Sun, 2004). En estas etapas la interpretación de la información se basa en el conocimiento previo del objeto de interés.

Los componentes necesarios para desarrollar un sistema de análisis de imágenes comprende: equipamiento para la captura de las imágenes (cámara, sistema de iluminación, sistema de almacenamiento de datos), procesadores y software adecuado para el procesamiento de las imágenes de los cuales hay una enorme disponibilidad en el mercado y se desarrollan y actualizan permanentemente, con aplicaciones especializadas para cada campo del conocimiento.

Image J (<http://imagej.nih.gov/ij/>) es un programa de dominio público de procesamiento de imágenes escrito en Java, desarrollada por Wayne Rasband desde 1997. Posee una arquitectura abierta que puede ser extendida por los plugins y macros, que ha sido expandida por las contribuciones de un grupo internacional. Soporta un gran número de formatos de archivos nativos o a través de extensiones de plugin, por ejemplo usando la librería Bio-Formats. Permite medir distancias y valores estadísticos de píxeles de las selecciones que interesen, generar histogramas de densidad así como aplicar funciones standard de procesamiento de imágenes tales como manipulación de contrastes, suavizamientos, detección de bordes y filtros. Las características clave de ImageJ son su soporte de diferentes modos de segmentación, la edición avanzada de imágenes, sus capacidades de filtración avanzada y procesamiento y sus comunidades de desarrollo y usuarios. También puede producir resultados en gráficas lineales y de superficie. Los tipos de mediciones básicas son: áreas, diámetros, perímetros, ángulos, circularidad, coordenadas en 2D y 3D, intensidades y valores calibrados de píxeles. Finalmente ImageJ puede producir también imágenes y mediciones estadísticas.

Los métodos de análisis de imágenes pueden usarse para evaluar la altura y el collar generado en una copa por un sistema de visión artificial (Machet et al, 1993; Robillard et al, 1995). Este método presenta la ventaja de evaluar la calidad de la espuma de

manera automatizada usando video cámaras en condiciones reales en una copa. Entre las conclusiones alcanzadas por ese trabajo, destaca la importancia de la calidad del cristal de la copa, porque afecta de manera significativa las propiedades espumantes, así como las condiciones ambientales. Se han reportado numerosos trabajos de investigación que estudian la efervescencia de los vinos espumantes y tratan de explicar la formación (nucleación) de burbujas en el interior del líquido, su ascenso y colapso en la superficie (G. Liger-Belair et al., 2002; G. Liger-Belair, 2012; Gérard Liger-Belair et al., 1999, 2000b; Gérard Liger-Belair, Parmentier, & Jeandet, 2006b; Perret, Bonhommeau, Liger-Belair, Cours, & Alijah, 2014b; Bertrand Robillard & Liger-Belair, n.d.).

Un caso particular del análisis de imágenes aplicado al estudio de champagne, y que ha proporcionado gran cantidad de información es la macrofotografía de alta velocidad (Vanrell i Truyols, 2002; Voisin et al., 2005b; Voisin, 2005). En estos sistemas se han medido por ejemplo la frecuencia de formación de burbujas, su cinética de crecimiento, la velocidad de ascenso a la superficie en el seno de la matriz líquida y los fenómenos que tienen lugar en la superficie en el momento de estallar una burbuja. Este método presenta la ventaja de evaluar automáticamente la calidad de la espuma en condiciones reales en la copa, en tiempo real usando videocámaras.

Liger-Belair et al (2012) han utilizado técnicas de termografía infrarroja (Figura I-17) para obtener imágenes del flujo de CO₂ liberado (invisibles en el espectro de luz blanca) durante el servido de copas de diferentes geometrías, y para registrar la nube de gases liberados al descorchar una botella de champagne (Liger-Belair et al., 2013).

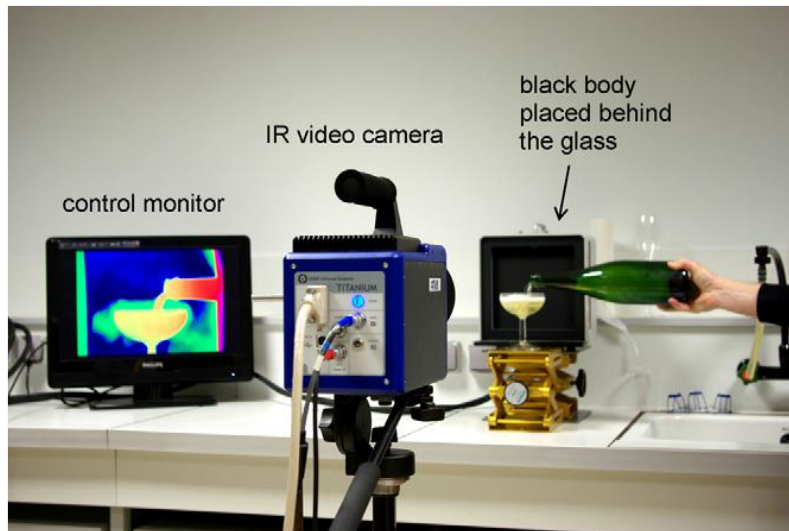


Figura I-17 Dispositivo utilizado para visualizar el gas liberado en una copa de champagne durante el proceso de servido, utilizando una cámara de video IR (Liger-Belair et al, 2012).

Otro sistema complejo y sofisticado, llamado método CAVE (*Computer Assisted Viewing Equipment*) mostrado en la Figura I-18, fue desarrollado con el propósito de evaluar las propiedades espumantes durante el proceso de servido de una copa y en condiciones de degustación reales (Cilindre et al., 2010). Está formado por un brazo robot asistido por computadora y un sofisticado sistema de registro de datos utilizando tres cámaras de video en diferentes posiciones que permiten puntos de vista en múltiples ángulos y un rayo láser que atraviesa la copa y detecta tanto la espuma así como niveles de líquido asegurando una regulación suave del proceso de llenado de la copa. Varios parámetros se obtienen: altura del líquido y de la espuma, altura máxima de la espuma, altura del collar durante seis minutos después de finalizado el servido.

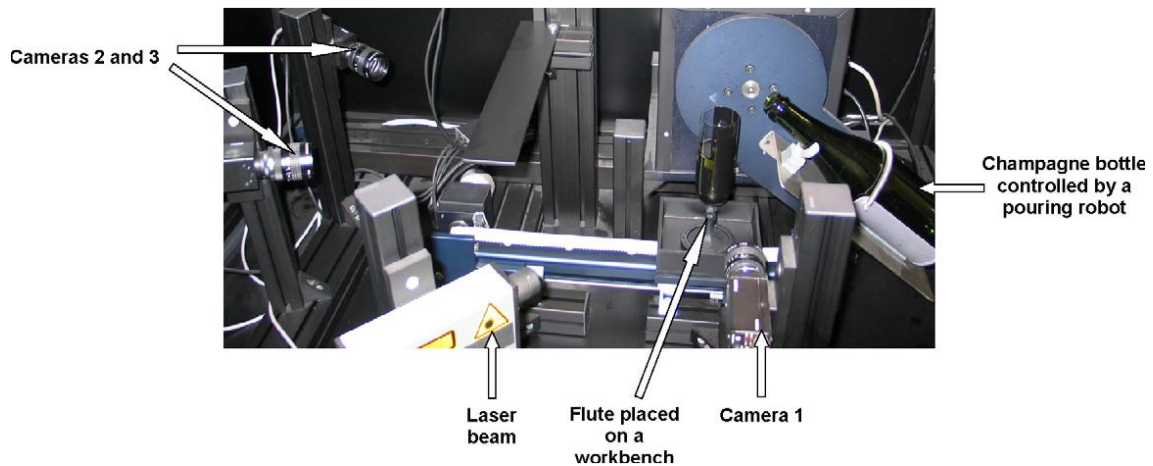


Figura I-18 Fotografía del sistema CAVE (Cilindre et al, 2010).

Vale la pena destacar que las imágenes capturadas por estos métodos no destructivos, quedan permanentemente registradas, y se pueden volver a usar, evaluar, procesar, analizar todas las veces que se desee para obtener información extra.

I.4-2 Evaluación sensorial

Podemos comprender los fenómenos que provocan la formación de burbujas, la dinámica de su ascensión y ruptura, relacionar por medio de ecuaciones los factores que intervienen en este complejo comportamiento, intentando predecir cómo será la espuma “perfecta”. Con la observación por medios digitales objetivamente podemos mirar las burbujas y espuma formada, medir parámetros necesarios para caracterizarla y describirla, en forma casi completa....la última palabra la tiene siempre el consumidor.

Lo primero que el consumidor ve al volcar el vino espumoso en una copa es el espectáculo de generación de burbujas (Polo, 2002). Si un vino muestra una buena espuma al servir la copa, el efecto puede ser hipnótico.

El CO₂ es un potente irritante en la cavidad nasal, actúa sobre receptores trigéminos y gustativos (Liger-Belair et al., 2012), así que la percepción del contenido de CO₂ disuelto impacta no sólo visualmente sino en la sensación en boca, la acción mecánica que las burbujas realizan cuando colapsan y la conversión en ácido carbónico excitan los receptores de la cavidad oral, conformando el “bouquet” del espumante.

En definitiva, la degustación es el momento clave, donde el consumidor decidirá de manera categórica -con mayor o menor conocimiento de todos los misterios que se ocultan detrás de la formación de las burbujas- “me gusta” ...o no.

La evaluación sensorial de alimentos en general es una herramienta utilizada en todos los productos alimenticios, para estudios de aceptabilidad, control de procesos, control de calidad, selección de nuevos ingredientes, etc. Debe distinguirse de otras actividades lúdico-socio-culturales, muchas veces denominadas “catas” que, aunque emplean los sentidos para la evaluación de los alimentos, no siempre siguen métodos rigurosos (Reglero Rada, 2011).

La técnica de perfil sensorial, es una de las técnicas de análisis descriptivo cuantitativo propuesta con el fin de obtener una caracterización objetiva y discriminación de productos alimenticios mediante la selección de descriptores sensoriales (Noble & Bursick, 1984). Se han reportado numerosas aplicaciones de estas técnicas al análisis sensorial de bebidas (Vannier et al., 1999).

En el caso de los vinos, la evaluación sensorial es un área de especialización muy importante, y lleva al reconocimiento de calidad en certámenes internacionales, donde en base a resultados de las sesiones de cata se deciden cuáles son los mejores (y/o los más costosos) vinos. Al interior de las bodegas, la capacidad de un enólogo para discriminar muestras, descubrir defectos y tomar decisiones sobre los procesos, se basa en el análisis fisicoquímico pero sin dudas el análisis sensorial es una herramienta poderosa que permite detectar aromas y sabores con mayor sensibilidad que las más sofisticadas técnicas analíticas. El desafío entre el campo de la evaluación sensorial y el marketing y la industria del vino, es lograr no sólo la mejora de las técnicas de vinificación, sino también permitir la clasificación de los vinos y una mejor interpretación de los deseos del consumidor (Noble et al, 2002).

En la bibliografía se encuentra una amplia variedad de fichas de catas de espumantes, descriptivas o de puntuación. Una de las fichas de cata más utilizadas, la unificada de la Organización Internacional de la Viña y el Vino (OIV) de la Unión Internacional de Enólogos (UIOE), que se emplea en los concursos internacionales de vinos, sólo dedica un apartado a la puntuación de la calidad de la espuma que denomina «efervescencia»

y que incluye la «finura» y la «persistencia» (Polo, 2002). La Facultad de Farmacia de la Universidad de Barcelona con técnicos del Grupo Freixenet, ha diseñado una ficha de cata y un protocolo de evaluación de la efervescencia de la espuma de los vinos espumosos, reconociendo la importancia de la evaluación de la espuma, como factor distintivo y determinante de la calidad de un vino espumante. Obiols et al. (1998), desarrollaron un protocolo para la evaluación de la efervescencia y espuma en vinos espumantes elaborados por el método *champenoise*, ampliamente referenciada en trabajos de investigación (Gallart, Tomás, Suberbiola, López-Tamames, & Buxaderas, 2004; M.V. Moreno-Arribas et al., 2000; Ribéreau-Gayón et al., 2008; Vanrell et al., 2007; Vanrell i Truyols, 2002). Esta ficha de cata se divide en tres categorías principales: espuma, corona y burbujas que se evaluarán de forma cuantitativa, define los atributos que se analiza en cada categoría y establece los tiempos para realizar las observaciones, variable que determina la evolución de la espuma. También detalla los factores extrínsecos que afectan la formación de burbujas y que deben ser tenidos en cuenta para establecer las condiciones ambientales óptimas donde desarrollar las sesiones (temperatura, humedad, iluminación), protocolo de lavado de las copas, forma de servido de las mismas, etc.

La espuma tiene dos atributos básicos: su fuerza o presión y el tamaño de las burbujas, características que no pueden ser apreciadas sólo con la observación visual del espumante en la copa; únicamente en boca se pueden evaluar las cualidades completas de la espuma.

Cuando un vino se sirve en copas aparentemente idénticas, pueden parecer diferentes calidades de espuma, ya que la formación de burbujas depende de la presencia de microcavidades donde ocurrirá la nucleación. La forma del servido de las copas afecta también esta característica (ver 1.4-4).

En este trabajo se decidió realizar evaluación sensorial de espumantes de naranja, centrada en la caracterización de la espuma y burbujas, para correlacionar con los parámetros físicos, químicos y datos obtenidos de las imágenes, pero teniendo en cuenta que la completa percepción de las características espumantes se logra conjugando todas las sensaciones (visual, odorífera, auditiva y gustativa).

I.4-3 Otros métodos para evaluar la espuma

Con la intención de correlacionar propiedades espumantes con características físicas y químicas de los vinos se han realizado muchos esfuerzos para encontrar técnicas instrumentales capaces de obtener valores cuantificables de la calidad de la espuma y permitir la comparación de vinos espumantes (Pozo-Bayón et al., 2009). Se pueden clasificar en métodos basados en: cinética de liberación de CO₂, métodos de burbujeo. Los primeros (Maujean et al., 1990) comprenden la cuantificación de la masa de CO₂ liberada espontáneamente de una botella, finalizada la liberación del gas libremente, se agita la botella y se cuantifica el CO₂ liberado. Los métodos de burbujeo están basados en el procedimiento desarrollado por Bikerman (1938) y consiste básicamente en hacer pasar un chorro de gas a velocidad controlada, a través de un volumen de muestra para generar espuma, se registra la altura alcanzada por la espuma y el tiempo que persiste la espuma luego que cesa la inyección del gas (Pueyo et al., 1995). Basados en este método, Maujean et al (1990) diseñaron el Mosalux, equipo ampliamente usado para describir las propiedades de la espuma (Andres-Lacueva et al., 1996; Brissonet & Maujean, 1993; Cilindre et al., 2010; Dussaud et al., 1994; Gallart et al., 2004; Girbau-Sòla, López-Tamames, Buján, & Buxaderas, 2002; Lao et al., 1999; López-Barajas, López-Tamames, E. Buxaderas, Suberbiola, & De la Torre-Boronat, 2001; Malvy et al., 1994; Marchal et al., 2001; Maujean, Poinssaut, Dantan, Brissonnet, & Cossiez, 2009; Bertrand Robillard et al., 1993; Senée, Robillard, & Vignes-Adler, 1999; Vanrell et al., 2007) y cuyos resultados han sido validados por comparación con otros parámetros espumantes tales como altura de la espuma y estabilidad (Bertrand Robillard et al., 1993), y resultados sensoriales (Gallart et al., 2004).

Los parámetros determinados en este equipo, que utiliza células fotoeléctricas para registrar la altura alcanzada, se muestran en la Figura I-19: HM representa la altura máxima de la espuma o fuerza de la espuma; HS es la altura estable de la espuma con el tiempo, y TS es el tiempo de estabilidad, luego que ha cesado el flujo de gas.

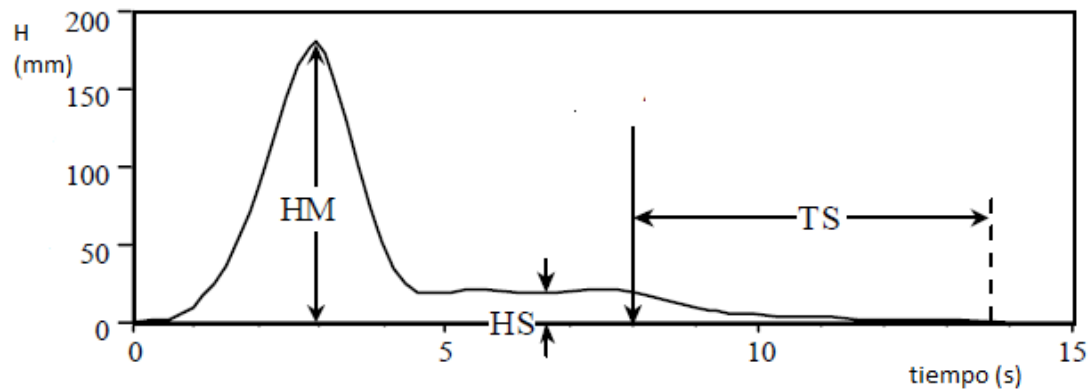


Figura I-19 Parámetros de la espuma determinados en Mosalux.

En el Instituto de Fermentaciones Industriales del Consejo Español de Investigaciones Científicas (CSIC) diseñaron un equipo para medir la espuma producida por burbujeo de gas, utilizando un emisor-detector de ultrasonido y una onda que detecta fluctuaciones en la espuma (Gonzalez et al., 2003; Moreno-Arribas et al., 2000; Nunez et al., 2005; Pozo-Bayón, 2004), obteniendo buenas correlaciones con análisis sensoriales.

En Vincenzi et al., (2014) se describen las características de la espuma con un tubo Rudin clásico, cerrado en el fondo con una placa de vidrio sinterizado (porosidad 40 – 60 micras). Se coloca la muestra ultrafiltrada en el tubo, se proyecta CO_2 a un ritmo constante desde el fondo. La altura de la espuma se mide a intervalos de tiempo regulares, luego se interrumpe el flujo de gas y se monitorea el decaimiento de la espuma.

CAPÍTULO II

JUSTIFICACIÓN

Esta tesis fue pensada intentando articular diferentes intereses. Por un lado, teniendo en cuenta los antecedentes del grupo de investigación que integro, y atendiendo a la importancia económica y social que la producción citrícola presenta para la región, surgió la posibilidad de continuar en la línea de estudio de la biotransformación de jugos de naranja, para generar productos innovadores con mayor valor agregado, y que resulten atractivos para los consumidores. Surge así la idea de someter a los “vinos de naranja” a una segunda fermentación en botella, adaptando el tradicional método “*champenoise*” y obtener así un “espumante de naranja”. El aumento del consumo de espumantes en general durante los últimos años, se relaciona con los precios más accesibles y con una diversificación de la oferta, así como cambios en las preferencias de los consumidores. La producción nacional de champaña creció 122% en el período 1990-1996, es decir, a una tasa promedio anual del 20%. El aumento en los niveles de producción a partir de 1991, coincide con la recuperación del sector vitivinícola que se inclinó a la elaboración de productos con alto valor agregado. En Argentina aunque la producción de estos vinos espumantes es menor comparada con la de los vinos (representan 1,6% de la producción mundial de vinos), el impacto económico para la industria enológica es muy importante por el elevado valor agregado de la mayoría de los espumantes.

Por otro lado, mi interés personal se centró en estudiar los fenómenos físicos detrás de la formación de burbujas y liberación de espuma, describir la cinética de ascenso de las burbujas que, en línea recta a partir de un sitio de nucleación, se expanden y aceleran hacia la superficie. El espumante de naranja es un producto complejo, donde se relacionan aspectos físicos, químicos y microbiológicos, que generan transformaciones y cambios, entre los que se destacan obviamente, por ser la característica distintiva de este producto, la formación y liberación de burbujas. Estos son procesos dinámicos, y para observarlos y analizarlos profundamente, el análisis de imágenes ofrece características inigualables ya que un mismo fenómeno queda registrado en un video y puede ser estudiado ininidad de veces, permite realizar mediciones y volver a medir, sin que se altere el producto ni cambien las propiedades de la muestra. Desde este punto de vista cabe destacar que en la Facultad no se han realizado investigaciones basados en análisis de imágenes, por lo que la posibilidad de desarrollarme en estos temas que

permitan luego su aplicación en otros proyectos y/o productos, representa para la institución y para mí, un valor agregado muy importante.

Todas las transformaciones bioquímicas y físicas que ocurren durante el proceso de obtención y añejamiento de los espumantes de naranja, se manifiestan en último término al momento de servir una copa y degustar el espumante. Por lo tanto el ciclo de estudio se cierra en el potencial consumidor. Por este motivo, resultó necesario incluir en esta tesis, la caracterización sensorial de los espumantes, ya que el objetivo final es, el desarrollo y caracterización de un producto factible de obtener técnicamente y con propiedades sensoriales deseables como para resultar aceptado por el consumidor.

De la integración de estas ideas e intereses resultó el presente trabajo titulado:

“Descripción de la cinética de formación de burbujas en espumantes de naranja”

CAPÍTULO III

OBJETIVOS

Y

PLAN DE TRABAJO

III.1 Objetivos generales

Los objetivos planteados en esta tesis son los siguientes:

- Desarrollar el producto “espumante de naranja” adaptando el tradicional método *champenoise* de segunda fermentación en botella.
- Describir la cinética de formación de burbujas aplicando técnicas de análisis de imágenes.
- Relacionar características espumantes con propiedades fisicoquímicas y sensoriales del producto final.

III.2 Objetivos específicos:

- Estudiar las variables de proceso que afectan el proceso de obtención de espumantes adaptando el método *champenoise*.
- Obtener el producto “espumante de naranja” por fermentación de “vino base de naranja”.
- Caracterizar fisicoquímica y sensorialmente el vino base de naranja.
- Caracterizar fisicoquímica y sensorialmente el espumante de naranja.
- Desarrollar técnicas de análisis de imágenes para describir la microestructura de los espumantes de naranja.
- Describir la cinética de formación de burbujas en los espumantes de naranja, basados en el análisis de imágenes y aplicando ecuaciones de mecánica de fluidos.
- Correlacionar, aplicando análisis estadístico, las características de calidad físicas, químicas y sensoriales del producto final, así como las condiciones de proceso, con la capacidad de formación de burbujas del producto “espumante de naranja”.

III.3 Plan de trabajo

Para alcanzar los objetivos propuestos se plantea el siguiente plan de trabajo:

1 Investigación bibliográfica acerca de:

- Los procesos de obtención de espumantes. Estudio del método tradicional, condiciones para la elaboración de un espumante.
- Las características de calidad de los espumantes
- La caracterización de propiedades espumantes: técnicas instrumentales y sensoriales.
- Análisis de imágenes aplicadas al estudio de los alimentos, en particular las relacionadas a estudios de las propiedades espumantes de champagne, cervezas, etc.
- Fisicoquímica de las burbujas.

2 Desarrollo del producto “espumante de naranja” a escala de laboratorio.

Este producto novedoso requiere etapas de diseño y puesta a punto del proceso de obtención, ya que no se han registrado experiencias previas ni productos similares en el mercado nacional. Las variables de proceso que afectan el producto son principalmente: materia prima para la obtención del vino base, procesos de elaboración del vino base, condiciones para el desarrollo de la segunda fermentación: temperatura de fermentación, composición del licor de tirage y tiempo de añejamiento en contacto con las borras.

En base a experiencias previas se seleccionó como materia prima la naranja Valencia Late, y la temperatura para el desarrollo de la primera y segunda fermentación se fijó en 15°C.

A los efectos de analizar la influencia del agregado de cortezas de levaduras (o chips) sobre las características de las burbujas se prepararon dos formulaciones del licor de tirage, una con agregado de 4,5 g/l de cortezas de levaduras (Fermoplus Integrateur®) y sin agregado de chips; para obtener respectivamente EC (Espumante CON chips) y ES (espumante SIN chips).

Para estudiar la influencia del tiempo de añejamiento en contacto con las borras, se mantuvieron los espumantes en condiciones de bodega, a 15°C y al abrigo de la luz, durante 9, 12 y 18 meses antes de proceder al degüelle y obtención del producto “espumante de naranja”.

3 Caracterización fisicoquímica del producto “espumante de naranja”

Para caracterizar el producto se realizarán ensayos fisicoquímicos estándares que se utilizan para describir a los espumantes tradicionales, basados en técnicas recomendadas por la O.I.V., que en han sido adaptados a los “vinos de naranja” en trabajos de investigación previos del grupo de trabajo.

4 Caracterización sensorial del espumante de naranja

Se entrenará un panel para la evaluación sensorial de los espumantes de naranja, en particular serán entrenados para caracterizar la espuma y formación de burbujas de los espumantes. Se desarrollará una ficha de cata apropiada a este fin, que tenga directa correlación con los aspectos que serán observados y cuantificados mediante el análisis de imágenes.

5 Análisis de imágenes

Desarrollo de la metodología necesaria para aplicar el análisis de videos digitales al estudio de la formación de burbujas y espuma del producto final.

Diseño del montaje experimental para la captura de imágenes: condiciones ambientales, equipamiento necesario, etc.

Elección del software adecuado para el procesamiento y análisis de los videos.

Formación académica del doctorando en aspectos básicos sobre análisis de imágenes.

6 Caracterización del espumante de naranja basados en el análisis de imágenes

En base a la información recogida en la captura de videos digitales se desarrollará una metodología para el procesamiento de datos sobre la espuma y burbujas observadas durante la evolución de una copa de espumante, servida en condiciones análogas a las de degustación, para comparar las observaciones del panel sensorial con técnicas instrumentales que podrían complementar ambos aspectos del estudio de los espumantes.

7 Análisis de datos y discusión de las relaciones entre aspectos fisicoquímicos, sensoriales y análisis de imágenes.

Con los datos obtenidos de todos los aspectos de caracterización del espumante (físicoquímicos, sensoriales y por análisis de imágenes), se buscarán correlaciones entre parámetros, se describirá la cinética de la formación y liberación de burbujas, analizando posibles modelos que expliquen los comportamientos observados.

CAPÍTULO IV

METODOLOGÍA

IV.1 Obtención de espumante de naranja

El proceso se basa en la adaptación del tradicional método *champenoise*, descrito para vinos de uva en el Capítulo I.

El proceso comprende dos etapas bien diferenciadas:

- La obtención del vino base y
- la segunda fermentación en botella

IV.1-1 Obtención del vino base de naranja

Para elaborar el vino base se adaptó la metodología propuesta por Ferreyra (2006) y Schvab (2006) con el objetivo de lograr características enológicas apropiadas para una segunda fermentación, principalmente se buscó obtener una bebida con menor graduación alcohólica. Para obtener el vino base de naranja se siguió el proceso mostrado en la Figura IV-1

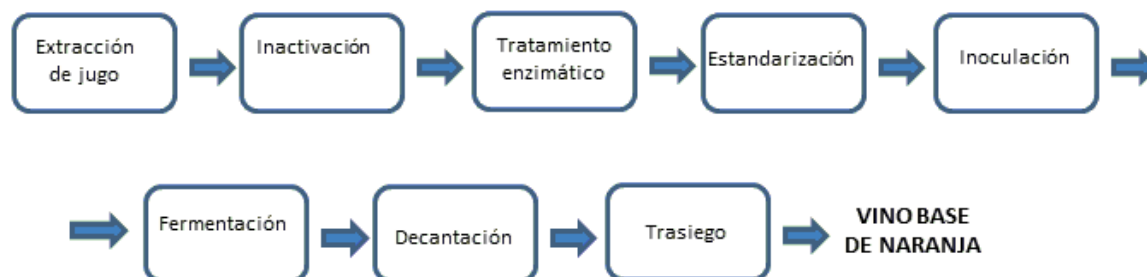
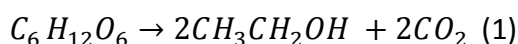


Figura IV-1 Diagrama de flujo correspondiente a la obtención del vino base de naranja.

Para lograr un “vino base” con una graduación alcohólica no mayor a 9,0 % v/v- que en la segunda fermentación aumentará el contenido alcohólico 1% a 2%v/v, (Ribéreau-Gayon et al, 2005)-, se debe estandarizar la concentración de sólidos solubles mediante el agregado de sacarosa comercial, porque el contenido de azúcares fermentescibles en los jugos de naranja no es suficiente para llegar a estos niveles de alcohol.

Teniendo en cuenta la ecuación de fermentación (1):



Se observa que por cada 180 g de glucosa consumidos, se producirán 92 g de etanol.

En base a esta relación se estimó la cantidad de azúcar necesaria. Expresando los sólidos solubles en °Brix (que si bien indican sólidos solubles totales, en jugo de naranja el valor representa básicamente a los azúcares, que son los componentes mayoritarios), y relacionando en base a la ecuación planteada (1), por cada 2°Brix se obtienen aproximadamente 1°G.L. El total de sacarosa que es necesario agregar se calculó en base a esta relación, en base a la medición de los °Brix iniciales del jugo, y en función de los litros de mosto a preparar.

El inóculo se preparó con levadura seca activa *Saccharomyces cerevisiae* ALG 804.- DMS, cuyas características son:

Conversión azúcar/alcohol: 16 g/L de azúcar genera 1° GL de alcohol.

Resistencia: Fermenta hasta 15° GL de alcohol (20°C).

Producción de acidez volátil: Máximo 0.1 g/L (expresado en ácido sulfúrico).

Fermentación: Alta actividad inicial y moderada al final.

Producción de espuma: Baja.

Resistencia al sulfitado: Hasta 100 ppm (10 g/hL).

Propiedades: No genera SO₂

Bajo contenido de acetaldehído y ácido pirúvico.

Resiste altas temperaturas.

Excelente capacidad floculante.

Posee factor Killer K2.

Para preparar el pie de cuba se utilizó jugo de naranja adicionado de nutrientes necesarios para el desarrollo de la biomasa (María Mercedes Ferreyra et al., 2014), según el siguiente procedimiento: en tres erlenmeyers de 1000 mL conteniendo 400 mL de jugo se agregaron 100 g/L de sacarosa y 10 g/L de (NH₄)₂HPO₄. Los erlenmeyers se trataron a vapor fluente durante 30 min, se enfriaron hasta temperatura ambiente y se inocularon en condiciones asépticas con 100 mg de la levadura seca activa. Los erlenmeyers se incubaron a 25 °C durante 24 h, con agitación. Al cabo de este tiempo se realizó un análisis microbiológico siguiendo la técnica de coloración vital con azul de metileno (O.I.V.) y recuento microscópico de levaduras. Al final del cultivo se integraron los contenidos de los 3 erlenmeyers y se utilizaron para la inoculación. Con este volumen de inóculo se aseguró un número de células viables de levaduras entre 1×10^6 y 1×10^7 células/mL.

Se mezcló el jugo clarificado, el pie de cuba y 1/3 de la cantidad total de sacarosa necesaria, para contrarrestar el efecto osmótico sobre las levaduras. El mosto obtenido se distribuyó en damajuanas de vidrio oscuro de 30 litros de capacidad, dejando un espacio de cabeza de 5 l. El proceso fermentativo se desarrolló en condiciones de aerobiosis durante 24 horas, tapando las damajuanas con torundas de algodón, para promover el crecimiento celular. Luego se realizó cierre hidráulico y se dispusieron las damajuanas para el desarrollo del proceso fermentativo, con producción de etanol, en cámaras a 15°C al abrigo de la luz.

La evolución de la fermentación se monitoreó a través de la medición de los °Brix, con corrección automática por temperatura, que indirectamente nos permiten estimar el consumo de azúcares.

Los 2/3 restantes de azúcar se agregaron en dos porciones durante el transcurso de los días, a medida que disminuían los °Brix. Al alcanzar 4-5° Brix residuales, y cesar el burbujeo en el cierre hidráulico se tomó muestra para determinar si se alcanzó el contenido de alcohol buscado. Luego se realizó el trasiego por caída natural del vino a damajuanas limpias y previamente sulfitadas (enjuague con una solución de KHSO_3 al 1 %). El producto así obtenido es el denominado "vino base". Se tomaron muestras para su caracterización físicoquímica.

IV.1-2 Proceso de segunda fermentación en botella

El proceso seguido para el desarrollo de la segunda fermentación y obtención del espumante se esquematiza en la Figura IV-2 y se describe cada etapa a continuación.

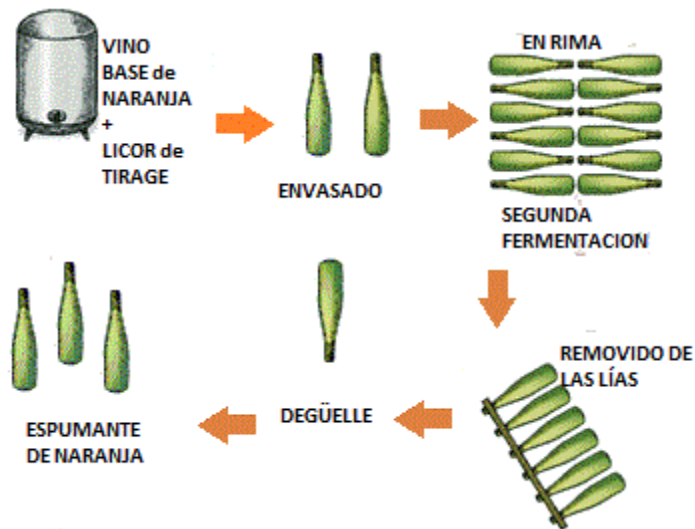


Figura IV-2 Esquema seguido para la obtención de espumantes, adaptando *método champenoise*.

IV.1-2.i Preparación del licor de tirage

El licor de tirage se preparó con “vino base”, adicionado de un cultivo comercial de levadura seca activa (LSA) *S. cerevisiae r.f. bayanus*, (Fermol Reims, laboratorio de la Universidad de Reims, Champagne-Ardenne, Francia). Esta levadura se seleccionó en base a su capacidad de mejoramiento de la espuma, por su resistencia al contenido alcohólico, a la presión y a las bajas temperaturas, así como con elevada capacidad de floculación y capacidad autolítica. Mediante recuento microscópico se estimó una cantidad 2×10^6 células viables/ml, por encima de este número la fermentación es más rápida pero puede aparecer gusto a levadura (Ribéreau-Gayon et al, 2005).

Sabiendo que se requieren aprox. 4-4,3 g/l para producir 1 atm a partir de un vino base con una graduación alcohólica de 10 °G.L. (Ribéreau-Gayon et al, 2005), y buscando lograr una bebida finamente gasificada, se calculó la cantidad necesaria de sacarosa comercial necesaria para obtener una presión de CO₂ aproximada de 4 atm a 15 °C.

Además en el licor de tirage, se agregaron nutrientes de vinificación con los componentes necesarios para el desarrollo óptimo de las levaduras, que eviten la aparición de olores de reducción en la fase fermentativa y asegurando los factores de resistencia necesarios para prevenir fermentaciones lentas. Se utilizó un preparado

comercial (Fermoplus energy®) que contenía: sulfato de amonio, fosfato de amonio bibásico. Se agregaron además 250 ppm de coadyuvantes de filtración (bentonita).

Se prepararon 2 litros de licor de tirage, en erlenmeyer con agitación durante 20 minutos, a 25°C, tiempo y temperatura requeridos para la activación del inóculo.

A los efectos de analizar la influencia del agregado de cortezas de levaduras (o chips) sobre las características de las burbujas se prepararon dos formulaciones del licor de tirage, una con agregado de 4,5 g/l de cortezas de levaduras (Fermoplus Integrateur®) y sin agregado de chips; para obtener respectivamente EC (Espumante CON chips) y ES (espumante SIN chips).

IV.1-2.ii Embotellado y segunda fermentación

Cada formulación del licor de tirage se mezcló con el vino base en tanque de acero inoxidable, con agitación vigorosa para favorecer la presencia de oxígeno en la mezcla, a temperatura ambiente (20°C) y se llenaron las botellas de 750 ml, oscuras y resistentes a la presión, rotuladas EC o ES según el licor de tirage utilizado.

Se utilizaron botellas recicladas, previamente enjuagadas con solución de KHSO_3 al 1 %; se taparon con opérculos y tapa corona. Los opérculos (o *bidulé*) son tapones de polietileno huecos de 17 mm de diámetro y 14 mm de largo, que proporcionan cierre hermético y favorecen la operación de degüelle ya que las borras se acumulan en el espacio hueco (Figura IV-3); encima se coloca tapa corona y se cerró a presión con tapadora manual.



Figura IV-3 Opérculo y tapa corona. Cierre de las botellas de espumante para la segunda fermentación. (<http://winemdg.blogspot.com.ar/2014/08/clinicas-premium-tasting-2014-espumoso.html>.)

Las botellas se dispusieron en rima (horizontalmente) para asegurar el contacto de las levaduras con el líquido, a temperatura controlada de $(15 \pm 1) ^\circ\text{C}$ y al resguardo de la luz.

La primera semana, se efectuó diariamente “movimiento de clavas” que consiste en tomar la botella por el cuello, levantarla y llevarla hacia atrás y adelante, con un golpe seco, para favorecer la distribución del gas formado y asegurar la disponibilidad de nutrientes para la biomasa. Se midió la presión interior de botellas testigo con afrómetro y se registraron valores alcanzados al transcurrir el tiempo. En estas condiciones la segunda fermentación llamado también proceso de toma de espuma que se desarrolló en un tiempo entre 25 y 60 días.

IV.1-2.iii Envejecimiento sobre las borras

El tiempo en contacto con las lías constituye una variable tecnológica que define características de calidad de un espumante. La legislación exige al menos 9 meses en contacto con las lías en los champagne y cava (Council Regulation, 1493/1999). Este tiempo se puede acortar utilizando componentes como los chips de levaduras, por eso en los espumantes de naranja se ensayó una composición del licor de tirage con corteza

de levaduras, que provee al medio con los componentes que se liberan por autólisis celular.

Finalizada la segunda fermentación, que visualmente se reconoce por la deposición de las borras, comenzó la crianza del espumante, manteniendo las condiciones de temperatura y oscuridad. En este período de tiempo de contacto con las borras, el espumante madura, se desarrollan aromas característicos de estos productos y se produce la autólisis de las levaduras, que libera al medio componentes celulares.

Para evaluar la influencia del tiempo en contacto con las borras, al cabo de 9, 12 y 18 meses se dispusieron muestras en pupitres para la remoción de las borras hacia el cuello de la botella.

IV.1-3 Diseño experimental

Se prepararon dos formulaciones del licor de tiraje: EC y ES que indican “Espumante con chips de levaduras” y “Espumante sin chips de levaduras” respectivamente.

Se analizó el tiempo en contacto con las lías en tres niveles: 9, 12 y 18 meses y los espumantes obtenidos se rotularon como muestra la tabla IV.1:

Tabla IV-1 Espumantes elaborados con dos composiciones del licor de tiraje y 3 tiempos de añejamiento en contacto con las lías

Tiempo en contacto con las borras (meses)	9	12	18
Con chips agregados	EC1	EC2	EC3
Sin chips agregados	ES1	ES2	ES3

El tiempo de 9 meses fue elegido porque es el mínimo recomendado para la elaboración de cava (según norma BOE N°189278:37587-93).

IV.2 - Caracterización fisicoquímica del espumante de naranja

IV.2-1 Toma de muestras

Los vinos base obtenidos en las damajuanas se integraron en tanque de acero inoxidable para la elaboración del vino espumante. Se extrajeron muestras representativas para su caracterización.

De las botellas de espumantes de naranja se tomó una muestra con chip (EC) y una muestra sin chip (ES) para cada tiempo a los efectos de su caracterización fisicoquímica.

Todas la muestras evaluadas sensorialmente y por análisis de imágenes, se caracterizaron por análisis fisicoquímicos, realizando ensayos por duplicados.

IV.2-2 Análisis físicos y químicos al vino base de naranja

Para caracterizarlo y establecer las condiciones de la segunda fermentación se realizaron las siguientes determinaciones:

Graduación alcohólica: por aerometría: según técnica MA-E.AS312-01-TALVOL, O.I.V., 2009. En °G.L.

pH: potenciométricamente (pHmetro BOECO BT- 500).

Sólidos solubles: con refractómetro ATAGO modelo DTM-1, expresados en °Brix.

Acidez total: por titulación (AOAC 9.135, pág. 190, 1984), determinada como ácido cítrico anhidro y expresada en % (p/v).

Acidez volátil: por destilación y posterior titulación (AOAC 28.1.30, pág. 8, 1995), determinada como ácido acético y expresada en g/L.

Azúcares reductores y azúcares totales: método de Somogyi-Nelson. Al calentar azúcares reductores en presencia de tartrato y Cu^{2+} , reducen el cobre a Cu^+ formando óxido cuproso, proporcionalmente al contenido de azúcares presentes; al agregar arsenomolibdato en medio ácido el molibdato se reduce formando azul de molibdeno (al agregar el reactivo de Nelson), que es cuantificado colorimétricamente porque absorbe a 530 nm. La curva de calibrado fue construída con glucosa.

Glicerol: método enzimático (Boehringer Mannheim/Biopharm). expresado en g/L.

Color: Se midieron absorbancias a 420 nm para evaluar el índice de amarronado; a 450, 520, 570 y 630 nm para calcular los parámetros de color utilizando Programa MSCV. Grupo de color. Universidad de La Rioja- Universidad de Zaragoza. (Ayala, J. et al, 2002).

SO₂ libre y SO₂ total: según Aleixandre y García, 1996. Método iodimétrico. Expresados en mg/L.

Proteínas totales: aplicando método colorimétrico de Bradford, (Ref) determina proteínas junto con péptidos de peso molecular mayor a 3,0 KDa (Moreno Arribas et al., 2002) se basa en la unión específica del reactivo coloreado Comassie Blue Brillante a las cadenas de tirosina formando un complejo que absorbe a 595 nm. Se construyó curva de calibración usando seroalbúmina bovina como estandar

Tensión Superficial: adaptando método Du Noüy, realizado con texturómetro TAXT plus, con anillo de platino de $1,863 \times 10^{-2}$ m de diámetro; expresado en N/m

Densidad: Por picnometría, según Compendium of International Methods of wine and must Analysis (OIV, 2008) en g/mL

Viscosidad: Con viscosímetro Brookfield Modelo IV con adaptador UL para muestras de muy bajas viscosidades."spindle" nº 1 y velocidad de rotación entre 0,3 y 60 rpm. Expresada en cP.

IV.2-3 Análisis físicos y químicos a espumantes de naranja

Para monitorear el proceso de segunda fermentación se midió la presión en dos botellas de espumantes utilizando afrómetro que perfora tapa corona.

Realizados los degüelles en los tiempos indicados, se tomaron dos botellas al azar y se realizaron determinaciones de parámetros enológicos básicos para caracterizar el espumante, en base a las técnicas O.I.V. (Organización Internacional de la Viña y el Vino) para vinos, adaptadas a los "vinos de naranja" (María Mercedes Ferreyra, 2006; Schwab, 2006).

Previo a cada determinación las muestras de espumantes se agitaron durante 5 minutos a 1400 rpm para eliminar el contenido de gas carbónico. Todas las determinaciones se realizaron por duplicado por cada botella.

Graduación alcohólica: por aerometría: según técnica MA-E.AS312-01-TALVOL, O.I.V., 2009. Expresada en °G.L.

pH: potenciométricamente (pHmetro BOECO BT- 500).

Sólidos solubles: Con refractómetro ATAGO modelo DTM-1, expresados en °Brix.

Azúcares reductores: por método de Somogyi -Nelson

Azúcares totales: hidrólisis ácida y determinación por método de Somogyi-Nelson.

Acidez total: por titulación (AOAC 9.135, 1984), determinada como ácido cítrico anhidro y expresada en % (p/v).

Acidez volátil: por destilación y posterior titulación (AOAC 28.1.30, pág. 8, 1995), determinada como ácido acético y expresada en g/L.

Color: Se midieron absorbancias a 420 nm para evaluar el índice de amarronado; a 450, 520, 570 y 630 nm para calcular los parámetros de color utilizando Programa MSCV. Grupo de color. Universidad de La Rioja- Universidad de Zaragoza. (Ayala, J. et al, 2002).

Tensión Superficial: en equipo TAXT plus-Texture Analyser, aplicando método Du Noüy, con anillo de platino. N/m

Densidad: por picnometría, según Compendium of Internacional Methods of Wine and Must Analysis (OIV, 2008) g/mL

Viscosidad: Con viscosímetro Brookfield Modelo IV con adaptador UL para muestras de muy bajas viscosidades, "spindle" nº 1 y velocidad de rotación entre 0,3 y 60 rpm. Expresada en cP.

Proteínas totales: aplicando método colorimétrico de Bradford, (Ref) determina proteínas junto con péptidos de peso molecular mayor a 3,0 KDa (Moreno Arribas et al., 2002) se basa en la unión específica del reactivo coloreado Comassie Blue Brillante a las cadenas de tirosina formando un complejo que absorbe a 595 nm. Se construyó curva de calibración usando seroalbúmina bovina como estandar.

Polisacáridos totales: Basados en la metodología descrita por Ayestarán et al (2004). 10 ml de vino se centrifugaron (8500 rpm, 20 minutos) en centrífuga Biofugo Primo (Heraeus, Hanau, Alemania) y el sobrenadante se concentró hasta un volumen final de 2 ml en evaporador al vacío (Univapo 100ECH, Uniequip, Martinsried, Alemania). Los polisacáridos solubles totales se precipitaron con 10 ml de etanol glacial acidificado (0,3M en etanol absoluto), mantenido 24 horas a 4°C. Luego las muestras se centrifugaron a 8500 rpm durante 10 minutos a 4°C. Los pellets obtenidos se lavaron cuatro veces con etanol glacial para eliminar interferencias. Finalmente el precipitado se disolvió en 1 ml de agua ultrapura, congelados a -80°C y liofilizados en equipo Christ Alpha 1-4 (Martin Christ, Osterode am Harz, Alemania). Para determinar la distribución moléculas y cuantificar polisacáridos, la fracción soluble fue analizada por cromatografía de exclusión de alta resolución (HRSEC) con detector de índice de refracción (RID). Las muestras liofilizadas se re-suspendieron en 1ml de 30mM de formato de amonio y filtradas a través de membranas de nylon de 0,45 µm; se inyectaron 100 µl en la columna. La separación se realizó a 20°C usando dos columnas Shodex OHpak SB-803 HQ y SB-804 HQ conectadas en serie (300mm x 8mm i.d.; Showa Denko, Japón). La fase móvil consiste en soluciones acuosas 30mM de formato de amonio, a un flujo de 0,6ml/min durante 60 min, y la temperatura de la celda RID se mantuvo a 35°C. La distribución de pesos moleculares de las fracciones de espumantes se calibró con estándares de pululan y dextrano de diferentes pesos moleculares. Para cuantificar los polisacáridos se calculó el área de los picos para cada fracción, usando el método de estándar externo con pectina y dextranos comerciales. La curva de calibración se obtuvo inyectando las soluciones estándar en las mismas condiciones que las muestras analizadas, en el rango entre 0 y 2 g/l.

IV.2-4 Análisis estadístico de los datos

Se realizó ANOVA multifactorial para analizar la influencia del tiempo de añejamiento y de la composición del licor de tirage sobre las muestras entre tratamientos con un nivel del 95% de confianza, aplicando estadístico de Fischer para evaluar las mínimas diferencias significativas (LSD). Se utilizó software estadístico Statgraphic Centurion®

IV.3 Evaluación sensorial de espumante de naranja

La espuma es una cualidad que define un vino espumante, que lo distingue de otros vinos y es lo primero que ve un consumidor (Gallart et al., 2004)

El objetivo principal de la evaluación sensorial para el desarrollo de esta tesis fue caracterizar la formación de burbujas y espumas generados al servir una copa de espumante de naranja, que pudiera correlacionarse con el análisis de las imágenes de la espuma y burbujas, por este motivo, se diseñó una planilla de evaluación sensorial que permitiera comparar los atributos con mediciones respectivas.

El ensayo aplicado fue un perfil sensorial cuantitativo, usando una escala no estructurada de 10 cm anclada en los extremos.

IV.3-1 Selección y Entrenamiento de los jueces

Se convocó a integrantes de la institución para conformar un panel sensorial de jueces entrenados. Fueron pre-seleccionados quienes habían participado previamente en la caracterización sensorial de vinos de naranja (entre 2006 y 2009), así como nuevos panelistas con experiencia en evaluación sensorial de otros productos.

En el primer encuentro sin ninguna referencia se presentó un espumante comercial para degustar, y se solicitó a los panelistas que describieran lo que observaban.

Seguidamente se describieron las fases para realizar la degustación de un espumante:

La primera impresión, la que percibimos visualmente se refiere a la apariencia en la copa. El aspecto es una primera fuente de información, principalmente en lo que se refiere a la espuma, color, luminosidad, y no sólo aportan datos sino que generan ideas previas acerca de lo que será percibido en las fases olfativa y gustativa.

Terminada la fase visual, se procede a la *fase olfativa*, cuando el vino está en la copa. Una primera impresión olfativa se realiza sin agitarlo ya que el desprendimiento del CO₂ arrastra las sustancias aromáticas; luego con ayuda de la muñeca se aplica un suave

movimiento rotatorio para que el vino gire y salgan los aromas de volatilidad mediana y los más pesados.

A continuación se procede a la degustación, la *fase gustativa*: el panelista confirma los aromas percibidos en la fase nasal, y/o encuentra nuevos, analiza los distintos gustos básicos (dulce, salado, amargo y ácido) junto con otras sensaciones táctiles como la *efervescencia*, el cuerpo, astringencia, el alcohol, equilibrio, el paso por boca y la persistencia. La diferencia entre un vino tranquilo y uno espumoso está, obviamente en las burbujas. La espuma tiene dos atributos básicos, su fuerza o presión y el tamaño de las burbujas, pero estas dos características no pueden apreciarse simplemente observando el vino en la copa, por lo tanto la evaluación de las características espumantes es completa cuando se percibe en boca sus efectos.

En base a las descripciones presentadas, se seleccionaron los atributos que hacían referencia a la espuma (Figura IV-4), y también los que se referían al aspecto, aroma y sabor. [Una adecuada elección de los descriptores es fundamental por eso se tuvieron en cuenta las siguientes condiciones para considerar un atributo en la lista (ISHA, 1990): relevancia, no debe ser ambiguo, independencia, discriminación. Así el grupo elaboró un listado con los atributos preseleccionados que fue consensuada.

En la siguiente sesión se realizó una presentación en diapositivas donde se hizo una reseña del proceso de elaboración de un espumante por el método *champenoise* y se presentó la ficha de cata definitiva.

Cada atributo fue, mostrado en videos e imágenes seleccionadas donde se definieron los extremos de cada uno en la escala. A continuación se realizó la evaluación de espumantes comerciales, con el fin de familiarizarse con la ficha de cata y ajustar los descriptores seleccionados para confeccionar la ficha de cata definitiva .

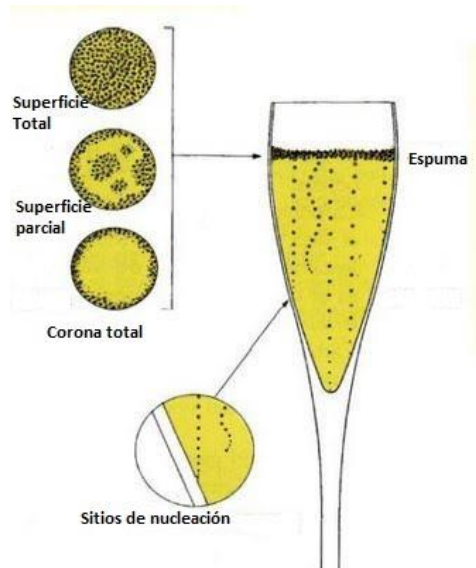


Figura IV-4 Definición de los atributos de la espuma

Con la ficha de cata definitiva, se desarrollaron 5 sesiones de entrenamiento con espumantes comerciales de marcas reconocidas del mercado, tipo “extra brut” y “demi sec”, con el objetivo de evaluar la capacidad de discriminación de cada panelista y su repetibilidad. Para evaluar la consistencia de las respuestas de cada juez, una muestra era replicada en cada sesión. Cada muestra de espumante fue evaluada en tres réplicas por cada panelista.

IV.3-2 Descripción de las copas

Las copas utilizadas para la evaluación sensorial de los espumantes de naranja fueron como las mostradas en la Figura IV-5, de cristal (cristalería San Carlos, Argentina) de 150 ml de capacidad, 23,5 cm de altura, 58,1 mm de diámetro en la boca y 0,8 mm de espesor.



Figura IV-5 Copa flauta de cristal utilizada para análisis sensorial y análisis de imágenes de espumantes de naranja.

El estado de las superficies de las copas es crítico en el proceso de formación de burbujas ya que fibras de celulosa provenientes del secado con toallas de papel o algodón pueden actuar como sitios de nucleación (Gerard Liger-Belair & Jeandet, 2002).

Para estandarizar las condiciones de limpieza de las copas se definió el siguiente protocolo para la limpieza de las copas destinadas a la evaluación sensorial y a la captura de imágenes: lavado de las copas en baño de ultrasonido con agua tibia (40°C) durante 1 hora, enjuague intensivo con agua destilada. Secado en estufa a 40°C suspendidas invertidas. Luego de enfriadas, se guardaban invertidas en cajas de plástico hasta el momento de su uso.

IV.3-3 Descripción de las sesiones de cata

Las sesiones de cata se desarrollaron en la sala para realizar evaluaciones sensoriales de la Facultad de Ciencias de la Alimentación. Esta sala dispone de 5 boxes estandarizados (según norma IRAM 20003: 1995 “Análisis sensorial. Guía para la instalación de locales de ensayo”), y dispusimos una mesa de cubierta de papel blanco, de manera que todos los panelistas se encontraban en la sala de cata degustando el mismo espumante en el mismo momento luego de destapada la botella.

El ambiente está aislado acústicamente y la iluminación puede ser regulada en intensidad así como en coloraciones. Se iluminó la sala y cada box individual con luz blanca artificial directa, igualando las condiciones de los evaluadores que estaban en las cabinas y los restantes dispuestos alrededor de la mesa y en todas las sesiones se adoptaron las mismas disposiciones de los panelistas.

En una mesa auxiliar, ubicada a la vista de todos los evaluadores, se dispusieron las copas que serían utilizadas en la degustación, apoyadas de forma invertidas.

Las botellas se mantuvieron en heladera durante 24 horas, y su temperatura fue de $(7\pm 1)^{\circ}\text{C}$ al destaparlas. Cada botella se identificó con un código numérico de 4 cifras al azar, que figuraba ya en la ficha de cata dispuesta en el sitio de cada panelista.

Al momento de destapar un espumante, todos los panelistas presentes observan el proceso de llenado de cada copa, realizado siempre manualmente por la misma persona. Durante el llenado las copas y la botella se mantuvieron inclinadas, servido que denominamos “tipo cerveza”(ya que esa es la forma tradicional de servir un vaso de cerveza cuando no deseamos abundante espuma), el espumante fluye sobre la pared de la copa inclinada y progresivamente la llena, generando menor turbulencia y mucho menos producción de espuma que en el modo de servido “tradicional” (el espumante fluye verticalmente y golpea el fondo de la copa, desde donde se va completando el volumen, generando abundante espuma que rápidamente colapsa). De esta manera propiciamos la liberación progresiva del CO_2 (Gérard Liger-Belair, Bourget, et al., 2010).

Las copas se llenaron hasta la mitad de su capacidad, dejando espacio suficiente para la formación de la espuma y observación de la generación y ascensión de los trenes de burbujas.

Cada copa fue distribuída cuidadosamente a cada panelista, tomada de la base intentando no provocar agitación del líquido.

El tiempo máximo para completar cada ficha se estableció en 5 minutos.

En cada sesión se evaluaron tres espumantes de manera consecutiva, con intervalos de 10 minutos entre una muestra y la siguiente, donde cada panelista disponía de agua y pan para enjuagar los sabores y las sensaciones que provocan la efervescencia.

Esta sesión y todas las siguientes se realizaron a temperatura ambiente de la sala de 16°C (esta condición se especificaba en la convocatoria, para que tomaran las precauciones de abrigo).

Finalizada la etapa de entrenamiento del panel sensorial se desarrollaron 5 sesiones de evaluación de los espumantes de naranja, que se organizaron para evaluar -por duplicado cada espumante- el efecto de la composición del licor de tirage (2 sesiones) y la influencia del tiempo de añejamiento (3 sesiones). Se registraron 180 planillas de evaluaciones sensoriales de espumante de naranja.

IV.3-4 Análisis estadísticos de los datos sensoriales

Durante la etapa de entrenamiento se realizó un seguimiento de las respuestas de los evaluadores. Para la evaluación del desempeño de cada juez se aplicó el análisis de varianza (ANOVA) a un factor (FProducto):

$$\text{Juez} = \text{Producto} + \text{Error}$$

tomando la prueba de Fisher (F) y la probabilidad (p) como índice del poder discriminante del juez y el Cuadrado Medio del error (CMe) como índice de repetitividad entre sesiones (Tomic, Nilsen, Martens, & Næs, 2007).

Para evaluar el desempeño del panel se aplicó el siguiente modelo mixto de ANOVA a dos factores:

$$\text{Atributo} = \text{Producto} + \text{Juez} + \text{Error}$$

considerando como efecto aleatorio el factor juez, mientras que el factor producto como fijo, tomando el estadístico de Fisher (F) y como índice del poder discriminante el factor producto (FProductos). La consensualidad en el uso de la escala entre los jueces fue evaluada mediante el factor jueces (FJueces) con un $\alpha = 0,05$ (Carbonell, Izquierdo, & Carbonell, 2007).

Se construyeron gráficas de línea, utilizando software estadístico R, representando los puntajes otorgados por los panelistas a las muestras ensayadas por duplicado durante las sesiones de entrenamiento, obteniendo un conjunto de gráficos: puntajes obtenidos

en función de los atributos, para cada muestra por duplicado; puntajes obtenidos por cada muestra en función de los atributos, para cada panelista individual. Luego se realizaron gráficos basados en los resultados de los ANOVA: F en función de los atributos donde se analizó la habilidad de cada evaluador para detectar diferencias entre muestras para un determinado atributo; y gráficos de CMe (cuadrado medio del error) en función de los atributos, para medir la repetibilidad de los evaluadores. Analizando estos gráficos de manera complementaria se realizó el seguimiento del desempeño de cada panelista individual y del panel en su conjunto.

Los atributos sensoriales de los espumante de naranja fueron estudiados aplicando ANOVA multifactorial para analizar la influencia del tiempo de añejamiento, de la composición del licor de tirage y el efecto de los panelistas sobre las muestras entre tratamientos con un nivel del 95% de confianza, aplicando estadístico de Fischer para evaluar las mínimas diferencias significativas (LSD). Se utilizó software estadístico Statgraphic Centurion®. Los resultados permitieron caracterizar la espuma de los espumantes de naranja, así como una evaluación global de sus propiedades sensoriales y los resultados se mostraron en gráfico de araña.

IV.4 Estudio de la espuma por análisis de imágenes

IV.4-1 Descripción del dispositivo experimental elegido.

Para observar la formación de burbujas y estudiar la cinética de desarrollo de las mismas, se propone analizar videos digitales capturados durante el llenado de copas de cristal, reproduciendo condiciones similares a la degustación de los mismos.

Se montó un dispositivo experimental como se muestra en la Figura IV-6, que ha sido adaptado del propuesto por Voisin (2005) y Soto Herrera et al., (2008).

La cámara de video de alta velocidad Sony CCD-Iris SSC C-370 (1) es un equipo analógico de alta definición, de calidad profesional; la capacidad de capturar imágenes nítidas de una escena con movimiento es notable ya que posee un CCD (*charge-coupled device*, o dispositivo de carga acoplado) de alta sensibilidad y obturador electrónico ajustable. Se

utilizó un objetivo de microscopio de 10X ensamblado a la cámara. Este equipo analógico se adaptó para capturar las imágenes en formato digital con capturadora Pinnacle®. La cámara (1) para captar trenes de burbujas se colocó sobre una base que permite el deslizamiento vertical; con esta se pudo seguir un tren de burbujas desde su nacimiento hasta la explosión en la superficie.

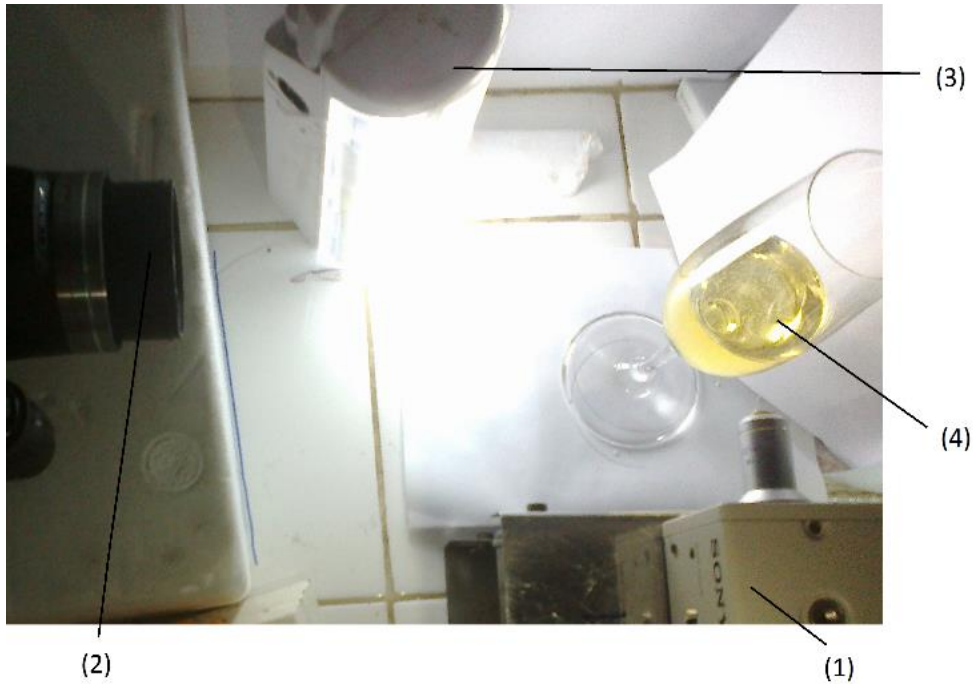


Figura IV-6 Dispositivo experimental montado para la captura de videos digitales de espumantes de naranja. (1) Cámara CCD Sony; (2) Cámara Panasonic Lumix; (3) Fuente de luz led; (4) Copa de cristal.

La cámara (2) permitió captar videos en HD, abarcando la altura total de la copa, el objetivo de utilizar esta cámara es para estudiar la evolución de la espuma y la altura del volumen de líquido.

Para determinar las posiciones relativas de cada dispositivo se siguió el procedimiento que se detalla a continuación:

Frente a la cámara (1) se ubicó la escala milimetrada hasta que la imagen se observó nítida. En ese punto se localiza el foco de la cámara por lo tanto se ubicará en esa posición la copa con el espumante a analizar. Para evaluar el efecto de distorsión causado por la pared de cristal de la copa, se suspendió el papel milimetrado dentro de la copa, en la posición focal anteriormente determinada. Así, comparando ambas imágenes se pudo estimar el error de las mediciones y se estableció la zona óptima de captura de trenes de burbujas (parte central de la copa, cercana a la pared de cristal pero alejada de los bordes laterales y por encima de la concavidad del fondo de la copa).

Con la copa y cámara (1) en su posición, se ubicó la cámara (2) que registró la evolución de la espuma capturando toda la altura de la copa.

Las fuentes de luz utilizadas son LED seleccionadas en base a ensayos previos realizados con espumantes comerciales, probando diferentes posiciones hasta optimizar la obtención de imágenes nítidas. Se colocó una pantalla translúcida entre la fuente de luz y la copa de espumante de frente al objetivo de la cámara (1).

Establecidas así las posiciones relativas de cada objeto (cámaras-copas-fuentes de luz) se marcaron sobre el banco de trabajo la ubicación de cada uno, así como las alturas correspondientes, para utilizar durante todos los ensayos.

IV.4-2 Captura de las imágenes digitales

En primer término para establecer la escala que permitirá convertir las distancias en pixeles, se capturaron imágenes de papel milimetrado, con las cámaras cada una en su posición fija.

El espumante, mantenido a temperatura de 7°C, fue volcado en copas de cristal estandarizadas para degustación de espumantes. Las copas fueron servidas de forma manual, del mismo modo que en las evaluaciones sensoriales (servido tipo cerveza) hasta la mitad de su volumen. La temperatura de la sala se mantuvo a 16°C; estas condiciones ambiente no impidieron que las copas se empañaran, por lo que se

limpiaban presionando sobre la superficie con papel tissue durante la captura de imágenes.

Se sincronizaron los tiempos en las cámaras, para comparar las imágenes obtenidas desde los diferentes ángulos y se registró de manera continua la evolución de la espuma y la formación de trenes de burbujas durante 20 minutos.

Se enfocaban trenes de burbujas en el plano focal de la cámara (1), su enfoque abarca una altura aproximada de 3 mm, la base permitió el desplazamiento vertical para registrar videos de la parte de la corona, región media de altura del fluido y cercano a la base de la copa.

De cada botella de espumante se realizaron videos por duplicado (dos capturas de 20 minutos cada una). Entre estas dos capturas consecutivas las botellas se conservaron herméticamente tapadas en heladera.

Las imágenes fueron capturadas en videos en formato VHS y transformadas en formato digital con el uso de capturadora Pinnacle. Los archivos fueron guardados en su formato original AVI sin compresión, en disco externo como respaldo y en ordenador personal con procesador Intel Core i3, con el cual fueron procesados.

IV.4-3 Procesamiento de las imágenes digitales

Las imágenes capturadas se convirtieron en video de formato AVI, compatible para ser analizadas con el software Image J de análisis de imágenes. Se utilizó procesador Pinnacle Studio®, transformando sin compresiones en videos de 60 imágenes por segundo. Cada video original capturado resulta muy pesado de procesar digitalmente por lo que se realizaron cortes en videos de no más de 1 minuto para ser procesados de manera fragmentada. Se rotuló cada video cuidadosamente especificando la muestra y los tiempos de corte referidos a la captura original. Así se puede ubicar cualquier imagen en los videos originales y volver a procesarlas de ser necesario.

Los videos capturados se analizaron y procesaron con software Image J, programa de libre distribución, con licencia de dominio público, creado por Wayne Rasband del Nacional Institute of Health (<http://imagej.nih.gov/ij/>).

En la Figura IV-7 se observa una imagen de la ventana de imágenes del programa. La barra inferior permite desplazarse entre cuadros. En la barra superior, figura el tiempo en que cada imagen fue capturada, así como el tamaño de la imagen.

El sistema de referencia ubica el cero en el extremo superior izquierdo de la imagen por lo tanto, las coordenadas en Y con menores valores son las que aparecen cercanas al borde superior de la imagen, y las que exhiben valores mayores están próximas al borde inferior.



Figura IV-7 Vista de una imagen en pantalla en el programa ImageJ.

El pre procesamiento aplicado en todos los videos consistió en:

-Establecer la escala que permite realizar mediciones, en base a las capturas de escalas milimetradas. En el programa se define la escala que convierte pixeles en mm (en este

caso) para evaluar un video y esta se mantiene durante todas las mediciones que se realicen (cada vez que se inicia el programa se debe volver a calibrar).

- Abrir los videos como secuencias de imágenes (*stacks*).
- Convertir en escala de grises.
- Operaciones aplicadas en forma “manual” (a cada video incluso a cada imagen de una secuencia): aumento de contraste, detección de bordes y filtros para eliminar ruidos.

Al abrir un “stack” se convierte el video en secuencia de imágenes. En cada imagen (figura IV-7) en la barra superior se lee: número de cuadro/nº total de cuadros del video; tiempo (s) en que fue captada esta imagen, tamaño de la imagen (alto x ancho) en pixeles, tipo de imagen y tamaño de almacenamiento. La barra inferior permite el desplazamiento entre imágenes del mismo video.

Luego, en función de las características de la espuma a estudiar en cada video, se realizaron operaciones diferentes:

- “Threshold” para analizar trenes de burbujas.
- “Multipoint” para establecer posiciones relativas de las burbujas
- Selección de formas que ajustan a las burbujas, para extraer características geométricas (perímetro, área, posición del centro de masas).

IV.4-4 Datos obtenidos de las imágenes

El programa ImageJ permite realizar mediciones sobre las formas seleccionadas o aspectos de una imagen (figura IV.8). Los resultados de las mediciones los vuelca en una tabla que luego se pueden importar en cualquier planilla de cálculo.

A partir de los videos capturados con la cámara (1) al procesarlos en Image J se pudieron obtener los siguientes datos:

Posición de una burbuja: Seleccionando una forma geométrica (forma de elipse, mostrada en la Figura IV-8) el programa registra los valores de posición del centro de esa

figura, en coordenadas cartesianas, en la escala establecida, por lo tanto expresada en mm.

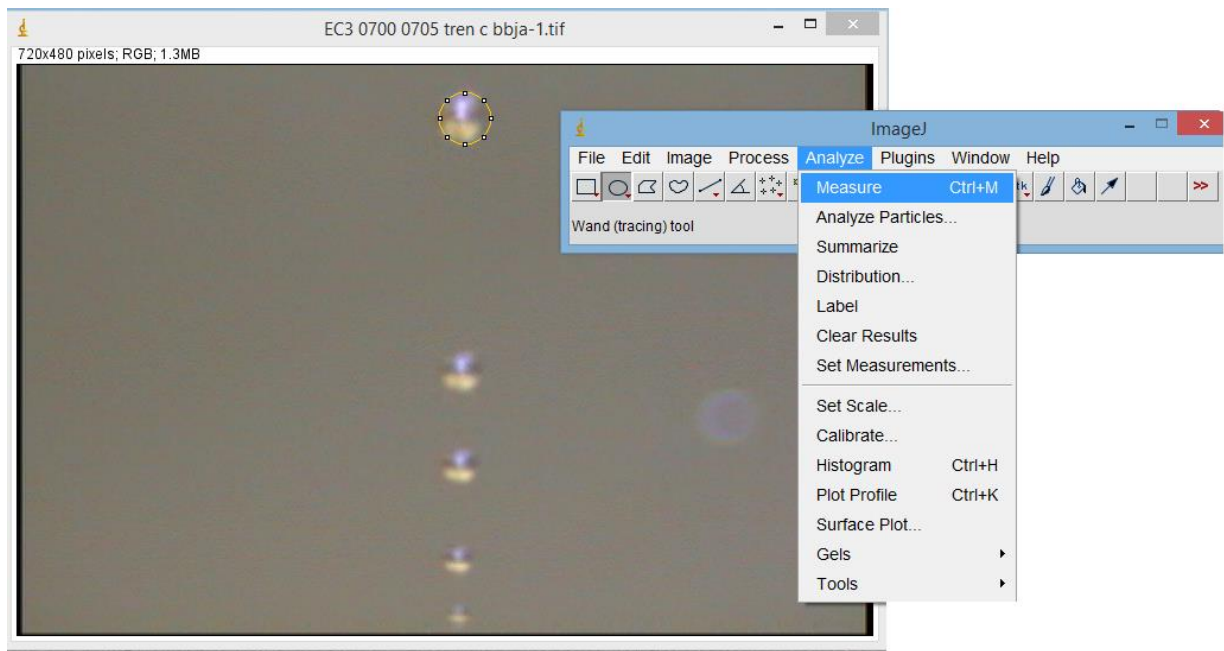


Figura IV-8 Vista de un tren de burbuja con forma seleccionada; se muestra en la barra de herramientas la opción que permite realizar mediciones elegidas previamente de la opción “Set measurements”.

Frecuencia de un tren de burbujas: se estableció una posición de referencia y se midió el tiempo hasta que otra burbuja pasa por esa posición, este sería el período de una burbuja por lo tanto la frecuencia es la inversa de este valor, resultando expresada como N° burbujas/segundo.

Radio de una burbuja: midiendo el perímetro del contorno de una burbuja y con este valor se calculó el radio.

La variación de la posición de los centros de masa de las burbujas en un tren, al transcurrir el tiempo permitió evaluar la velocidad de las mismas, graficando posición vs tiempo.

Con la cámara lateral (2) se registraron videos que abarcaron toda la altura del líquido. A partir de estos videos se evaluó la altura de la espuma y su evolución en el tiempo. Se seleccionó la herramienta “línea” y se midió la altura en tres posiciones en cada imagen, como se muestra en la Figura IV-9. La altura registrada resulta el promedio de las tres medidas en un momento dado.

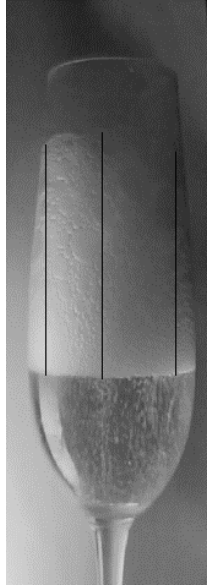


Figura IV-9 Mediciones de la altura de la corona, para estudiar su evolución en el tiempo.

IV.4-5 Análisis estadístico de los resultados

Los datos se procesaron utilizando software estadístico Statgraphic Centurion®.

Para analizar los datos de frecuencias de los trenes de burbujas se realizaron ANOVA simples para determinar diferencias significativas en base al estadístico de Fischer, con un 95% de confianza.

Se ajustaron modelos de regresión a los conjuntos de datos obtenidos de posición en función del tiempo y radios en función del tiempo, con la finalidad de describir el movimiento de las burbujas desde sus sitios de nucleación, durante su ascenso en el seno del líquido y en las proximidades de la interfase. Se obtuvieron así las funciones de velocidad, aceleración y ratio de crecimiento de las burbujas que permitieron describir y analizar la cinética de la formación y ascenso de burbujas.

CAPÍTULO V

RESULTADOS

V.1 Resultados Fisicoquímicos

V.1-1 Obtención del vino base de naranja

La elaboración del vino base para luego proceder a la segunda fermentación, (siguiendo el diagrama de flujo detallado en IV.1) se realizó en octubre de 2012, con naranja de la variedad Valencia late que provino de un empaque de la zona. Se procesaron 495 kg de naranjas previamente cepilladas y enjuagadas por aspersión, en extractora tipo FMC, y se obtuvieron aproximadamente 240 L de jugo resultando un rendimiento de jugo del 48,4%p/p. Las principales características del jugo obtenido fueron: 10,3 °Brix, pH=3,1; acidez= 0,128 g ácido cítrico/100ml.

Según la ecuación de fermentación (IV.1), fueron necesarios 20 g de azúcar/100 ml de mosto en total. Descontando la cantidad disponible de azúcares presentes en el jugo (estimados a partir de los°Brix) fue necesario agregar al mosto obtenido 4,8 kg de sacarosa. Esta cantidad total se dividió en tres fracciones, que se fueron agregando a medida que se registraba su consumo. Inicialmente, al jugo clarificado se agregó 1,6 kg de sacarosa, y se inoculó con el pie de cuba preparado como se indicó en el capítulo IV.

Se obtuvieron 165 l de vino base obteniéndose así un rendimiento calculado en base al jugo de 68,8%. Se reservaron 15,0 l para preparar licor de expedición, envasados en botellas de 750 ml de vidrio oscuro.

V.1-2 Caracterización fisicoquímica del vino base de naranja

Para establecer las características del espumante, previamente se debe conocer y estandarizar el vino base ya que define la calidad del producto final.

Se tomaron muestras y determinaron las principales características fisicoquímicas del vino base de naranja que se muestran en la Tabla V-1.

El contenido en etanol alcanzado por los vinos base fue de 9,6°G.L., que resulta apropiado para un vino base que será fermentado por segunda vez (Ribéreau-Gayón et al., 2008).

Tabla V-1 Características fisicoquímicas de los vinos base de naranja para la elaboración de espumantes (valores medios y desviación estándar de muestras por triplicado).

PARAMETROS FÍSICOQUÍMICOS DEL VINO BASE de NARANJA	
Densidad (kg/dm ³)	1,009±0,006
Viscosidad (cP)	1,50±0,10
Tensión superficial (mN/m)	59,8±2,6
Etanol (°G.L.)	9,6±0,3
pH	3,55±0,07
Sólidos solubles (°Brix)	7,3±0,2
Acidez total (g ác cítrico/100 ml)	1,05±0,05
Acidez volátil (g ac. Acético/100 ml)	0,63±0,02
Azúcares reductores (%)	0,14±0,02
Azúcares totales (%)	0,15±0,03
Glicerol (g/l)	7,51±0,89
Proteínas (ppm)	164,7±8,8
SO2 libre	32,4±2,6
SO2 total	36,2±3,1

La acidez de los vinos en general es importante por las características de sabor que les imparte, pero es mucho más significativa por las condiciones que puede establecer para el crecimiento de la levadura y en nuestro caso, para una buena fermentación secundaria. Los ácidos orgánicos de las frutas son los principales responsables de la acidez total del vino y contribuyen a las características organolépticas finales, así como a la estabilidad biológica y fisicoquímica posterior (Clarke & Bakker, 2004). La acidez total en los vinos de naranja resulta superior a los valores encontrados en vinos similares, entre 5,96-8,0 g/l (Corazza, Rodrigues, & Nozaki, 2001) pero ya registrados en vinos de naranja procedentes de diversas variedades (Schwab, 2006).

El glicerol es el tercer componente más abundante presente en el vino. Se origina en los primeros momentos de la fermentación alcohólica, mediante el proceso denominado fermentación glicero-pirúvica (Ribéreau-Gayón et al., 2008). Las levaduras que son capaces de desviar el consumo de azúcar para producir glicerol durante la glicólisis, también tiene como característica que disminuyen el rendimiento en la obtención de etanol (Pretorius, 2000). Por lo tanto, la producción de este metabolito transcurre durante la fermentación del mosto para obtener el vino base, cuya concentración de etanol es baja. Los contenidos en los vinos han sido reportados en rangos muy amplios,

desde 2 a 10 g/L. El contenido determinado en los vinos base de naranja, de 7,51 g/l están dentro de los valores previstos.

El sulfitado con la dosis correcta permite obtener vinos de sabor y olor más agradables, es decir de mayor frescor, con mejor color debido a su acción antioxidante. Sin embargo excesivas cantidades ejercen el efecto contrario provocando alteraciones en el sabor (Aleixandre Benavent, 1999).

Para la medida física del color de los vino de naranja se utilizó el programa MSCV (Ayala, Echavarri, & Negueruela, 2001). Este programa determina las coordenadas de color (L*, a* y b*) con iluminante D65 y observador de 10º mediante la medida espectrofotométrica de la absorbancia a cuatro longitudes de onda (450, 520, 570, 630 nm) y cubetas de 10 mm como lo propuesto por la O.I.V.

En la Tabla V-2se observan los valores obtenidos para el vino base.

Tabla V-2 Resultados de color para vino base de naranja

Coordenadas de color	L*	C*	h*	a*	b*
	83	20,1	89,1	0,31	20,1

La contribución del color amarillo expresada a través del parámetro b* de la escala de color CIELab, señaló valores más cercanos a los determinados para jugos de naranja, que a los reportados para vinos de naranjas de otras variedades (Schwab, 2006). El parámetro a* indicador del color rojo en cambio mostró valores más aproximados a los encontrados en vinos de naranjas de las variedades W. Navel y Navelina (Schwab, 2006). En lo que se refiere al parámetro L*, luminosidad, se observa un valor elevado, similar a los reportados para vinos de Jerez (Monedero et al, 2000). El valor relativamente alto de h* podrían atribuirse a los pigmentos amarillos que absorben a 420 nm (Gil-Muñoz, Gómez-Plaza, Martínez, & López-Roca, 1997).

Los datos de viscosidad experimental para los vinos de naranja analizados a 20°C, resultaron comparables a los de vinos blancos reportados por Košmerl et al. (2000) que publican valores entre 1,456 a 1,678 mPas a 20°C (medidas con viscosímetro capillar Ubbelodhe) y Yanniotis et al. (2007), que reportan entre 1,66 y 1,93 mPas a 16°C (medidas realizadas con viscosímetro Hoppler, HAAKE) Los vinos de naranja se comportan como fluidos newtonianos en el rango de temperaturas que soportan

durante su proceso de elaboración y maduración (María Cristina Cayetano Arteaga, Stefani, Ferreyra, & Schwab, 2013).

V.1-3 Obtención del Espumante de naranja

Se prepararon 5 litros de licor de tiraje con agregado de chips de levaduras, siguiendo las pautas establecidas en el capítulo IV.2-2, y 5 litros de licor sin agregado de chips de levaduras. El contenido de azúcar agregado fue calculado con la intención de obtener no más de 4 atmósferas para lograr un producto finamente gasificado, agregando en base al contenido de alcohol del vino base, 20 g de azúcar/l de vino base.

Se obtuvieron 95 botellas de 750 ml con el agregado de chips de levaduras y 92 botellas sin agregado de chips, que fueron rotuladas “EC” y “ES” respectivamente.

Todas se dispusieron en rima, en canastos de madera colocados en 4 filas de botellas encimadas. Durante 5 días consecutivos se aplicó movimiento de “clavas” a las botellas, para asegurar el contacto uniforme de las levaduras con los nutrientes. Luego se las mantuvo en esas condiciones durante 40 días. Se midió la presión utilizando afrómetro (Figura V-1) en dos botellas EC y en dos botellas ES.



Figura V-1 Medición de la presión con afrómetro que perfora tapa corona.

De manera cualitativa, al observar una botella horizontalmente a contraluz se podía apreciar el depósito de las lías, y el líquido se percibía translúcido (Figura V-2), indicando

el fin de la fermentación y deposición de las levaduras inactivadas. En el proceso realizado, los espumantes finalizaron la toma de espuma a los 32 días de envasados.



Figura V-2 Deposición de las borras finalizada la segunda fermentación.

Finalizada la segunda fermentación los espumantes de naranja comenzaron su período de añejamiento en contacto con las borras (o lías), con la finalidad de adquirir características deseables, mejorar la integración de las burbujas, permitir la autólisis de las levaduras, desarrollar sabores, entre otros cambios que afectan la calidad del producto final. Como se explicó se eligieron 3 niveles de tiempos para analizar la influencia de este factor: 9, 12 y 18 meses.

A los 9 meses se colocaron 15 botellas EC y 15 botellas ES en el pupitre de madera como muestra la Figura V-3 (a). Diariamente se le aplicó a cada botella un movimiento giratorio de $1/8$ de vuelta en sentido horario hasta completar dos vueltas y luego en sentido antihorario $1/4$ de vuelta cada día hasta completar dos giros. La inclinación se aumentó progresivamente mediante el cerrado del pupitre, de forma tal que al finalizar el proceso las botellas quedaron “en punta” (figura V.3 (b)), con las borras acumuladas en el opérculo.

Las botellas en punta fueron enfriadas en heladera, durante 24 horas. Para realizar la operación de degüelle se utilizó un baño de solución incongelable (etilenglicol al 45 %) que alcanzó una temperatura de -25 °C.

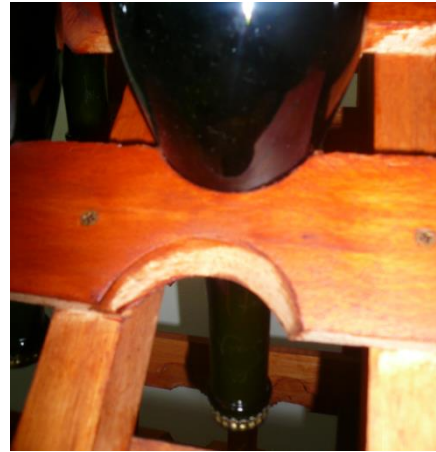


Figura V-3 a) Pupitre de madera utilizado para la remoción de las borras. b) Botella “en punta” lista para proceder al degüelle.

Los picos de las botellas en punta se sumergieron en el baño, -Figura V-4(a)- hasta que se congelaron. Se invirtieron y al destapar la tapa corona -Figura V.4 (b)- salieron despedidas las borras acumuladas congeladas junto con el opérculo, y obviamente con algo de espumante.



Figura V-4 (a) Baño para congelar picos de las botellas y (b) momento del degüelle para eliminar borras congeladas depositadas en el opérculo.

Se completó el volumen de las botellas con espumante de una de las botellas, utilizada así como “licor de expedición”, sin agregado de azúcar, y se taparon nuevamente con opérculo y tapa corona. Una vez rotulados, indicando el tiempo de degüelle. Se

dispusieron horizontalmente en bodega a la temperatura de cámara (15°C) y al abrigo de la luz, hasta el momento de su evaluación fisicoquímica y sensorial. A los 12 meses se repitió el mismo proceso y a los 18 meses se realizó el degüelle de la última tanda de botellas con el objetivo de ser analizados en esta tesis. Las restantes botellas continúan almacenadas en contacto con las borras para posteriores estudios.

V.1-4 Caracterización fisicoquímica de los espumantes de naranja

En el caso de los espumantes de naranja se ha publicitado acerca de la comercialización de un vino espumoso de naranja obtenido por aplicación del tradicional método champenoise (“Burnaj”, <http://www.burnarj.es/quees.html>) no se han encontrado reportes de investigaciones sobre la caracterización fisicoquímica de este producto, por lo tanto se hará referencia a los vinos base y espumantes tradicionales ampliamente caracterizados, para comparar resultados obtenidos.

Al destapar una botella de espumante y servir una copa se observa un sistema heterogéneo, en el cual se distingue la fase gaseosa, formada por las burbujas de CO₂ que se liberan por la brusca descompresión, inmersas en una fase líquida, translúcida, que es una compleja solución hidroalcohólica de múltiples componentes.

V.1-4.i Presión y CO₂

El CO₂ formado durante la segunda fermentación por acción de las levaduras sobre los azúcares fermentescibles, conservado en recipiente cerrado, es la característica esencial que define a los vinos espumantes. La cantidad de gas formado depende de la actividad metabólica de las levaduras así como de la disponibilidad de azúcares. Durante el desarrollo de la segunda fermentación a medida que se forma el gas se disuelve en la fase líquida y genera presión en el interior del recipiente. La presión desarrollada dentro de la botella es directamente proporcional a la concentración del CO₂, según la ley de Henry (Ecuación 2, Capítulo 1.3-1); K_H depende del contenido de azúcares y etanol y principalmente de la temperatura (Vignes-Adler, 2013), como se muestra en la tabla V.3.

Se registró la presión de los espumantes posteriormente al degüelle, presión final, la que está disponible al destapar una botella.

Tabla V-3 Constante de la ley de Henry en función de la temperatura, para un champagne típico con 12,5%v/v de etanol y 10 g/l de azúcares. (adaptada de Liger-Belair et al, 2005)

Temperatura (°C)	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
K_H ($\text{kgm}^{-3}\text{atm}^{-1}$)	2,98	2,88	2,78	2,68	2,59	2,49	2,41	2,32	2,23	2,16	2,07	2	1,93

Las presiones registradas estuvieron levemente por debajo de las 4 atmósferas calculadas para la preparación del licor de tirage.

La temperatura a que se realizó cada medición permitió elegir los valores de K_H de la tabla V.3 y aplicando la ley de Henry, se calculó la cantidad de dióxido de carbono disuelto en los espumantes.

Los contenidos de CO_2 resultaron menores a los reportados en espumantes tradicionales tipo cava y champagne (≈ 12 g/l), porque justamente se buscó un espumante suavemente gasificado.

Tabla V-4 Presión del espumante al descorchar y contenido de anhídrido carbónico calculado aplicando la ley de Henry (*valores medios y desviaciones estándar determinados en dos botellas)

	ES1	ES2	ES3	EC1	EC2	EC3
Presión (atm)*	3,85±0,04	3,80±0,07	3,70±0,06	3,95±0,06	3,80±0,05	3,65±0,06
CO₂ (g/l)	8,6	8,8	8,0	8,8	8,8	8,1
Temperatura	8°C	7°C	9°C	8°C	7°C	8°C

La temperatura se mantuvo controlada durante la etapa de toma de espuma, recomendado para desarrollar una fermentación regular y lenta, que mejora la integración del CO_2 formado, otorgando fineza a la espuma al descorchar y servir.

La presión generada presenta un efecto inhibitorio muy fuerte en la producción de biomasa y actividad fermentativa de las levaduras, y esta inhibición es reducida cuando las células de levaduras son adaptadas previamente al medio antes de ser inoculadas en el vino (Martí-Raga, Sancho, Guillamón, Mas, & Beltran, 2015). Además a bajas temperaturas, como la solubilidad de los gases aumenta, esto reduce la presión y las concentraciones de CO₂, disminuyendo así el efecto inhibitorio de la presión sobre el crecimiento de las *S. cerevisiae* (Kunkee & Ough, 1966).

V.1-4.ii Parámetros físicos

En la Tabla V-5 se muestran los valores de los parámetros físicos: densidad, viscosidad y tensión superficial de los espumantes de naranja, determinados a muestras de todos los espumantes previamente desgasificados como se indicó en el capítulo IV. Estos valores de densidad, viscosidad y tensión superficial, permiten calcular parámetros de flujo que definen el comportamiento del espumante y su efervescencia: número de Reynolds, coeficientes de difusión, radio crítico de nucleación de las burbujas, (que se discuten en el apartado V.5).

Tabla V-5 Parámetros físicos de los espumantes de naranja

(Valores medios y desviaciones estándar de muestras por triplicado; letras diferentes indican diferencias significativas, $\alpha=0,05$).

	Densidad (kg/dm ³)	Viscosidad (cP)	Tensión superficial (mN/m)
ES1	1,007±0,019a	1,50±0,10b	54,9±3,3c
ES2	0,975±0,042a	1,51±0,10 b	53,5±1,4 c
ES3	1,006±0,015a	1,55±0,12 b	52,4±3,1 c
EC1	1,002±0,014a	1,60±0,15 b	52,9±1,6 c
EC2	0,998±0,021 a	1,65±0,19 b	52,1±4,2 c
EC3	1,006±0,015 a	1,63±0,10 b	55,2±1,3 c

La viscosidad es una propiedad de transporte que define el comportamiento al flujo de un fluido y es necesario cuantificarla para la selección, diseño y operación del proceso de obtención. Además, y no menos importante, la viscosidad es una característica sensorial que afecta la aceptación de un alimento por parte del consumidor (Steffe, 1994). La viscosidad de los espumantes de naranja resultó en todos los casos similar a la de los vinos base y su comportamiento reológico responde a un modelo de flujo newtoniano. Los ensayos ANOVA indicaron que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los valores de viscosidad, determinados en las muestras, a los distintos tiempos en contacto con las borras ni con diferente composición del licor de tirage, con un 95% de confianza, presentando valores similares al vino base. Los valores mostrados en la Tabla V.5 son comparables a los reportados para champagne (1,48 mPas) por Liger-Belair (2005), determinados por el método de la caída de la gota.

La densidad de los espumantes de naranja, entre 0,975 y 1,007 kg/m³ también son comparables a las de champagnes, 998 kg/m³ (Gérard Liger-Belair, 2005). Al igual que con la viscosidad, los valores de densidad resultan similares a los del vino base, y no se detectaron diferencias estadísticamente significativas, a los distintos tiempos en contacto con las borras ni con diferente composición del licor de tirage, con un 95% de confianza.

Los valores de tensión superficial son de especial interés ya que las propiedades tensoactivas de los espumantes determinan la estabilidad de las burbujas y se observa que en todos los espumantes resultaron menores que la tensión superficial del vino base. La tensión superficial de los espumantes de naranja presentó valores entre 52,1 y 56,4 mN/m a 20 °C. En champagnes se han reportado valores en el orden de 50 mN/m (Andres-Lacueva et al., 1996; Gérard Liger-Belair, Bourget, et al., 2010; Voisin, 2005). Es reconocida la influencia de ciertos constituyentes químicos del champagne sobre la tensión superficial de los mismos. La tensión superficial de vinos son cercanas a las de soluciones hidroalcohólicas con la misma concentración de alcohol (Senée et al., 1999). La adición de etanol disminuye significativamente la tensión superficial de soluciones acuosas: el valor correspondiente a la tensión superficial del agua destilada fue a 23°C medida por el método de DuNuoy resultó 76,8±0,1 mN/m; una solución acuosa con 12% v/v de etanol exhibe una tensión superficial de 49,5±0,6 mN/m a 25°C, mientras que con

10%v/v el valor reportado es de $52,2 \pm 0,8$ mN/m a 25°C (Glampedaki, Hatzidimitriou, Paraskevopoulou, & Pegiadou-Koentzopoulou, 2010). Otros componentes como las proteínas y los polisacáridos, aunque presentes en pequeña concentración pueden exhibir elevados efectos superficiales.

Tabla V-6 Componentes químicos determinados en espumantes de naranja.

PARAMETROS ENOLÓGICOS DE LOS ESPUMANTES						
	EC1	EC2	EC3	ES1	ES2	ES3
alcohol (°G.L.)	11,8±0,2a	11,6±0,3a	12±0,1 ^a	12±0,1a	12±0,1a	11,8±0,3a
pH	3,63±0,01a	3,58±0,01a	3,61±0,01 ^a	3,59±0,01a	3,55±0,01a	3,55±0,01a
Sólidos solubles (°Brix)	7,8±0,5a	8,0±0,4a	7,7±0,2 ^a	6,8±0,1a	6,4±0,2a	6,4±0,3a
Acidez total (g ác cítrico/100 ml)	1,03±0,07a	1,12±0,06a	1,05±0,05a	1,09±0,06a	1,00±0,02a	1,02±0,08 a
Acidez volátil (g ac. Acético/l)	0,49±0,06	0,63±0,07	0,36±0,03	0,40±0,03	0,40±0,01	0,33±0,02
Azúcares reductores (%)	0,48±0,04 a	0,4 9±0,03 a	0,43±0,02 a	0,58±0,02 b	0,41±0,02 b	0,32±0,01 c
Azúcares totales (%)	0,52±0,01a	0,52±0,01a	0,46±0,03a	0,58±0,01b	0,43±0,02b	0,41±0,04b
Glicerol (g/l)	8,63±0,81 a	8,54±0,94 a	9,12±0,65 a	9,33±0,86 a	8,56±0,70 a	9,41±0,54 a
Proteínas (ppm)	196,5±6,8 a	186,1±3,5 a	190,2±5,9 a	182,5±7,4 a	179,1±4,4 a	179,5±2,3 a
SO ₂ libre (mg/l)	5,12±0,08	6,4±0,9	5,03±0,8	3,84±0,12	4,12±0,9	5,73±0,25
SO ₂ total(mg/l)	22,4±1,2	24±2,3	12,8±0,9	41,6±4,1	16,1±1,7	14,4±2,3

(Valores medios y desviaciones estandar de muestras por triplicado). Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($\alpha=0,05$).

V.1-4.iii Composición química básica

En la tabla V.6 se describe la composición química de los espumantes de naranja; los diferentes tratamientos no generaron diferencias significativas ($\alpha=0,05$) en la mayoría de las variables observadas.

La graduación alcohólica de los espumantes obtenidos resultó entre 11,6-12°G.L. a partir de un vino base con 10°G.L., lo que muestra un incremento entre 1,4-2°G.L. durante la toma de espuma, aumento previsible y esperado en todos los procesos de champanización tradicionales (Ribéreau–Gayón et al., 2008). Este valor ha sido ajustado en base a experiencias previas (Stefani Leal et al. 2011) en las que se habían obtenido espumantes de naranja con mayores contenidos de etanol.

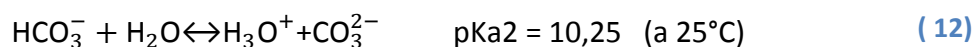
El contenido en azúcares totales de los espumantes de naranja obtenidos en todos los casos resultó comprendido entre 3 y 8 g/l por lo que podríamos definirlos tipo “Extra Brut” atendiendo a las categorías para vinos espumantes establecidas en el Reglamento Vitivinícola del Mercosur (Res No. 45/96). En el proceso de degüelle, no se agregó azúcar en el licor de expedición, por lo tanto esta cantidad representa azúcares que quedaron sin fermentar al finalizar la toma de espuma.

El pH afecta a varios componentes de los vinos, por ejemplo, el balance entre las diferentes formas iónicas del ácido carbónico y del dióxido de azufre, la configuración de las proteínas. En solución acuosa el CO₂ formado durante la segunda fermentación se encuentra en equilibrio con el ácido carbónico, como se expresa en la ecuación (10):



El ácido carbónico es un ácido débil que en solución acuosa establece los equilibrios mostrados en las ecuaciones (11) y (12), sufriendo dos disociaciones:





A los pH de los espumantes y champagnes, no deberían encontrarse los iones carbonatos y bicarbonatos en equilibrio con el CO₂ disuelto, lo que ha sido confirmado por espectroscopía de resonancia magnética nuclear (Gérard Liger-Belair, Prost, Parmentier, Jeandet, & Nuzillard, 2003) y por lo tanto este comportamiento sería esperable en los espumantes de naranja (pH entre 3,55-3,63).

Las diferentes formas de acidez: total, volátil y “real” (o pH) inciden en la percepción organoléptica y permiten evaluar eventuales alteraciones microbianas (Ribéreau-Gayón et al., 2008). La acidez total es afectada por la concentración de CO₂ disuelto, por lo que es necesario eliminar los gases presentes previo a las determinaciones de acidez. Los valores encontrados de acidez volátil resultan por debajo de los recomendados para champagne, que en Francia para champagnes con D.O.C. son de 1,1 g/l (Ribéreau-Gayón et al., 2008). En los espumantes de naranja la acidez total alcanzada no fue inferior a 10 g/l, valores típicos para vinos de naranja que pueden resultar intensos en la percepción sensorial pero que resultó una característica distintiva del ácido cítrico.

Varios autores acuerdan que el dióxido de azufre puede afectar negativamente la calidad de la espuma de los vinos (Girbau-Sòla et al., 2002; López-Barajas et al., 1997; Maujean et al., 1990; Pueyo et al., 1995). Según Kolb (2002), el contenido de SO₂ libre para los vinos de frutas debe estar comprendido entre 25 y 40 mg/L, rango en el cual se encuentran los espumantes de naranja (no superaron 41 mg/l) y que además se encuentran muy por debajo de los límites legales establecidos en el Código Alimentario Argentino. Los bajos pH de los espumantes de naranja favorecen también la acción antiséptica del SO₂, otorgando mayor estabilidad microbiológica.

Hay cierta controversia acerca de los efectos de la acidez total en la calidad de la espuma, ya que algunos autores considera que proporciona efectos beneficiosos (Andres-Lacueva et al. 1996; Girbau-Solà et al. 2002;) mientras que otros le atribuyen efectos negativos (Brissonet & Maujean, 1993; López-Barajas et al., 1997).

La formación de glicerol como se explicó anteriormente para los vinos de naranja, está en relación con la temperatura de fermentación, el contenido de alcohol, la cepa de levadura, entre otros factores, y es uno de los componentes mayoritarios de los vinos. Los valores determinados en los espumantes de naranja estuvieron comprendidos entre 8,54 y 9,41 g/l. Valores similares han sido reportados para vinos blancos. Noble & Bursick (1984) determinaron la contribución del glicerol a la viscosidad percibida de los vinos blancos y concluyeron que era necesaria una adición de 25,8 g/L de glicerol para producir un incremento detectable en la viscosidad percibida. Esta concentración de glicerol es muy superior a la encontrada en los vinos de naranja, y si bien se ha reportado que el glicerol podría contribuir al dulzor de los vinos blancos (Reynolds, Cliff, Girard, & Kopp, 2001), en el caso de los vinos de naranja no se pudo apreciar su contribución a este atributo sensorial (Schwab, 2006), aunque no podemos descartar efectos sinérgicos con otros componentes del vino (María Cristina Cayetano Arteaga et al., 2013).

La composición de las lías es compleja y variable, contiene principalmente microorganismos (levaduras), y en menor proporción sustancias inorgánicas (Pérez-Serradilla & de Castro, 2008). La autólisis de las levaduras es un proceso continuo que puede extenderse por lo menos por varios meses (A J Martínez-Rodríguez, Carrascosa, Martín-Alvarez, Moreno-Arribas, & Polo, 2002); asociado a la muerte de las células, que involucra enzimas hidrolíticas que actúan para liberar sustancias citoplasmáticas (péptidos, ácidos grasos, nucleótidos y aminoácidos) y componentes de la pared celular: las manoproteínas (Alexandre & Guilloux-Benatier, 2006). Mientras el vino espumante se encuentra en contacto con las borras, estas le proporcionan efecto buffer de oxidorreducción, el vino se conserva y se añeja perfectamente (Ribéreau-Gayón et al., 2008).

La liberación de componentes celulares productos de la autólisis de las levaduras incluye aminoácidos, péptidos, proteínas y polisacáridos, compuestos relevantes en la formación y estabilización de espuma (Blasco et al., 2011).

V.1-4.iv Proteínas

Los compuestos nitrogenados son considerados generalmente como los principales componentes que se liberan durante la autólisis de las levaduras (A J Martínez-Rodríguez et al., 2002). El origen de las proteínas en los espumantes es múltiple; pueden proceder de la materia prima, de las levaduras y/o de los productos de clarificación (coadyuvantes de tirage). El contenido de proteínas en los vinos no se correlaciona con el contenido inicial de proteínas en los mostos, debido a desnaturalización de las mismas, producto de la actividad proteolítica, y cambios en el pH del medio durante las fermentaciones (Dambrouck et al., 2003). La mayoría de las proteínas de los vinos exhiben bajos puntos isoeléctricos, entre 4,1 a 5,8, (Ferreira, Piçarra-Pereira, Monteiro, Loureiro, & Teixeira, 2001), sería de esperar que en los espumantes de naranja a pH menores a estos valores (3,53-3,63) las proteínas aparecerían más hidrofóbicas, por lo tanto, con mayor actividad superficial que favorecerían las propiedades espumantes. El etanol actúa como un solvente muy pobre de las proteínas, especialmente con estos valores de pH, cercanos al punto isoeléctrico, es decir de menor solubilidad, y además actúan como agente desnaturalizantes, principalmente debilitando las uniones hidrofóbicas y por lo tanto, exponiendo los extremos de las cadenas hidrofóbicas al medio, en el estado desnaturalizado (Senée, 1999).

La aislación, separación y caracterización de las proteínas es una tarea compleja debido a su baja concentración y fuerte interacción con polifenoles endógenos y otros compuestos no proteicos (Ferreira et al., 2001). El ensayo utilizado para cuantificar proteínas en esta tesis se basa en el uso del reactivo de Bradford, que reacciona con proteínas y polipéptidos de pesos moleculares mayores de 3,0 KDa (Luguera, Moreno-Arribas, Pueyo, Bartolomé, & Polo, 1998); es la técnica más común usada para vinos, porque es simple y rápida, pero la precisión de los resultados es relativa ya que no hay estándares de proteínas de vinos, por lo tanto, no se puede realizar una calibración precisa y la respuesta de las diferentes proteínas al reactivo es variable (Le Bourse, Jégou, Conreux, Villaume, & Jeandet, 2010)

En el licor de tirage los elaboradores de champagne y cava agregan bentonita para facilitar el proceso de removido de las levaduras finalizado el proceso de maduración; el uso de bentonita en el licor de tirage beneficia la calidad del espumante y remueve enzimas oxidativas (Puig-Deu et al, 1999). Sin embargo la presencia de estos clarificantes, se ha reportado que deterioran la calidad y persistencia de las espumas de los espumantes tradicionales (Cilindre et al., 2010); pueden eliminar más del 80% de proteína soluble total afectando así las propiedades espumante (Vanrell et al., 2007). En la composición del licor de tirage utilizada para la obtención del espumante de naranja se ensayaron previamente diferentes concentraciones de bentonita (A. Stefani Leal et al., 2014) y no se encontraron diferencias en las evaluaciones sensoriales.

El contenido proteico del espumante de naranja es el resultado por lo tanto de todo el proceso de obtención, siendo influenciado por la variedad de naranja, el proceso de clarificación del vino base, la composición del licor de tirage, el tiempo de crianza que permita el desarrollo de los procesos de autólisis de las levaduras. Se puede afirmar con un 95% de confianza, que el proceso de añejamiento a los diferentes tiempos analizados no mostró diferencias estadísticamente significativas ni tampoco se detectaron diferencias en el contenido de proteínas entre los espumantes con y sin chips agregados. Se observa en la tabla V.6 un contenido levemente superior del contenido proteico en los espumantes con chips agregados, en todo el proceso de añejamiento.

La evolución del contenido de proteínas durante el proceso de añejamiento de espumantes ha sido analizada por numerosos autores, reportando resultados diversos. Vanrell (2002), no han detectado liberación de proteínas al cabo de 24 meses en contacto con las borras. Luguera et al. (1998) han observado una disminución inicial del contenido de proteínas durante la segunda fermentación, seguido por un incremento entre 6 a 12 meses, probablemente por la liberación al medio de polipéptidos procedentes de la lisis de la pared celular de las levaduras y a continuación una estabilización hasta los 18 meses de estudio. Otros autores (Alexandre & Guilloux-Benatier, 2006) han reportado la liberación de aminoácidos al medio incluso antes de que comiencen los procesos de autólisis. Martínez-Rodríguez et al. (2002) encontraron que el contenido de nitrógeno proteico disminuye

durante 180 días de añejamiento, luego entre 180 y 360 días observaron un incremento que podría asociarse con los procesos de autólisis. En el caso de los espumantes de naranja se han determinado contenidos proteicos a partir de 270 días (9 meses), podríamos considerar que los procesos de autólisis de las levaduras se encuentran avanzados. Los resultados obtenidos (valores entre 179 y 195 ppm) nos muestran elevados contenidos en proteínas solubles, en comparación con los publicados en cavas y champagnes, pueden ser atribuidos además de los procesos de autólisis mencionados, a los nutrientes adicionados en el licor de tirage, ya que fue enriquecido con el complemento Fermoplus Energy®. Los requerimientos de nitrógeno durante la segunda fermentación son muy bajos, y la adición de nitrógeno al licor de tirage –práctica común en enología- solo mejora la cinética de la fermentación en el caso de vinos con muy bajos contenidos de nitrógeno (por debajo de 30 mg/l) (Martí-Raga et al., 2015) que no es el caso de los espumantes de naranja, ya que los vinos base utilizados en la elaboración mostraron contenidos proteicos suficientes para cubrir estos requerimientos.

V.1-4.v Polisacáridos

Los polisacáridos son componentes mayoritarios de la fracción coloidal de los vinos espumantes. En champagnes se encuentran en concentraciones mayores a 200mg/l (Voisin, 2005) y su importancia en la formación y estabilización de burbujas es reconocida (A J Martínez-Rodríguez et al., 2002; Nunez et al., 2005). Las manoproteínas son polisacáridos neutros compuestos principalmente por manosa y pequeñas cantidades de glucosa asociadas con proteínas (Coelho, Rocha, & Coimbra, 2011), por lo que resultan particularmente importantes dada su naturaleza hidrofóbica que provoca la adsorción preferencial en la interfaz gas/líquida de las burbujas (Andres-Lacueva et al., 1996; A J Martínez-Rodríguez et al., 2002; Nunez et al., 2005). El estudio de la evolución de polisacáridos es usado para evaluar el grado de autólisis, porque cuantifica mayormente glucanos y manoproteínas procedentes de la pared celular de las levaduras (Rodríguez-Nogales, Fernández-Fernández, & Vila-Crespo, 2012). Los polisacáridos tienden a proteger

a las proteínas de la desnaturalización por etanol y también a incrementar su solubilidad (Senée et al., 1999).

La determinación de polisacáridos en espumantes de naranja fue realizada en el laboratorio del grupo de investigación en Tecnología Enológica de la Universitat Rovira i Virgili (Tarragona, España), que han adaptado la metodología para determinación de polisacáridos en vinos de uva (Gil et al., 2012), a estos espumantes de naranja. Los valores totales de polisacáridos determinados son mostrados en la Figura V-5.

Se aislaron tres fracciones denominadas PMA (Peso Molecular Alto), PMM (Peso Molecular Medio) y PMB (Peso Molecular Bajo) que abarcan polisacáridos con pesos moleculares entre 633,5 y 11,6 KDa; entre 11,6 y 3,0 y entre 3,0 y 0,4 KDa, respectivamente. Es notoria la mayor proporción de polisacáridos de la fracción de bajo peso molecular, en todas las muestras analizadas, representan entre un 48% y un 64% del total de polisacáridos, observándose una leve disminución en los EC2. Se observa también que la relación entre las diferentes fracciones de polisacáridos en todos los espumantes se mantuvo casi constante.

Se observa en las gráficas de barra (Figura V-5), que todos los espumantes con chips de levaduras agregados (EC) presentaron contenidos entre 651 y 855mg/l de polisacáridos totales, mientras que todas las fracciones de los espumantes sin chips agregados (ES), mostraron valores menores, entre 290 y 604mg/l. Estos contenidos encontrados en los espumantes de naranja resultaron superiores a los reportados para cavas (Andres-Lacueva et al., 1996; M.V. Moreno-Arribas et al., 2000).

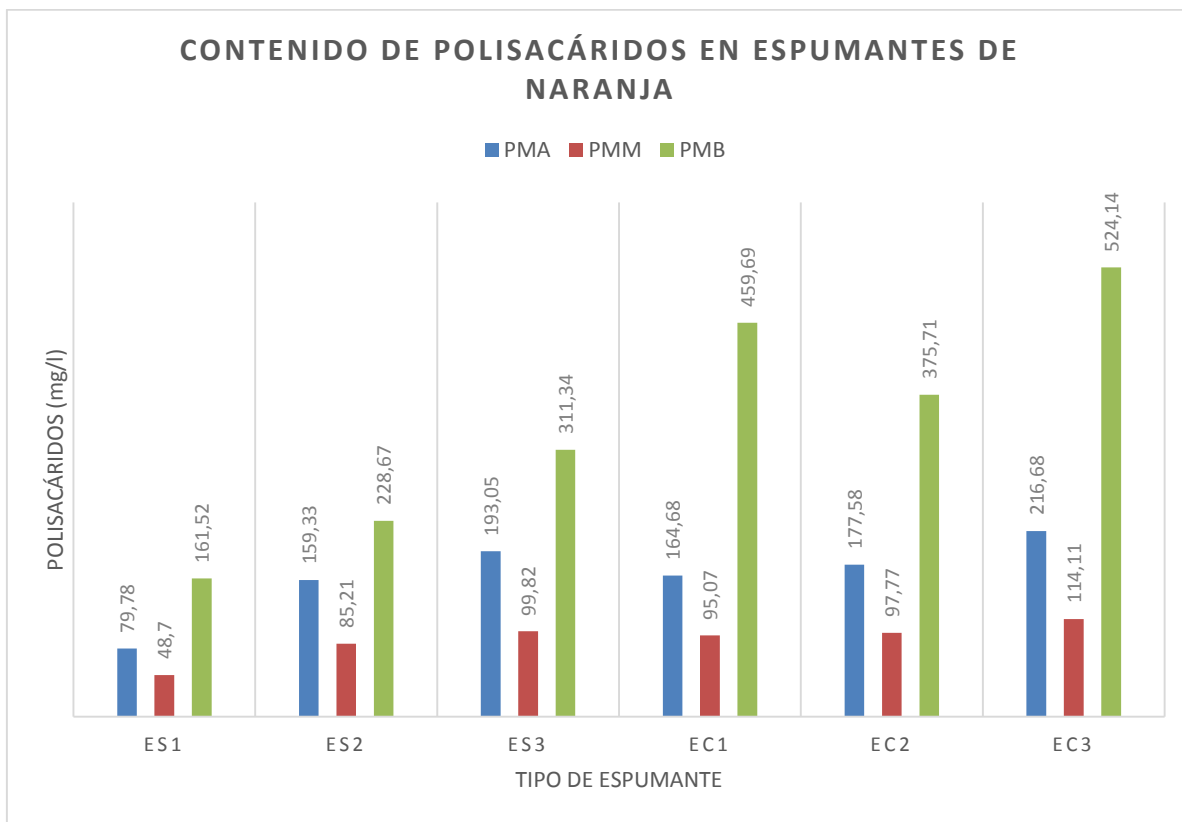


Figura V-5 Fracciones y contenidos de polisacáridos en espumantes de naranja a los distintos tiempos de añejamiento en contacto con las borras y para las diferentes composiciones del licor de tiraje.

Las fracciones correspondientes a los mayores pesos moleculares (mayores a 50 KDa) podrían abarcar, a manoproteínas liberadas durante la autólisis de levaduras, mientras que las fracciones con pesos moleculares menores a 11 KDa podrían atribuirse a oligosacáridos y fragmentos menores de manoproteínas (Guadalupe, Martínez-Pinilla, Garrido, Carrillo, & Ayestarán, 2012). Diferentes autores han observado que la concentración de polisacáridos conteniendo glucosa y manosa en su estructura se incrementa tres o cuatro veces durante el añejamiento en contacto con la levaduras (M. Á. Pozo-Bayón, Martínez-Rodríguez, Pueyo, & Moreno-Arribas, 2009). López-Barajas et al. (2001) identificaron fracciones de polisacáridos con pesos moleculares entre 62-48 KDa, 13-11 KDa y 3-2 KDa que parecen agentes activos sobre la espumabilidad, y la fracción 3-2 KDa correlacionada también con la estabilidad de la espuma.

El método utilizado permitió cuantificar el contenido de polisacáridos totales, así como aislar las fracciones de diferentes pesos moleculares; sería de interés avanzar en la identificación de los monosacáridos que componen cada muestra, que podría realizarse a través de cromatografía gaseosa.

V.1-4.vi Color

Las características cromáticas de los espumantes se muestran en la tabla V.7:

Tabla V-7 Parámetros de color de los espumantes de naranja.

	<i>EC1</i>	<i>EC2</i>	<i>EC3</i>	<i>ES1</i>	<i>ES2</i>	<i>ES3</i>
<i>L</i>	91,5±0,8	91,4±0,3	91,0±0,6	89,0±3,1	90,9±1,6	91,2±1,15
<i>C</i>	15,6±1,1	14,6±1,3	17,0±1,5	20,1±4,2	17,2±1,6	16,3±1,4
<i>H</i>	95,7±1,2	96,0±0,4	96,0±0,7	95,4±0,7	96,0±2,1	96,0±7,0
<i>a</i>	-1,53±0,23	-1,53±0,19	-1,76±0,28	-1,85±0,18	-1,66±0,29	-1,73±0,35
<i>b</i>	15,5±1,1	14,6±1,3	16,9±1,5	19,9±4,2	16,9±2,0	16,2±1,4

El ANOVA multifactorial mostró que los factores analizados (tiempo de añejamiento y composición del licor de tirage) no tienen efectos significativos sobre los parámetros del color, todos los espumantes presentaron coloraciones similares.

Los parámetros de color han evolucionado respecto del vino base, particularmente a y b responsables de la percepción amarillo verdoso de los productos.

La luminosidad de los espumantes de naranja aumentó respecto del vino base, y la evolución del valor de a hacia los amarillo-verdosos. Analizando los valores de L se observa que los espumantes de naranja resultaron muy luminosos, evidenciando así que el proceso de separación de las borras se realizó de manera apropiada.

V.1-5 Conclusiones de los resultados fisicoquímicos

Los resultados obtenidos muestran que la combinación de variables de proceso elegidas permitieron elaborar espumantes de naranja con características fisicoquímicas comparables a los vinos espumantes comerciales, excepto por los valores de acidez total, levemente superior en los espumantes de naranja. Sin embargo, los diferentes tiempos que se mantuvieron en contacto con las lías y la utilización de chips de levaduras en el licor de tirage, no afectaron significativamente la mayoría de las características fisicoquímicas mostradas en la tabla V.6 de estos espumantes. Los polisacáridos sí mostraron diferencias y evolución durante el añejamiento, aumentando los contenidos con ambas formulaciones de licor de tirage. La presencia de chips de levaduras en los espumantes EC, liberaron al medio concentraciones mucho mayores que en los espumantes sin chips (ES) en todos los tiempos de contacto analizados. Los tiempos de añejamiento fueron establecidos respetando el tiempo mínimo (9 meses) establecido para la elaboración de los espumantes de mayor calidad aplicando el método tradicional, que se basan en los tiempos atribuidos al desarrollo de los procesos de autólisis, que liberan al medio componentes que favorecen las propiedades espumantes (polisacáridos y proteínas principalmente). Para analizar la influencia de los tiempos de añejamiento se deberían elaborar nuevos espumantes y observar su evolución en tiempos más cortos en contacto con las lías, para observar si el agregado de chips provoca un acortamiento de los tiempos de añejamiento, y se logran mejores características espumantes.

V.2 Resultados sensoriales

V.2-1 Obtención del perfil sensorial de las características espumantes

V.2-1.vii Entrenamiento del panel

Al servir una copa de champagne, nuestra mirada ¿hacia donde se dirige? ¿qué es lo primero que vemos?...la espuma, las burbujas..capturan nuestra atención y observamos el “show” con una fascinación casi mágica.

En la revisión bibliográfica sobre evaluaciones sensoriales de espumantes se observa que las fichas de cata de espumantes y champagnes otorgan una escasa apreciación de los aspectos espumantes, a pesar de ser esta es su características distintiva. Aspectos tales como el color, sabores y aromas son los que revisten, tradicionalmente mayor importancia en la cata de vinos y espumantes (Rodríguez-Nogales et al., 2012; Vannier et al., 1999) . Por este motivo desarrollamos una ficha de cata especialmente diseñada para evaluar las características de las espuma de forma más completa. El entrenamiento del panel y la posterior evaluación sensorial insumieron tiempos prolongados de trabajo.

El objetivo principal de la evaluación sensorial para el desarrollo de esta tesis fue caracterizar la formación de burbujas y espumas generados al servir una copa de espumante de naranja. Se decidió elaborar una ficha de cata que, haciendo énfasis y especial detalle en la observación de las características espumantes (perfil sensorial de las características espumantes), tuviera en cuenta además una evaluación global del producto, incluyendo atributos relacionados al sabor y aroma, aunque estos últimos aspectos no son discutidos en esta tesis.

Las sesiones de evaluación sensorial se desarrollaron en la sala acondicionada a tal fin, según IRAM 20002 (1995), como muestra la Figura V-6

Se conformó un panel de 14 integrantes, integrado por 3 hombres y 11 mujeres, entre 29 y 55 años, de los cuales varios habían participado previamente en evaluaciones sensoriales de vino de naranjas.



Figura V-6 -Sesión de evaluación sensorial.

El entrenamiento se centró en describir para luego analizar, evaluar y caracterizar la formación y liberación de burbujas, en base a una ficha de evaluación sensorial especialmente diseñada para registrar los atributos de la espuma, que fueron comparados luego con los resultados obtenidos del análisis de las imágenes digitales.

La mayoría de los evaluadores habían recibido ya formación en evaluación sensorial, en los aspectos referidos a reconocimiento y caracterización de aromas y sabores de los “vinos de naranja”, por lo que durante las sesiones de entrenamiento se centró la atención en la definición de atributos que caracterizaran la espuma.

El compromiso de participar en el panel implicaba respetar los días y horarios establecidos para la cata, y se pudo contar con todos los panelistas presentes al momento de destapar una botella, así, el proceso de llenado de las copas se desarrollaba a la vista de todos, y los tiempos de evolución de la espuma fueran iguales para todos.

En la primera sesión se describió el proceso de obtención del espumante de naranja, brevemente a través de un video, ya que se trata de un producto nuevo a caracterizar.

De las puestas en común luego de la primera sesión definimos los atributos del perfil sensorial a evaluar:

-La *espuma* es el conjunto de burbujas que se acumulan en la superficie del líquido una vez servido. Luego de transcurridos unos segundos para que las condiciones iniciales, turbulentas debido al servido y a la incorporación de aire dejen paso a la espuma generada por el dióxido de carbono que se libera desde el seno del líquido y llega a la superficie.

-Observando por encima de la copa, se evalúa si las burbujas de la espuma cubren la *superficie* de manera total, parcial o sólo en los bordes.

-La *corona* es el conjunto de burbujas que al ascender, en lugar de desplazarse hacia el centro de la superficie se acumulan en las paredes de la copa y allí quedan pegadas, formando como una puntilla.

-Las *burbujas* se forman en sitios definidos en cada copa, los *sitios de nucleación* generan de manera periódica burbujas que ascienden formando “trenes” o rosarios, de manera constante hacia la superficie. Un rosario o tren de burbujas finas y pequeñas, que de manera constante ascienden a *velocidad* moderada, son indicadores de un espumante de calidad. Burbujas gruesas y rápidas son indicadores de un espumante joven.

Estas características fueron explicadas en general, mostrando imágenes de bebidas espumantes varias, como cervezas, gaseosas y espumantes comerciales, que permitieron acordar los extremos de las escalas.

Posteriormente se realizó la degustación de un espumante comercial, con el fin de observar los detalles explicados. La primera dificultad que surgió al evaluar este producto es su rápida evolución en el tiempo, ya que la liberación de burbujas es un proceso dinámico que cambia rápidamente, por lo que se estandarizaron tiempos de observación.

Del grupo surgieron términos para describir las características espumantes, que fueron registrados para la elaboración de la ficha de cata, en base a la propuesta por Obiols et al (1998), adaptada a los términos consensuados en la sesión previa y teniendo en cuenta su correlación con las mediciones que se realizarían por medio del análisis de imágenes.

Resultaron términos diversos, que se agruparon en relación a los aspectos a observar: espuma, corona, burbujas:

Espuma -Los atributos evaluados: abundancia y persistencia

Corona-los atributos analizados fueron: si es completa alrededor de la superficie, y el grado de cobertura de la superficie (mirando por encima de la copa).

Burbujas- se observaron tres atributos de las burbujas: tamaño, cantidad de sitios de nucleación, velocidad de ascenso.

Color: en una escala de colores cuyos extremos estaban disponibles para su observación en todas las sesiones.

Aspecto: el atributo analizado se refiere al grado de transparencia de la muestra.

En la ficha de cata se incluyó la evaluación de aromas a través de cuatro atributos, y del sabor a través de cuatro indicadores, entre estos últimos se incluyó el atributo “*efervescencia*” que resulta fundamental para una evaluación integral de las características espumantes.

En la segunda sesión, se presentó la ficha de cata definitiva (Anexo I) y se acordaron los extremos de las escalas propuestas, utilizando una presentación en diapositivas, con imágenes seleccionadas a tal fin. Se degustó un espumante comercial, con la finalidad de familiarizar a los evaluadores en la utilización de la ficha de cata, en la terminología usada y en la escala a utilizar. Luego de la evaluación individual se comentaron resultados observados, para precisar algunos términos y extremos de las escalas. El atributo que resultó más complejo de evaluar fue el correspondiente a la cantidad de “núcleos de burbujas”, ya que esta condición depende de muchos factores externos, y aunque el

proceso de lavado y secado con aire de las copas fue cuidado (IV.4-2), las características propias de cada copa no son uniformes.

Se realizaron 5 sesiones de entrenamiento, en cada sesión se presentaron para su evaluación 3 muestras de espumantes comerciales a cada panelista, con el objetivo de analizar la capacidad de discriminación y repetitividad de cada uno. Los datos obtenidos fueron analizados y discutidos con los panelistas cuando se observaban resultados muy dispersos. Se procesaron los resultados volcados en 180 planillas de evaluación durante la etapa de entrenamiento. Con estos resultados de la etapa de entrenamiento se realizó el seguimiento del desempeño de cada integrante del panel. Para los fines propuestos se evaluaron los resultados de los atributos relacionados con los aspectos que comprenden a la descripción de la espuma: todos los “visuales” más “efervescencia” y “sensación global”; los referidos a sabor y aroma a los fines de esta tesis no resultaron relevantes.

La gráfica de línea de puntos de la Figura V-7 se presenta como ejemplo de una de las muestras evaluadas. La línea une los valores medios de los puntajes otorgado a cada atributo. Esta gráfica permitió visualizar el grado de concordancia entre los panelistas en la evaluación de cada atributo y en cada muestra analizada. Se observa por ejemplo que el atributo evaluado de manera más uniforme por todos los panelistas resultó el 3, “formación de corona” seguido del 9, “transparencia” y el 5, “tamaño de burbujas” en esta muestra, y el atributo que mayor dispersión de respuestas o fue el 10 “efervescencia”. Luego se volvió a explicar de qué manera percibir la efervescencia intentando disminuir esta dispersión. Idealmente el rango de variación debería ser lo más reducido posible. Luego se construyeron gráficas individuales para cada panelista, comparando la línea de puntos obtenida por cada uno, con la línea promedio, y así analizar el desempeño de cada panelista, en comparación con el promedio del panel.

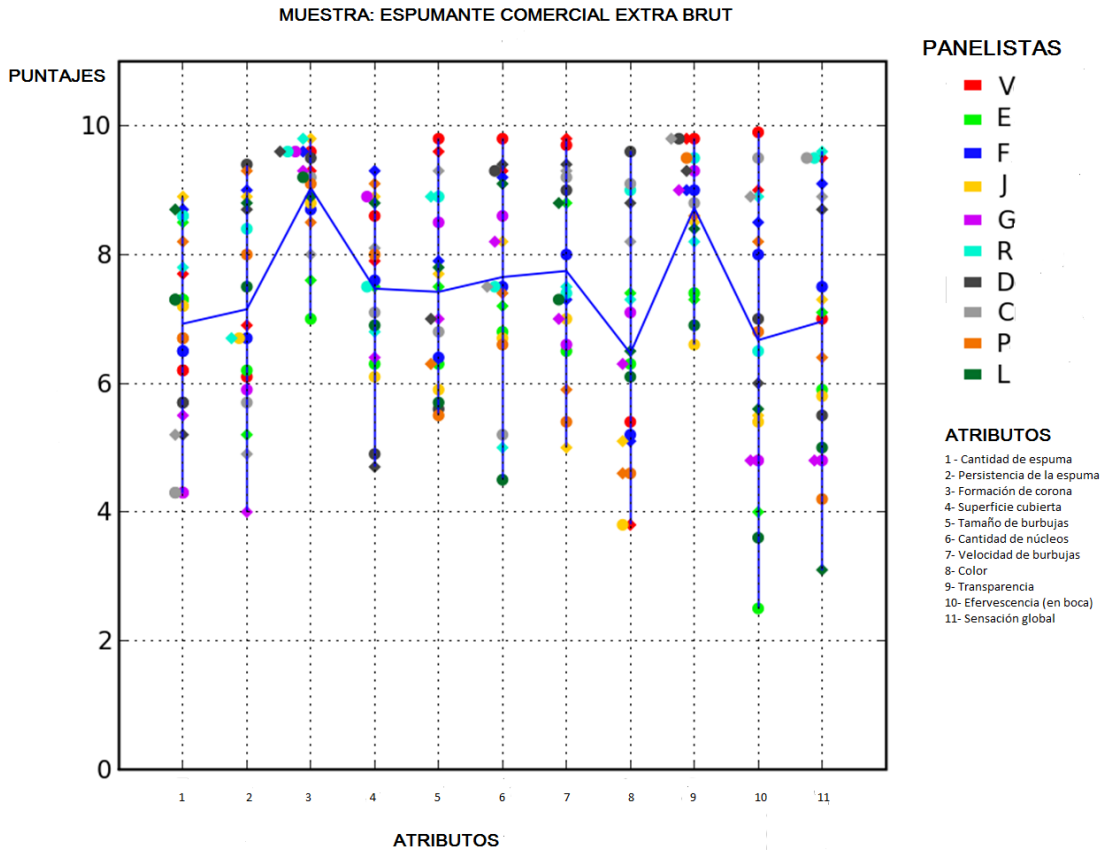


Figura V-7 Gráfica de línea de puntos de evaluación sensorial para muestra de espumante comercial Extra Brut.

Los valores de F se usaron para evaluar la capacidad de un evaluador para detectar diferencias en un atributo entre muestras; se representaron en gráficos de barra, como el ejemplo de la Figura V-8 en el cual para un atributo dado, se analiza la respuesta de los evaluadores; en este ejemplo se observa que la mayoría de los evaluadores (7) han alcanzado valores aceptables con un nivel de significancia del 5%, aunque solamente dos superaron el nivel de significancia del 1%. Los panelistas que no han alcanzado estos niveles mínimos fueron entrenados nuevamente en este atributo en particular.

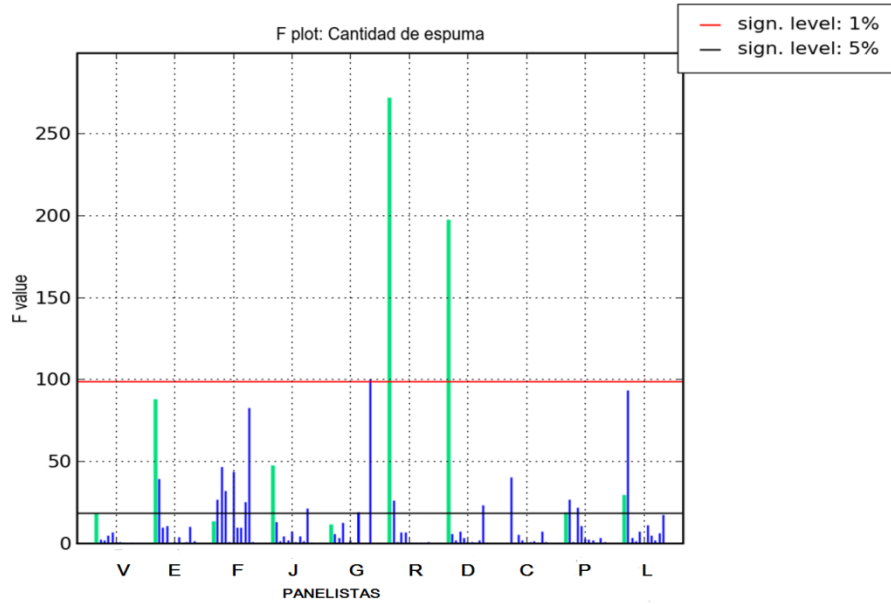


Figura V-8 Gráfica de F para el atributo cantidad de espuma.

El cuadrado medio del error (CMe) representa la varianza residual de un evaluador para cada atributo evaluado en las muestras, y permite medir la repetitividad de un evaluador entre sesiones. Menores valores de CMe indican mayor repetibilidad del evaluador. Idealmente, todos los evaluadores deberían lograr bajos valores de p y de CMe.

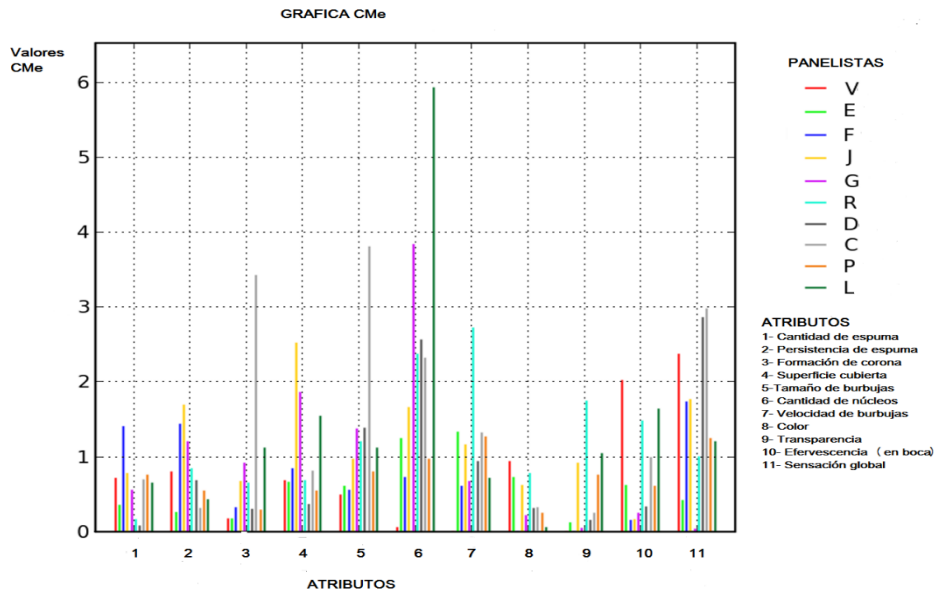


Figura V-9 Gráfica de CMe por atributos para una muestra. Cada barra de color representa a un panelista.

En la Figura V-9 se muestra un ejemplo de gráficas del CMe por atributos, y se puede visualizar que para el atributo 6 la apreciación de los panelistas fue muy dispersa; la menor repetibilidad en conjunto para todos los panelistas se observa para el atributo 11 y 6; el panelista "L" exhibe la más baja repetibilidad en el atributo 6 mientras que "C" exhibe baja repetibilidad en varios atributos (3, 5, 6, 11). Para el resto de los atributos la mayoría de los panelistas muestran valores bajos de CMe, que resulta lo esperado.

Los resultados del entrenamiento fueron variables en cada sesión, resulta complejo establecer condiciones de evaluaciones sensoriales uniformes y estandarizadas, dados los incontables factores humanos que pueden afectar las condiciones del evaluador al momento de la cata. A pesar de las dificultades de aplicar análisis sensorial a los vinos espumantes (Vannier et al., 1999), el proceso llevado a cabo para entrenar este panel en las condiciones disponibles (Figura V-6) volcó resultados satisfactorios, y permitió preparar y seleccionar los panelistas para la evaluación sensorial de los espumantes de naranja. Si bien las condiciones en que se desarrollaron las sesiones de cata no cumplen los estándares

normados, se priorizó la apreciación simultánea por todos los participantes, de las características espumantes de cada botella evaluada.

V.2-2 Caracterización sensorial de espumantes de naranja

Los constituyentes del vino, la autólisis celular y el tiempo sobre las lías son considerados los principales factores que regulan las características sensoriales de los vinos espumantes (Moreno-Arribas 2009; Pozo-Bayón et al. 2009) aunque existen incertidumbres en relación a interacciones con otros factores (Alberici Stefanon, 2013).

Con los resultados de las evaluaciones sensoriales, para cada atributo ponderado, los ANOVA multifactoriales mostraron que no hay diferencias significativas ($\alpha=0,05$) entre los diferentes tipos de espumantes, a los tres tiempos en contacto con las lías y las dos composiciones del licor de tirage.

En la Figura V-10 se muestran los resultados obtenidos para los seis tipos de espumantes elaborados.

Se observa que los espumantes exhiben atributos equilibrados en sus características espumantes. Los atributos que se refieren a la espuma que se forma inicialmente, y la persistencia de la espuma presentan valores similares, y bajos, (menores a 4,5). La formación de la espuma inicial, su persistencia y la permanencia de una corona de burbujas en la superficie son fenómenos relacionados a la tensión superficial del vino, a la interfacial entre vino y vidrio de la copa y/o a la concentración de sustancias con carácter tensioactivo como por ejemplo aminoácidos y proteínas (Casey, 1998).

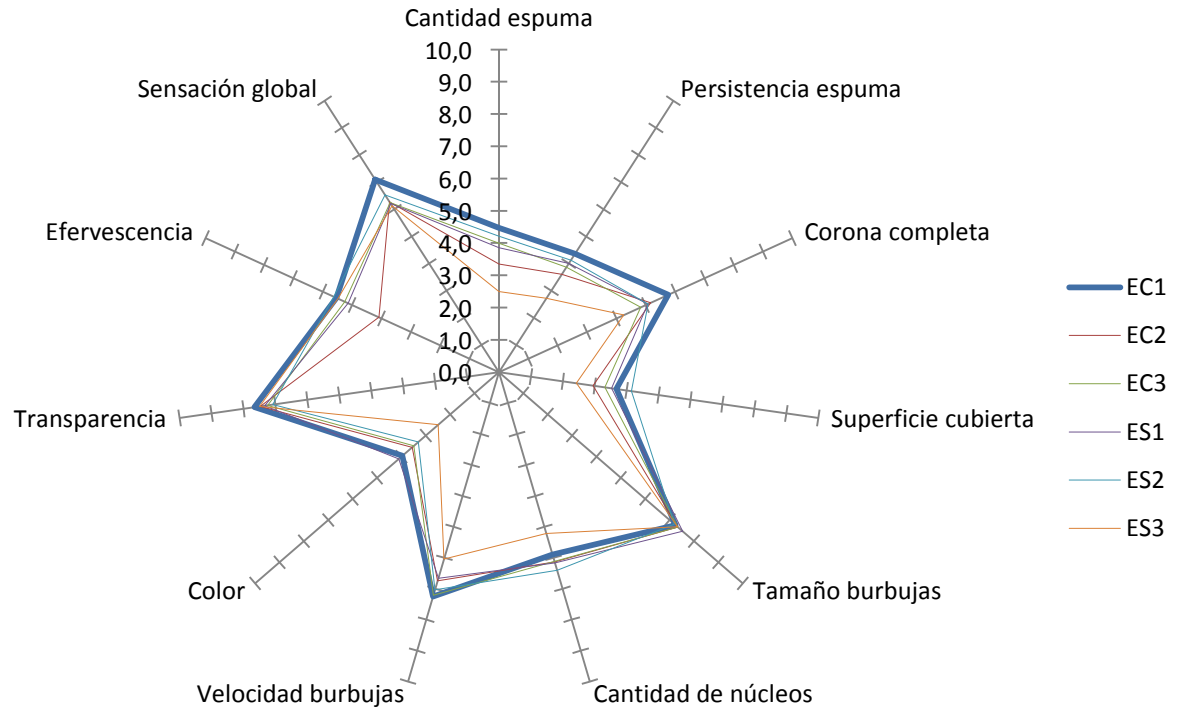


Figura V-10 Representación gráfica del análisis descriptivo mostrando los atributos relacionados a las características espumantes de los seis tipos de vinos producidos.

La estabilidad de la espuma en la superficie depende del balance entre la formación de espuma y el ratio al cual las burbujas explotan. Los menores valores registrados en el parámetro “superficie cubierta” hacen referencia a las burbujas observadas en la superficie. La *velocidad* de las burbujas fue caracterizada con un valor comprendido entre 6,0 y 7,3, por lo tanto, en una escala en la que el extremo superior (10) representaba a burbujas “muy rápidas”. Valores similares fueron obtenidos por el atributo *tamaño* de burbujas, (entre 7 y 7,5), considerando que 10 es un valor que hace referencia a burbujas muy pequeñas y que no resultarían tan apropiadas. Estos dos resultados hacen referencia a un espumante de buena calidad en cuanto al aspecto visual de las burbujas.

El color presentó una tendencia hacia las tonalidades amarillo-verdoso, en concordancia con los parámetros medidos en el sistema CIElab. Esta fue la principal diferencia con los

espumantes comerciales evaluados previamente, ya que la coloración en estos últimos siempre estuvo cercana al extremo superior de la escala, que correspondía a las coloraciones más pálidas.

La transparencia resultó el atributo evaluado con mayores valores (entre 7,1 y 7,7). Esta observación fue además confirmada de forma oral en las sucesivas sesiones, en las cuales los panelistas destacaron la luminosidad y transparencia de los espumantes. Este atributo resulta comparable a los valores de luminosidad (L) que resultaron elevados (tabla V.7). Además este atributo pone en evidencia que las etapas del proceso de deposición de borras en el pico de las botellas,- realizada en pupitres- y posterior degüelle, fueron realizadas de manera apropiada, y se lograron obtener espumantes limpios y brillantes.

De los atributos relacionados a la fase gustativa, fueron analizados los valores obtenidos por la *efervescencia*, que completan la percepción de las características espumantes, y se observa que resultaron próximos al medio en la escala de valores. Se puede concluir que desde este punto de vista resulta un espumante equilibrado, que el cosquilleo producido por la explosión de las burbujas en la boca y que provoca sensaciones que afectan también el sentido del oído, resulta agradable. Valores elevados indicarían sensaciones de agresividad poco deseables, debido al brusco desprendimiento de gases y aromas, reconocido durante la etapa de entrenamiento en algunos espumantes comerciales, porque generan picazón en la nariz. La efervescencia se comporta como un verdadero regulador de aromas, pues las burbujas contienen, junto al CO₂, compuestos odoríferos (Maujean et al., 1996).

Para integrar los efectos generales, el atributo "*sensación global*" mostró valores entre 6,1 y 7,1, mostrando en conjunto, que los espumantes de naranja evaluados resultaron satisfactorios para los panelistas, y fueron puntuados de manera similar a los espumantes comerciales degustados durante la etapa de entrenamiento.

En la gráfica V.10 se ha destacado con trazo más grueso, el espumante EC1, porque reúne los mejores valores en los atributos que describen las características espumantes. Este

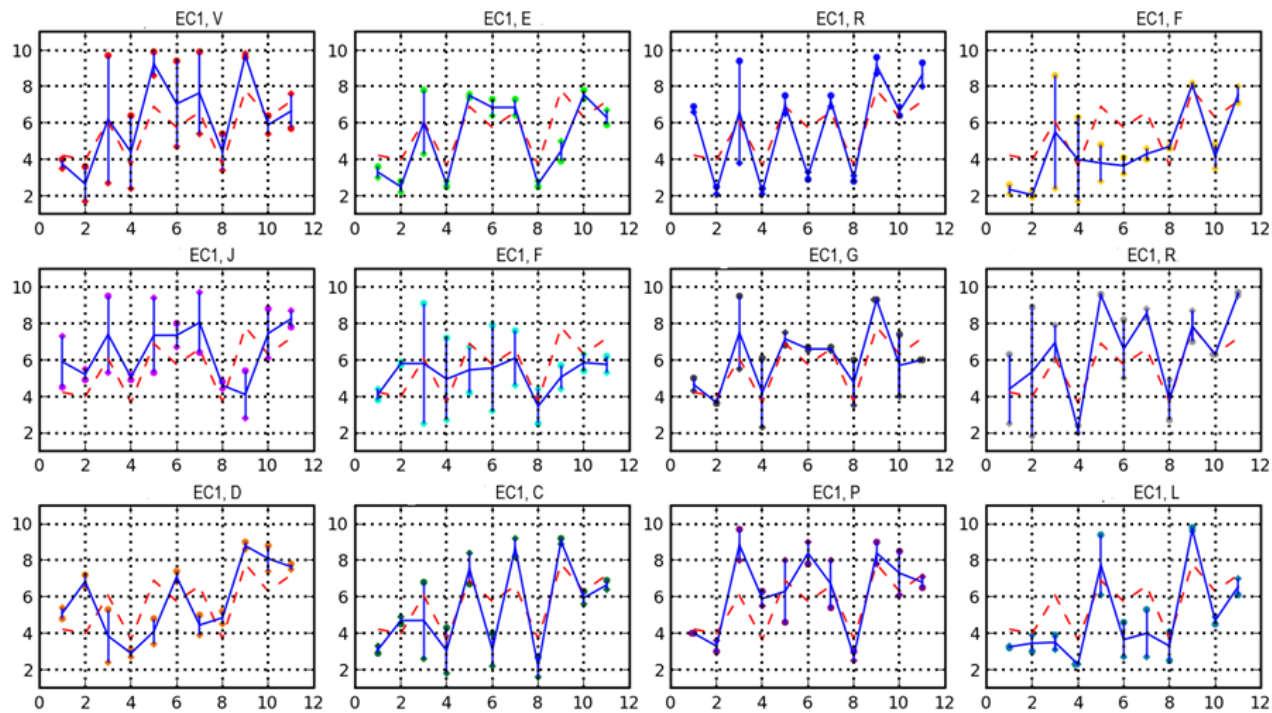
producto fue seleccionado para el análisis de imágenes que se desarrolla en el siguiente capítulo.

En las gráficas de la Figura V-11 se muestra la evaluación del espumante EC1, en la que se visualiza el desempeño de cada panelista, con respecto a los valores medios (en línea discontinua) logrados en cada atributo.

V.2-3 Conclusiones

El espumante de naranja resultó un producto finamente gasificado, de coloración ligeramente amarillada, translúcido. La velocidad de ascenso de las burbujas es moderada así como la efervescencia en boca, resultando un producto con una valoración global satisfactoria. El análisis estadístico reveló que no se observaron diferencias significativas entre los diferentes tratamientos por lo que en base a estas conclusiones y las obtenidas del análisis fisicoquímico, se seleccionó el espumante con las mejores puntuaciones para realizar el procesamiento y análisis de imágenes.

Se logró diseñar una ficha de cata que describe el perfil sensorial de un espumante con énfasis en las características espumantes del producto. Esta ficha fue puesta a punto a través de evaluaciones de espumantes comerciales.



Evaluación sensorial del espumante EC1. Puntajes (eje vertical) asignados a los siguientes atributos (eje horizontal):

- | | | | |
|------------------------|-------------------------------|--------------------------|-----------------------|
| 1- Cantidad de espuma. | 2- Persistencia de la espuma. | 3- Formación de corona. | 4-Superficie cubierta |
| 5-Tamaño de burbujas. | 6-Cantidad de núcleos. | 7- Velocidad de burbujas | 8- Color |
| 9-Transparencia. | 10-Efervescencia (en boca) | 11-Sensación global. | |

Figura V-11 Resultados de la evaluación sensorial del espumante de naranja EC1

V.3 Caracterización de la espuma y formación de burbujas por análisis de imágenes

V.3-1 Descripción de la obtención de imágenes

Con la finalidad de evaluar la formación de burbujas en condiciones similares a las que experimenta realmente un consumidor cuando degusta un espumante, se filmaron videos de la evolución de la espuma al servir una copa.

Se capturaron dos videos con cada botella de espumante, resultado de servir dos copas de espumantes, de manera consecutiva a intervalos de 25 minutos cada una. Se registraron así duplicados de cada producto, con las mismas características fisicoquímicas. Para conservar la presión en la botella, se cerró con opérculo y tapa corona en el intervalo entre una y otra servida, y se mantuvo en heladera a la temperatura de servicio. Sin embargo aún con estas precauciones, se observaron comportamientos diferentes en las dos copas servidas de la misma botella, ya que mínimas variaciones en el estado de la superficie de las copas es suficiente para modificar la formación de burbujas y espuma.

Los videos originales obtenidos, de 20 minutos de duración, fueron cortados en fragmentos de hasta 1 minuto, como máximo, con 60 cuadros por segundo, sin compresión para que no afectara la calidad de las imágenes, utilizando el software Pinnacle StudioHD®. De esta manera se obtuvieron archivos de tamaños adecuados a la capacidad de procesamiento de imágenes de los ordenadores utilizados. Cada video reducido fue etiquetado cuidadosamente con el nombre del espumante, referencia al tiempo de la captura del video original (tiempo del “corte”), para identificar fácilmente cada momento del servido y poder volver a medir, transformar, procesar, las imágenes.

Para el análisis y procesamiento en el software Image J cada archivo fue convertido a escala de grises y establecida la escala de referencia se realizaron medidas a partir del menú de opciones que ofrece este programa. El procesamiento de las imágenes digitales se realizó siguiendo un procedimiento “manual” que aunque requirió más tiempo de procesamientos resulta más realista para identificar y reconocer patrones y

comportamientos, que al intentar aplicar procedimientos automáticos, estandarizados, que conducen a realizar mayores errores (José Miguel Aguilera, 2007).

Las imágenes de papel milimetrado permitieron establecer una escala (Capítulo IV.5-2) de (165 ± 5) píxeles/mm en la cámara Sony y de (33 ± 3) píxeles/cm en la cámara Panasonic (Figura V-12)

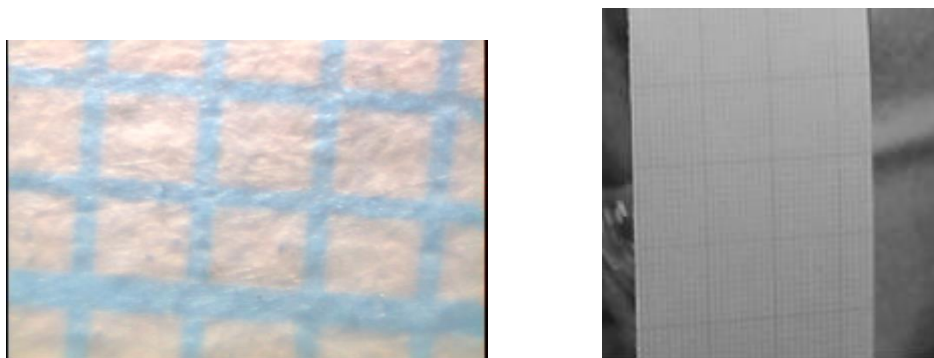


Figura V-12 Imágenes de papel milimetrado para establecer las escalas respectivas y realizar mediciones sobre las imágenes, capturadas con: a) la cámara Sony; b) la cámara Panasonic. Los cuadrados tienen 1 mm de lado.

La cámara Sony con el objetivo de 40X captura imágenes de 2,91 mm de altura. Cuando se enfocaba un tren en este campo, se lo monitoreaba durante su ascenso hasta que salía del alcance de la cámara.

V.3-1.viii Selección del espumante a caracterizar por análisis de imágenes

Los resultados fisicoquímicos mostraron que las propiedades físicas y químicas no presentaron diferencias significativas entre los espumantes obtenidos a los diferentes tiempos ensayados en contacto con las lías y con las dos formulaciones de licor de tirage.

A los efectos de estudiar y describir la cinética de la formación y liberación de burbujas, analizando las propiedades espumantes mediante procesamiento de imágenes, y considerando que desde el punto de vista fisicoquímico no presentan diferencias significativas, se seleccionó el espumante con mejores puntuaciones, basados en los resultados de las evaluaciones sensoriales, porque resultaría el más aceptado por los consumidores.

De la Figura V-10 de resultados sensoriales, se observa que el EC1, (espumante obtenido con el agregado de cortezas de levadura en el licor de tiraje y mantenido durante 9 meses en contacto con las borras), además de ser el que tiene mayor aceptabilidad, coincide con las mejores puntuaciones en las características espumantes, por lo tanto se realizó el estudio de las imágenes de la espuma y burbujas de este producto.

V.3-1.ix Aspectos estudiados en las imágenes

Los atributos de la espuma evaluados en el análisis sensorial son definidos de manera equivalente para su estudio en las imágenes, así:

La *espuma* es el conjunto de burbujas que se acumulan en la superficie del líquido una vez servido; la *corona* es el conjunto de burbujas que al ascender, en lugar de desplazarse hacia el centro de la superficie se acumulan en las paredes de la copa y allí quedan pegadas, formando como una puntilla; las *burbujas* se forman en sitios definidos en cada copa; los *sitios de nucleación* generan de manera periódica burbujas que ascienden formando *trenes* o *rosarios*, hacia la superficie.

Los parámetros obtenidos son analizados en los siguientes apartados: evolución de la espuma (altura en cm); descripción de la corona (distribución de tamaño de burbujas), frecuencia de ascenso de las burbujas (en Hz, burbujas/segundo), velocidad de ascenso de las burbujas (mm/s) y tasa de crecimiento del tamaño de las burbujas durante su ascenso (mm/s).

V.3-2 Evolución de la espuma

Con la cámara lateral (Figura IV-6) se registró la evolución de la espuma desde el momento que se sirve la copa, como se observa en la Figura V-13.



Figura V-13 Imagen de una copa de espumante (a) a los 30 segundos de servida, (b) a los 10 minutos.

La generosa espuma inicial se origina por la captura de aire en el seno del líquido durante el proceso de llenado, proceso turbulento y caótico, y se debe principalmente al CO_2 retenido en el cuello de la botella (Vignes-Adler, 2013). Para minimizar estos efectos iniciales se realiza el llenado de las copas inclinando tanto la copa como la botella, forma denominada “tipo cerveza”(G. Liger-Belair, 2012), pero es inevitable observar la producción de una espuma abundante y turbulencias en el líquido a medida que se llena la copa. Como se describió en la metodología (IV.4-3 y IV.5-2) las copas se llenaban de forma manual inclinando la copa y la botella.

Esta espuma es efímera, dura unos segundos hasta que se estabiliza y alcanza el equilibrio. Luego, la espuma se mantiene durante el tiempo de observación, que se corresponde entonces con la que “disfruta” el consumidor.

La Figura V-14 muestra la evolución de la espuma, que cómo puede apreciarse, disminuye rápidamente, en un lapso de pocos segundos hasta estabilizarse en un cordón de burbujas en la superficie.

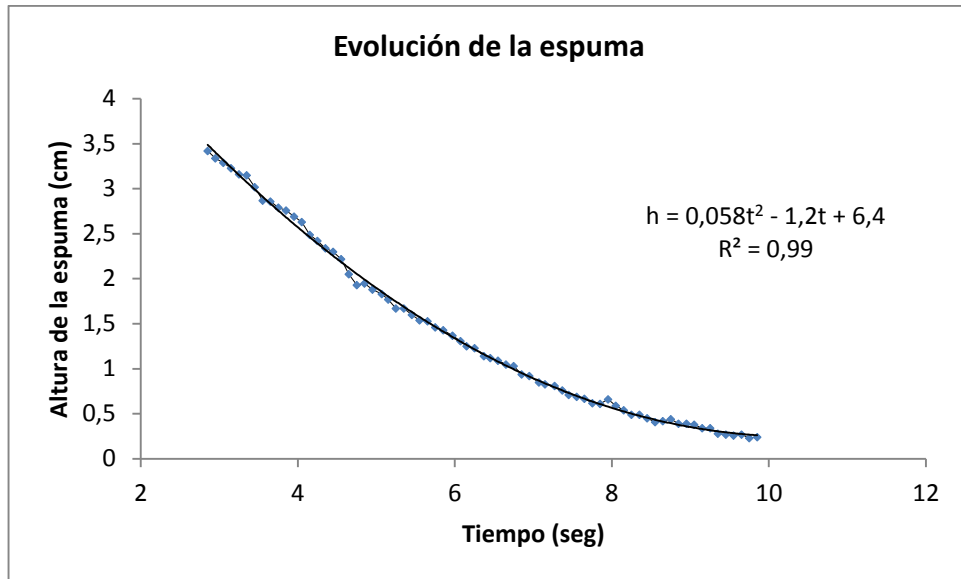


Figura V-14 Evolución de la altura de la espuma en función del tiempo, registrada 30 segundos después de servida la copa.

La espuma disminuye en el tiempo siguiendo un comportamiento que ajusta a una relación polinómica de segundo grado con un 95% de confianza. El valor final alcanzado de la espuma no puede cuantificarse con esta cámara ya que su aumento no resulta suficiente. Con la cámara Sony se registró el collar formado en el espumante (Figura V-15) a los 10 minutos de comenzada la filmación, y se puede observar que el collar conserva apenas una fila de burbujas, pero completa alrededor de la interfaz, y que resulta casi imperceptible a simple vista.

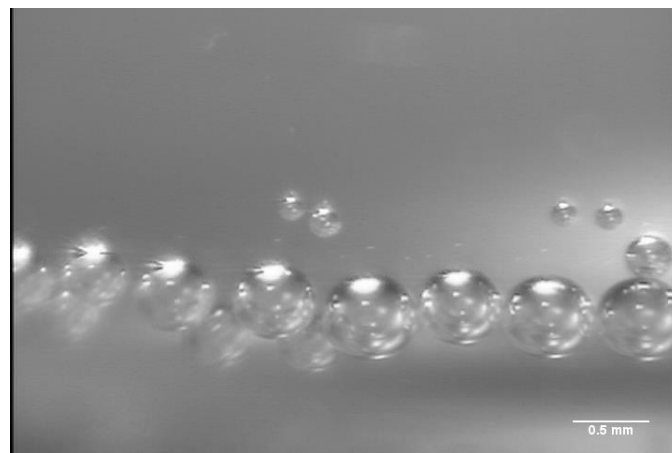


Figura V-15 Collar de burbujas estable a los 10 minutos de servida una copa de espumante.

La permanencia de la espuma es definida como la capacidad para que este desprendimiento dure más o menos tiempo. Se corresponde a un estado estacionario en el que la velocidad de desaparición de las burbujas a la superficie es igual a la incorporación de nuevas burbujas a la corona (Vanrell et al., 2007). Durante el añejamiento sobre las borras, la permanencia de la espuma decrece pero es compensado por un aumento de la estabilidad de la misma (Ribéreau-Gayón et al., 2008).

V.3-3 Descripción de la corona

Cuando la espuma de la superficie formada en la interfase alcanza el régimen estacionario se forma la corona.

El número, tamaño y distribución de las burbujas en la corona determina la textura, con burbujas de pequeño tamaño distribuidas uniformemente que dan lugar a una espuma suave (Blasco et al., 2011).

Para analizar las características estructurales de la corona, se numeraron burbujas y se midieron sus radios a lo largo del tiempo, como muestran las imágenes mostradas en la Figura V-16, que fueron obtenidas a los 3 minutos de servida una copa, a intervalos de 1 segundo.

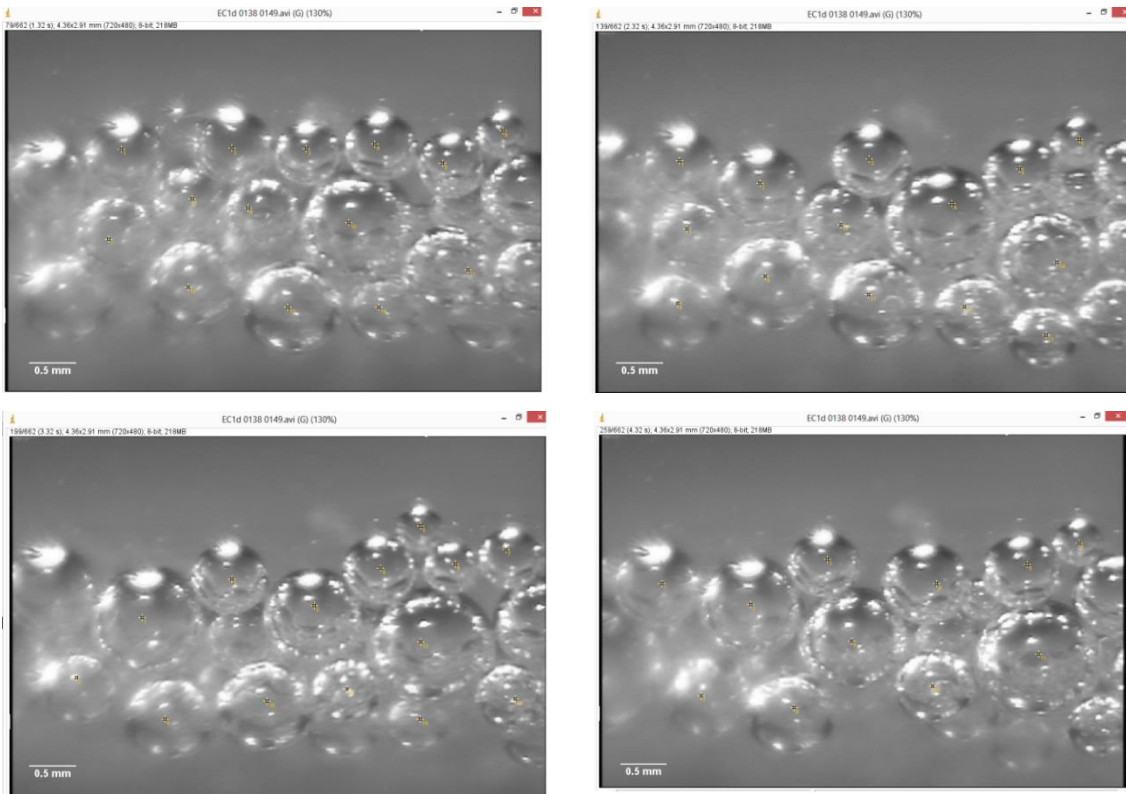


Figura V-16 Evolución de la corona con el tiempo. Secuencia de imágenes obtenidas en intervalos de 1 segundo (1:38 minutos de servida la copa).

Analizados los tamaños de estas burbujas se obtuvo el histograma mostrado en la Figura V-17 donde se observa la distribución de tamaños medios

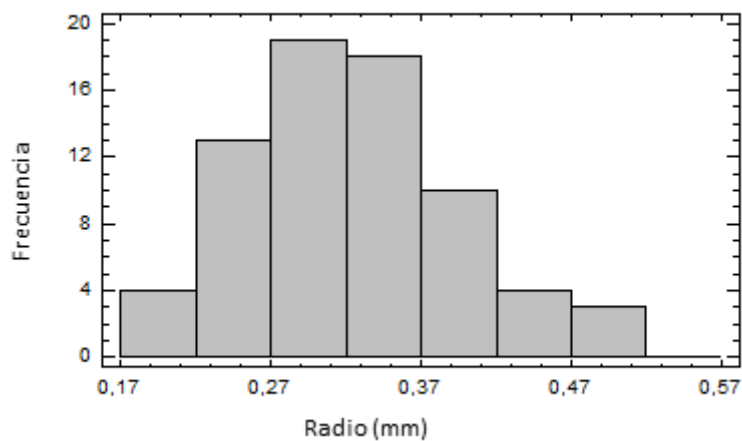


Figura V-17 Distribución de tamaños de burbujas correspondientes a las observadas en la figura V.16.

El radio medio de las burbujas en estos 4 segundos, estimando que no hay diferencias significativas ya que se encuentra en estado estacionario, resultó $(0,324 \pm 0,073)$ mm.

En el mismo espumante, luego de 10 minutos desde que se sirvió la copa (Figura V-15), se midieron radios de las burbujas para obtener el histograma mostrado en la Figura V-18.

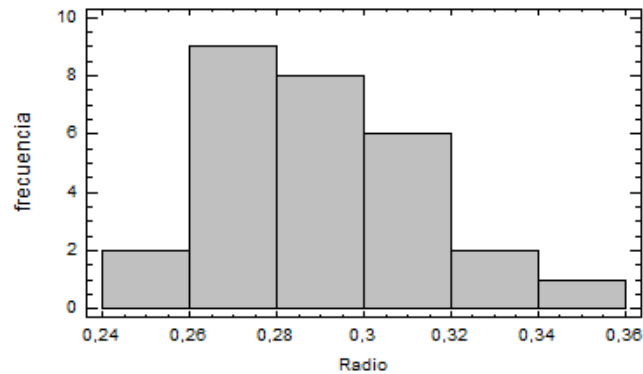


Figura V-18 Histograma de radios de burbujas mostradas en la figura V.15.

El radio medio de esta distribución resultó $(0,286 \pm 0,024)$ mm, mostrando que el tamaño medio de las burbujas disminuyó con el tiempo, pero este tamaño resulta más estable, ya que se observó que la corona se mantiene durante más tiempo, y el tamaño de las burbujas resultó más uniforme.

V.3-4 Estabilidad de las burbujas en la corona

Dos procesos desestabilizan la espuma: las burbujas más pequeñas se agregan a burbujas vecinas más grandes, y ruptura del film, provocada por un adelgazamiento excesivo y una cantidad insuficiente de compuestos adsorbidos para impedirlo (Vignes-Adler, 2013).

En la Figura V-19 se observa en (a) una imagen de la corona con una burbuja resaltada justo antes de colapsar y el espacio que deja luego (b).

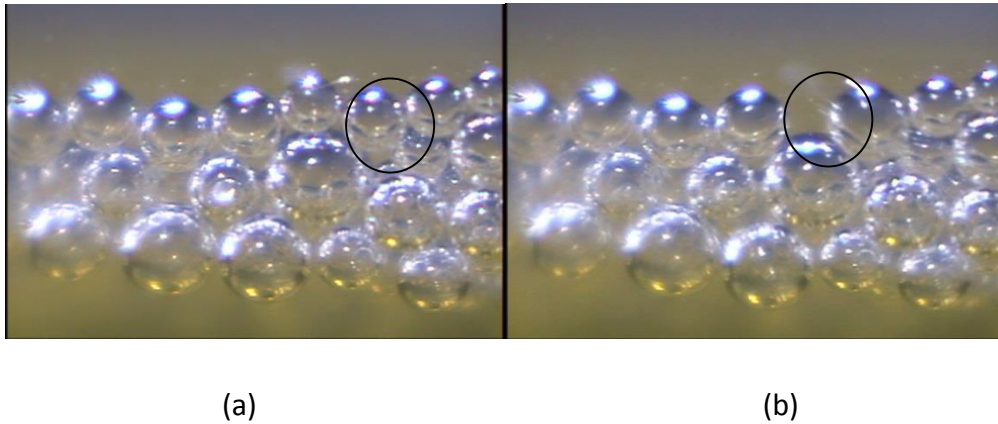


Figura V-19 Corona de burbujas a los 3 minutos de servida una foto, destacando: (a) una burbuja antes (b) después colapsar. El intervalo de tiempo entre (a) y (b) es de 0,010 segundo.

Se realizó el seguimiento de varias burbujas para medir sus radios justo antes de colapsar, llamados “radios críticos”. Los valores registrados muestran que a 1:38 minutos de servida una copa, las burbujas más inestables, que explotan fácilmente, presentan tamaños críticos con radios entre 120 μm y 200 μm .

Al transcurrir el tiempo, los radios críticos aumentan, y a los 10 minutos de servida una copa de espumante de naranja se observó que las burbujas colapsan cuando alcanzan radios críticos alrededor de 180-200 μm y para burbujas de mayor tamaño, alrededor de 350- 460 μm , es decir, las burbujas son estables cuando presentan radios comprendidos entre estos valores extremos, tal como indica el histograma de la figura V.18, las burbujas más estables en este tiempo presentaron radios de 280 μm aproximadamente.

La inestabilidad de la espuma está definida por tres parámetros (Ribéreau-Gayón et al, 2008): 1) la desproporción por la cual el gas de una burbuja pasa a otra más grande que aumenta más todavía, esto conduce a una espuma irregular y grosera, de mala calidad sensorial; 2) el drenaje del líquido que se desliza de la espuma, que conduce a una reducción del volumen de la espuma; 3) la coalescencia, ruptura del film que separa dos burbujas dando origen a una burbuja de mayor dimensión, pero que desaparece rápidamente.

Factores externos al espumoso que aparecen durante el consumo como partículas de grasa, provenientes de postres y cremas, partículas de silicona de los lápices labiales,

por ejemplo, son destructores de la espuma, porque se distribuyen en la superficie del film y arrastran líquido, disminuyendo localmente el espesor del film y desbalanceando las fuerzas atractivas intermoleculares de Van der Waals, provocando la ruptura de las burbujas (Vignes-Adler, 2013).

V.3-5 Frecuencia de formación y ascenso de burbujas

La frecuencia se determinó como la inversa del período, tomado como el tiempo que tardó una burbuja en pasar por una posición de referencia. Se seleccionó “forma oval” para ajustar a la burbuja, y se dejó fija en una posición (Figura V-20), cada vez que una burbuja ocupaba esa posición se registraba el tiempo.

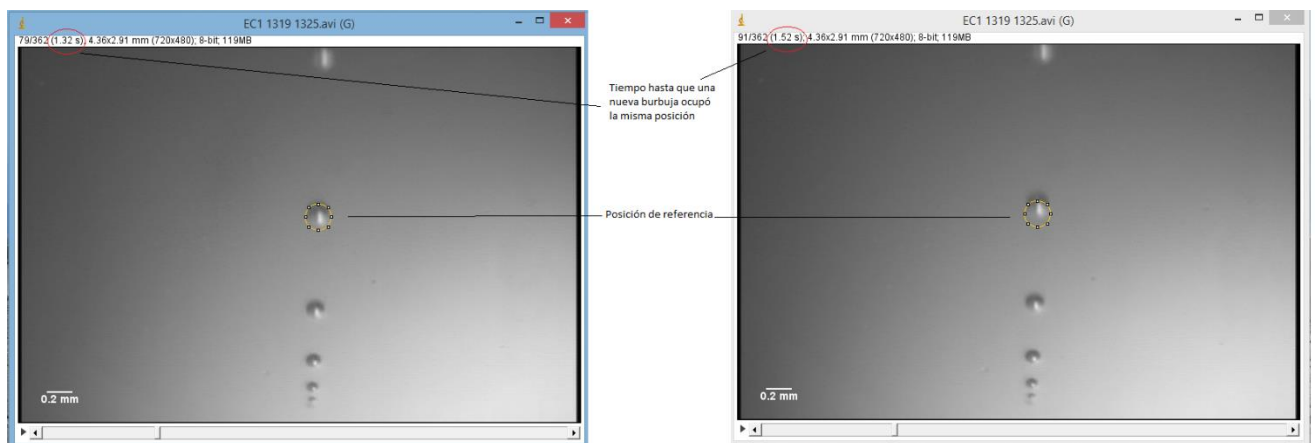


Figura V-20 Medición de períodos de trenes de burbujas.

En las figuras se indica que el tiempo registrado como el intervalo transcurrido entre que dos burbujas sucesivas ocupan la misma posición, no coincide exactamente con el período, ya que la burbuja en la figura de la derecha se ha desplazado una distancia por encima de la referencia. Esta ligera diferencia afecta el período medido de esta manera, por lo que se resta el tiempo que la burbuja insumió en recorrer esa diferencia de trayecto, a partir de los valores de velocidad calculados para esta burbuja (considerando velocidad constante en ese breve intervalo de tiempo).

Durante el llenado de una copa se produce flujo convectivo por la agitación del fluido, que incorpora aire y genera turbulencias en la copa. Por este motivo, se comenzaron a registrar mediciones de frecuencias a partir de 2 minutos de servida una copa.

Los datos obtenidos se muestran en la tabla V.8 donde se indica además de la posición, el tiempo transcurrido desde que se sirvió la copa. Se midieron frecuencias de trenes de burbujas observados en tres posiciones de la copa: cercanos al sitio de nucleación de un tren, en el seno del líquido, y próximos a la superficie, justo antes de alcanzar la corona.

En la Figura V-21 (a) se observan dos trenes, A y B captado en sus sitios de nucleación, muy próximos entre sí.

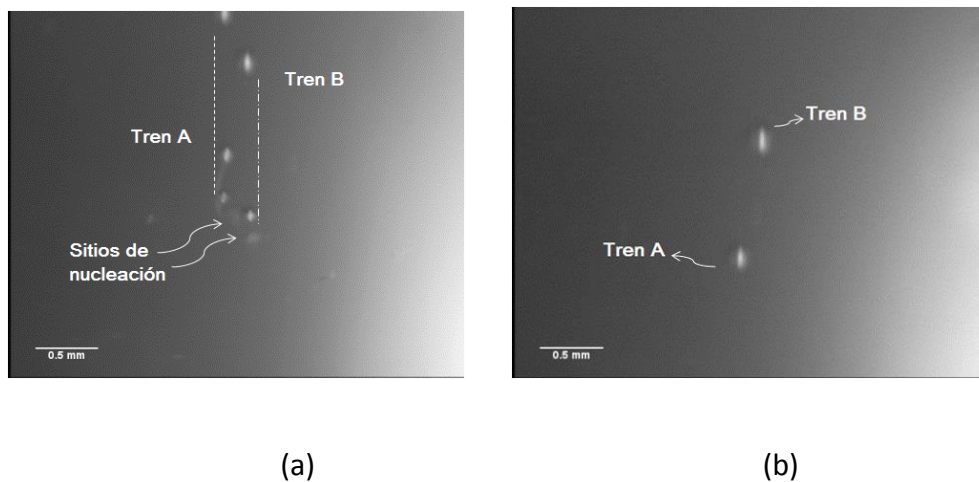


Figura V-21 Dos trenes de burbujas a) desde sus sitios de nucleación; b) durante su ascenso cercano a la superficie. (Imágenes tomadas a los tiempos 16:58 y 16:46 respectivamente)

Resultó confuso monitorear un tren desde su sitio de nucleación y seguirlo con la cámara durante todo su ascenso, ya que cuando se ubica un sitio de nucleación con la cámara 1, en una corta distancia, el tren sale del enfoque de la cámara. Pero la frecuencia de un tren permite caracterizar un sitio de nucleación (Gerard Liger-Belair et al., 1999).

Las frecuencias registradas para el tren A resultó diferente a la del tren B (test de comparación de medias, $\alpha=0,05$). En la Figura V-21(b) se muestran los mismos trenes en su ascenso hacia la superficie. Durante el ascenso de las burbujas en el seno del líquido, alejadas de sus sitios de nucleación las frecuencias calculadas resultaron las mismas que en base a los datos cerca del sitio de nucleación, (test de comparación de medias, $\alpha=0,05$) podemos confirmar así que se trata de los mismos trenes.

Se observa una amplia distribución de frecuencias que abarca entre 1,77 y 8,89 Hz. Se han reportado valores muy dispersos de frecuencias de formación de burbujas en champagnes y que esta distribución no guarda relación significativa con el tiempo ni con la posición donde se observan.

Rodriguez-Nogales et al. (2012) reportaron frecuencias de (4,40±0,21) Hz hasta (5,54±0,1) Hz, en cavas a 20°C con presiones de 3,7 bars, 3 minutos después de servida una copa. han registrado entre 10 y 20 burbujas por segundo (Gérard Liger-Belair et al., 2000a).

La frecuencia de generación de burbujas desde un sitio de nucleación depende de las características geométricas de las fibras donde se forman las burbujas, que se adhieren a la copa debido a fuerzas electrostáticas durante el proceso de secado y/o procedentes del ambiente (Liger-Belair et al. 2012), así como de características del fluido: contenido en CO₂, temperatura, viscosidad, densidad y tensión superficial (Gérard Liger-Belair, Polidori, & Jeandet, 2008b).

Liger-Belair et al (2008) han deducido una expresión (13) para estimar la frecuencia de generación de burbujas en un sitio de nucleación, en función de:

$$f \approx 5,2 \times 10^{-8} \frac{T^2(c_L - k_H(P + 0,2))}{\eta(P + 0,2)} \quad (13)$$

c_L es la concentración de dióxido de carbono en el líquido (g/l), k_H es la constante de la ley de Henry (g/l⁻¹atm⁻¹), P es la sobrepresión de CO₂ (atm) y η es la viscosidad (kg m⁻¹ s⁻¹); 0,2 es un valor estimado en función de parámetros geométricos aproximados de una fibra de celulosa típica donde se produce nucleación.

Analizando la dependencia de la frecuencia con la concentración de dióxido de carbono disuelto, y considerando constantes el resto de los parámetros involucrados, basados en el modelo anterior se pueden justificar que los valores de frecuencia obtenidos resulten menores que los reportados para champagnes, debido a la menor concentración inicial de CO₂ lograda en estos espumantes de naranja finamente gasificados.

Tabla V-8 Frecuencias de liberación de burbujas en diferentes posiciones durante el ascenso. Valores medios y desviaciones estándar (n=8). Letras diferentes indican diferencias significativas entre las medias ($\alpha=0,05$).

Tiempo de observación (min:seg)	Observación	Frecuencia (Hz)
00:31	Tren de burbujas próximo a su sitio de nucleación	7,86±0,67 ^a
2:38	Tren de burbujas próximo a la superficie	7,09±0,48 ^b
04:57	Tren de burbujas en el seno del líquido	1,77±0,10 ^c
05:08	Tren de burbujas desde sitio de nucleación	6,86±0,39 ^d
08:20	Tren de burbujas en el seno del líquido	8,89±0,71 ^e
09:00	Tren de burbujas desde sitio de nucleación	7,86±0,67 ^a
09:30	Tren de burbujas desde sitio de nucleación	7,76±0,58 ^a
10:43	Tren de burbujas desde sitio de nucleación	6,58±0,24 ^f
11:20	Tren de burbujas desde sitio de nucleación	7,83±0,69 ^a
12:36	Tren de burbujas desde sitio de nucleación	5,59±0,37 ^g
12:55	Dos burbujas ascendiendo en el seno del líquido	5,25±0,26 ^h
13:19	Tren de burbujas desde su sitio de nucleación	5,26±0,00 ^h
13:49	Tren de burbujas en ascenso en el seno del líquido	1,94±0,04 ⁱ
14:32	Tren de burbuja próximo a la superficie	1,89±0,02 ^j
15:54	Tren de burbujas en ascenso en el seno del líquido	6,85±0,37 ^d
16:46	Trenes de burbujas desde dos sitios de nucleación	2,85±0,15 ^k 3,75±0,20 ^l
17:46	Burbujas en sitio de nucleación múltiple	3,12±0,13 ^m 2,77±0,15 ⁿ
18:58	Tren de burbujas desde sitio de nucleación	4,08±0,15 ^o

Por otra parte a medida que transcurre el tiempo sería de esperar una disminución de la frecuencia, por la liberación de dióxido de carbono al medio. En los valores medidos mostrados en la tabla de frecuencias no se encontró relación entre la frecuencia de generación de burbujas y el tiempo transcurrido. Para observar este comportamiento habría que dejar fija la cámara de video para registrar todo el tiempo un solo sitio de nucleación y monitorerar así exclusivamente la frecuencia de generación de burbujas en un lugar determinado.

El número de sitios de nucleación, donde se genera la efervescencia en una copa, depende del proceso de limpieza y de la manera en que fue almacenada la copa antes de utilizarla para servir el espumante (G. Liger-Belair, 2012).

En la fotografía mostrada (Figura V.13) se puede observar que la cantidad de sitios de nucleación disminuye, ya que al pasar el tiempo se van inactivando los sitios que no verifican la relación planteada en la ecuación (8) en el capítulo I. En esa expresión está explicada la dependencia del radio de las microcavidades donde se produce la nucleación por la disminución de la concentración de CO_2 que disminuye la relación de supersaturación s (ecuación 5 del capítulo I).

La influencia de la temperatura está expresada en la ecuación mostrada, directamente elevada al cuadrado, pero la temperatura también afecta la constante de la ley de Henry (ecuación 3 del capítulo I; tabla V.3) y la viscosidad de la solución (María Cristina Cayetano Arteaga et al., 2013). Un aumento de 10 K en la temperatura (rango que ocurre aproximadamente durante el tiempo que dura la degustación de una copa) aumenta en un 50% la frecuencia de nucleación (Gérard Liger-Belair et al., 2008b) por lo tanto el espumante se desgasifica más rápido y el show de la efervescencia finaliza antes.

La presión del ambiente también afecta la frecuencia, según la relación planteada, al aumentar la presión disminuye la frecuencia pero este efecto resulta despreciable considerando la presión atmosférica constante (aunque podría ser relevante si estás brindando en la cima de una montaña muy alta..).

En los espumantes de naranja se observaron sitios de nucleación múltiples, como los mostrados en las Figura V-21Figura V-22.

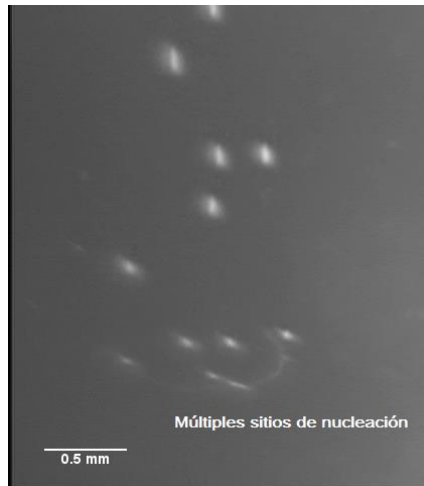


Figura V-22 Sitios de nucleación múltiple (registrado al tiempo 17:46).

Esto parece ocurrir en imperfecciones de la copa o en fibras de celulosa casi macroscópicas, que hayan caído del ambiente, con capacidad de actuar con varias microcavidades donde generar burbujas. En la tabla V.8 se observa que los valores de frecuencias para los dos trenes de los observados en la figura V.22 presentan diferencias significativas ($\alpha=0,05$), sugiriendo que los sitios de nucleación donde se generan presentan características geométricas diferentes, es decir, en esta fibra “grande” y compleja habría numerosas microcavidades que actúan en forma independiente generando trenes de burbujas con frecuencias particulares.

Liger-Belair et al (2012) han reportado observaciones de fibras presentando numerosos bolsillos de gas, donde se generan burbujas, describiendo la presencia de fibras de celulosa que se desprenden de las paredes de la copa y quedan inmersas en el seno del líquido, a las que llamó “*fliers*”. Estas fibras se mueven al azar en la copa, dando origen a trenes de burbujas como los mostrados en la Figura V-22.

V.3-6 Análisis del ascenso de las burbujas.

V.3-6.x Análisis de un tren de burbujas

Trenes de burbujas fueron registrados en imágenes como la que se muestra en la Figura V-23. La primera información que brindan estas imágenes es que al ascender las burbujas se aceleran (porque se observa que la distancia entre ellas aumenta) y se expanden (porque se observa un aumento de su tamaño).

Las burbujas ascienden en línea recta, como muestran las coordenadas constantes en X de sus centros geométricos. Se registraron las posiciones de las burbujas que integran el tren y cada una fue monitoreada cuadro a cuadro, registrando las posiciones sucesivas durante el mismo tiempo.

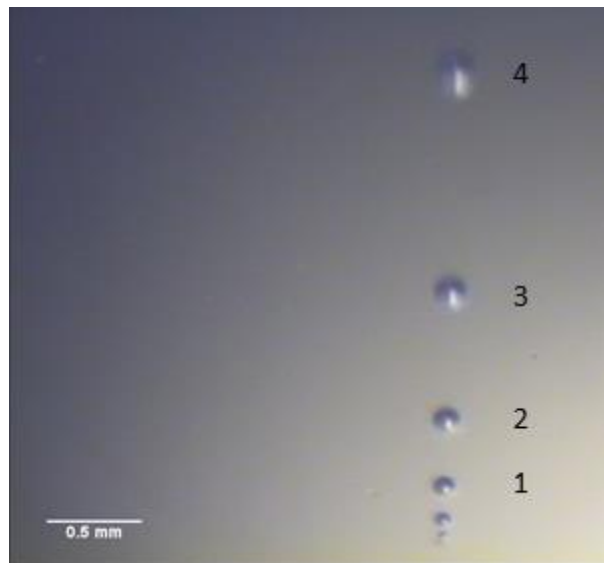


Figura V-23 Tren de burbujas desde su sitio de nucleación. (Observación a los=13:19 minutos)

Al graficar la posición en función del tiempo para todas las burbujas de este tren, se obtuvieron las curvas de la Figura V-24. Cada curva representa las posiciones que ocupa una burbuja hasta ocupar la posición de la burbuja inmediatamente superior en el tren, como se visualiza en las gráficas correspondientes. Así la burbuja 1 mostrada en la Figura

V-23 ocupa las posiciones más cercanas al sitio de nucleación y la burbuja 4 es la que se encuentra más arriba, y le corresponden valores de posición negativos porque el programa Image J toma como origen de coordenadas el extremo superior izquierdo de la imagen.

En un mismo intervalo de tiempo se monitorearon las 4 burbujas superiores del tren, esta posibilidad de realizar múltiples mediciones en el mismo tiempo se realizó utilizando la herramienta “multipoint” del menú de análisis de imágenes.

El análisis de regresión lineal mostró una relación significativa ($\alpha=0,05$) que explica la variabilidad de más del 98% de los datos de posición en función del tiempo, para las burbujas del tren. En base a este análisis, en cada intervalo de tiempo, la aproximación de considerar el movimiento de las burbujas con movimiento rectilíneo uniforme resulta válido. En publicaciones sobre el comportamiento de burbujas en sidra (Soto Herrera et al., 2008) y champagnes (G. Liger-Belair et al., 2002; G. Liger-Belair, 2012; Gérard Liger-Belair, 2005; Gérard Liger-Belair et al., 1999), hacen referencia a una velocidad promedio entre dos posiciones sucesivas de un tren de burbujas; en base a estas velocidades promedio, aproximan el movimiento de las burbujas con aceleración constante durante el ascenso.

Sin embargo, los datos del tren fueron ajustados a una función polinómica de segundo grado, ($\alpha=0,05$), y con este modelo se explica la variabilidad de más del 99% de los datos, mostrando así que el movimiento que realizan las burbujas es acelerado. Las derivadas primeras de estas funciones permitieron calcular las velocidades de cada burbuja (Figura V-25), acotadas entre una posición en el tren y la siguiente. La derivada segunda nos indica la aceleración en ese intervalo.

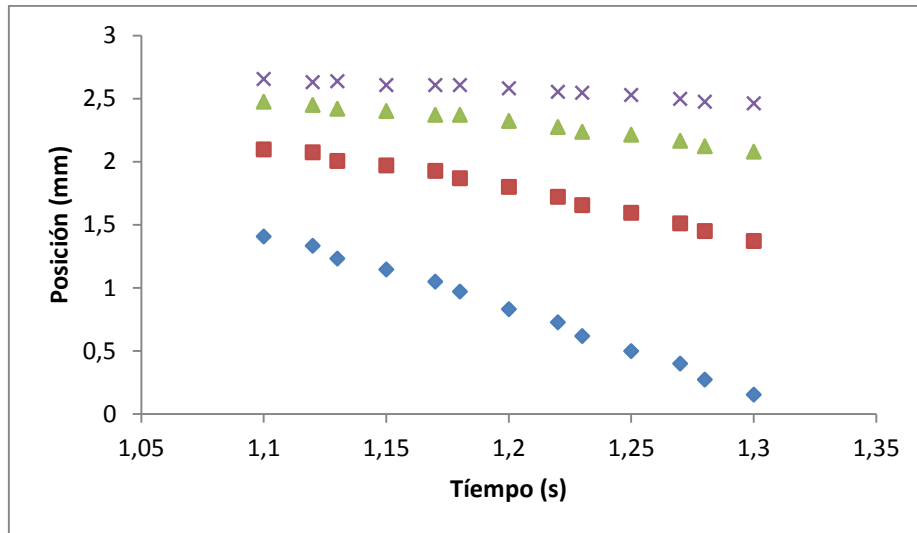


Figura V-24 Gráficos de posición en función del tiempo de las cuatro burbujas superiores del tren mostrado en la figura V.23.

Las pendientes de las gráficas de velocidad en función del tiempo (Figura V-25) muestran que la aceleración de cada burbuja no es constante durante el ascenso, sino que aumenta a medida que las burbujas ascienden. Cuando están próximas a su sitio de nucleación, la burbuja 1 del tren mostrado en la Figura V-23, muestra una aceleración de $5,0 \text{ mm/s}^2$, mientras que la burbuja más alejada del sitio de nucleación, aumentó su aceleración hasta un valor de $12,2 \text{ mm/s}^2$.

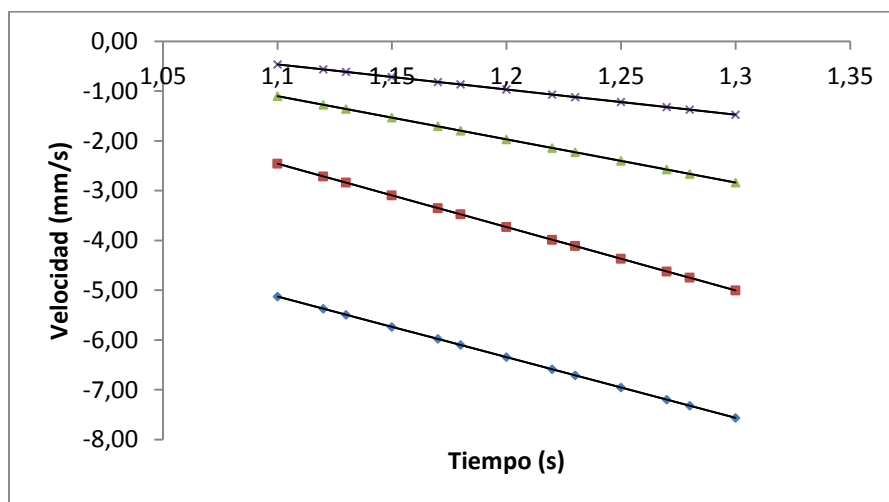


Figura V-25 Gráfico de velocidad de las burbujas del tren en función del tiempo. V1 es la velocidad de la burbuja más elevada en la figura (t=13:19 minutos)

Por lo tanto, a medida que una burbuja se libera de su sitio de nucleación, su velocidad se incrementa y su aceleración es uniforme en los intervalos de tiempo analizados, pero esta aceleración se incrementa a medida que las burbujas ascienden.

V.3-6.xi Análisis de dos trenes de burbujas que ascienden paralelos

Para el caso de las burbujas A y B mostrados en la Figura V-21, que ascienden en forma paralela se observó que la posición de las burbujas varía en función del tiempo como muestran las gráficas mostradas en la Figura V-26 (a) y (b).

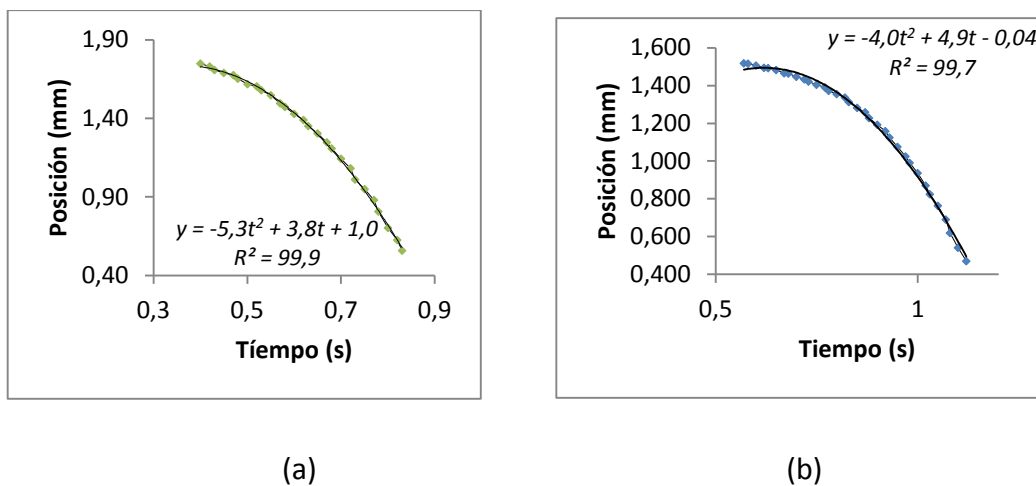
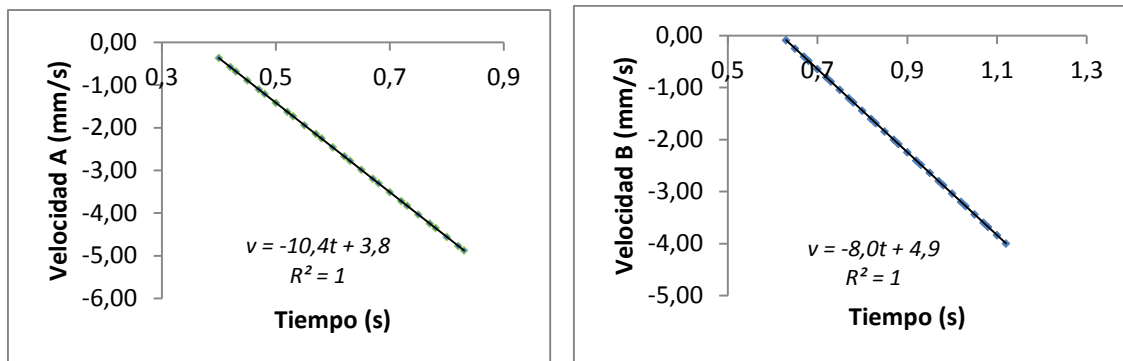


Figura V-26 Gráficas de la posición en función del tiempo (a y b) para los trenes de burbujas (A y B) observados en las figura V.21 (Tiempo de observación=16:58)

Las velocidades de estas burbujas, calculadas en base a las gráficas anteriores se muestran en la Figura V-27.



(a)

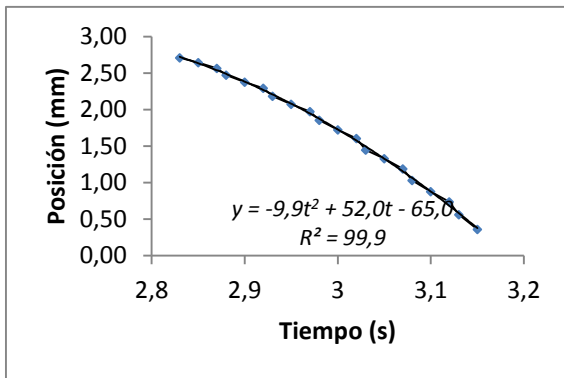
(b)

Figura V-27 Gráficas de velocidad en función del tiempo para los trenes de burbujas A y B observados en las figuras V.21

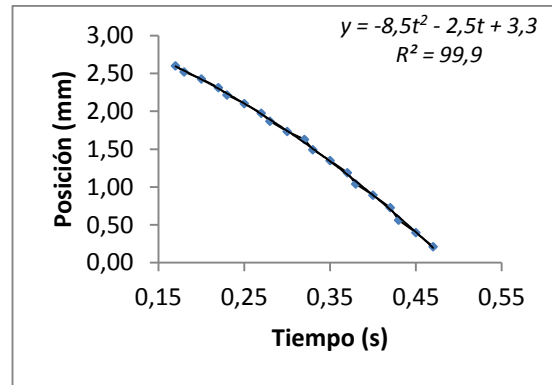
Se monitoreó el ascenso de estos mismos trenes, y aproximadamente a mitad de camino entre el sitio de nucleación y la superficie, sus posiciones y velocidades varían según muestran las gráficas siguientes. Las gráficas de la izquierda (a) en todos los casos representan al tren A, y las gráficas a la derecha representan resultados del tren B

Comparando los datos, se observa que en aproximadamente 3,00 cm de ascenso su aceleración aumenta: en el caso del tren A pasó de $10,4 \text{ mm}\cdot\text{s}^{-2}$ a $19,8 \text{ mm}\cdot\text{s}^{-2}$, el mismo comportamiento fue observado en el tren B cuya aceleración próxima al centro de nucleación de $8,0 \text{ mm}\cdot\text{s}^{-2}$ (Figura V-26-b) aumentó a $17 \text{ mm}\cdot\text{s}^{-2}$ (Figura V-28-b).

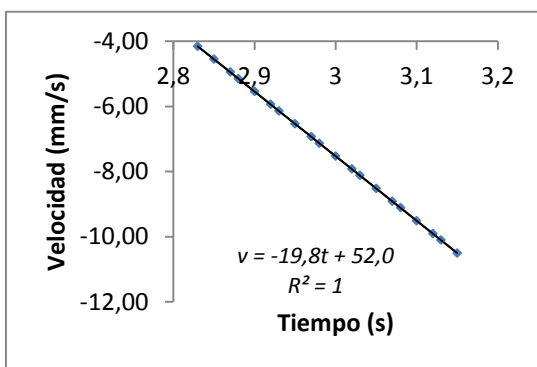
Dos trenes de burbujas ascendiendo muy próximos podrían interactuar entre sí, pero no se han encontrado reglas generales acerca de tales interacciones (G. Liger-Belair, 2012)



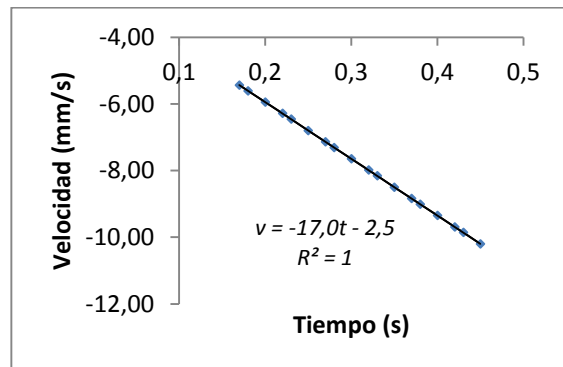
(a)



(b)



(a)



(b)

Figura V-28 Gráficos de posición en función del tiempo (a y b) y velocidad en función del tiempo (c y d) de las burbujas A y B de la figura V.21 (b)

V.3-6.xii Análisis de burbujas cerca de la interfaz

En burbujas capturadas ascendiendo cerca de la interfaz aire-espumante, se observó el comportamiento mostrado en la Figura V-29, donde resulta evidente que la velocidad de ascenso en esta región es constante (regresión lineal, $\alpha=0,05$) y por lo tanto su aceleración es nula. En este caso, esta velocidad constante resultó igual a 12,0 mm/s.

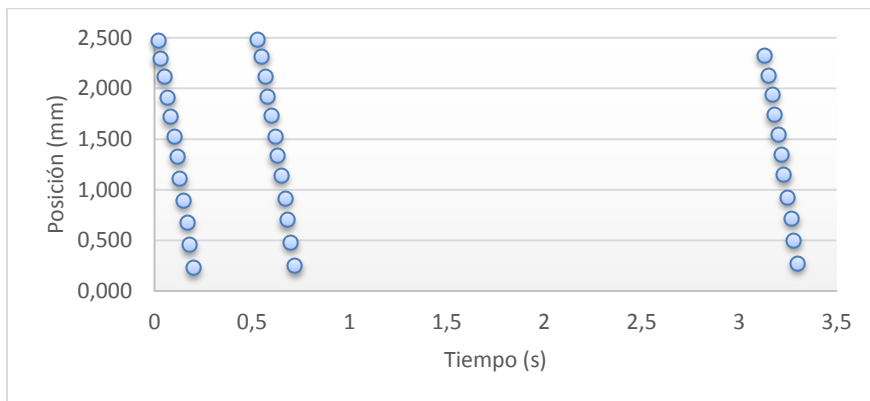
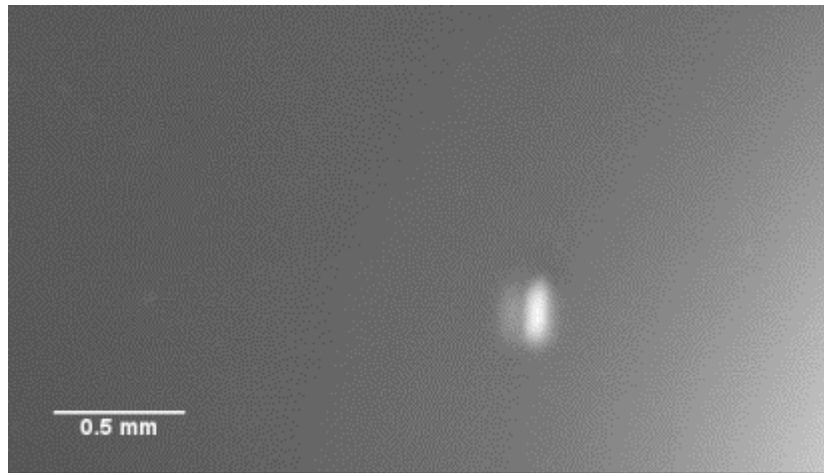


Figura V-29 Burbuja ascendiendo en las proximidades de la interfaz espumante-aire (Tiempo observación= 13:49 minutos)

Se puede concluir en base a los resultados observados, que a medida que las burbujas ascienden y se aceleran, el régimen de flujo varía (Gérard Liger-Belair et al., 1999). En base a las observaciones en los espumantes de naranja, se pueden reconocer dos etapas, una etapa cuando la burbuja está próxima a sus sitios de nucleación, que se modelizan como movimientos rectilíneos acelerados no uniformemente, y un comportamiento que ajusta a un movimiento rectilíneo uniforme, cuando la burbuja asciende libremente en regiones próximas a la interfaz.

Los resultados de evaluar el ajuste de los datos de posición en función del tiempo se muestran en la tabla V.9 para trenes de burbujas descritos en la tabla V.8.

Tabla V-9 Descripción de la velocidad en función del tiempo para los trenes de burbujas indicados en la tabla V.8

<i>Tiempo de observación (min:seg)</i>	<i>Velocidad (mm/s)</i>	<i>R² (%)</i>
00:31	$v = 4,2t - 30,1$	99,1
2:38	26,5	98,7
04:57	22,2	98,5
05:08	$v_1 = 29,0t + 2,5$ $v_2 = 16,0 + 0,715t$ $v_3 = 9,1t + 0,46$	99,3 99,2 99,7
08:20	12,9	99,7
09:00	7,6	99,3
12:36	$v_1 = 10,9t + 44,4$ $v_2 = 8,11t + 34,0$ $v_3 = 2,3t + 9,2$ $v_4 = 2,9t + 12,5$	99,7 99,6 98,4 97,7
13:19	$v_1 = 12,2t - 8,3$ $v_2 = 12,7t - 11,6$ $v_3 = 8,7t - 8,5$ $v_4 = 5,1t - 5,5$	99,7 99,6 99,4 98,6
16:46	$v_D = 17,0t - 2,5$ $v_I = 19,8t - 52$	99,6 99,8
16:58	$v_A = 8,0t - 4,9$ $v_B = 10,5t - 3,8$	99,6 99,9

V.3-7 Descripción del tamaño de burbujas

Durante su ascenso las burbujas se expanden, como se observa en las imágenes V.23. Para analizar como varía el tamaño de las burbujas, se calculó el radio de cada burbuja de un tren, y se analizó su variación con la posición, o sea, a medida que ascienden en línea recta.

Cada burbuja del tren mostrado en la Figura V-23 asciende y ocupa la posición de la siguiente burbuja al transcurrir un tiempo igual a un período. Al graficar el radio de las burbujas, en estos tiempos, se obtuvieron gráficas como la mostrada en la Figura V-30.

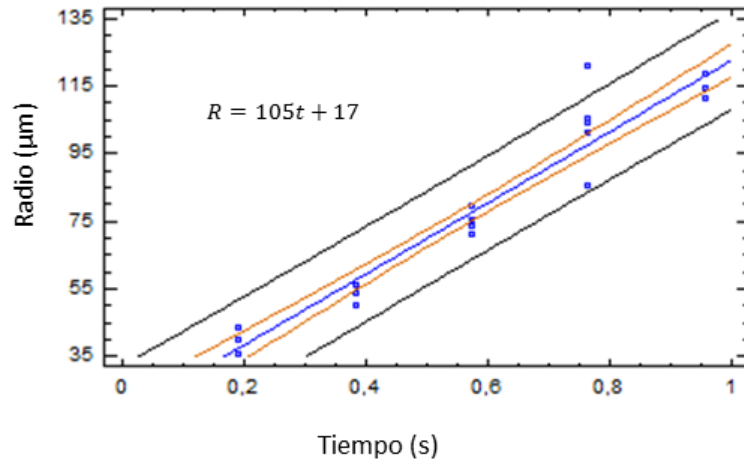


Figura V-30 Gráfico del modelo ajustado de la tasa de crecimiento de una burbuja. Correspondiente al tren mostrado en la figura V.23.

La ecuación de regresión (14) indica que las burbujas aumentan su tamaño siguiendo una relación lineal ($\alpha=0,05$), y la pendiente de esta gráfica indica el ritmo de cambio del radio de la burbuja a medida que pasa el tiempo. Este valor es una característica de cada tren de burbujas.

$$k = \frac{dR}{dt} \tag{ 14}$$

En este tren, observado a los 13:19 minutos de servida la copa, el valor de k hallado resultó $(105\pm 5) \mu\text{m/s}$. En la tabla V.10 se leen tasas de crecimiento calculadas de trenes de burbujas desde sus sitios de nucleación.

Tabla V-10 – Tasa de crecimiento de trenes de burbujas

<i>Tiempo de observación (min:seg)</i>	<i>K (μm/s)</i>	<i>R²</i>
00:31	181±5	79,7
05:08	150±4	98,7
09:00	149±12	89,0
09:30	146±5	97,9
10:43	132±5	95,5
11:20	116±5	98,3
12:36	74±6	88,4
12:55	128±6	97,4
13:19	105±5	94,7
15:54	113±4	95,2
17:46	129±6	99,8
	165±8	99,3

El rango de valores observados en el espumante EC1, abarca desde 74 μm/s hasta 181 μm/s. En espumantes comerciales y champagnes se han reportado tasas de crecimiento desde 122 μm/s (Gérard Liger-Belair et al., 1999) hasta 350-400 μm/s a 20°C a los 3 minutos de servida una copa hasta 150 μm/s una hora después (G. Liger-Belair et al., 2002; Gérard Liger-Belair et al., 2008b). Para cervezas han sido reportadas tasas de crecimiento de 40 μm/s, mucho menores que las de estos espumantes, pero el comportamiento sigue también una función lineal (Shafer & Zare, 1991).

El aumento de tamaño de burbujas determina el radio final de las mismas, al momento de colapsar en la superficie o en la boca, al momento de su degustación. La tasa de crecimiento está gobernada principalmente por difusión molecular hacia la interfase de la burbuja, y también influenciada por numerosos factores tales como la inercia del

fluido, la viscosidad y tensión superficial (S. Jones et al., 1999). El tamaño final promedio de las burbujas ascendiendo es una combinación entre ratio de crecimiento y velocidad de ascenso (G. Liger-Belair, 2012).

El cambio del tamaño de las burbujas altera el impacto sensorial de una bebida; la percepción del champagne como una bebida superior a otros vinos espumantes generalmente se atribuye a la generación de burbujas más pequeñas (Barker, Jefferson, & Judd, 2002). Esto conduce a un incremento en el transporte de masa del dióxido de carbono cuando las burbujas impactan en la lengua, incrementando la sensación de “hormigueo” provocada por la conversión del CO_2 en H_2CO_3 por la enzima anhidrasa carbónica (Grabber & Kelleher, 1998).

V.3-8 Conclusiones del análisis de imágenes

El procesamiento de las imágenes obtenidas al filmar la evolución de la espuma generada al servir una copa de espumante, permitió caracterizar propiedades espumantes y describir la cinética de la formación de burbujas. Se calcularon características de la corona (persistencia, tamaño, radio crítico antes de colapsar); la frecuencia con que se generan y ascienden burbujas, y tasas de crecimiento de los trenes de burbujas durante su ascenso. En base a estos datos se calcularon valores casi instantáneos de los parámetros que definen el régimen de flujo (velocidad, aceleración) y aproximarse así al comportamiento local, microscópico del fluido. Las muestras conservadas en formato original permiten su análisis y re procesamiento todas las veces que resulte necesario. Utilizando esta técnica instrumental no destructiva, que permite la observación de las propiedades espumantes en condiciones similares a las de degustación que experimenta un consumidor real, se lograron especificar parámetros que permiten describir las propiedades de las burbujas de espumante de naranja.

V.4 Discusiones complementarias

V.4-1 Integrando resultados

Con los datos obtenidos de la caracterización fisicoquímica y los calculados a partir del análisis de las imágenes (velocidad durante el ascenso, ratio de crecimiento, radios, frecuencias, etc.) se analizarán a continuación diferentes aspectos involucrados en la formación de burbujas, su ascenso y colapso final, en el espumante de naranja. Así, se combinan y complementan los distintos estudios abordados en esta tesis para la caracterización de este nuevo producto, incluyendo los comúnmente utilizados en las bodegas (fisicoquímicos y sensoriales) incorporando el estudio cuantitativo basado en imágenes reales. Este enfoque pretende proporcionar información valiosa para describir la calidad final de un vino espumante. Del relevamiento realizado en Argentina, no se han encontrado hasta hoy, referencias a la caracterización de las propiedades específicas de la espuma, utilizando análisis de imágenes.

El CO_2 responsable de las burbujas en una copa (Figura V-31), se libera del medio líquido debido a las diferencias de presión existentes entre el seno del espumante y la presión atmosférica, para restablecer el equilibrio termodinámico (1.4-2)

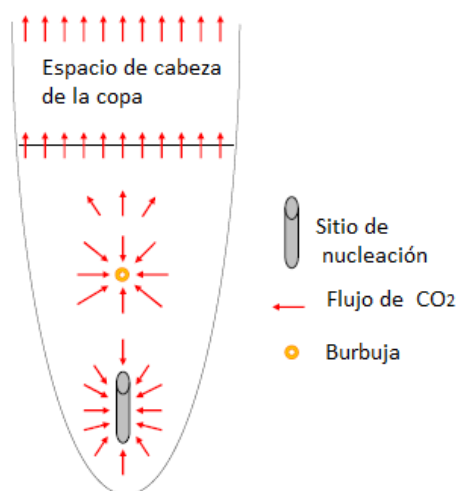


Figura V-31 Representación de una copa de espumante indicando las etapas de la desorción de CO_2 .

El mecanismo de desorción del CO_2 de una copa de champagne, la “vida” de una burbuja ha sido exhaustivamente estudiado por numerosos autores: Douillard et al., (2000);

Liger-Belair et al., (1999, 2000, 2001, 2003, 2005, 2006, 2008, 2010, 2012); Mulier, 2009; Parmentier & Cilindre, 2012; Parmentier et al., (2006); Perret et al., (2014); Robillard et al., (2009); Takemura et al.,(2002); Uzel et al., (2006); Voisin, (2005).

V.4-2 De la formación de burbujas

Como se ha detallado en la Introducción (I.3-2), la formación de burbujas en los espumantes ocurre por nucleación heterogénea de tipo IV (S. Jones et al., 1999). La Figura V-32 (Liger-Belair et al., 2002) esquematiza un sitio de nucleación. La fuerza impulsora para que las burbujas crezcan en los sitios de nucleación es el gradiente de concentración (ΔC) que existe entre el seno del líquido (C_L) y la superficie de la burbuja (C_B). Esta concentración (C_B) es proporcional a la presión en el interior de la burbuja (P_B), según la ley de Henry.

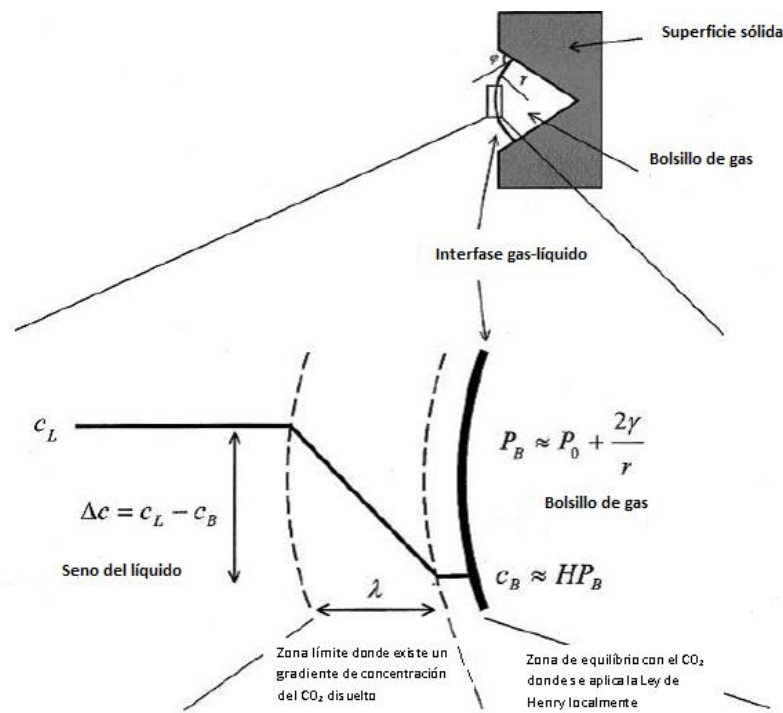


Figura V-32 Concentración de CO_2 en sitio de nucleación (adaptado de Liger-Belair et al, 2002)

Una burbuja es una región en la cual sustancias en estado gaseoso están atrapadas por una delgada lámina. La superficie de la burbuja se comporta como una membrana elástica que ejerce una fuerza hacia el interior debido al radio de curvatura (r).

Para una superficie esférica de radio r , la diferencia de presión entre el interior y el exterior de la burbuja está dada por la ecuación de Laplace (ecuación (8)):

La presión exterior, P_0 es la suma de la presión atmosférica más la presión hidrostática, dada por la profundidad a la que se encuentra el sitio de nucleación. La altura máxima de líquido en una copa de espumante alcanza aproximadamente 10 cm, y considerando la densidad del espumante EC1 (Tabla V-1) realizando el cálculo de la presión hidrostática máxima, correspondiente a un sitio de nucleación en el fondo de la copa, resultaría establecida según la ecuación (15):

$$P_H = \rho gh = 1 \times 10^{+3} \frac{kg}{m^3} \times 9,8 \frac{m}{s^2} \times 0,1m = 980 Pa \approx 0,01 P_{atm} \quad (15)$$

Se puede considerar despreciable la contribución de la presión hidrostática a la presión total, ya que representa como máximo un 1% del valor de la presión atmosférica.

Por lo tanto, a los efectos de los cálculos a realizar será considerada la presión P_{ext} igual a la $P_{atm} = 1 atm = 101.300 Pa$.

De la ecuación anterior se calcula la presión en el interior de la burbuja (P_B) como:

$$P_B \cong P_{atm} + \frac{2\sigma}{r} \quad (16)$$

Las moléculas de CO_2 difunden hacia las cavidades hasta que la burbuja alcanza el radio crítico que le permite superar la fuerza de capilaridad que la mantiene ligada al sitio de nucleación.

V.4-2.xiii Sobresaturación y radio crítico de nucleación

En el espumante de naranja, al igual que en los tradicionales champagnes y cavas, el radio crítico para que ocurra nucleación heterogénea de tipo IV está dado por la ecuación (8) (Gérard Liger-Belair et al., 2000b).

Con la presión del EC1 (Tabla V-4) fue calculada la relación de sobresaturación en este espumante de naranja:

$$s = \frac{P_L}{P_0} - 1 = \frac{3,95}{1} - 1 = 2,95 \quad (17)$$

Esta relación resultó inferior a la de los champagnes y cava (Gérard Liger-Belair et al., 2000a) ya que en estas bebidas la presión interna generada es de aproximadamente 6 atm y por lo tanto la relación de sobresaturación alcanza valores mayores $s \approx 5$. Para los espumantes de naranja se buscó obtener un producto con menor presión, que resultara finamente gasificado, más suave, y se logró alcanzar las presiones buscadas (≈ 4 atm).

Voisin, (2005) y Uzel (2006) han observado por medio de análisis de imágenes, que en el 90-95% de los casos los sitios de nucleación de burbujas en champagne ocurre en fibras tubulares de celulosa, (procedentes del ambiente o del proceso de secado) y determinaron que la geometría de las mismas gobiernan en parte la formación y liberación de burbujas. El sistema de captura de imágenes utilizado en estas experiencias no permitió observar en detalle los sitios de nucleación, es decir, no se pudo captar ni el interior de una microcavidad, ni medir directamente el radio de nucleación crítico pero se realizó un cálculo en base a las ecuaciones propuestas.

Utilizando el valor calculado de sobresaturación en espumantes de naranja y la tensión superficial (Tabla V-1) del EC1, se logró estimar el radio crítico que deben tener las impurezas en la copa capaces de generar trenes de burbujas:

$$r_c \cong \frac{2 \times 52,9 \times 10^{-3} Nm^{-1}}{(3,95 \times 10^5 Pa \times 2,95)} \cong 0,88 \times 10^{-7} m \cong 88 \mu m \quad (18)$$

Este tamaño de burbujas es imperceptible a simple vista, ya que la capacidad de resolución del ojo humano aproximadamente es de $100 \mu m$ (José Miguel Aguilera, 2007).

La presión al interior de esta pequeña burbuja, resulta, aplicando la ecuación (16) :

$$P_B \cong 101.300 Pa + \frac{2 \times 52,9 \times 10^{-3} Nm^{-1}}{88 \times 10^{-6} m} = \mathbf{102.502 Pa} \quad (19)$$

El radio crítico calculado es entonces el que permitió la nucleación de burbujas por lo tanto una vez liberadas de estas impurezas o microcavidades, comenzaron a ascender y aumentaron su tamaño. La diferencia de presión entre el interior y el exterior de la burbuja disminuye ya que al ascender la burbuja aumenta su radio.

Se han reportado para champagnes valores del radio crítico de nucleación entre 20-30 μm (Gérard Liger-Belair, 2005), del mismo orden de magnitud que la fibra de celulosa que actúa como centro de nucleación.

La ecuación (5) pone de manifiesto que el radio crítico no es fijo, ya que depende de la relación de sobresaturación. Con el transcurso del tiempo la cantidad de CO_2 disuelto en el líquido disminuye y por lo tanto, disminuye la relación s , incrementando el valor del radio crítico necesario para mantener la formación de trenes de burbujas; los sitios que no alcancen este valor se inactivan y así, visualmente se observa cómo disminuye la cantidad de trenes en una copa. Durante la captura de imágenes, se pone en evidencia la disminución del número de trenes, como se observa en la Figura V-13.

Considerando los resultados del análisis sensorial el atributo *número de núcleos* se relaciona con esta característica fisicoquímica. En todos los de espumantes analizados se obtuvieron valores relativamente bajos (entre 5,2 y 6,4 puntos), comparados con los asignados a los espumantes comerciales durante la fase de entrenamiento de los panelistas, que otorgaron puntajes hasta 9,8 (datos no consignados). C

Como ya se mencionó la mayoría de los sitios de nucleación están localizados en fibras huecas cilíndricas de celulosa exógenas, procedentes del ambiente o remanentes del

proceso de secado de las copas al utilizar toallas de algodón o papel, (Gerard Liger-Belair & Jeandet, 2002), por lo tanto, el proceso de lavado y secado de las copas, es una etapa fundamental a controlar para asegurar que la formación de burbujas resulte lo más uniforme posible.

Si se quisiera modificar el radio crítico y aumentar el número de núcleos, una manera sería aumentando la relación de sobresaturación pero esta opción no resulta válida en estos espumantes ya que como se explicó, se buscó generar una presión inferior a la de los espumantes tradicionales. Otra manera de influir sobre el radio mínimo de las burbujas sería disminuyendo la tensión superficial y este efecto sí se podría manejar, modificando por ejemplo el contenido de cortezas de levaduras en el licor de tirage (M.C. Cayetano Arteaga, Stefani Leal, González, Ferreyra, & Schvab, 2014). Se han desarrollado copas con un anillo de micro cavidades generadas por impactos de láser en el fondo de la misma (Figura V-33) con la finalidad de promover nucleación “artificial”; los trenes generados ascienden vigorosamente y de manera más caótica que cuando se produce nucleación “natural”.



Figura V-33 Nucleación “artificial” generada en microcavidades grabadas con láser en el fondo de una copa (Liger Belair, 2012).

Sin embargo el efecto no sólo es estético sino que se supone que la cinética de liberación del CO₂ y la liberación de aromas podría verse favorecida durante la degustación (Liger 2012).

V.4-3 Del ascenso de las burbujas

Una vez alcanzado el radio crítico, la fuerza de empuje supera a la fuerza de capilaridad que mantiene a la burbuja ligada al sitio de nucleación, entonces la burbuja se libera y asciende a través del líquido aumentando su tamaño y acelerándose, como se describió en V.3-5 y se observa en las imágenes de trenes de burbujas Figura V-21 a Figura V-23.

V.4-3.xiv Estimación de la cantidad de burbujas liberadas en una copa de espumante

Para tener una estimación de la cantidad de burbujas liberadas en una copa de champagne, se considera comportamiento ideal del gas liberado. A la presión alcanzada en el interior del espumante EC1 (3,95 atm), corresponde una concentración de dióxido de carbono de 8,8 g/l a 8°C (Tabla V-4).

El número de moles de CO₂ generados resultó:

$$n = \frac{8,8 \text{ g/l}}{44 \text{ g/mol}} = 0,20 \text{ moles/l} \quad (20)$$

Una botella de 0,75 l contendrá entonces 0,15 moles de CO₂. El volumen que se libera por descompresión al destapar una botella del espumante a presión atmosférica, asumiendo que la masa de aire rápidamente calienta la masa de gas liberada a la temperatura ambiente, 20°C (293 K), es:

$$V = \frac{nRT}{P} = \frac{0,15 \text{ moles} \times 0,082 \text{ l. atm. mol}^{-1}\text{K}^{-1} \times 293 \text{ K}}{1,0 \text{ atm}} = 3,6 \text{ l} \quad (21)$$

Una gran proporción del gas se escapa al destapar la botella y durante el proceso de llenado de una copa. En este proceso, altamente turbulento, la superficie aire/espumante aumenta considerablemente y contribuye a la difusión del CO₂ y pérdidas del gas disuelto, de aproximadamente un 20% considerando la forma de servir las copas, en nuestro caso del modo denominado “tipo cerveza” (Liger-Belair et al. 2010, 2012; Cilindre et al. 2010).

Teniendo en cuenta esta pérdida inicial, y considerando que una copa contiene 0,1 l de espumante, en cada copa se liberarían aproximadamente 0,5 l de CO₂. Considerando el radio promedio de una burbuja de espumante EC1, aproximado 0,28 mm al momento de su explosión en la superficie (V.3-3), y asumiendo que solamente el 20% del gas liberado escapa en forma de burbujas (Gérard Liger-Belair, 2005) en cada copa se liberarían en el orden de ¡5 millones de burbujas! Es poco probable que en el tiempo que demora una persona en la degustación de una copa, el espumante alcance a desgasificarse totalmente. Las capturas de imágenes duraron más de 20 minutos, y se seguían observando trenes de burbujas muy activos.

Este parámetro estimado contribuye y se relaciona con el atributo sensorial *efervescencia* (V.2-1). Se observó que el puntaje otorgado por los panelistas a este atributo oscila alrededor del punto medio de la escala (Figura V-10), valor que representa un espumante equilibrado, suavemente gasificado, con una efervescencia moderada al impactar en el paladar.

Muchos factores están implicados en la cinética de la efervescencia: la naturaleza física de la superficie sólida, involucrando las partículas en suspensión o pared del recipiente, el número y radio de curvatura de las microcavidades a partir de las cuales se forman burbujas, que poseen superficies hidrófobas porque si no, se llenarían de espumante (Ribéreau-Gayón et al, 2003). También intervienen factores inherentes al líquido: viscosidad, composición química. En cuanto a la composición química podría imaginarse que ciertas moléculas de dióxido de carbono están inmovilizadas por unión con otras sustancias; por otro lado pueden considerarse interacciones de naturaleza electrostática, que conducen a la adsorción del gas en la superficie de las macromoléculas; el agregado de proteínas o de polisacáridos modifica profundamente la cinética de efervescencia de los vinos espumantes (Maujean et al., 2009). El elevado contenido en la fracción de polisacáridos de bajo peso molecular determinados en los espumantes de naranja, parecen resultar activos sobre la espumabilidad, y estabilidad de la espuma (V.1-4).

Los trenes de burbujas ascienden desde sus sitios de nucleación con diferentes *frecuencias*, muy próximas unas de otras, por lo tanto, es de esperarse interacciones

entre los trenes que afectan el balance de las fuerzas expresadas en el párrafo anterior, pero estos efectos no han sido detectados por medios experimentales (Gérard Liger-Belair et al., 2000a).

V.4-3.xv Velocidad de ascenso de las burbujas

Liger-Belair et al. (2000a) han analizado el movimiento de las burbujas describiendo que durante su ascenso su comportamiento varía entre dos extremos: cuando una burbuja se libera desde su sitio de nucleación, se comporta como una esfera fluída, pero a medida que ascienden su comportamiento tiende a ser el de una esfera rígida, comportamientos observados en el análisis de imágenes discutido en V.3-6.

El estado de la superficie de una burbuja es modificado debido al movimiento ascendente; el líquido que fluye hacia abajo por la superficie de la burbuja arrastra sustancias tensoactivas (proteínas, glicoproteínas) que se acumulan en la superficie posterior de la misma y la “plastifican” parcialmente, generando un gradiente de tensión superficial, que dan origen a esfuerzos viscosos (Figura I-12). Como consecuencia, estos efectos demoran el ascenso hacia la superficie de la burbuja.

Pero a medida que asciende, la burbuja también va aumentando su superficie, generando un efecto de dilución en la adsorción de las sustancias plastificantes, ya que el ratio de crecimiento de la superficie de la burbuja es mayor que la tasa de adsorción de materiales con acción tensoactiva, por lo que la superficie no se vuelve completamente rígida (Vignes-Adler, 2013). El trayecto que debería recorrer la burbuja hasta alcanzar el efecto de saturación completa de su superficie, es mayor al disponible en una copa de espumante (Voisin et al., 2005b) por lo que el comportamiento final observado tiende a ser el de una esfera rígida en ascenso.

Si las burbujas se comportaran como esferas rígidas ascenderían según la ley de Stokes, aumentando su velocidad en forma directamente proporcional con el radio de las burbujas elevado al cuadrado:

$$U(R) = \frac{2\rho g}{9\eta} R^2 \quad (22)$$

En base a resultados experimentales con champagne, Liger-Belair et al. (2000a) han propuesto una modificación a la ecuación de Stokes para expresar la velocidad de una burbuja que asciende próxima a la pared de una copa, con números de Reynolds entre 0,2 y 90, introduciendo en la expresión un factor α que toma valores entre 0,6 y 0,8 (G. Liger-Belair, 2012); este factor representa el efecto de dilución descrito anteriormente:

$$U(R) = \frac{2\rho g \alpha}{9\eta} R^2 \quad (23)$$

Los números de Reynolds calculados para espumantes de naranja están comprendidos en el rango mencionado, y además, se observaron trenes de burbujas cercanos a las paredes de la copa por lo que podemos adoptar esta expresión propuesta para champagne y adaptarla a las características del espumante de naranja.

En la figura V.34 se representó la velocidad en función de R^2 , para el espumante EC1. Se observa una relación lineal y la pendiente de esta gráfica resultó $(571,9 \pm 38,2) \text{ mm}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$; en unidades del Sistema Internacional: $5,72 \times 10^5 \text{ m}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$.

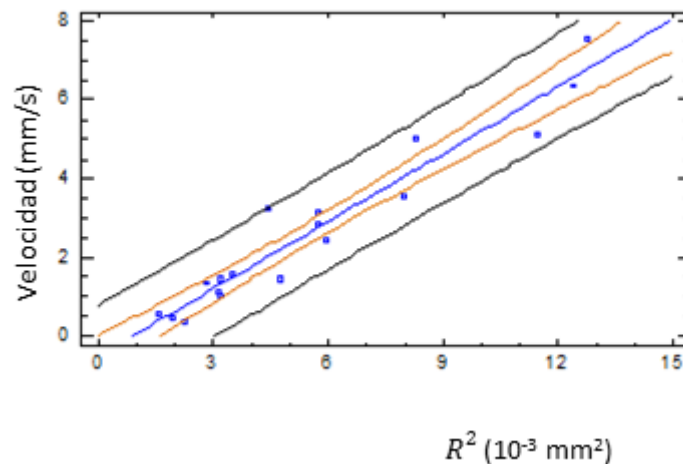


Figura V-34 Representación de la velocidad en función de R^2 para trenes de burbujas del EC1.

Utilizando los valores de densidad y viscosidad determinados experimentalmente para los espumantes de naranja y mostrados en la Tabla V-5, se calculó la relación: $\frac{2\rho g}{9\eta}$ que representa la constante de proporcionalidad de la ley de Stokes:

$$\frac{2\rho g}{9\eta} = \frac{2 \times (1,002 \times 10^3 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-3}) \times (9,81 \text{ ms}^{-2})}{9 \times (1,60 \times 10^{-3} \text{ Pa} \cdot \text{s})} = 1,36 \times 10^6 \text{ m}^{-1} \text{ s}^{-1} \quad (24)$$

Comparando este resultado con la pendiente de la gráfica Figura V-34, se estimó el valor del coeficiente α para espumantes de naranja:

$$\alpha = \frac{5,76 \times 10^5 \text{ m}^{-1} \text{ s}^{-1}}{1,36 \times 10^6 \text{ m}^{-1} \text{ s}^{-1}} = 0,4 \quad (25)$$

Por lo tanto la expresión que describe la velocidad durante el ascenso de una burbuja de espumante de naranja cercana a la pared de una copa, se puede calcular en base a la ecuación propuesta por Liger-Belair et al (2012) utilizando el valor $\alpha = 0,4$, determinado en base a los resultados experimentales, combinando determinaciones fisicoquímicas y parámetros calculados del análisis de imágenes. Este valor estimado resultó inferior a los determinados para champagnes, reportados por el mismo autor.

Las burbujas en el espumante de naranja ascienden comportándose como esferas parcialmente rígidas, y dado el valor del coeficiente α se puede inferir que su comportamiento se aproxima más al de una esfera fluida. En base a este resultado, podría suponerse que la concentración en sustancias con acción plastificante es baja y esto sería una posible causa de los bajos puntajes otorgados a los atributos sensoriales cantidad de espuma, persistencia de la espuma y superficie cubierta (Figura V-10).

V.4-4 Del colapso de las burbujas

Además del aspecto estético que brinda un tren de burbujas ascendiendo elegantemente a través de un líquido, las burbujas explotando en la superficie libre emiten un sonido típico durante la degustación y producen una nube de pequeñas gotitas, que al explotar dispersan en el aire (y en la boca) sustancias surfactantes contribuyendo a la percepción sensorial global (Gerard Liger-Belair et al., 2001).

Desde el punto de vista de la calidad sensorial del producto es reconocido que burbujas pequeñas son las preferidas, por lo tanto los valores de radios de burbujas interesaría

que fuesen pequeños. Las evaluaciones sensoriales han mostrado una valoración elevada en el atributo relacionado al *tamaño de burbujas*, otorgando puntajes del medio de la escala hacia el máximo (Figura V-10), correspondiente al de “Burbujas muy pequeñas”, por lo que se puede considerar satisfactorio el tamaño obtenido de las burbujas del espumante de naranja. El tamaño final promedio de las burbujas en ascenso es el resultado de la combinación entre la tasa de crecimiento y la velocidad con que ascienden. A medida que transcurre el tiempo de degustación el tamaño final promedio de las burbujas en la superficie del líquido disminuye progresivamente (Liger-Belair et al., 2005). El tamaño final de las burbujas contribuye también a la percepción sensorial de la *efervescencia*.

Para realizar la descripción de la interfaz espumante/aire sensorialmente se evaluaron los parámetros *superficie cubierta* y *corona* (Figura V-10) y la estabilidad de la corona observada a través de las imágenes (Figura V-15 y Figura V-18). Los resultados obtenidos fueron complementarios, la corona que se aprecia es estable y completa formada por una hilera de burbujas alrededor de la interfaz, que se mantiene durante el tiempo de degustación de una copa de espumante. Cada burbuja en la superficie, está rodeada de una capa líquida que la delimita y que comparte dos interfases: aire/líquido y líquido/CO₂ en la parte sumergida. La fuerza de Arquímedes hace que la burbuja flote en la superficie. El drenaje provocado por la fuerza de la gravedad hace que la capa líquida que constituye la parte emergente disminuya su grosor, que puede provocar su ruptura. El drenaje depende principalmente de la viscosidad de la capa líquida (Robillard et al, 2007). Por lo tanto los componentes químicos que afectan la viscosidad del espumante de naranja contribuyen a la estabilidad de la corona de burbujas. Algunos estudios han relacionado la capacidad espumante al contenido de etanol y SO₂, y a la acidez total del vino; debido a los efectos de la acidez y del etanol sobre las propiedades tensoactivas y a la acción desnaturalizante del SO₂ sobre las proteínas hidrofóbicas (Blasco et al, 2011).

Mientras colapsan las burbujas, una cavidad milimétrica se forma en la interfase libre, y de esta cavidad emerge un jet de pequeñas burbujas a alta velocidad por encima de la superficie líquida, cuya fuerza impulsora es el gradiente de presión. (Liger-Belair et al, 2002). El efecto combinado de la inercia y la tensión superficial originan gotas de formas

diversas, tipo “lágrimas”. El estudio de los aromas liberados a través de este efecto mecánico es motivo del trabajo de tesis de otra integrante del grupo de investigación.

V.4-5 Conclusiones

La caracterización del espumante de naranja se realizó integrando diferentes técnicas analíticas, sensoriales y aplicando análisis de imágenes que resultaron complementarias para describir aspectos diferentes del producto.

El análisis de imágenes permitió obtener cuantitativamente valores de velocidad de ascenso de burbujas, frecuencia de generación, tasa de crecimiento, radios finales, tiempos de permanencia de la espuma que pueden relacionarse directamente con los atributos sensoriales velocidad de burbujas, efervescencia, tamaños de burbuja, corona, abundancia y persistencia de la espuma. De esta manera se podría evaluar de forma integral la capacidad espumante de un producto.

Las propiedades fisicoquímicas analizadas en combinación con los resultados obtenidos del análisis de imágenes posibilitaron describir la cinética de ascenso de las burbujas de espumante ajustando a un modelo que sigue la ley de Stokes modificada para champagne. Estos resultados permitirán avanzar en la descripción de la hidrodinámica que controla el ascenso de las burbujas, para lo que se deberán tomar como referencia las ecuaciones de difusión molecular, fuerzas viscosas, inerciales y de tensión superficial.

CAPÍTULO VI

CONCLUSIONES

Se desarrolló el proceso de obtención del producto “espumante de naranja” adaptando el tradicional método *champenoise*. La producción se realizó en planta piloto de la Facultad de Ciencias de la Alimentación. El proceso abarcó dos etapas principales: la obtención del vino base de naranja y la segunda fermentación en botella. En esta última etapa se ensayaron dos formulaciones de licor de tirage y tres tiempos de añejamiento. Los tiempos de añejamiento fueron establecidos respetando el tiempo mínimo (9 meses) establecido para la elaboración de los espumantes de mayor calidad aplicando el método tradicional, que se basan en los tiempos atribuidos al desarrollo de los procesos de autólisis, que liberan al medio componentes que favorecen las propiedades espumantes (polisacáridos y proteínas principalmente).

La caracterización del espumante de naranja se realizó integrando diferentes técnicas analíticas, sensoriales y aplicando análisis de imágenes que resultaron complementarias para describir aspectos diferentes del producto.

Los resultados de la caracterización fisicoquímica muestran que la combinación de variables de proceso elegidas permitieron elaborar espumantes de naranja comparables a los espumantes comerciales, excepto por los valores de acidez total, levemente superior en los espumantes de naranja.

Los diferentes tiempos que se mantuvieron en contacto con las lías y la utilización de corteza de levaduras en el licor de tirage, no afectaron significativamente la mayoría de las características fisicoquímicas. Para analizar la influencia de los tiempos de añejamiento se deberían elaborar nuevos espumantes y observar su evolución en tiempos más cortos en contacto con las lías, para observar si el agregado de corteza de levaduras provocan mejores características espumantes.

Se logró caracterizar sensorialmente la espuma y burbujas liberadas en espumante de naranja. El estudio sensorial estuvo orientado principalmente a valorar atributos relacionados con la espuma y burbujas. Se diseñó una ficha de cata que pudiera relacionar las características evaluadas con las observadas a través del análisis de imágenes.

El espumante de naranja resultó un producto finamente gasificado, de coloración ligeramente ambarina, y translúcido. La velocidad de ascenso de las burbujas es moderada así como la efervescencia en boca, resultando un producto con una valoración global satisfactoria. El análisis estadístico reveló que no se observaron diferencias significativas entre los diferentes tratamientos por lo que en base a estas conclusiones y las obtenidas del análisis fisicoquímico, se seleccionó el espumante con las mejores puntuaciones para realizar el procesamiento y análisis de imágenes.

El procesamiento de las imágenes obtenidas al filmar la evolución de la espuma generada al servir una copa de espumante, permitió caracterizar propiedades espumantes y describir la cinética de la formación de burbujas. Se calcularon características de la corona (persistencia, tamaño, radio crítico antes de colapsar); la frecuencia con que se generan y ascienden burbujas, y tasas de crecimiento de los trenes de burbujas durante su ascenso. En base a estos datos se calcularon valores casi instantáneos de los parámetros que definen el régimen de flujo (velocidad, aceleración) y aproximarse así al comportamiento local, microscópico del fluido.

Las muestras conservadas en formato original permiten su análisis y re procesamiento todas las veces que resulte necesario. Utilizando esta técnica instrumental no destructiva, se pudieron observar las propiedades espumantes en condiciones similares a las de degustación que experimenta un consumidor real, se lograron especificar parámetros que permiten describir las propiedades de las burbujas de espumante de naranja.

En base a estos resultados se podría proponer un protocolo de evaluación de características espumantes utilizando análisis de imágenes, en condiciones similares a las que experimenta un consumidor al degustar una copa de vino espumante.

Las propiedades fisicoquímicas analizadas en combinación con los resultados obtenidos del análisis de imágenes posibilitaron describir la cinética de ascenso de las burbujas de espumante de naranja. Estos resultados permitirán avanzar en la descripción de la hidrodinámica que controla el ascenso de las burbujas, para lo que se deberán tomar como referencia las ecuaciones de difusión molecular, fuerzas viscosas, inerciales y de tensión superficial.

Los objetivos planteados en esta tesis han sido desarrollados de acuerdo a lo previsto, en las condiciones disponibles. El producto obtenido “espumante de naranja” resulta un desafío a encarar si se pretende desarrollarlo de manera comercial. Los resultados alcanzados permitirán profundizar en la descripción de la fisicoquímica de las burbujas, y avanzar en la aplicación de las técnicas de procesamiento y análisis de imágenes desarrolladas para el estudio de alimentos. En particular, la evaluación de las características espumantes por análisis de imágenes podría aplicarse como metodología rutinaria en la producción de espumantes, y permitiría la descripción objetiva de los indicadores de calidad que definen una bebida como el espumante de naranja.

ANEXO

FICHA DE CATA DE ESPUMANTE DE NARANJA

Catador _____

Fecha _____ Hora _____ Muestra _____

Agradecemos tu dedicación y tiempo. Por favor, lee la ficha completa antes de comenzar. Cualquier observación o sugerencia que desees realizar será muy valorada.

FASE VISUAL

ESPUMA

Abundante Escasa

Persistente Efímera

CORONA

Completa No se forma

Superficie total No se aprecia

BURBUJAS

Pequeñas Grandes

Núcleos abundantes No se observan núcleos

Ascenso muy rápido Ascenso muy lento

COLOR

Amarillo pálido Ambarino

ASPECTO

Muy turbio Cristalino

AROMAS

Afrutado	<input type="text"/>	<input type="text"/>	No
Floral	<input type="text"/>	<input type="text"/>	No
Cítrico	<input type="text"/>	<input type="text"/>	No
Defectuosos	<input type="text"/>	<input type="text"/>	No
Otros (especificar)			

SABOR

Dulce	<input type="text"/>	<input type="text"/>	No
Acido	<input type="text"/>	<input type="text"/>	No
Afrutado	<input type="text"/>	<input type="text"/>	No
Astringencia	<input type="text"/>	<input type="text"/>	No
Efervescencia	<input type="text"/>	<input type="text"/>	No

SENSACIÓN GLOBAL

Desequilibrado	<input type="text"/>	<input type="text"/>	Armonioso
----------------	----------------------	----------------------	-----------

COMENTARIOS

BIBLIOGRAFÍA

- Aguilera, J. M. (2005). Why food microstructure? *Journal of Food Engineering*, 67, 3–11.
- Aguilera, J. M. (2007). Curso de Posgrado: Microscopía de Alimentos. Concordia.
- Aguilera, J. M. A., Cipriano, A. A., & Era, M. (n.d.). Computer Vision for Quality Control in Latin American Food Industry , A Case Study, 1–11.
- Aguilera, J. M., & Briones, V. (2000). Computer vision and food quality, 21–30.
- Alberici Stefanon, C. (2013). *Avaliação de Parâmetros Enológicos, Sensoriais e Biológicos em Vinhos Espumantes: efeito de agentes moduladores*.
- Aleixandre Benavent, J. L. (1999). *Vinos y bebidas alcohólicas*. (U. P. de Valencia, Ed.).
- Alexandre, H., & Guilloux-Benatier, M. (2006). Yeast autolysis in sparkling wine - A review. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 12(2), 119–127. doi:10.1111/j.1755-0238.2006.tb00051.x
- Andres-Lacueva, C., Gallart, M., Lopez-Tamames, E., Lamuela-Raventos, R. M., & Andrés-Lacueva, C. (1996). Influence of Variety and Aging on Foaming Properties of Sparkling Wine (Cava). 1. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(12), 3826–3829. doi:10.1021/jf9605153
- Atkins, P., & De Paula, J. (2008). *Química Física* (8va ed.). Editorial Médica Panamericana.
- Ayala, F., Echavarri, J., & Negueruela, A. I. (2001). MSCV. Retrieved from <http://www.unizar.es/negueruela/MSCV.es>
- Barker, G. S., Jefferson, B., & Judd, S. J. (2002). The control of bubble size in carbonated beverages. *Chemical Engineering Science*, 57, 565–573.
- Blasco, L., Viñas, M., & Villa, T. G. (2011). Proteins influencing foam formation in wine and beer : the role of yeast. *International Microbiology*, 14, 61–71. doi:10.2436/20.1501.01.136
- Briones, V., & Aguilera, J. M. (2005). Image Analysis of changes in surface color of chocolate. *Food Research International*, 38, 669–676.
- Brissonet, F., & Maujean, A. (1993). Characterization of foaming proteins in a champagne base wine. *Am. J. Enol. Vitic.*, 44, 297–301.
- Carbonell, L., Izquierdo, L., & Carbonell, I. (2007). Sensory analysis of Spanish mandarin juices. Selection of attributes and panel performance. *Food Quality and Preference*, 18, 329–341. doi:10.1016/j.foodqual.2006.02.008

- Caridi, A. (2006). Enological functions of parietal yeast mannoproteins. *Antonie van Leeuwenhoek*, 89(3-4), 417–22. doi:10.1007/s10482-005-9050-x
- Castillo Castañeda, E., Courtois, F., & Relkin, P. (2006). Cuantificación de la persistencia y homogeneidad de espumas mediante procesamiento de imágenes. *Ciencia Y Tecnología Alimentaria*, 5, 147–155.
- Cayetano Arteaga, M. C., Stefani, A., Ferreyra, M. M., & Schwab, M. del C. (2013). Comportamiento reológico del “vino de naranja”: Influencia de la temperatura y la composición. *Revista de La Ciencia, Tecnología E Ingeniería de Los Alimentos*.
- Cayetano Arteaga, M. C., Stefani Leal, A., González, R., Ferreyra, M. M., & Schwab, M. C. (2014). Efecto de características enológicas y variables de proceso sobre propiedades tensioactivas de espumantes de naranja. In *International Conference on Food Innovation-FoodInnova*®.
- Cebollero, E., Carrascosa, A. V., & Gonzalez, R. (2005). Evidence for yeast autophagy during simulation of sparkling wine aging: A reappraisal of the mechanism of yeast autolysis in wine. *Biotechnology Progress*, 21(2), 614–616. doi:10.1021/bp049708y
- Cilindre, C., Liger-Belair, G., Villaume, S., Jeandet, P., & Marchal, R. (2010). Foaming properties of various Champagne wines depending on several parameters: grape variety, aging, protein and CO₂ content. *Analytica Chimica Acta*, 660(1-2), 164–70. doi:10.1016/j.aca.2009.10.021
- Clarke, R. J., & Bakker, J. (2004). *Química del flavor del vino*. Zaragoza: Editorial Acribia S.A.
- Coelho, E., Rocha, S. M., & Coimbra, M. a. (2011). Foamability and foam stability of molecular reconstituted model sparkling wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(16), 8770–8778. doi:10.1021/jf2010657
- Corazza, M. L., Rodrigues, D. G., & Nozaki, J. (2001). PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO VINHO DE LARANJA. *Quimica Nova*, 24(4), 449–452.
- Dambrouck, T., Marchal, R., Marchal-Delahaut, L., Parmentier, M., Maujean, a., & Jeandet, P. (2003). Immunodetection of proteins from grapes and yeast in a white wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(9), 2727–2732. doi:10.1021/jf0208435
- DÍAZ VÉLEZ, R., & VERA, L. M. (2010). PEA de cítricos 2010/2016. *INTA EEA*.
- Douillard, R., Aguié-béghin, V., Fare, U. M. R., Urca, I., & Reims, E. R. G. (2000). Incidence des macromolécules sur la tenue de mousse d’ un champagne, 20–26.
- Du, C.-J., & Sun, D.-W. (2004). Recent developments in the applications of image processing techniques for food quality evaluation. *Trends in Food Science & Technology*, 15(5), 230–249. doi:10.1016/j.tifs.2003.10.006
- Du, C.-J., & Sun, D.-W. (2006). Learning techniques used in computer vision for food quality evaluation: a review. *Journal of Food Engineering*, 72(1), 39–55. doi:10.1016/j.jfoodeng.2004.11.017

- Dussaud, A., Han, G. B., Ter-Minassian-Saraga, L., & Vignes-Adler, M. (1994). Surface properties of protein alcoholic solutions: I. Surface tension. *Journal of Colloid and Interface Science*, *167*, 256–265.
- Ferreira, R. B., Piçarra-Pereira, M. a., Monteiro, S., Loureiro, V. B., & Teixeira, A. R. (2001). The wine proteins. *Trends in Food Science and Technology*, *12*(7), 230–239. doi:10.1016/S0924-2244(01)00080-2
- Ferreira, M. M. (2006). *Estudio del proceso biotecnológico para la elaboración de una bebida alcohólica a partir de jugo de naranjas*.
- Ferreira, M. M., Schwab, C., Gerard, L. M., Davies, C. V., Cayetano Arteaga, M. C., & Leal, A. S. (2014). Nutritional requirements of a *Saccharomyces cerevisiae* starter culture used in the elaboration of wine from orange. *Revista de La Sociedad Venezolana de Microbiología*, *34*, 38–42.
- Ferreira, M. M., Schwab, M. del C., Gerard, L. M., Zapata, L. M., Davies, C. V., & Hours, R. A. (2009). Fermentación alcohólica de jugo de naranja con *S. cerevisiae* Alcoholic Fermentation of Orange Juice with *S. Cerevisiae* *. *Ciencia, Docencia Y Tecnologia*, *2009*(39), 143–158. Retrieved from <http://www.scielo.org.ar/pdf/cdyt/n39/n39a08.pdf>
- Flanzy, C. (2002). *Enología: Fundamentos científicos y tecnológicos*. Editorial S.A. Mundi Prensa Libros.
- Gallart, M., Tomás, X., Suberbiola, G., López-Tamames, E., & Buxaderas, S. (2004). Relationship between foam parameters obtained by the gas-sparging method and sensory evaluation of sparkling wines. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *84*(2), 127–133. doi:10.1002/jsfa.1614
- Gil, M., Kontoudakis, N., González, E., Esteruelas, M., Fort, F., Canals, J. M., & Zamora, F. (2012). Influence of Grape maturity and maceration length on color, polyphenolic composition, and polysaccharide content of Cabernet Sauvignon and Tempranillo Wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *60*(32), 7988–8001. doi:10.1021/jf302064n
- Gil-Muñoz, R., Gómez-Plaza, E., Martínez, A., & López-Roca, J. M. (1997). Evolution of the CIELAB and other spectrophotometric parameters during wine fermentation. Influence of some pre and postfermentative factors. *Food Research International*, *30*(9), 699–705. doi:10.1016/S0963-9969(98)00029-5
- Giovani, G., Canuti, V., & Rosi, I. (2010). Effect of yeast strain and fermentation conditions on the release of cell wall polysaccharides. *International Journal of Food Microbiology*, *137*(2-3), 303–7. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2009.12.009
- Girbau-Solà, T., López-Barajas, M., López-Tamames, E., & Buxaderas, S. (2002). Foam aptitude of Trepát and Monastrell red varieties in Cava elaboration. 2. Second fermentation and aging. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *50*(20), 5600–5604. doi:10.1021/jf011209e
- Girbau-Sòla, T., López-Tamames, E., Buján, J., & Buxaderas, S. (2002). From aptitude of Trepát and Monastrell red varieties in Cava elaboration. 1. Base wine characteristics. *J. Agric. Food Chem.*, *50*, 5596–5599.

- Glampedaki, P., Hatzidimitriou, E., Paraskevopoulou, A., & Pegiadou-Koemtzopoulou, S. (2010). Surface tension of still wines in relation to some of their constituents: A simple determination of ethanol content. *Journal of Food Composition and Analysis*, 23(4), 373–381. doi:10.1016/j.jfca.2010.01.006
- Gonzalez, R. C., & Woods, R. E. (2011). *Digital Image Processing* (3rd ed.). Pearson Education.
- Gonzalez, R., Martinez-Rodriguez, a. J., & Carrascosa, a. V. (2003). Yeast autolytic mutants potentially useful for sparkling wine production. *International Journal of Food Microbiology*, 84(1), 21–26. doi:10.1016/S0168-1605(02)00389-6
- Grabber, M., & Kelleher, S. (1998). Side effects of acetazolamide: The champagne blues. *American Journal of Medicine*, 84, 978–981.
- Guadalupe, Z., Martínez-Pinilla, O., Garrido, Á., Carrillo, J. D., & Ayestarán, B. (2012). Quantitative determination of wine polysaccharides by gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS) and size exclusion chromatography (SEC). *Food Chemistry*, 131(1), 367–374. doi:10.1016/j.foodchem.2011.08.049
- Jones, S., Evans, G., & Galvin, K. (1999). The cycle of bubble production from a gas cavity in a supersaturated solution. *Advances in Colloid and Interface ...*, 51–84. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S000186869800075X>
- Jones, S. F., Evans, G. M., & Galvin, K. P. U. (1999). Bubble nucleation from gas cavities: a review. *Advances in Colloid and Interface ...*, 80, 27–50.
- Klis, F. M., Mol, P., Hellingwerf, K., & Brul, S. (2002). Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Reviews*, 26(3), 239–56. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12165426>
- Kolb, E. (2002). *Vinos de Frutas. Elaboración Artesanal e Industrial*. Acribia. Zaragoza, España. Zaragoza: Editorial Acribia S.A.
- Košmerl, T., Abramovič, H., & Klofutar, C. (2000). Rheological properties of Slovenian wines. *Journal of Food Engineering*, 46(3), 165–171. doi:10.1016/S0260-8774(00)00079-0
- Lao, C., Santamaria, A., López-Tamames, E., Bujan, J., Buxaderas, S., & de la Torre Boronat, M. C. (1999). Effect of grape pectic enzyme treatment on foaming properties of white musts and wines. *Food Chemistry*, 65, 169–173.
- Le Bourse, D., Jégou, S., Conreux, a, Villaume, S., & Jeandet, P. (2010). Review of preparative and analytical procedures for the study of proteins in grape juice and wine. *Analytica Chimica Acta*, 667(1-2), 33–42. doi:10.1016/j.aca.2010.03.062
- Liger-Belair, G. (2005). The Physics and Chemistry behind the Bubbling Properties of Champagne and Sparkling Wines: A State-of-the-Art Review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 2788–2802.
- Liger-Belair, G. (2012). The physics behind the fizz in champagne and sparkling wines. *The European Physical Journal Special Topics*, 201(1), 1–88. doi:10.1140/epjst/e2012-01528-0

- Liger-Belair, G., Bourget, M., Cilindre, C., Pron, H., & Polidori, G. (2013). Champagne cork popping revisited through high-speed infrared imaging: The role of temperature. *Journal of Food Engineering*, 116(1), 78–85. doi:10.1016/j.jfoodeng.2012.11.006
- Liger-Belair, G., Bourget, M., Pron, H., Polidori, G., & Cilindre, C. (2012). Monitoring gaseous CO₂ and ethanol above champagne glasses: flute versus coupe, and the role of temperature. *PLoS One*, 7(2), e30628. doi:10.1371/journal.pone.0030628
- Liger-Belair, G., Bourget, M., Villaume, S., Jeandet, P., Pron, H., & Polidori, G. (2010). On the losses of dissolved CO₂ during champagne serving. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(15), 8768–75. doi:10.1021/jf101239w
- Liger-Belair, G., & Jeandet, P. (2002). Effervescence in a glass of champagne : A bubble story. *Europhysics News*, (February), 10–14.
- Liger-Belair, G., & Jeandet, P. (2003). More on the Surface State of Expanding Champagne Bubbles Rising at Intermediate Reynolds and High Peclet. *Langmuir*, 19, 801–808.
- Liger-Belair, G., Lemaesquier, H., Robillard, B., Duteurtre, B., & Jeandet, P. (2001). The Secrets of Fizz in Champagne Wines: A Phenomenological Study. *Am. J. Enol. Vitic.*, 52(2), 88–92. Retrieved from <http://www.ajevonline.org/cgi/content/abstract/52/2/88>
- Liger-Belair, G., Marchal, R., Robillard, B., Dambrouck, T., Maujean, A., & Jeandet, P. (2000a). On the Velocity of Expanding Spherical Gas Bubbles Rising in Line in Supersaturated Hydroalcoholic Solutions :, (11), 1889–1895.
- Liger-Belair, G., Marchal, R., Robillard, B., Dambrouck, T., Maujean, A., & Jeandet, P. (2000b). On the Velocity of Expanding Spherical Gas Bubbles Rising in Line in Supersaturated Hydroalcoholic Solutions : *Langmuir*, (11), 1889–1895.
- Liger-Belair, G., Marchal, R., Robillard, B., Vignes-Adler, M., Maujean, A., & Jeandet, P. (1999). Study of Effervescence in a Glass of Champagne: Frequencies of Bubble Formation, Growth Rates, and Velocities of Rising Bubbles. *American Journal of Enology and Viticulture*, 50(3), 317–323.
- Liger-Belair, G., Marchal, R., Robillard, B., Vignes-Adler, M., Maujean, A., & Jeandet, P. (1999). Study of effervescence in a glass of champagne: Frequencies of bubble formation, growth rates, and velocities of rising bubbles. ... *Journal of Enology ...*, 50(3), 317–323. Retrieved from <http://www.ajevonline.org/cgi/content/abstract/50/3/317> \n <http://www.ajevonline.org/content/50/3/317.short>
- Liger-Belair, G., Parmentier, M., & Cilindre, C. (2012). More on the Losses of Dissolved CO₂ during Champagne Serving: Toward a Multiparameter Modeling. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(October), 11777–11786.
- Liger-Belair, G., Parmentier, M., & Jeandet, P. (2006a). Modeling the kinetics of bubble nucleation in champagne and carbonated beverages. *Journal of Physical Chemistry B*, 110(42), 21145–21151. doi:10.1021/jp0640427

- Liger-Belair, G., Parmentier, M., & Jeandet, P. (2006b). Modeling the Kinetics of Bubble Nucleation in Champagne and Carbonated Beverages. *Journal of Physical Chemistry B*, *110*, 21145–21151.
- Liger-Belair, G., Polidori, G., & Jeandet, P. (2008a). Recent advances in the science of champagne bubbles. *Chemical Society Reviews*, *37*(11), 2490–2511. doi:10.1039/b717798b
- Liger-Belair, G., Polidori, G., & Jeandet, P. (2008b). Recent advances in the science of champagne bubbles. *Chemical Society Reviews*, *37*(11), 2490–511. doi:10.1039/b717798b
- Liger-Belair, G., Prost, E., Parmentier, M., Jeandet, P., & Nuzillard, J.-M. (2003). Diffusion Coefficient of CO₂ Molecules as Determined by ¹³C NMR in Various Carbonated Beverages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *51*, 7560–7563.
- Liger-Belair, G., Vignes-Adler, M., Voisin, C., Robillard, B., & Jeandet, P. (2002). Kinetics of Gas Discharging in a Glass of Champagne: The Role of Nucleation Sites. *Langmuir*, *18*(4), 1294–1301. doi:10.1021/la0115987
- Liger-Belair, G., Villaume, S., Cilindre, C., & Jeandet, P. (2010a). CO₂ volume fluxes outgassing from champagne glasses: The impact of champagne ageing. *Analytica Chimica Acta*, *660*(1-2), 29–34. doi:10.1016/j.aca.2009.09.047
- Liger-Belair, G., Villaume, S., Cilindre, C., & Jeandet, P. (2010b). La libération progressive du CO₂ au cours de la dégustation d'un vin de champagne: le rôle de la température de service. *Revue Française D'œnologie*, 1–5.
- López-Barajas, M., López-Tamames, E., Buxaderas, S., Suberbiola, G., & De la Torre-Boronat, M. C. (2001). Influence of Wine Polysaccharides of Different Molecular Mass on Wine Foaming. *American Journal of Enology and Viticulture*, *52*(2), 146–150.
- López-Barajas, M., Viu-Marco, A., López-Tamames, E., Buxaderas, S., & de la Torre-Boronat, M. C. (1997). Foaming in grape juices of white varieties. *J. Agric. Food. Chem*, *45*, 2526–2529.
- Luguera, C., Moreno-Arribas, V., Pueyo, E., Bartolomé, B., & Polo, M. C. (1998). Fractionation and partial characterization of protein fractions present at different stages of the production of sparkling wines. *Food Chemistry*, *63*(4), 465–471.
- Malvy, J. B., Robillard, B., & Deteurtre, B. (1994). Influence of proteins on the foam behavior of champagne wines. *Science Aliments*, *14*, 88–98.
- Marchal, R., Bouquelet, S., & Maujean, A. (1996). Purification and partial biochemical characterization of glycoproteins in champagne Chardonnay wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *44*, 1716–1722.
- Marchal, R., Tabary, I., Valade, M., Moncomble, D., Viaux, L., Robillard, B., & Jeandet, P. (2001). Effects of Botrytis cinerea infection on Champagne wine foaming properties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *81*(14), 1371–1378.
- Martínez-Rodríguez, A. J., Carrascosa, A. V., Martín-Alvarez, P. J., Moreno-Arribas, V., & Polo, M. C. (2002). Influence of the yeast strain on the changes of the amino acids, peptides

- and proteins during sparkling wine production by the traditional method. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 29(6), 314–22. doi:10.1038/sj.jim.7000323
- Martínez-Rodríguez, A. J., & Pueyo, E. (2009). Sparkling Wines and Yeast Autolysis. In M. V. Moreno-Arribas & M. C. Polo (Eds.), *Wine Chemistry and Biochemistry* (pp. 61–80). New York, NY: Springer New York. doi:10.1007/978-0-387-74118-5
- Martí-Raga, M., Sancho, M., Guillamón, J. M., Mas, a., & Beltran, G. (2015). The effect of nitrogen addition on the fermentative performance during sparkling wine production. *Food Research International*, 67, 126–135. doi:10.1016/j.foodres.2014.10.033
- Maujean, A., Poinssaut, P., Dantan, H., Brissonnet, F., & Cossiez, E. (1990). Study of the performance and quality of the foam in sparkling wines. II. Perfecting of a measuring techniques for foaming ability, performance and stability of the foam in sparkling wines. *Bull. l'OIV*, 63, 405–427.
- Maujean, A., Poinssaut, P., Dantan, H., Brissonnet, F., & Cossiez, E. (2009). Study of the performance and quality of the foam in sparkling wines. II. Perfecting of a measuring techniques for foaming ability, performance and stability of the foam in sparkling wines. In *Wine Chemistry and Biochemistry* (p. 728).
- Moreno-Arribas, M. V., Pueyo, E., Nieto, F. J., Martín-Alvarez, P. J., & Polo, M. C. (2000). Influence of the polysaccharides and the nitrogen compounds on foaming properties of sparkling wines. *Food Chemistry*, 70, 309–317.
- Mulier, M. (Université de R. (2009). *MISE EN PLACE D ' UN SPECTROMETRE LASER INFRAROUGE POUR L ' ETUDE DE LA DIFFUSION DU CO 2 GAZEUX HORS DU CHAMPAGNE ET DE QUELQUES BOISSONS EFFERVESCENTES.*
- Noble, A. C., & Bursick, G. F. (1984). The contribution of glycerol to perceived viscosity and sweetness in white wine. *J. Enol. Vitic.*, 35, 110–112.
- Nunez, Y. P., Carrascosa, A. V., González, R., Polo, M. C., & Martínez-Rodríguez, A. J. (2005). Effect of accelerated autolysis of yeast on the composition and foaming properties of sparkling wines elaborated by a champenoise method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(18), 7232–7237. doi:10.1021/jf050191v
- Obiols, J. M., de la Presa-Owens, C., Buxaderas, S., Bori, J. L., & de la Torre Boronat, M. C. (1998). Protocol d'avaluació de la formació d'efervescència i escuma en vins escumosos. *ACE Revista d'Enologia*.
- Pérez-Serradilla, J. a., & de Castro, M. D. L. (2008). Role of lees in wine production: A review. *Food Chemistry*, 111(2), 447–456. doi:10.1016/j.foodchem.2008.04.019
- Perret, A., Bonhommeau, D. A., Liger-Belair, G., Cours, T., & Alijah, A. (2014a). CO₂ Diffusion in Champagne Wines: A Molecular Dynamics Study. *The Journal of Physical Chemistry*.
- Perret, A., Bonhommeau, D. A., Liger-Belair, G., Cours, T., & Alijah, A. (2014b). CO₂ diffusion in champagne wines: A molecular dynamics study. *Journal of Physical Chemistry B*, 118(7), 1839–1847.

- Peynaud, E., & Blouin, J. (1997). *The Taste of Wine: The Art Science of Wine Appreciation*. John Wiley&Sons.
- Pozo-Bayón, M. (2004). Effect of vineyard yield on the composition of sparkling wines produced from the grape cultivar Parellada. *Food Chemistry*, *86*(3), 413–419. doi:10.1016/j.foodchem.2003.09.016
- Pozo-Bayón, M. Á., Martínez-Rodríguez, A., Pueyo, E., & Moreno-arribas, M. V. (2009). Chemical and biochemical features involved in sparkling wine production : from a traditional to an improved winemaking technology. *Trends in Food Science & Technology*, *20*, 289–299. doi:10.1016/j.tifs.2009.03.011
- Pozo-Bayón, M. Á., Martínez-Rodríguez, A., Pueyo, E., & Moreno-Arribas, M. V. (2009). Chemical and biochemical features involved in sparkling wine production: from a traditional to an improved winemaking technology. *Trends in Food Science & Technology*, *20*(6-7), 289–299. doi:10.1016/j.tifs.2009.03.011
- Pueyo, E., Martín-Alvarez, P. J., & Polo, M. C. (1995). Relationship between foam characteristics and chemical composition in wines and cavas (sparkling wines). *Am. J. Enol. Vitic.*, *46*, 518–524.
- Quirós, M., Gonzalez, R., & Morales, P. (2012). A simple method for total quantification of mannoprotein content in real wine samples. *Food Chemistry*, *134*(2), 1205–10. doi:10.1016/j.foodchem.2012.02.168
- Reynolds, A., Cliff, M., Girard, B., & Kopp, G. (2001). Influence of Fermentation Temperature on Composition and Sensory Properties of Semillon and Shiraz Wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, *52*(3), 235–240.
- Ribéreau-Gayón, P., Glories, Y., Maujean, A., & Dubourdieu, D. (2008). *Tratado de Enología. Química del vino. Estabilización y tratamientos. 1º Ed.* (1a. edición). Buenos Aires: Hemisferio Sur.
- Riu-Aumatell, M. (2005). *Caracterización de compuestos volátiles en bebidas derivadas de fruta*.
- Robillard, B., Delpuech, E., Viaux, L., Malvy, J., Vignes-Adler, M., & Duteurtre, B. (1993). Improvements of Methods for Sparkling Base Wine Foam Measurements and Effect of Wine Filtration on Foam Behavior. *American Journal of Enology and Viticulture*, *44*, 387–392.
- Robillard, B., & Liger-Belair, G. (n.d.). Les gaz dans la bouteille - Partie 1.
- Robillard, B., & Liger-Belair, G. (2007). Les gaz dans la bouteille. *Revue Des Oenologues*, *34*(125), 39–42. Retrieved from http://www.oeno.tm.fr/extraits/wod/clst/2571x8325n8649_vRub/2571x8325x8637x8638x8649.html
- Rodriguez-Nogales, J. M., Fernández-Fernández, E., & Vila-Crespo, J. (2012). Effect of the addition of β -glucanases and commercial yeast preparations on the chemical and

- sensorial characteristics of traditional sparkling wine. *European Food Research and Technology*, 235(4), 729–744. doi:10.1007/s00217-012-1801-0
- Schvab, M. del C. (Universidad P. de V. (2006). *Bebida alcohólica de jugo de naranja: Estudio de los parámetros de calidad, influencia de las variables de proceso y caracterización del producto*.
- Senée, J., Robillard, B., & Vignes-Adler, M. (1999). Films and foams of Champagne wines. *Food Hydrocolloids*, 13, 15–26.
- Senee, J., Viaux, L., Robillard, B., & Duteurtre, B. (1998). The endogenous particles of a sparkling wine and their influence on the foaming behaviour, 12, 217–226.
- Shafer, W. L., & Zare, E. A. (1991). No Title. *Phys. Today*, 44, 48–52.
- Soto Herrera, J., Castillo Castañeda, E., & Martínez Peniche, R. A. (2008). Efecto del nivel de azúcar en la calidad de la efervescencia en sidra espumosa mediante análisis de imágenes. *Ciencia Y Tecnología Alimentaria*, 6, 33–40.
- Stefani Leal, A., Cayetano Arteaga, M. C., Schvab, M. del C., & Ferreyra, M. M. (2011). Desarrollo de “ espumante de naranja ” como alternativa biotecnológica en la actividad cítrica regional. *INNOTEC*, (6), 60–64.
- Stefani Leal, A., Cayetano Arteaga, M.C. Schvab, M. C., Ferreyra, M. M., Fariña, L., Dellacassa, E., & Ares, G. (2014). Stefani Leal, A.; Cayetano Arteaga, M.C.; Schvab, M.C.; Ferreyra, M.M.; Fariña, L.; Dellacassa, E.; Ares, G. Aplicación del Mapeo Proyectivo (NAPPING®) para la Caracterización Sensorial de Espumante de Naranja Trabajo completo presentado y aceptado para s. In *International Conference on Food Innovation- FoodInnova*®.
- Steffe, J. F. (1994). *Rheological Methods in Food Process Engineering. Agricultural Engineering* (Second, Vol. 23). East Lansing: Freeman Press. doi:10.1016/0260-8774(94)90090-6
- Tadmor, R. (2009). Marangoni flow revisited. *Journal of Colloid and Interface Science*, 332(2), 451–4. doi:10.1016/j.jcis.2008.12.047
- Takemura, F., Takagi, S., Magnaudet, J., & Matsumoto, Y. (2002). Drag and lift forces on a bubble rising near a vertical wall in a viscous liquid. *Journal of Fluid Mechanics*, 461, 277–300. doi:10.1017/S0022112002008388
- Tomic, O., Nilsen, A., Martens, M., & Næs, T. (2007). Visualization of sensory profiling data for performance monitoring. *LWT - Food Science and Technology*, 40(2), 262–269. doi:10.1016/j.lwt.2005.09.014
- Torresi, S., Frangipane, M. T., & Anelli, G. (2011). Biotechnologies in sparkling wine production. Interesting approaches for quality improvement: A review. *Food Chemistry*, 129(3), 1232–1241. doi:10.1016/j.foodchem.2011.05.006
- Uzel, S., Chappell, M. A., & Payne, S. J. (2006). Modeling the Cycles of Growth and Detachment of Bubbles in Carbonated Beverages. *Journal of Physical Chemistry B*, 110, 7579–7586.

- Vannier, A., Brun, O. X., & Feinberg, M. H. (1999). Application of sensory analysis to champagne wine characterisation and discrimination. *Food Quality and Preference*, *10*(2), 101–107. doi:10.1016/S0950-3293(98)00047-0
- Vanrell, G., Canals, R., Esteruelas, M., Fort, F., Canals, J. M., & Zamora, F. (2007). Influence of the use of bentonite as a riddling agent on foam quality and protein fraction of sparkling wines (Cava). *Food Chemistry*, *104*(1), 148–155. doi:10.1016/j.foodchem.2006.11.014
- Vanrell i Truyols, G. (2002). *ESTUDI DE L'EVOLUCIÓ DEL COMPORTAMENT ESCUMANT I DE LA FRACCIÓ COLLOIDAL DEL CAVA DURANT LA SEVA ELABORACIÓ; EFECTE DE DIFERENTS TRACTAMENTS.*
- VERA, L. ., DIAZ VELEZ, R.; RIVANDERNEIRA, F.; GARRAN, S. ., & GARIN, R. I.-F. (2007). Informe cítrícola regional de Entre Ríos 2007. *INTA-FEDERCITRUS.*
- Vignes-Adler, M. (2013). The fizzling foam of champagne. *Angewandte Chemie (International Ed. in English)*, *52*(1), 187–90. doi:10.1002/anie.201207299
- Vincenzi, S., Crapisi, A., & Curioni, A. (2014). Foamability of Prosecco wine: Cooperative effects of high molecular weight glycoconjugates and wine PR-proteins. *Food Hydrocolloids*, *34*, 202–207. doi:10.1016/j.foodhyd.2012.09.016
- Voisin, C. (2005). *Quelques aspects de la nucléation des bulles de Champagne dans une fl^ute et de leur ascension á petits nombres de Reynolds .*
- Voisin, C., Jeandet, P., & Liger-Belair, G. (2005a). On the 3D-reconstruction of Taylor-like bubbles trapped inside hollow cellulose fibers acting as bubble nucleation sites in supersaturated liquids. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, *263*(1-3), 303–314. doi:10.1016/j.colsurfa.2004.12.052
- Voisin, C., Jeandet, P., & Liger-Belair, G. (2005b). On the 3D-reconstruction of Taylor-like bubbles trapped inside hollow cellulose fibers acting as bubble nucleation sites in supersaturated liquids. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, *263*(1-3), 303–314. doi:10.1016/j.colsurfa.2004.12.052
- WILKINSON, J. (2003). Oportunidades y desafíos para la pequeña producción en el nuevo cuadro de dominación del Sistema Agroalimentario en América Latina. In *VII Congreso Internacional ALACEA*. Lima.
- Wilt, P. . (1986). Nucleation rates and bubble stability in water-carbon dioxide solutions. *Journal of Colloid and Interface Science*, *112*(2), 530–538. doi:10.1016/0021-9797(86)90122-0
- Yanniotis, S., Kotseridis, G., Orfanidou, a., & Petraki, a. (2007). Effect of ethanol, dry extract and glycerol on the viscosity of wine. *Journal of Food Engineering*, *81*(2), 399–403. doi:10.1016/j.jfoodeng.2006.11.014
- Zheng, C., Sun, D.-W., & Zheng, L. (2006). Recent developments and applications of image features for food quality evaluation and inspection – a review. *Trends in Food Science & Technology*, *17*(12), 642–655. doi:10.1016/j.tifs.2006.06.005

