



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

*Programa de Doctorado Ingeniería Agraria, Alimentaria,
Forestal y del Desarrollo Rural Sostenible por la
Universidad de Córdoba y la Universidad de Sevilla*

TESIS DOCTORAL

Aseguramiento de la calidad y autenticación de vinagres de vino mediante sensores NIRS



Rocío Márquez Ortega

TITULO: *ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD Y AUTENTIFICACIÓN DE
VINAGRES DE VINO MEDIANTE SENSORES NIRS*

AUTOR: *María del Rocío Márquez Ortega*

© Edita: UCOPress. 2020
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A
14071 Córdoba

<https://www.uco.es/ucopress/index.php/es/>
ucopress@uco.es

UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

*Programa de Doctorado Ingeniería Agraria, Alimentaria, Forestal y del
Desarrollo Rural Sostenible por la Universidad de Córdoba y la
Universidad de Sevilla*



*Aseguramiento de la calidad y autenticación de vinagres de
vino mediante sensores NIRS*

*Quality assurance and authentication of wine vinegars using
NIRS sensors*

TESIS DOCTORAL

Rocío Márquez Ortega

Directoras:

**Dra. M^a Teresa Sánchez Pineda de las Infantas
Dra. M^a Isabel López Infante**

Marzo 2020



Aseguramiento de la calidad y autenticación de vinagres de vino mediante sensores NIRS

TESIS DOCTORAL

Para aspirar al Grado de Doctor por la Universidad de Córdoba presentada por D^a. María del Rocío Márquez Ortega, Licenciada en Biología por la Universidad de Córdoba y Licenciada en Enología por la Universidad de Córdoba

La Doctoranda

Fdo.: María del Rocío Márquez Ortega

V^oB^o Las Directoras

*Fdo.: Prof^a. Dra. M^a Teresa Sánchez
Pineda de las Infantas*

*Fdo.: Prof^a. Dra. M^a Isabel López
Infante*

Marzo 2020



M^a Teresa Sánchez Pineda de las Infantas, Catedrática de Universidad del Departamento de Bromatología y Tecnología de los Alimentos de la Universidad de Córdoba y M^a Isabel López Infante, Formadora de Alimentación y Salud en los Servicios Centrales del IFAPA y Profesora Asociada en el Departamento de Bromatología y Tecnología de los Alimentos de la Universidad de Córdoba

I N F O R M A N:

Que la Tesis titulada "Aseguramiento de la calidad y autenticación de vinagres de vino mediante sensores NIRS", del que es autora D^a. María del Rocío Márquez Ortega, ha sido realizada bajo nuestra dirección durante los años 2015 a 2020; y cumple los requisitos académicos exigidos por la Legislación vigente para optar al título de Doctora por la Universidad de Córdoba.

Y para que conste a los efectos oportunos firman el presente informe en Córdoba a 20 de febrero de 2020

Fdo.: Prof^a. Dra. M^a Teresa Sánchez Pineda de las Infantas *Fdo.: Prof^a. Dra. M^a Isabel López Infante*



TÍTULO DE LA TESIS:

ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD Y AUTENTIFICACIÓN DE VINAGRES DE VINO MEDIANTE SENSORES NIRS

DOCTORANDA:

MARÍA DEL ROCÍO MÁRQUEZ ORTEGA

INFORME RAZONADO DE LAS DIRECTORAS DE LA TESIS

La Tesis Doctoral cuyo título se menciona arriba se ha adaptado, desde sus inicios, a la metodología y el diseño programados, derivando todo ello en la obtención de resultados de indudable relevancia científica y tecnológica.

En primer lugar, hay que destacar que del trabajo de esta Tesis Doctoral se han establecido las bases científico-técnicas para el desarrollo de modelos de predicción NIRS cuantitativos y se han obtenido un amplio abanico de aplicaciones NIRS relativas a la determinación de parámetros de calidad química en vinagres de vino, pertenecientes a la Denominación de Origen Protegida “Vinagre de Montilla-Moriles”. Con este fin se han utilizado estrategias de regresión lineal, específicamente, se ha empleado la regresión en mínimos cuadros parciales modificada.

Asimismo, hay que destacar que la doctoranda ha tenido la posibilidad de formarse, no sólo en aspectos científicos-técnicos ligados a la tecnología NIRS, sino también en los relacionados con la producción de vinagres de vino, realizando los siguientes cursos:

- Espectroscopía de Infrarrojo Cercano (NIRS). Aplicaciones en el Control de Calidad y Trazabilidad de Productos y Procesos. 06 a 17 de febrero de 2017. Universidad de Córdoba.
- Historia y Tipos de Vinagres de Calidad. Vinagres de Montilla-Moriles. Iniciación a la Elaboración y Cata de Vinagres. 01 de septiembre de 2017 a 30 de diciembre de 2017. IES Valle. Jaén.
- Especialización en Vinos de Andalucía. 22 a 26 de octubre de 2018. Universidad Internacional de Andalucía. La Rábida.

El trabajo publicado en forma de artículo científico relacionado con los resultados de la Tesis Doctoral es el siguiente:

1. Sánchez, M.T., Márquez, R., Torres, I., De la Haba, M.J., Pérez-Marín, D., López, M.I. Chemical characterization of wine vinegars belonging to the *Vinagre de Montilla-Moriles* protected designation of origin, using near infrared spectroscopy. *Food Analytical Methods* 13, 802–810 (2020). Índice de impacto de la revista en el año 2019 de publicación del Artículo: 2,413. Lugar que ocupa/Nº de revistas del Área temática: Food Science and Technology-SCIE: Rank: 45/135, Q2.

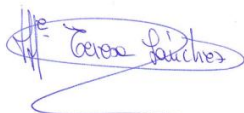
La doctoranda ha participado en los siguientes congresos, simposios y conferencias:

- Taller de Enología. Estudios Universitarios para Alumnos Mayores. Curso 2013/2014. Cátedra Intergeneracional de la Universidad de Córdoba.
- Elaboración de Mermeladas y Gelatinas de Vino y Vinagre de la variedad *Pedro Ximénez* Ecológicas. VIII Congreso CYTA/CESIA. 07 a 10 de abril de 2015. Badajoz.
- Jornadas de divulgación de Proyectos de Investigación y Desarrollo relacionado con la DOP Montilla-Moriles. 24 de enero de 2017. Consejo Regulador de las DOP Montilla-Moriles y Vinagre de Montilla-Moriles.

- II Taller AGRIFORVALOR: Aprovechamiento de Residuos y Subproductos Agrícolas y Forestales en Andalucía. 15 de febrero de 2017. Agencia Andaluza del Conocimiento. Málaga.
- Elaboración de Vinagre y su papel en la Gastronomía. VIII Jornada sobre Bebidas Fermentadas: Hostelería y Nutrición. 2 de diciembre de 2019. Universidad Complutense de Madrid.
- Línea de Investigación correspondiente a Bodegas Robles. Elaboración de un Vino Gasificado ecológico y un Vinagre Ecológico. Proyecto de Innovación Montilla-Moriles: el Resurgir. 2019. IES Emilio Canalejo. Montilla.

Por todo ello, se autoriza la presentación de la tesis doctoral.

Córdoba, 20 de febrero de 2020

Handwritten signature in blue ink, appearing to read "Teresa Sánchez".Handwritten signature in blue ink, appearing to read "Isabel López Infante".

*Fdo.: Prof^a. Dra. M^a Teresa Sánchez Fdo.: Prof^a. Dra. M^a Isabel López Infante
Pineda de las Infantas*

“A mis padres, hermanos, tía Rosibel y a mis Enriques”

Agradecimientos

Deseo expresar mi sincera gratitud y reconocimiento a todas las personas que han hecho posible la realización de este Trabajo de Investigación:

A la Dra. María Teresa Sánchez Pineda de las Infantas, Catedrática de Universidad del Departamento de Bromatología y Tecnología de los Alimentos de la Universidad de Córdoba, y codirectora de esta Tesis, por su gran paciencia y ayuda en este trabajo.

A la Dra. M^a Isabel López Infante, Formadora de Alimentación y Salud en los Servicios Centrales del IFAPA y Profesora Asociada del Departamento de Bromatología y Tecnología de los Alimentos de la Universidad de Córdoba, y codirectora de esta Tesis, por su guía desde el inicio, no solo de este trabajo sino de toda mi carrera laboral .

A mis padres, Amalia y Luis Alfonso por sus esfuerzos en darme una buena educación y una mente fuerte, siempre desde el cariño.

A mi marido, por su confianza y su apoyo incondicional durante todo el tiempo que ha durado la realización de esta Tesis Doctoral y el resto de los días.

A Bodegas Robles SA y en especial a Francisco Robles y familia, por la oportunidad que me brindaron el día que me abrieron sus puertas.

A las bodegas del marco de la denominación de Origen Montilla Moriles que se prestaron a cedermme muestras de sus vinagres.

Por último, a todos aquellos que durante estos años se han interesado y me han ayudado en el desarrollo de esta Tesis Doctoral, muchas gracias a Enrique, Lourdes, Jesús Manuel, Daniel, Lázaro, Juan y por supuesto a Yolanda.

Índice

RESUMEN	3
SUMMARY	7
Capítulo 1. INTRODUCCIÓN	11
Capítulo 2. OBJETIVOS	19
2.1. Objetivo general	19
2.2. Objetivos específicos	19
Capítulo 3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	23
3.1. Los vinagres de vino: su origen y evolución	23
3.2. Tecnología de la elaboración de los vinagres de vino	29
3.2.1. <i>Método artesanal</i>	31
3.2.2. <i>De lo artesano a lo proto-industrial en la elaboración de vinagres</i>	32
3.2.3. <i>Método de Orleans o “Sistema Francés”</i>	32
3.2.4. <i>Método Alemán</i>	35
3.2.5. <i>Métodos industriales</i>	37
3.2.6. <i>Elaboración de vinagres pertenecientes a la DOP “Vinagre de Montilla-Moriles”</i>	43
3.3. Calidad físico-química de los vinagres de la Denominación de Origen Protegida “Vinagre de Montilla-Moriles”	51
3.3.1. <i>Métodos analíticos físico-químicos tradicionales de determinación de los principales parámetros de calidad en vinagre</i>	51
3.4. Calidad sensorial de los vinagres	61
3.4.1. <i>Percepción del aroma</i>	66
3.4.2. <i>Percepción del gusto</i>	67
3.4.3. <i>Percepción del color</i>	68
3.4.4. <i>Proceso de cata</i>	69
3.5. La tecnología NIRS para el control de calidad y trazabilidad en vinagres	73
3.5.1. <i>Bases teóricas</i>	74
3.5.2. <i>Instrumentación</i>	78
3.5.3. <i>Análisis quimiométrico de datos espectroscópicos NIRS</i>	80

3.5.4. Aplicaciones de la tecnología NIRS en el aseguramiento de la calidad en vinagres	87
Capítulo 4. MATERIAL Y MÉTODOS	93
4.1. Muestras de vinagre	93
4.2. Determinación de parámetros físico-químicos de calidad en vinagres	93
4.3. Toma de datos espectrales	94
4.4. Procesado de datos y desarrollo de modelos predictivos de calidad físico-química utilizando la regresión en mínimos cuadrados parciales modificada	94
4.4. Determinación de parámetros sensoriales de calidad en vinagres	97
Capítulo 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	109
5.1. Caracterización de los colectivos NIRS de calibración y validación	109
5.2. Modelos de calibración para la predicción de parámetros de calidad físico-química en vinagres de vino de la DOP “Vinagre de Montilla-Moriles”	111
5.3. Validación de los modelos de calibración desarrollados	116
5.4. Principales longitudes de onda para la predicción de los parámetros de calidad físico-químicos analizados en vinagres de vino de la DOP “Vinagre de Montilla-Moriles”	117
5.5. Características organolépticas de los vinagres embotellados de la DOP “Vinagre de Montilla-Moriles”	119
Capítulo 6. CONCLUSIONES	127
Capítulo 7. RECOMENDACIONES FINALES Y FUTUROS TRABAJOS DE INVESTIGACIÓN	131
Capítulo 8. BIBLIOGRAFÍA	135
Anexo I: Fichas de Cata	151

ÍNDICE DE TABLAS

		Página
Tabla 3.1	Sentidos utilizados en la cata de vinagre	63
Tabla 4.1	Vinagres de la DOP “Vinagre de Montilla-Moriles” analizados sensorialmente	99
Tabla 5.1	Características de los colectivos de calibración y validación y error típico de laboratorio	110
Tabla 5.2	Estadísticos de calibración de los mejores modelos obtenidos para la predicción de calidad química en vinagres	112
Tabla 5.3	Estadísticos de validación para las mejores ecuaciones para la predicción de calidad química de vinagres de la DOP “Vinagre de Montilla-Moriles”. Rango espectral 400-2500 nm.	116
Tabla 5.4	Puntuaciones obtenidas en la cata descriptiva para cada atributo en los vinagres según su contenido en azúcar (dulzor)	120
Tabla 5.5	Puntuaciones obtenidas en la cata descriptiva para cada atributo en los vinagres de vino según su sistema de crianza y tipo de envejecimiento	122

ÍNDICE DE FIGURAS

	<u>Página</u>
Figura 3.1 Diagrama de dos fermentadores conectados en serie y con modo semi-continuo	30
Figura 3.2 Acetificación por el método Orleans	33
Figura 3.3 Método alemán para la producción de vinagres vínicos	36
Figura 3.4 Proceso de fabricación del vinagre de vino	38
Figura 3.5 Diagrama de flujo de la fabricación industrial del vinagre	38
Figura 3.6 Fermentador industrial de vinagre	39
Figura 3.7 Esquema de Acetator FRINGS	41
Figura 3.8 Diagrama de las etapas en un modo de trabajo semi-continuo	42
Figura 3.9 Tipos de vinagres de la Denominación de Origen Protegida “Vinagre de Montilla-Moriles”	45
Figura 3.10 Envejecimiento de vinagres por el sistema de criaderas y soleras	47
Figura 4.1 Ficha de cata utilizada por el panel de catadores	102
Figura 5.1 “Loadings” para los parámetros masa volúmica, azúcares reductores, acidez total y pH	118

Resumen



RESUMEN

Los productores, las bodegas, así como los consumidores necesitan la puesta a punto y el desarrollo de tecnologías que proporcionen información exacta y útil sobre la calidad y la autenticación de los vinagres de vino pertenecientes a la Denominación de Origen Protegida “Vinagre de Montilla-Moriles”, siendo clave el que dichas tecnologías no estén limitadas por sus costes o tiempos de análisis.

La Espectroscopía de Reflectancia en el Infrarrojo Cercano (en inglés, Near Infrared Spectroscopy, NIRS) se puede definir como una técnica no invasiva que combina rapidez, facilidad y precisión en la medida, con un bajo coste de análisis por muestra y una gran versatilidad, lo cual permite su incorporación en distintos niveles de decisión a lo largo de la cadena productiva, relativos a calidad de los vinagres. Asimismo, la tecnología NIRS ha sido empleada con éxito en el sector de los vinagres de vino para su autenticación.

La instrumentación NIRS ha ido evolucionando desde finales de los años sesenta hasta nuestros días. En la actualidad existe una amplia variedad de equipos NIRS con diferentes características, como diseño óptico, rango espectral de trabajo, portabilidad, coste, etc. Esto hace que, dependiendo de la aplicación, las soluciones que ofrece esta tecnología estén cada vez más adaptadas a las necesidades. No obstante, en este ámbito de enormes potencialidades quedan numerosos aspectos en los que profundizar, principalmente, los relativos a la optimización de la medida, al procesado de los datos espectrales y a su conexión con sistemas de apoyo a la decisión, que posibiliten que este tipo de aplicaciones sean una realidad.

El objetivo principal de esta Tesis Doctoral ha sido desarrollar modelos NIRS para la predicción de parámetros de calidad y a la autenticación de



vinagres de vino pertenecientes a la Denominación de Origen Protegida (DOP) “Vinagre de Montilla-Moriles”.

Los resultados obtenidos han puesto de manifiesto el potencial de la tecnología NIRS para su incorporación en el sector de los vinagres de vino pertenecientes a dicha denominación de origen protegida, como sensor y herramienta de apoyo a la decisión que proporcionará una huella espectral única de cada producto, de utilidad para la determinación de su calidad y autenticación y, asimismo, como un registro óptico de enorme interés para asegurar que el producto cumple los estándares de calidad determinados por la normativa vigente para su pertenencia a la DOP “Vinagre de Montilla-Moriles”.



Summary



SUMMARY

Producers, vinegar cellars and consumers are demanding the development of rapid, accurate, economical and above all non-destructive technologies for the quality determination and authentication of Spanish wine vinegars belonging to *Vinagre de Montilla-Moriles* protected designation of origin (PDO), being a key factor that these technologies are not limited by their response time or cost.

Near Infrared Spectroscopy (NIRS) is recognised as a precise and reproducible technique for quantitative and qualitative analysis in the vinegar sector, because it meets all the requirements for modern and automatic quality control. This technology represents a marked change from the conventional analytical methods, because a single spectrum allows the simultaneous characterization of different physicochemical and sensory properties, in a matter of seconds and without sample preparation, thus allowing real-time decision-making.

Over recent years, due to its swift response, precision, applicability to multiple products and analytes (it is able to provide a number of quality readings simultaneously) and the advanced level of development of the latest generation of instruments, NIR spectroscopy has become one of the most widely-used, flexible techniques in the vinegar sector. This technology is particularly well-suited to the prediction of complex parameters with a crucial influence on end-product quality, such as the ones found in wine vinegars, where information from across the whole spectrum is indispensable.

Therefore, the main objective of this PhD dissertation was to develop, evaluate and optimize NIRS models aimed at assuring quality in wine vinegars belonging to *Vinagre de Montilla-Moriles* (PDO).



The results obtained in this PhD dissertation showed that NIR spectroscopy, combined with suitable chemometric methods, could be used to measure quality in vinegar and to monitor the fermentation process of this product, as well as in detecting commercial fraud in the vinegar industries. These measurements will facilitate real-time decision-making throughout the production process and when the vinegars are later aged.



Capítulo 1: Introducción



Capítulo 1. INTRODUCCIÓN

Esta introducción comenzará exponiendo los motivos personales y profesionales que han influenciado la elección de la Espectroscopía de Infrarrojo Cercano (NIRS) aplicada a los vinagres de vino de la Denominación de Origen Protegida “Vinagre de Montilla-Morilla”, como tema de estudio de mi Tesis Doctoral. En primer lugar, se debe al haber estudiado las licenciaturas de Biología y de Enología, lo cual me ha influido a la hora de optar por una temática relacionada con dichas titulaciones. Además, desempeño el cargo de Presidenta en Asociación “VINAVIN”, una vinculación profesional con el mundo del vinagre que de sobremanera también me ha influido en esta elección. Por otro lado, no debemos olvidar la importancia socioeconómica y cultural que actualmente representa, e históricamente siempre ha tenido, el subsector vinagrero y vitivinícola en la provincia de Córdoba, especialmente para la zona de la Denominación de Origen Montilla-Moriles. En último lugar, comentar que desde hace unos años ha surgido un movimiento que intenta mejorar la calidad en la elaboración de los vinagres y el desarrollo de nuevas tecnologías ha permitido que así sea. Todo ello, me hizo declinar por un estudio técnico que nos permitiera determinar el aseguramiento de la calidad en los vinagres de vino.

El vinagre de vino siempre ha estado íntimamente ligado a la vida cotidiana de la humanidad, que desde tiempos inmemoriales idealizó aplicaciones con él para poder elaborar alimentos y remedios caseros. Ello ha marcado su abundancia, importancia y diversidad, lo que lo hace uno de los alimentos más interesantes para investigar. Desde las civilizaciones antiguas, el vinagre alcanzó una gran importancia económica pero también sociocultural. Actualmente, la tendencia es el uso de vinagres de calidad en aplicaciones gastronómicas.

La palabra vinagre tiene su procedencia etimológica del latín “vinum acre”, equivalente a “vino duro”, de la que deriva la locución francesa “vin



agire”, cuyo significado es vino agrio, pero en su acepción la procedencia de la materia prima no queda sólo formada por el vino, sino que cualquier sustrato amiláceo sería susceptible de ser utilizado. El Real Decreto 661/2012, de 13 de abril, por el que se establece la norma de calidad para la elaboración y la comercialización de los vinagres (BOE núm. 100, de 26 de abril de 2012), lo define como: “es el líquido apto para el consumo humano resultante de la doble fermentación alcohólica y acética de productos de origen agrario”. Asimismo, define al grado de acidez de los vinagres como la acidez total expresada en gramos de ácido acético por cada 100 mililitros.

Para la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS), “el vinagre es un líquido, apto para el consumo humano, producido exclusivamente con productos idóneos que contienen almidón o azúcares, o almidón y azúcares por el procedimiento de doble fermentación, alcohólica y acética” (Codex Alimentarius, 1987). Esta definición indica que el alcohol contenido en la materia prima debe ser producido mediante fermentación alcohólica, por lo cual no se permite la práctica de añadir alcohol de origen sintético. Esta peculiaridad también es extensible a la legislación española del vinagre. La Unión Europea define al vinagre de vino como el “obtenido exclusivamente por fermentación acética del vino, y con una acidez total, expresada en ácido acético, no inferior a 60 g/l” (DOUE, 2008).

El vinagre de vino es un producto cada vez más valorado debido a su calidad y riqueza sensorial. En muchas zonas vitivinícolas, como, por ejemplo, en el marco de Montilla-Moriles, el vinagre fue tradicionalmente considerado como un subproducto de la elaboración de los vinos. Sin embargo, actualmente se le considera con el mismo nivel mercadotécnico que los productos enológicos comercializados, exigiéndose rigurosos métodos de análisis y de control de los procesos de elaboración que mejoren la calidad y permitan describir y discriminar el producto final obtenido.



Así, en enero de 2015, se inscribe en el Registro de la Unión Europea de Denominaciones de Origen Protegidas (DOP) y de Indicaciones Geográficas Protegidas, la DOP “Vinagre de Montilla-Moriles” (DOUE, 2015). Dicho Reglamento define el «Vinagre de Montilla-Moriles» como aquel vinagre de vino obtenido de la fermentación acética de vino certificado de la DOP «Montilla-Moriles» envejecido o, en su caso, un vinagre envejecido dulce procedente de vinagre de vino obtenido de la fermentación acética de vino certificado de la DOP «Montilla-Moriles» con adición durante el periodo de crianza, de mostos de uva pasificada o no de las variedades “Pedro Ximénez” o “Moscatel”, igualmente certificados de dicha denominación vínica.

Asimismo, en el Anexo del Reglamento de Ejecución se recoge el Pliego de Condiciones de la citada DOP, donde se establecen los productos amparados y las características de los mismos (DOUE, 2015).

Por tanto, y en el caso de vinagres pertenecientes a la DOP “Vinagre de Montilla-Moriles” es en el citado Pliego de Condiciones donde se establece la calidad tanto química como sensorial de dichos vinagres, garantizando dicha calidad a los consumidores y protegiéndolos frente a fraudes.

Es importante tener en consideración que la calidad de un vinagre se ve directamente condicionada por la materia prima de partida, el sistema seguido para la acetificación y, si tiene lugar, el envejecimiento en madera (barrica). Para evaluar dicha calidad, es fundamental disponer de técnicas analíticas de control las cuales deben suministrar la información relacionada con parámetros vinculados a las propiedades químicas y organolépticas que sean indicadoras de dicha calidad.

El fraude, un fenómeno cada vez más frecuente durante los últimos tiempos debido al auge de los mercados internacionales y a la competencia global, también incide sobre los vinagres, por lo que limitar o eliminar este riesgo de falsificación en el vinagre de vino es una cuestión relevante. Para el



caso de la industria vinagrera española, el control y la detección del fraude corresponden a la Asociación Española del Vinagre (Sáiz-Abajo, 2005). Sin embargo, las herramientas analíticas recogidas en la reglamentación española son insuficientes para detectar los fraudes más habituales en el vinagre con unos límites de detección razonables (Durán-Guerrero, 2008). El incremento de dichos fraudes puede ocasionar consecuencias económicas negativas e irreversibles para el sector de la profesión que cumple con la legislación vigente. Los fenómenos de fraude para el vinagre pueden reducirse a dos circunstancias principales:

- Adición al vinagre de ácido acético de origen no agrícola hasta cumplir con las especificaciones legales.
- Mezcla de diferentes proporciones de vinagre de vino y vinagre de alcohol y la posterior venta del producto resultante bajo la denominación de vinagre de vino genuino.

La primera de las adulteraciones citadas puede ser actualmente detectada gracias al desarrollo de métodos analíticos basados en la resonancia magnética nuclear (IOV, 2015). Sin embargo, el segundo de los fraudes mencionados es mucho más complicado de detectar y resolver.

Por lo tanto, el disponer de una tecnología no destructiva, que sea rápida y precisa, de bajo coste, no contaminante y que también pueda ser aplicada directamente en la industria, proporcionando datos en tiempo real, y con posibilidad de aplicación para caracterizar estándares de calidad tanto químicos como sensoriales del producto analizado, es de gran interés y utilidad en la industria vinagrera.

Hoy en día, la combinación de rapidez, precisión y de bajo coste hace que la Espectroscopía de Reflectancia en el Infrarrojo Cercano (NIRS) sea una de las tecnologías más idóneas, alternativas a los procedimientos tradicionales



de vía húmeda, para la determinación de la calidad y autenticación de vinagres.

Por tanto, en la presente Tesis Doctoral, se abordará la puesta a punto de una metodología de aseguramiento de la calidad y autenticación basada en la tecnología NIRS, que sea aplicable al sector del vinagre de vino perteneciente a la Denominación de Origen Protegida, “Vinagre de Montilla-Moriles”.

Con el fin de facilitar su lectura y comprensión este Tesis doctoral se ha estructurado en los siguientes capítulos:

- En el Capítulo 1, se ha tratado de justificar y clarificar de forma muy breve el Trabajo de Investigación desarrollado en esta Tesis doctoral.

- En el Capítulo 2, se exponen y concretan los objetivos a alcanzar.

- En el Capítulo 3, se pone de manifiesto la problemática real que ha servido como justificación y punto de partida del actual estudio. En la primera sección, se presentan los aspectos más relevantes relacionados con la calidad del vinagre. La segunda sección se ha orientado principalmente, a la revisión de los métodos analíticos tradicionales para la determinación de los principales parámetros de calidad en vinagre. Por último, y en la tercera sección, se ha realizado una revisión de las bases teóricas, instrumentales y quimiométricas de la tecnología de Espectroscopía en el Infrarrojo Cercano y de las distintas aplicaciones NIRS, destinadas al control de calidad de vinagre en la industria. También se ha realizado el análisis sensorial de los vinagres estudiados.

- En el Capítulo 4, se presenta el material utilizado, así como los distintos métodos empleados para la determinación de los parámetros de calidad de vinagres estudiados.

- En el Capítulo 5, se presentan los resultados obtenidos y se lleva a cabo la discusión de los mismos.

- El Capítulo 6, recoge las conclusiones obtenidas en este Trabajo.



- En el Capítulo 7 se establecen unas recomendaciones de futuro y los posibles trabajos de investigación a desarrollar.

- Finalmente, en el Capítulo 8, se indican las referencias bibliográficas utilizadas para la elaboración de esta Tesis doctoral.



Capítulo 2: Objetivos



Capítulo 2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

El objetivo general de esta Tesis Doctoral es analizar el potencial de la Espectroscopía de Reflectancia en el Infrarrojo Cercano como sensor no destructivo para la caracterización de la calidad de vinagres de vino pertenecientes a la Denominación de Origen Protegida “Vinagre de Montilla-Moriles”.

2.2. Objetivos específicos

Los objetivos específicos de esta Tesis Doctoral serán:

1. Caracterización química de vinagres de vino pertenecientes a la Denominación de Origen Protegida “Vinagre de Montilla-Moriles”.
2. Desarrollo y evaluación de modelos de predicción NIRS para la determinación de los principales parámetros de calidad química en vinagres, pertenecientes a la Denominación de Origen Protegida “Vinagre de Montilla-Moriles”.
3. Caracterización sensorial de vinagres de vino pertenecientes a la Denominación de Origen Protegida “Vinagre de Montilla-Moriles”.
4. Evaluación de instrumentos NIRS para su adaptación al control de calidad en la industria de elaboración de vinagres de vino de la Denominación de Origen Protegida “Vinagre de Montilla-Moriles”.



Capítulo 3: Revisión Bibliográfica



Capítulo 3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

3.1. Los vinagres de vino: su origen y evolución

Las primeras referencias escritas que se conocen sobre la elaboración humana del vino y el vinagre datan del 5000 a. C., provenientes de la medicina en Babilonia. Las uvas, los higos y otras frutas mediterráneas también proporcionaron sustancias fermentables de las que se obtuvieron diversos tipos de vinagres.

Varios usos favorecieron el desarrollo singular del vinagre y pronto se hizo indispensable como método para intensificar el sabor de los alimentos (condimento) y como sustancia para conservarlos, así como un medio curativo y cosmético (remedios caseros para personas y animales). Antes de la llegada de la tecnología moderna, el vinagre, además de la salmuera, era el principal modo de conservar los alimentos. La naturaleza ácida que presenta el vinagre retarda la proliferación de bacterias nocivas en los alimentos. Un fenómeno espontáneo transformó el vino en vinagre, cuyo proceso permitió el desarrollo de una industria biotecnológica para producir ácido acético a partir de alcohol etílico.

Antes de conocerse los microorganismos que dan lugar al vinagre, se fabricaba vinagre de vino en los principales países vitivinícolas, como Francia, Italia o España, vinagre de alcohol en Alemania o vinagre de arroz en China y Japón. Los restos arqueológicos que avalan la utilización primigenia del vinagre provienen de la época que corresponde al Antiguo Egipto, concretamente sobre urnas egipcias que datan de 3000 a. C.

Dioscórides hizo algunas menciones en sus libros de medicina griega sobre la salmuera de vinagre. Por otro lado, el griego Hipócrates prescribía el vinagre de sidra de manzana mezclado con miel para el tratamiento de muchas



enfermedades humanas, como por ejemplo la de ser un buen remedio para el resfriado y la tos o, en general, servir contra las molestias respiratorias. Los romanos emplearon el vinagre obtenido en factorías para condimentar alimentos, como bebida energética y con aplicación medicinal. Así, Columela dijo que: *“para hacer vinagre, echar en 48 sextarios de vino torcido una libra de levadura, tres onzas de higos secos y un sextario de sal, todo molido y desleído antes en un cuartario de miel clara”* (Columela, siglo I d. C.). Un uso muy antiguo era la limpieza de llagas y heridas por medio de vinagre diluido.

También, recomendados por el médico romano Galeno, había remedios para el alivio de la tos, que podían obtenerse mediante una mezcla de vinagre y miel. Entre las muchas aplicaciones conocidas del vinagre, se podría destacar su aplicación para el alivio de las picaduras de los insectos o las torceduras, así como para reducir los problemas provocados por las varices (Bourgeois y Barja, 2006).

Desde la antigüedad, el vinagre se ha empleado como un condimento y un conservante importante de los alimentos, así como ingrediente para diversos remedios. Los antecedentes históricos del vinagre han quedado muy ligados a la historia del vino. Según Conner y Allgeier (1976) la elaboración del vino data desde hace unos 10.000 años, por lo tanto, se puede suponer la existencia del vinagre desde aquel tiempo. El vinagre fue considerado antiguamente un accidente en el proceso de vinificación, pero, en realidad, era el resultado de la contaminación del vino en maduración por bacterias acéticas (Steinkraus, 1996).

Basándonos en datos históricos, las primeras referencias del vinagre, tal y como se indicó al principio, nacen desde hace más de cinco mil años. Estas reseñas acerca de la utilización del vinagre se sitúan en la cultura babilónica sobre la obtención de un “vinagre de dátiles” (Llaguno-Marchena y Polo, 1991). Existen fuentes históricas que hacen alusiones a un vinagre de cerveza en la civilización egipcia y a un vinagre de vino durante la época romana



(Bourgeois y Barja, 2006). Otras frutas mediterráneas, como las uvas y los higos, también se utilizaban como materias primas para obtener vinagre. De otra parte, tribus nómadas noreuropeas y asiáticas, empleaban manzanas para hacer una bebida agria fermentada. Por lo tanto, el uso del vinagre se ha extendido durante miles de años, desde los fenicios, egipcios, griegos, romanos y el resto del mundo occidental (Baena-Ruano, 2013).

Como ya se afirmó, el ácido acético ha sido durante muchos años el ácido más fuerte del que se disponía y el componente principal del vinagre. Los alquimistas lo usaban por su capacidad para disolver sustancias. Para mejorar su capacidad como ácido, se concentró mediante un proceso de destilación. El alquimista o científico árabe Jabir ibn Hayyan (721-815), conocido como Geber, destiló vinagre hacia los años 760-800; el proceso se describió en lo que pudo ser el primer tratado sobre la elaboración de vinagre. Geber descubrió que, al destilar el vinagre, obteniendo una pequeña fracción que consistía en un vinagre más fuerte, más concentrado al de partida, y siendo agua la mayor parte del destilado (Gutsche y Pasto, 1979).

Durante la Edad Media surgieron los primeros artesanos vinagreros En Francia, con el reinado de Carlos VI (1380-1422), surgieron y se agruparon los primeros artesanos vinagreros, que finalmente pasaron a ser una cofradía profesional. Sus primeros estatutos fueron sancionados por sentencia el 28 de octubre de 1394 Tenían unas normas muy severas, ya que utilizaban fórmulas confidenciales empleando sustancias de fuerte sabor, como por ejemplo la pimienta, el jengibre y otras especias o hierbas aromáticas, que proporcionaban al vinagre un sabor peculiar o característico (Palenzuela-Domínguez, 2003).

En la Edad Media, Orleans (Francia) era un gran centro productor de vinos y vinagres; de aquí viene la denominación de uno de los métodos empleados durante mucho tiempo para la producción industrial del vinagre, conocido como el Método de Orleans (Baena-Ruano, 2013).



La descripción más antigua de la fabricación industrial de vinagre aparece publicada en 1616, basada en la acetificación de mosto de cerveza y vino en barriles de madera medio-llenos dejados al aire libre, para favorecer la oxidación del etanol en ácido acético. Hasta el siglo XVIII no se obtienen las primeras conclusiones de dicho proceso; no fue hasta 1732 cuando el holandés Hermann Boerhaave (1668-1738) describió a la llamada “madre del vinagre” como el organismo vivo responsable del proceso de acetificación (Boerhaave, 1732).

En 1789, Antoine Lavoisier (1743-1794) intenta establecer una nomenclatura química en esta clase de fermentación, llegando a concluir que *“el alcohol suministra el hidrógeno y una porción de carbono, el ácido carbónico desprendido de la fermentación alcohólica proporciona carbono y oxígeno y, finalmente, el aire atmosférico debe surtir lo que falta de oxígeno para llevar la mezcla al estado de ácido acetoso (vinagre)”* (Lavoisier, 1789); cabe destacar que no se hace ninguna mención a las bacterias acéticas.

En 1803 Louis Berthollet (1748-1822) llegó a la conclusión de que el oxígeno se combina con el hidrógeno para descomponer el vino (Berthollet, 1803). Edmond Davy descubrió (1821) que al poner en contacto una esponja de negro (polvo) de platino en vapores de alcohol, aquella se calentaba hasta ponerse incandescente y continuaba caliente mientras hubiese alcohol en el medio, transformando este último en ácido acético (Baena-Ruano, 2013). Hendrik Persoon (1761-1836) observó en 1822 cómo se forma una película de grasa sobre la superficie de vino, cerveza o vinagre que tiene naturaleza vegetal, añadiendo nuevas especies de *Mycoderma* en la “micología europea” de la época (Persoon, 1822). Johann Döbereiner (1823) comprobó que el alcohol absorbe oxígeno, produciendo agua y ácido acético sin desprendimiento de carbónico. Midiendo el volumen de oxígeno que absorbe una cantidad específica de alcohol llegó a probar *“que los elementos de un átomo de alcohol se combinan con cuatro átomos de oxígeno, de manera que se formaban un átomo de ácido acético y tres átomos de agua”*; cabe destacar que, en aquella



época, no se conocía la nomenclatura de átomos y moléculas. Incluso Jacob Berzelius (1779-1848) reconoció en 1829 que la llamada *Mycoderma* o “madre del vinagre” tiene influencia en la producción vinagrera, pero no se identificaba como la causa de la fermentación acética, sino como un producto formado en el proceso de putrefacción del vinagre (Llaguno-Marchena y Polo, 1991).

El químico francés Jean-Antoine Chaptal (1756-1832) había observado que la producción de vinagre va bien cuando en la superficie del vino aparecen las llamadas “flores del vino”, cuya formación anuncia y precede a la acetificación (Llaguno-Marchena y Polo, 1991). Una gran evolución en el estudio del proceso de formación del vinagre se produjo en el s. XIX. Friedrich Kützing (1807-1892) observó al microscopio en 1837 las levaduras y la “madre del vinagre”, dándose cuenta de cómo la fina película que aparece sobre el vino al comenzar el proceso de acetificación está formada por glóbulos 6 veces más pequeños que las levaduras; además, clasificó a los glóbulos que forman la “madre del vinagre” como *Acetobacter Kützingianum*, siendo la primera clasificación taxonómica de dichos microorganismos (Kützing, 1837). Justus von Liebig (1803-1873) asemejó la técnica de producción del vinagre como un proceso puramente químico, responsabilizando a las sustancias nitrogenadas de la materia prima como las causantes de que se produzca la absorción del oxígeno por parte del alcohol presente: “...*el acceso del aire es una circunstancia indispensable para la acetificación. Pero como los líquidos fermentados con los cuales se prepara el vinagre ordinario contienen siempre materias extrañas que el aire modifica igualmente, en cuyo estado acompañan al producto de la acetificación del alcohol. Se le comparó a la fermentación del mosto, sin tener otra analogía que el ser ambos espontáneos y exigir la presencia del aire. Esta circunstancia hizo que se adoptase la denominación de fermentación ácida para designar el efecto de la acetificación*” (Liebig, 1840). El vinagre aún se fabricaba en talleres artesanales y era distribuido en barriles de madera.



En 1861 Louis Pasteur (1822-1895) comunicó a la Sociedad Química de París los primeros resultados de la fermentación acética, tan sólo se sabía que las bebidas hidro-alcohólicas, como el vino, la sidra o la cerveza, se acetificaban o avinagraban espontáneamente al estar en contacto con el aire y a una temperatura elevada (verano). Pasteur afirmó lo siguiente sobre la obtención de los vinagres (Llaguno-Marchena y Polo, 1991):

*“Todas las veces que el vino se transforma en vinagre es por la acción de un velo de *Mycoderma aceti* desarrollado en su superficie (madre del vinagre: Fig. 3.8). No existe, en ningún sitio, una gota de vino avinagrado espontáneamente en contacto con el aire, sin que *Mycoderma aceti* no haya estado presente previamente”.*

Finalmente, Louis Pasteur, en 1867, demostró que sin *Mycoderma*, la cual denominó *aceti*, no hay acetificación. El proceso de acetificación era independiente de la cantidad de sustancias nitrogenadas del medio y las virutas de madera empleadas en el procedimiento alemán de acetificación sólo eran el soporte para el desarrollo del *Mycoderma aceti*. Estos resultados han sido científicamente aceptados y terminaron demostrando que los vinagres naturales aparecen debido a la oxidación de líquidos alcohólicos por ciertas bacterias del género *Acetobacter*, que los transforman en ácido acético (Gerard, 2015). Desde un punto de vista productivo a nivel industrial es de gran importancia conocer las cepas implicadas en la transformación del etanol en ácido acético. Generalmente, la producción de vinagre se asocia con la especie *Acetobacter aceti*. En el mundo actual, el vinagre de vino es producido en la mayoría de los países mediterráneos y es ampliamente utilizado como un condimento, acidificante y conservante de los alimentos (Moreno-Rojas, 2015), siendo un producto cuyo valor y apreciación por parte de los consumidores ha experimentado un importante incremento en las últimas décadas, especialmente durante los últimos años por el auge de los productos con marchamo de calidad.



3.2. Tecnología de la elaboración de los vinagres de vino

Las bacterias acéticas son los microorganismos responsables del proceso de oxidación del etanol en ácido acético. Son bacterias Gram negativas y forman un grupo de morfología variable, que se presentan en forma elipsoidal o de bastoncillos y tienen un tamaño que oscila entre 0,5-0,8 μm de diámetro y 0,9-4,2 μm de largo. Su metabolismo es aerobio estricto, siendo el oxígeno el último aceptor electrónico. El pH óptimo para su crecimiento es 5-6,5, aunque pueden crecer a valores más bajos (Gerard, 2015)

De forma natural, estas bacterias aparecen en medios azucarados y/o alcohólicos ligeramente ácidos, como flores, frutas, cerveza, vino, sidra, vinagre, zumos de frutas y miel. Tienen la capacidad de oxidar azúcares y alcoholes para formar ácidos orgánicos. Al ser el ácido acético un producto industrial muy conocido, es por lo que tradicionalmente se las conoce como “bacterias acéticas”, aunque, sin embargo, no sólo son importantes por su capacidad para sintetizar ácido acético, sino también por la de oxidar glucosa, galactosa o arabinosa, entre otros ejemplos, que las hace interesantes para otros fines biotecnológicos.

Dependiendo de la materia prima y el tipo de vinagre se pueden hallar algunas diferencias entre los procesos empleados a nivel industrial, pero básicamente, son todos muy similares. En primer lugar, es necesario preparar el medio alcohólico que se utilizará como medio de cultivo; a continuación, se realiza la oxidación biológica y, finalmente, las operaciones de separación y acondicionamiento necesarias para terminar el producto.

El modo habitual de trabajo para la elaboración industrial del vinagre, que mayoritariamente se ha impuesto, es el semi-continuo (Fig. 3.1). En este sistema el fermentador trabaja por ciclos periódicos donde al final de cada uno, y una vez que se alcanza una determinada concentración del sustrato (etanol), se descarga una fracción volumétrica del medio de cultivo, quedando la restante



como inóculo para el medio fresco (vino) que sustituirá la fracción descargada. Dependiendo de variables operacionales, tales como la concentración de etanol residual y la acidez existentes en el momento de la descarga, el volumen de descarga y el modo por el cual se reponga el volumen descargado, las bacterias que quedan en el fermentador se ven expuestas a condiciones ambientales muy diferentes que afectan a su concentración y actividad.

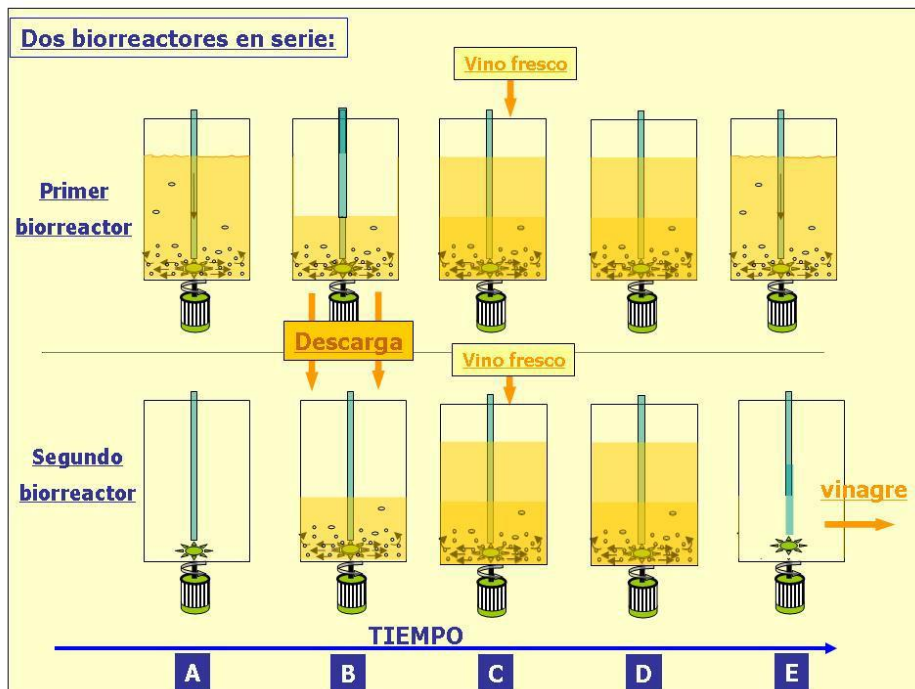


Figura 3.1. Diagrama de dos fermentadores conectados en serie y con modo semi-continuo.

Fuente: Elaboración propia.

Básicamente, con este método de trabajo:

- Se puede aprovechar una parte de la biomasa generada en un ciclo para el siguiente.
- Seleccionando el valor óptimo de las variables operacionales pueden controlarse las concentraciones de etanol y de ácido acético dentro de un rango adecuado para las bacterias acéticas. De tal modo, se produce, de



forma natural, una selección automática de las bacterias más adecuadas para el medio concreto con el que se trabaje.

- En la práctica, el punto anterior permite adaptar el fermentador para la elaboración de productos dentro de un margen relativamente amplio de acidez final.

El trabajo en modo discontinuo, además de la menor productividad que normalmente implica, tiene un importante inconveniente para este proceso como es la preparación de los inóculos en cada ciclo de trabajo. La dificultad para el mantenimiento y la propagación de los cultivos bacterianos, así como la necesidad de adaptación de las bacterias al medio que se pretende acetificar, hace muy difícil la estabilidad de un proceso industrial basado en este modo de trabajo.

Pero los procesos comentados han tenido unos métodos precedentes que han ido evolucionando a lo largo del tiempo y que han desembocado en los actuales métodos utilizados en la elaboración de vinagres. A continuación, se describen los principales métodos de acetificación utilizados a lo largo de la historia.

3.2.1. Método artesanal

El método más antiguo empleado para la producción de vinagre, a pequeña escala, consistía en exponer al medio atmosférico el vino o sustrato alcohólico empleado, hasta que se produjera su transformación completa en vinagre. El sustrato alcohólico podía ser: vino, malta fermentada, miel de dátiles, alcohol de patatas o de cereales, melazas de azucarería, suero de leche fermentada, etc. (Llaguno-Marchena y Polo, 1991). El proceso era completamente natural y la única etapa que se debía realizar era añadir al sustrato alcohólico una proporción de vinagre turbio, también llamado como “madre del vinagre”; posteriormente, se retiraba una parte del vinagre obtenido antes de añadir el nuevo sustrato. El vinagre así elaborado tenía



aproximadamente un 4-5 % (m/v) de acidez y una elevada concentración de etanol sin transformar.

3.2.2. De lo artesano a lo proto-industrial en la elaboración de vinagres

La descripción más antigua de la fabricación de vinagre data de 1616 (Conner y Allgeier, 1976). Se describe la acetificación del mosto de la cerveza y el vino en barriles de madera semillenos dejados al aire libre para favorecer el proceso de acetificación; se utilizaban diferentes barriles y el proceso se realizaba transfiriendo una pequeña cantidad de vinagre de un barril a otro. Este proceso se mantuvo cientos de años y fue llamado por los británicos como “*fielding process*”.

3.2.3. Método de Orleans o “Sistema Francés”

En el siglo XVII la principal industria vinagrera se hallaba en Orleans, en cuya ciudad francesa se desarrollaría uno de los métodos más antiguos para la elaboración de vinagre. Se trata de un método que corresponde al más antiguo de todos los conocidos, datando sus primeras referencias de 1670 (Mitchell, 1916; Suárez e Íñigo, 2008). En la España del siglo XIX, este método sería practicado de dos maneras distintas, dependiendo de la cantidad de vinagre que se quisiera producir (Martínez-Montalvo, 2004). El método se basaba en un cultivo superficial y estacionario de las bacterias acéticas, aunque por entonces no se identificaban como auténticas responsables del proceso. Las condiciones operativas consistían en preservar en contacto con el aire una fina capa grasienta que se mantenía en la superficie del vino, procurando siempre que no cayese al fondo del barril al renovar el contenido parcial de vino. Por lo tanto, se disponían barriles medio llenos de vino, que se dejaban acetificar o bien se mezclaban con vinagre de vino turbio con el objetivo de acelerar el proceso (Llaguno-Marchena y Polo, 1991).



Se utilizaban toneles cuya capacidad volumétrica era de unos 200 litros, que se disponían tumbados, formando filas horizontales y superpuestas, de tal forma que se aumenta la superficie de contacto líquido-aire. Los barriles iban provistos de dos agujeros de unos 5 centímetros (2 pulgadas), ubicados uno en cada una de las bases planas del tonel, y se disponían en su mitad superior. Uno de dichos orificios era utilizado como ventana de observación para visualizar el proceso y el otro tenía la misión de dejar pasar el aire ambiental, encontrándose ambos rellenos con estopa para evitar la entrada de las “moscas del vinagre”, las cuales contaminarían el proceso (Llaguno-Marchena y Polo, 1991). Además, en la parte superior de cada uno de los toneles, cabe destacar la presencia de un embudo con un tubo de vidrio que era lo suficientemente largo como para que tocara casi el fondo, cuya función era suministrar líquido alcohólico fresco al recipiente. De tal forma, no se alteraba la capa superficial en las diferentes etapas de la renovación parcial del contenido del tonel (Fig. 3.2).

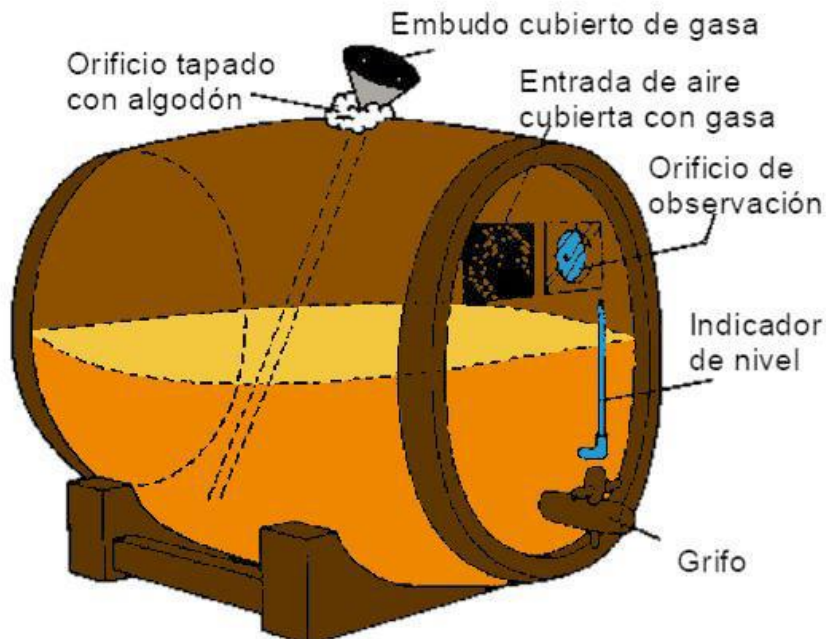


Figura 3.2. Acetificación por el método de Orleans.

Fuente: Adams, 1985.

El sustrato empleado era una mezcla de vino de baja graduación alcohólica y un 20% de vinagre turbio. Este proceso era muy lento y se obtenía un bajo rendimiento de transformación del etanol en ácido acético, no llegándose a superar el 85% respecto al valor teórico, pero en cambio el vinagre producido por este método es de buena calidad y además permite realizar simultáneamente la acetificación y el envejecimiento. Sin embargo, presenta el hándicap de que su proceso es lento y costoso, por lo que hoy en día es empleado para producir vinagres de vino selectos y tradicionales (Davies, 2015).

Para iniciar el proceso de acetificación era fundamental preparar cada tonel adicionando un volumen de vinagre no pasteurizado. Una vez iniciada la acetificación dentro del tonel, el proceso de transformación duraba entre 8 y 10 días. Inicialmente, se añadían 60 litros de vinagre de buena calidad; una vez transcurridos 8 días, debían adicionarse 12 litros de vino a través de la varilla de vidrio anteriormente mencionada, que se transformaba en vinagre, siendo una quinta parte del volumen de vinagre. Inmediatamente, se procede a inocular el tonel con un poco del cultivo superficial de otro tonel en pleno proceso de producción vinagrera. Llegado este momento, se repite la adición de los 12 litros de vino cada 8 días, hasta que el líquido contenido llegue casi al borde inferior del orificio de entrada de aire. A partir de aquel instante, se daba por iniciada la etapa de producción.

Es importante que la temperatura de los locales donde se ubiquen los toneles se mantenga a unos 20-25°C. Normalmente, se utilizaban bodegas o recintos en cuyo interior la temperatura se mantenía elevada en invierno, ya que experimentalmente se comprobó que la acetificación se producía con más rapidez a una mayor temperatura del ambiente.

Una vez que el tonel ya estaba en proceso productivo, cada 8 ó 10 días se sacan unos 12 litros de vinagre y se sustituyen por otros 12 litros de vino, de



forma que se puede prolongar de forma indefinida o continua el proceso de la elaboración, siempre que no se produzca ninguna infección bacteriana por parte de bacterias productoras de celulosa y/o las consumidoras de ácido acético, así como contaminación por anguílulas (nematodos).

La renovación del líquido del tonel dependía de varios factores que influían en el proceso de forma directa: temperatura, capacidad de transformación de las bacterias acéticas, grado alcohólico y composición del vino empleado. En cualquier caso, el proceso de acetificación tenía lugar de forma lenta (Xandri-Tagueña, 1977).

3.2.4. Método Alemán

La aparición del llamado método rápido (método alemán para vinagre de alcohol), ideado por Boerhaave y posteriormente modificado por Schützenbach en 1823, supone un gran avance para la vinagrería. Representa el paso de un sistema estático a uno dinámico, pues la mezcla hidro-alcohólica circula desde la parte superior a la zona inferior del tonel, a partir de donde nuevamente se recicla (Martínez-Montalvo, 2004).

En el interior de las barricas está el relleno de material inerte y poroso, que proporciona una superficie amplia para el desarrollo de las bacterias acéticas; por lo general, este relleno está constituido de virutas de madera de haya (Suárez e Iñigo, 2008).

Con este método, Schützenbach logró acelerar el proceso de acetificación y aumentó el contacto del oxígeno atmosférico con el alcohol. Además, economizó el número de trabajadores al idear un “aparato de graduación” que consistía en la agrupación aneja de tres toneles, de manera que el caldo del primer barril caía por su propio peso en el segundo tonel y de ahí pasaba igualmente hacia el tercero.



Pero, aunque se trataba de un método más rápido que su predecesor el de Orleans, presentaba el inconveniente de disipar parte del alcohol, por la aireación a la que se sometía el líquido, así como también ácido acético y principios aromáticos que se volatilizaban, obteniendo un vinagre de peor calidad al de Orleans. Por ello el método alemán era recomendado para la acetificación de líquidos poco alcohólicos y pobres en sustancias extractivas, alcanzando un gran ahorro de tiempo en el proceso (Martínez-Montalvo, 2004).

El fundamento científico de los “métodos rápidos” de producción vinagrera consiste en hacer pasar, de un modo continuo y lento, la sustancia líquida que se quiere acetificar a través de una gruesa capa de virutas de haya, convenientemente preparadas e inoculadas con bacterias acéticas; mientras, en sentido contrario, se procura y se regula una corriente de aire que activa de manera extraordinaria el avinagrado (Fig. 3.3). En este caso, la materia prima se recircula hasta que su contenido alcohólico haya desaparecido prácticamente.

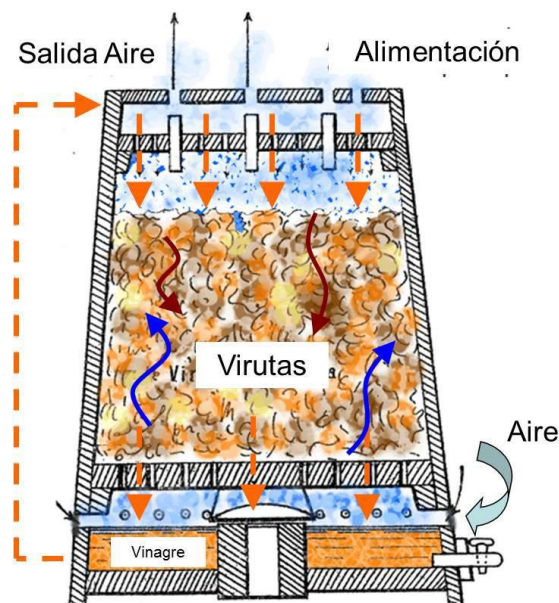


Figura 3.3. Método alemán para la producción de vinagres vínicos.

Fuente: Xandri-Tagüeña, 1977.



Según el criterio de Marcilla-Arazola (1942), cuando se desea obtener vinagres fuertes, mayores a 6 o 7° de ácido, es preferible disponer por lo menos de una batería de dos o tres generadores y comenzar cada vez la acetificación por un generador, que recibirá vino o piqueta; luego se deberá seguir siempre con la misma ordenación, pasando los líquidos cada vez más avinagrados a los restantes generadores, cuyas bacterias terminan habituándose de tal modo a trabajar bajo medios progresivamente más ricos en ácido acético.

Estos métodos han permitido con anterioridad a la tecnología de cultivo sumergido los máximos rendimientos (8 grados), e incluso un 11 y 12% de ácido acético, si se dispone de bacterias resistentes. El método alemán no se ha utilizado en Montilla-Moriles.

El vinagre obtenido por métodos que aplican un cultivo superficial se caracteriza por el aroma y el gusto singular que le aporta la propia lentitud del proceso de acetificación, que se ve favorecido por el simultáneo envejecimiento (Llaguno-Marchena y Polo, 1991).

3.2.5. Métodos industriales

Industrialmente, la fabricación de vinagre se puede llevar a cabo por diferentes métodos (Fig. 3.4 y 3.5), dependiendo del modo de cultivo de las bacterias acéticas, siendo éstos clasificados en:



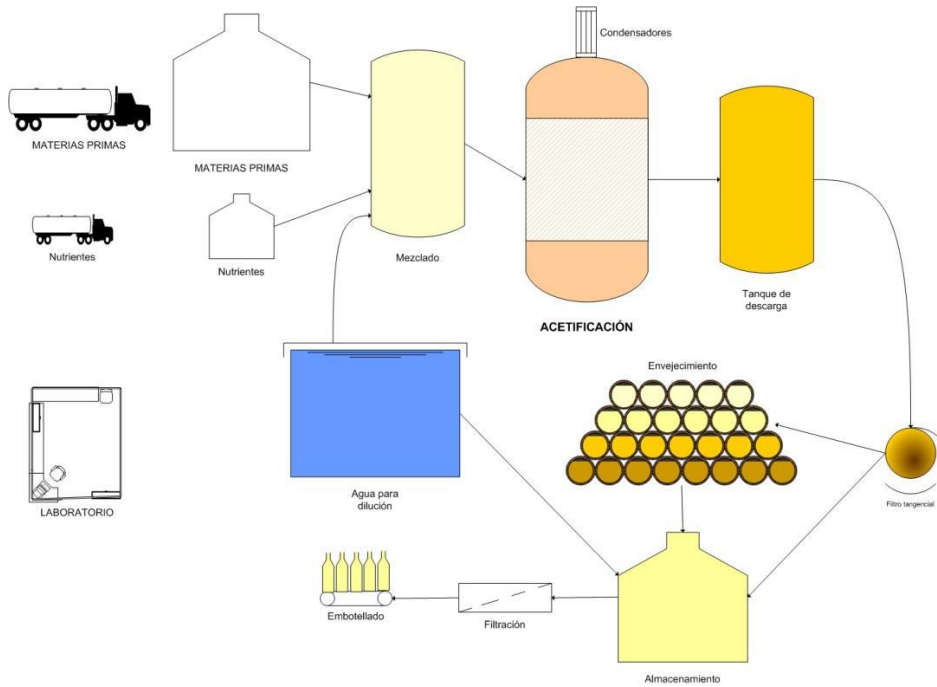


Figura 3.4. Proceso de fabricación del vinagre de vino.

Fuente: Elaboración propia.

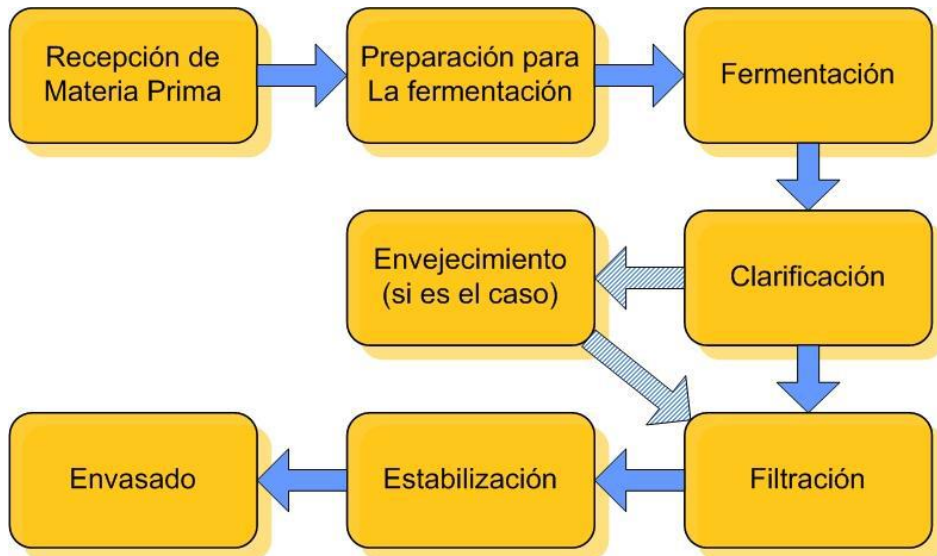


Figura 3.5. Diagrama de flujo de la fabricación industrial del vinagre.

Fuente: Elaboración propia.



- Cultivo superficial. Las bacterias se encuentran en contacto directo con el oxígeno gaseoso del aire o fijadas sobre soportes sólidos, normalmente virutas.
- Cultivo sumergido. Las bacterias se encuentran dispuestas en el seno del líquido a fermentar. Este procedimiento requiere el aporte continuo de oxígeno mediante la aireación del medio.

Asimismo, también se puede llevar a cabo un cultivo sumergido con células inmovilizadas. Este último caso pretende retener las células que se pierden en la descarga del fermentador acompañando al producto obtenido. Sin embargo, las elevadas velocidades de acetificación que pueden llegar a conseguirse no compensan, a nivel industrial, las dificultades encontradas para la transferencia de oxígeno y la baja acidez final obtenida (Kennedy et al., 1980; Ghommidh et al., 1982; Namba et al., 1985).

En los países mediterráneos se suelen usar biorreactores (fermentadores) con cultivo sumergido para elaborar el vinagre de vino (Fig. 3.6). El vinagre obtenido puede sufrir un proceso de envejecimiento en madera (barriles o barricas) o no, similar al proceso de envejecimiento del vino (García-García et al., 2009).



Figura 3.6. Fermentador industrial de vinagre.

Fuente: www.cetotec.com, 2019.



a) Método de fermentación sumergida:

El sistema sumergido fue puesto a punto por Hromatka y Ebner en 1949 (Davies, 2015). Representa una innovación que consiste en insuflar aire al recipiente donde se encuentra la materia prima, prescindiendo por tanto de los materiales que soportan el desarrollo bacteriano.

El aire inyectado, finalmente dividido en pequeñas burbujas, se distribuye homogéneamente por toda la masa a acetificar, ayudado mediante un dispositivo de agitación; así se cubre el requerimiento de las bacterias en oxígeno. Los modernos aparatos que aplican el sistema van provistos de camisa para una refrigeración controlada y un analizador de grado alcohólico conectado a un dispositivo que permite la descarga automática, cuando se alcanza el valor cero de alcohol (Suárez e Iñigo, 2008).

El método Frings es el más empleado actualmente para la elaboración del vinagre de Montilla-Moriles (Fig. 3.7). Mediante este método el vino se rebaja a 10º de alcohol, aproximadamente, y se somete a un proceso de acetificación mediante inoculación de cultivos puros de bacterias *Acetobacter*, hasta conseguir el grado de acetificación adecuado. Cada grado alcohólico del vino se convierte en un grado acético (López et al., 2003).



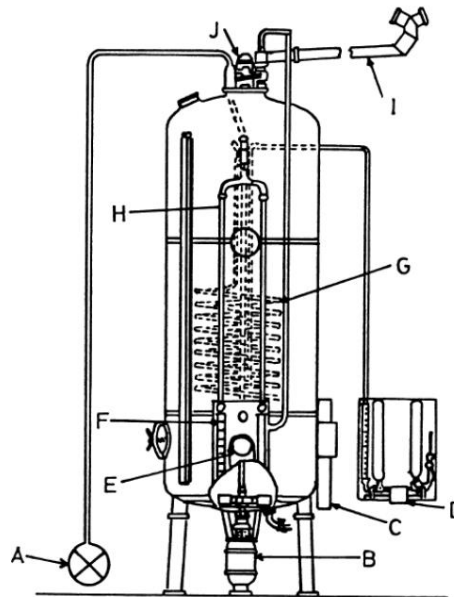


Figura 3.7. Esquema de Acetator FRINGS.

Fuente: Adams, 1985.

b) Métodos que utilizan células inmovilizadas:

En los últimos años ha tenido gran desarrollo la técnica de inmovilización de microorganismos y de enzimas. La fermentación continua con microorganismos inmovilizados, a diferencia de la semi-continua (Fig. 3.8), se caracteriza por el hecho de que las células microbianas no son eliminadas de los reactores donde se realiza el proceso, lográndose velocidades de transformación muy altas.

En los procesos que utilizan microorganismos libres y trabajan en discontinuo, como es el caso de la mayoría de los procesos de acetificación, durante las cargas y descargas alternativas se producen importantes descensos de la población microbiana. Esta circunstancia trae como consecuencia una disminución en la velocidad del proceso (Suárez e Iñigo, 2008).



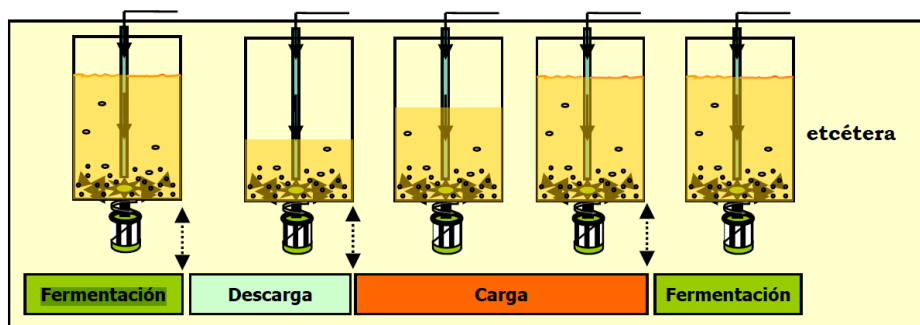


Figura 3.8. Diagrama de las etapas en un modo de trabajo semi-continuo.

Fuente: Elaboración propia.

Los métodos de inmovilización celular se pueden dividir en dos grandes grupos: inmovilización por unión al soporte, e inmovilización por atrapamiento (Suárez e Iñigo, 2008).

Los métodos de inmovilización por unión al soporte se clasifican desde el punto de vista de la naturaleza de las fuerzas de unión entre biocatalizador y soporte, y se dividen en: métodos químicos (unión covalente), y métodos físicos (unión iónica y adsorción) (Suárez e Iñigo, 2008).

La unión covalente implica la formación de un enlace covalente entre los grupos funcionales del biocatalizador y el soporte material (o matriz). Este método presenta ciertas desventajas en inmovilización celular. Las células vivas, al dividirse, no estarían unidas al soporte por lo que se perdería un sustancial número de ellas. Muchas veces se establecen enlaces covalentes entre las superficies celulares y las proteínas u otros compuestos poliméricos, mediante reactivos como el glutaraldehído, con lo que se forman agregados en los que las células quedan inmovilizadas por entrecruzamiento.

Por otra parte, la fuerte interacción con el soporte puede provocar la muerte celular, por lo que estos métodos se utilizan principalmente con células muertas que pueden, sin embargo, seguir reteniendo su actividad enzimática



La unión iónica se basa en las interacciones electrostáticas entre el biocatalizador y un soporte cargado, como podrían ser resinas de intercambio iónico, utilizándose fundamentalmente en la inmovilización de enzimas, o bien, en microorganismos por unión de unas células con otras formando agregados. La agregación celular se puede facilitar manipulando el pH o la fuerza iónica del medio, o adicionando floculantes.

3.2.6. Elaboración de vinagres pertenecientes a la DOP “Vinagre de Montilla-Moriles”

Los tipos de vinagres de Montilla-Moriles (Fig. 3.9) se obtienen exclusivamente a partir de vinos certificados de la DOP “Montilla-Moriles”, con adición o no de mostos de uva apagados con alcohol. Los mostos serán procedentes de uva pasificada o no, según el caso, de las variedades “Pedro Ximénez” o “Moscatel” e igualmente certificados de la DOP “Montilla-Moriles”.



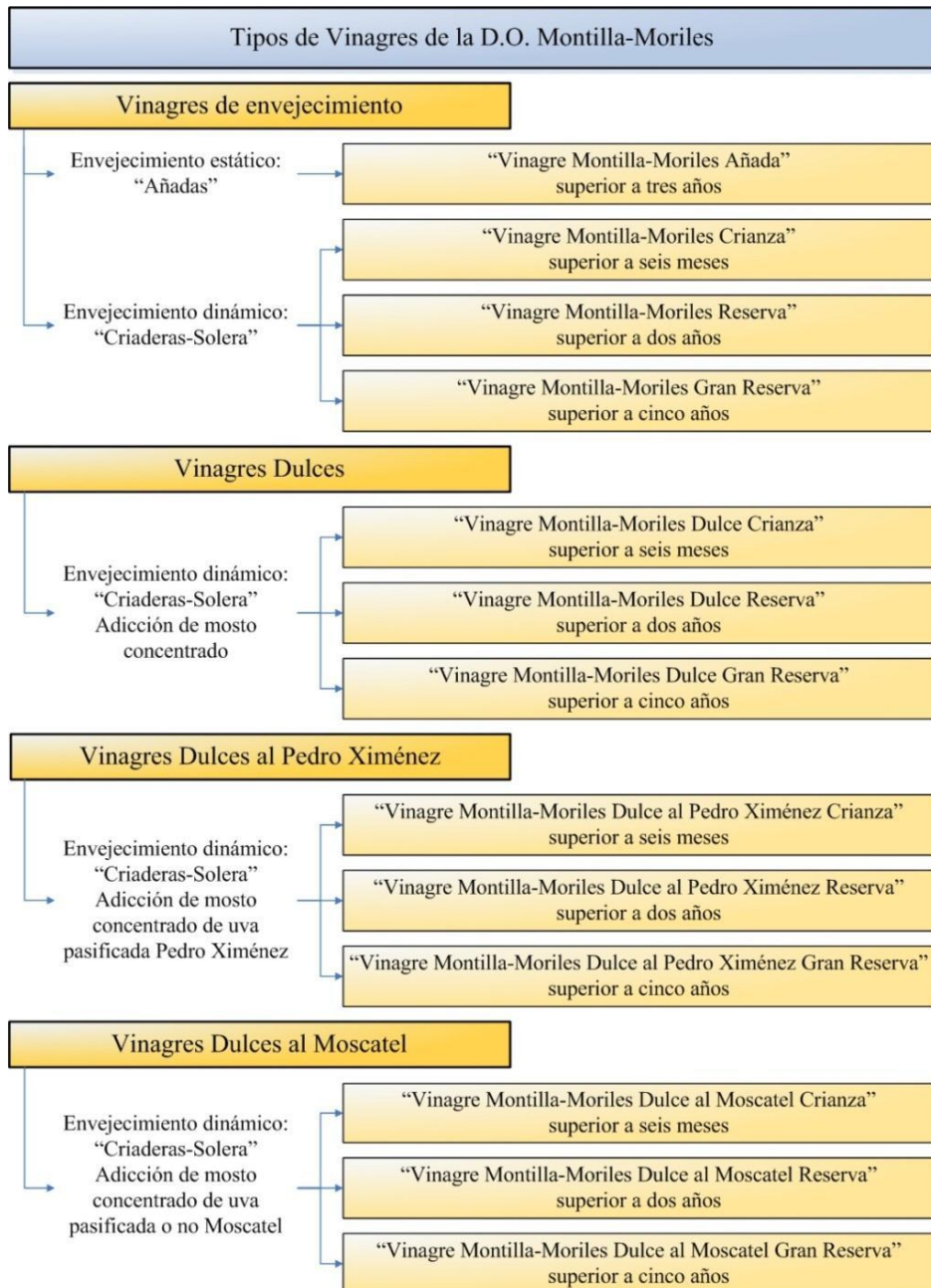


Figura 3.9. Tipos de vinagres de la Denominación de Origen Protegida "Vinagre de Montilla-Moriles".

Fuente: DOP "Vinagre de Montilla-Moriles", 2008



En la elaboración del “Vinagre de Montilla-Moriles”, el vino certificado por la DOP “Montilla-Moriles” es recepcionado por la bodega de elaboración de vinagre, y puede someterse a dos métodos de elaboración que se utilizan en la zona:

- Métodos tradicionales o en cultivo superficial: Estos métodos de fermentación lenta se caracterizan por la acción de bacterias acéticas que se encuentran en contacto directo con el oxígeno gaseoso, situadas en la interfase líquido/gas, como es el caso del método de Orleans descrito anteriormente y tradicional en la zona.
- Métodos industriales o en cultivo sumergido: Este sistema se basa en la presencia de un cultivo de bacterias sumergidas libremente en el seno del vino a fermentar, en el que constantemente se introduce aire (sólo o enriquecido con oxígeno) en condiciones que permiten la máxima transferencia posible desde la fase gaseosa a la fase líquida. El recipiente de acetificación consiste principalmente en un tanque cilíndrico de gran capacidad donde se introduce el vino que se somete a acetificación, sembrándolo con bacteria acéticas seleccionadas, y al que se inyecta aire finamente dividido en pequeñas burbujas, distribuyéndose homogéneamente mediante un dispositivo de agitación. Durante el proceso es necesario mantener una temperatura por debajo de 35 °C. Cuando el contenido del fermentador reduce la concentración de alcohol hasta 0,2% vol., se descarga entre el 40-45% del volumen de líquido, que se repone con nuevo vino. El vinagre elaborado se somete a diferentes tratamientos tecnológicos de clarificación, filtración y estabilización, que persiguen conseguir vinagres limpios y con mayor estabilidad, para una adecuada y segura salida al mercado.

El envejecimiento o crianza de los vinagres de la DOP “Vinagre de Montilla-Moriles” consiste en un proceso de oxidación en botas de madera de roble, el cual se realiza de dos formas:



- Sistema estático tradicional de “Añadas”, donde se confina el vinagre en toneles de madera y se somete a un envejecimiento oxidativo de forma estática, sin realizar mezclas, por lo que las características de los vinagres son intrínsecas a la añada en cuestión.
- Sistema dinámico tradicional de “Criaderas y Solera” (Fig. 3.10). Es un sistema de crianza dinámico, consistente en la extracción parcial o “saca” del vinagre de cada una de las botas, vasijas de madera que forman una escala o criadera con un determinado nivel homogéneo de envejecimiento, y la reposición o “rocío” con vinagre de otra escala o criadera más joven, utilizándose vinagre sin crianza para la reposición de la más joven. De esta forma en cada criadera siempre queda una proporción de todos los vinagres de las sucesivas añadas con las que se ha ido reponiendo la misma. La última criadera, en la que concluye el proceso de envejecimiento, recibe el nombre de “solera” y de ella se efectúa la saca del vinagre ya criado, que es el resultado de la homogeneización y envejecimiento prolongado de los vinagres de todas las añadas desde la que data dicha solera, hasta la última añada con la cual haya sido “rociada”.

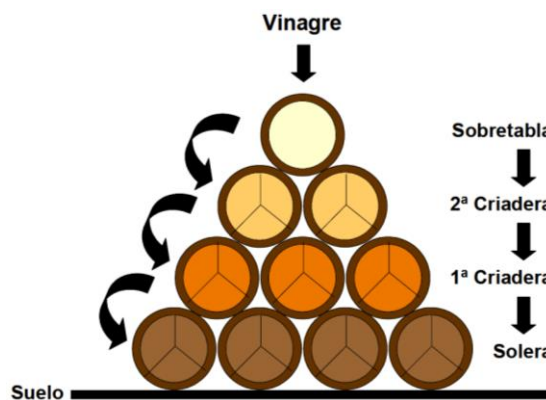


Figura 3.10. Envejecimiento de vinagres por el sistema de criaderas y soleras.

Fuente: Elaboración propia.



Atendiendo al tipo de elaboración particular y envejecimiento, en la zona Montilla-Moriles se pueden distinguir los siguientes vinagres:

- Vinagres de envejecimiento: aquellos que son sometidos a un determinado sistema y periodo de envejecimiento. Entre ellos se pueden distinguir: “Vinagre de Montilla-Moriles Añada” (envejecimiento estático superior a 3 años). Si el envejecimiento se realiza por el sistema dinámico de “criaderas y solera”, atendiendo al periodo de envejecimiento podemos distinguir: “Crianza” (periodo en madera como mínimo de 6 meses), “Reserva” (envejecimiento en madera mínimo de 2 años) y “Gran Reserva” (mínimo de 10 años de envejecimiento).

- Vinagres dulces: aquellos vinagres, que siendo envejecidos a través del sistema tradicional de “criaderas y solera”, tienen la peculiaridad de poseer una adición de mosto concentrado. Según la procedencia del mosto se distinguen los “Vinagres Dulces al Pedro Ximénez” (si el mosto procede de uvas pasificada “Pedro Ximénez”) y los “Vinagres Dulces al Moscatel” (si el mosto procede de uva pasificada o no de la variedad “Moscatel”). Estos vinagres dulces también se someten a envejecimiento en “criaderas y solera” obteniéndose vinagres “Crianza”, “Reserva” y “Gran Reserva”.

Los operadores inscritos deben tener un sistema de control que garantice la correcta separación de los productos protegidos de aquellos no protegidos por la DOP y se encuentren en las instalaciones inscritas para su almacenamiento, elaboración, envasado y comercialización, de manera que éstos queden perfectamente delimitados evitando así cualquier tipo de adulteración, mezcla o degradación de los productos amparados.



Para la introducción o mero almacenamiento en las bodegas inscritas de cualquier otro vinagre, distinto de los contemplados en el Reglamento de la DOP, se tiene que comunicar de manera expresa al Consejo Regulador, velando el mismo por la separación física y documental de dichos productos.

El embotellado de vinagres amparados por la DOP “Vinagre de Montilla-Moriles” debe ser realizado exclusivamente en las bodegas inscritas por el Consejo Regulador en sus registros, o incluidas en el correspondiente listado de envasadores de productos protegidos, o en su defecto en instalaciones que hayan sido autorizadas previamente por el Consejo Regulador. Los vinagres envasados únicamente pueden circular y ser expedidos por las bodegas inscritas en envases de vidrio u otros que no perjudiquen su calidad o prestigio, de capacidades autorizadas por la legislación correspondiente y debidamente aprobados por el Consejo Regulador. El Consejo Regulador llevará un inventario de envases autorizados.

En lo relacionado con los materiales aptos para la fabricación del envase con destino al consumidor final, sólo se admite el vidrio, la cerámica u otros materiales nobles de uso alimentario, que no modifiquen las características físico-químicas y sensoriales del producto.

Dentro del Pliego de Condiciones de la DOP “Vinagre de Montilla-Moriles” se encuentra también un listado de prácticas permitidas y no permitidas para este producto (BOE núm. 310, de 25 de diciembre de 2009).

a. Prácticas permitidas

- Para favorecer el proceso de almacenamiento y crianza se permite la adición de vinos protegidos por la DOP “Montilla-Moriles”, siempre que no supere el contenido alcohólico fijado.



- La adición de agua al vino para rebajar su grado y facilitar la acetificación, así como al vinagre protegido, siempre que no se haga en la fase de comercio minorista.
- El tratamiento con carbón animal purificado y carbón activo lavado para atenuar su color, a condición de que no dejen en los vinagres sustancias extrañas a éstos.
- Para favorecer el proceso de acetificación se permite el empleo de sustancias nutrientes, tales como el fosfato amónico, sódico o potásico y la adición de extracto de malta o levadura.
- El empleo de bacterias acéticas seleccionadas y cultivadas en estado de pureza.
- Tratamientos térmicos, tales como la pasteurización y la refrigeración.
- La centrifugación y filtración con o sin coadyuvantes tecnológicos autorizados para uso alimentario.
- La oxidación forzada por medio de aire u oxígeno puro, para facilitar la acetificación.
- La clarificación con albúminas animales, gelatinas, bentonita, taninos y demás productos clarificantes autorizados para uso alimentario.
- El empleo de anhídrido sulfuroso en dosis inferiores a 170 miligramos por litro, ya directamente en estado líquido o gaseoso a presión, o mediante la combustión de azufres o por solución de metabisulfito potásico o por medio de soluciones preparadas.
- El empleo de ácido cítrico cristalizado, con pureza mínima del 99% y en dosis tal que la riqueza total no exceda de 1 gramo por litro.

b. Prácticas no permitidas

- La adición de ácido acético procedente de materias distintas a las autorizadas en el pliego de condiciones, así como cualquier ácido mineral y orgánico, a excepción de los expresamente autorizados.



- La adición de alcohol durante el proceso de elaboración y envejecimiento del vinagre protegido.
- La mezcla de vinagres de la DOP con otros no pertenecientes a ella.
- La adición de materias colorantes, con excepción del caramelo de mosto.

3.3. Calidad físico-química de los vinagres de la Denominación de Origen Protegida “Vinagre de Montilla-Moriles”

Las características físico-químicas que deben cumplir los vinagres amparados en esta Denominación de Origen Protegida son los que se citan a continuación (BOE núm. 310, de 25 de diciembre de 2009):

- El contenido de alcohol residual no será superior al 3% en volumen.
- Acidez total mínima en acético de 60 g/l.
- El extracto seco soluble no será inferior a 1,30 g/l y grado de ácido acético.
- El contenido en cenizas estará comprendido entre 2 y 7 g/l, con excepción de los vinagres dulces que estará comprendido entre 3 y 14 g/l.
- El contenido de acetoína no será inferior a 100 mg/l.
- Para las categorías de vinagre dulce al Pedro Ximénez o al Moscatel, el contenido en azúcares reductores no será inferior a 70 g/l.

3.3.1. Métodos analíticos físico-químicos tradicionales de determinación de los principales parámetros de calidad en vinagre

La caracterización de los vinagres de vino ha sido dirigida, en la mayoría de los casos, a la autenticación de vinagres de calidad por su mayor valor económico.



La mayoría de las determinaciones analíticas oficiales descritas a continuación requieren la realización de una serie de etapas en su desarrollo: preparación de muestra, dilución, valoración, medidas instrumentales, etc.

A continuación, se describen los principales parámetros empleados para evaluar la calidad del vinagre y los métodos analíticos tradicionales utilizados para ello.

3.3.1.1. Acidez total

La acidez total se define como la totalidad de los ácidos volátiles (ácidos acético, propiónico, etc.) y fijos (ácido tartárico, láctico, cítrico, málico, succínico, etc.) que contiene el vinagre expresada en gramos de acético por 100 ml de vinagre. Según la Norma de Calidad para la elaboración y la comercialización de los vinagres (BOE num. 100, de 26 de abril de 2012), la acidez total, expresada en gramos de ácido acético por litro, debe ser como mínimo de 60 g/l en vinagres de vino. A este parámetro también se le denomina normalmente grado acético (°Ac.).

El método oficial de análisis está basado en una volumetría de neutralización establecido por Ministerio de Presidencia (BOE núm. 167, de 14 de julio de 1977).

Importancia enológica:

Los vinagres que destacan por su alta acidez total corresponden a vinagres con largos periodos de envejecimiento, como son los de crianza, donde se ha evaporado gran cantidad de agua. Sin embargo, también aparecen otros que no llegan al mínimo establecido por la Norma de Calidad del Vinagres. Estos bajos grados acéticos se deben, bien a que no ha terminado el proceso de acetificación, o bien a la adición reciente de vino fresco a las



criaderas, con lo que se ha diluido mucho su contenido en ácido acético (López et al., 2003).

3.3.1.2. Acidez fija

La acidez fija se define como la totalidad de los ácidos fijos que contiene el vinagre, expresada en gramos de ácido acético por 100 ml de vinagre. Este parámetro se utiliza para estimar la acidez volátil. La Norma de Calidad del Vinagre no establece niveles de acidez fija ni tampoco lo hace la DOP de Montilla-Moriles.

La determinación consiste en una volumetría de neutralización ácido-base con hidróxido sódico en presencia de un indicador coloreado. La determinación se efectúa mediante titración (BOE núm. 167, de 14 de julio de 1977).

Importancia enológica:

Para diferenciar el vinagre vínico del de alcohol, es muy útil la estimación de la acidez no volátil, que se atribuye a los ácidos no volátiles o fijos, más importantes en el vinagre vínico: ácidos tartárico, málico, succínico y málico.

3.3.1.3. Acidez volátil

En los métodos oficiales de análisis de vinagres se define convencionalmente como acidez volátil de un vinagre, la diferencia entre los valores de su acidez total y fija, expresadas ambas en gramos de ácido acético por 100 ml de vinagre. Su determinación se hace por diferencia entre la acidez total y la acidez fija (BOE núm. 167, de 14 de julio de 1977).

Importancia enológica:



Este es un parámetro utilizado en la determinación de fraudes en la composición de los vinagres. La relación acidez volátil (expresada en gramos de ácido acético/100 ml)/extracto seco (expresada en g/100 ml) es muy útil para comprobar si se trata o no de vinagres procedentes de materias primas fermentadas. Así, esta relación es baja, normalmente inferior a 8 cuando se analizan vinagres vínicos, y alta (10-100) si se trata de vinagres de alcohol (Guzmán, 1998).

Otra relación importante a la hora de detectar los fraudes en los vinagres es la relación acidez volátil/cenizas. La relación acidez volátil (expresada en gramos de ácido acético/100 ml)/cenizas (expresada en g/100 ml) no debe ser mayor de 40 ni menor de 10, según las experiencias realizadas por Llaguno-Marchena y Polo (1991).

Si un vinagre tiene un grado acético bajo y se le añade ácido acético de origen mineral, el contenido en cenizas y el extracto seco serán muy bajos y reflejarán esta práctica. Por el contrario, si se intenta aumentar el extracto seco mediante la adición de componentes no volátiles, los datos de contenido de cenizas serán anormales.

3.3.1.4. pH

El pH constituye una medida de los protones cedidos al agua por parte de las especies con actividad ácida en la muestra. Se define como el logaritmo decimal de la concentración de hidrogeniones, cambiado de signo, en la solución a analizar. Es una medida complementaria de la acidez total porque permite medir la fuerza de los ácidos que contienen. La determinación de pH se realiza mediante potenciometría.

Importancia enológica:



Durante el proceso de envejecimiento del vinagre se suele producir un descenso del pH inicial. No es normal encontrar valores muy inferiores a 3, ya que el desarrollo de las bacterias acéticas se dificulta mucho a pH inferiores.

3.3.1.5. Extracto seco

El extracto seco se define como el conjunto de todas las sustancias que, en condiciones físicas determinadas, no se volatilizan. Pueden estar presentes como ácidos fijos, taninos (especialmente en los vinagres envejecidos), carbohidratos, elementos minerales y materia colorante, entre otros componentes (Suárez e Íñigo, 2008). Las condiciones físicas deben fijarse de tal manera que las sustancias componentes del extracto sufran el mínimo de alteración (Panreac, 1999). Según la Norma de Calidad del Vinagre (BOE núm. 100, de 26 de abril de 2012) para los vinagres de vino el extracto seco no será inferior a 1,2 gramos/litro y grado de ácido acético, mientras que según la DOP “Montilla-Moriles” (BOE núm. 310, de 25 de diciembre de 2009) este valor será de 1,3 gramos/litro y grado de ácido acético.

La determinación del extracto seco se lleva a cabo mediante el método oficial de análisis publicado por el Ministerio de Presidencia (BOE núm. 167, 14 de julio de 1977).

Importancia enológica:

El objetivo principal de la determinación del contenido en extracto seco total es la detección de ciertos fraudes, como la dilución con agua o con una solución acuosa de ácido acético que sin embargo mantenga el grado acético inicial (valor de extracto seco total muy débil) o la adición de sustancias no volátiles, tales como la glicerina (valor de extracto seco total muy elevado) (Llaguno-Marchena y Polo, 1991).



Los valores máximos autorizados para extracto seco y cenizas se superan en la mayoría de los vinagres envejecidos (Troncoso y Guzmán, 1988). Los altos valores de estos parámetros para vinagres envejecidos se corresponden con: la materia prima, las técnicas de vinificación y la cesión de sustancias desde la madera, sin olvidar el proceso de concentración.

3.3.1.6. Cenizas

Se denominan cenizas de un vinagre al conjunto de los productos de incineración del residuo de evaporación de un volumen conocido del vinagre, realizada de manera que se puedan obtener todos los cationes en forma de carbonatos y otras sales minerales anhidras.

El método oficial de análisis es el método descrito en el BOE núm. 167, del 14 de julio de 1977, y establecido por el Ministerio de Presidencia (BOE, 1977).

Importancia enológica:

La determinación del contenido en cenizas es importante por motivos de control de fraude y porque a partir de las cenizas se determina el contenido en elementos minerales. Si un vinagre está muy diluido, y luego se le añade ácido acético mineral, esta práctica se reflejará en que el contenido en cenizas será anormal. La norma de calidad del vinagre establece un intervalo válido de 1 a 5 g/l, fuera del cual la situación es fraudulenta, salvo para el vinagre de alcohol (BOE núm. 100, de 26 de abril de 2012).

La relación extracto seco/cenizas, debe ser 3 como mínimo y 8 como máximo (Quiñones, 2006).

3.3.1.7. Polifenoles totales



Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios de las plantas y están presentes en hojas, frutos, semillas, corteza y también en la madera de vegetales. Si bien los compuestos fenólicos están presentes en la mayoría de las plantas, existe una enorme diversidad tanto cualitativa como cuantitativa entre las diferentes especies.

Están asociados con las características organolépticas de color, flavor y astringencia en los alimentos de origen vegetal (frutas, zumo, vino, etc.). Además, en la última década sus propiedades saludables han sido objeto de numerosos estudios (Villano et al., 2005; Fernández-Pachón et al., 2008). Hoy en día, se reconocen como un grupo de compuestos bioactivos con propiedades antioxidantes.

Los compuestos fenólicos presentes en la madera están involucrados especialmente en procesos de oxidación durante el envejecimiento, lo cual está relacionado directamente con el color y las propiedades organolépticas del vinagre (Labbé-Pino, 2007).

Se determina mediante el método del Índice de Folin-Ciocalteu descrito en el Diario Oficial de las Comunidades Europeas (Reglamento CEE núm. 2676/90, de 17 de septiembre de 1990. DOUE 272, 03/10/1990).

Importancia enológica:

La acetificación con cultivo superficial o sumergido juega un importante papel en la evolución posterior de los fenoles. La acetificación es un proceso aerobio en el cual el oxígeno es crucial para el crecimiento de las bacterias. La reactividad de los compuestos fenólicos y el oxígeno está relacionada con el pardeamiento de los vinos blancos y por la evolución de los antocianos, en el caso de los tintos. La composición fenólica de vinagres comerciales de acetificación rápida es muy diferente de la analizada para los vinagres de acetificación lenta. Los vinagres rápidos presentan un mayor



contenido de flavanoles, probablemente debido a que se utilizan vinos de sobreprensa para su elaboración. Por el contrario, los vinagres de acetificación lenta presentan mayor contenido en aldehídos fenólicos, ya que normalmente se elaboran en barriles de madera que ceden este tipo de compuestos al producto (García-Parrilla et al., 1998).

Las sustancias cedidas por la madera dependerán del tipo de madera y tueste, de la superficie de contacto, y del tiempo de envejecimiento. El proceso de envejecimiento mejora las propiedades del producto, tanto que es un criterio para diferenciar las distintas clases según la normativa.

El contenido de polifenoles es muy variable, pudiendo ofrecerse un intervalo muy amplio, 50-1000 p.p.m. Un contenido excesivamente escaso puede ser un criterio, junto con los valores encontrados para otros parámetros, que lo pueden confirmar, de que se trata de un vinagre de mala calidad.

Es muy importante en los vinagres de calidad, que alcanzan un elevado precio en el mercado, encontrar diferencias en la composición química que marquen los diferentes orígenes.

3.3.1.8. Color

La determinación del color se efectúa mediante los índices de Sudraud (1958) (intensidad y tonalidad o matiz). Cuanto mayor valor tenga este parámetro, más oscuro va a ser el vinagre, dentro de unos límites y no de forma proporcional. En este parámetro influyen tanto los pigmentos rojos (absorbancia a 520 nm) como los pigmentos amarillos y naranjas (absorbancia a 420 nm).

El método oficial de análisis está basado en una espectrometría en el rango visible definido en el Reglamento CEE núm. 2676/90, de 17 de septiembre de 1990 (DOUE, 1990).



Importancia enológica:

Como la tonalidad de un vinagre realmente expresa la proporción de color amarillo en relación con el rojo, lógicamente, cuanto más bajo sea el valor mayor es la tonalidad roja del vinagre. Por lo tanto, valores bajos de tonalidad indican que el vinagre está elaborado con vinos más oscuros. El paso por madera también hace que disminuya este parámetro. En este Trabajo, se han estudiado vinagres elaborados a partir de una variedad blanca, la característica de la zona, “Pedro Ximénez”.

Cuanto mayor sea la intensidad colorante, más oscuro va a ser el vinagre, dentro de unos límites y no de forma proporcional.

3.3.1.9. Grado alcohólico

Se entiende por grado alcohólico la cantidad porcentual, en volumen de etanol (alcohol etílico) presente en vinagre. Según la norma de calidad del vinagre el contenido en alcohol residual no debe ser superior al 1,5% v/v (BOE núm. 100, 26 de abril de 2012). Como excepción, el alcohol residual máximo de los vinagres con denominación de origen protegida (DOP) o indicación geográfica protegida (IGP) será el que se establezca en el correspondiente pliego de condiciones. En el caso de la DOP “Vinagres de Montilla-Moriles” el alcohol residual no será superior al 3 % en volumen (BOE núm. 310, de 25 de diciembre de 2009).

El método oficial de análisis para el grado alcohólico es el establecido por el Ministerio de Presidencia, descrito en el BOE núm. 207, 29 de agosto de 1979 (BOE, 1979).

Importancia enológica:

Durante el proceso fermentativo, se procura el mayor rendimiento posible de la transformación de etanol hasta ácido acético. No resulta rentable agotar el etanol, ya que entonces las bacterias acéticas, en ausencia de sustrato alcohólico, podrían degradar el ácido acético producido. Si los vinagres se fabrican por modernos sistemas industriales, lo normal es que al final se observe una pequeña concentración de etanol residual. Pero si intervienen métodos artesanales, como después sigue generalmente una fase de envejecimiento, no se desea agotar todo el etanol, que luego al reaccionar con el ácido acético (en un proceso lento) puede mejorar el buqué del vinagre por formación de ésteres como, por ejemplo, el acetato de etilo (Llaguno-Marchena y Polo, 1991).

3.3.1.10. Metanol

El metanol es un producto que se forma directamente en la fermentación, aunque se halla presente en pequeñas cantidades en los vinos. El metanol proviene de una hidrólisis enzimática parcial (pectinesterasa) de la pectina que produce ácido péctico y metanol.

En el caso del vinagre, la Norma de Calidad establece un límite de 0,5 g/l (BOE núm. 100, de 26 de abril de 2012). El método oficial de análisis es el método descrito en el BOE del 29 de agosto de 1979, Método del ácido cromotrópico, establecido por el Ministerio de La Presidencia (BOE, 1979).

Importancia enológica:

La ingestión de 10 ml de metanol puro puede conducir a ceguera, 30 ml a la muerte. Cantidades más pequeñas producen la “resaca” (Bourgeois et al., 2006).

La cantidad de metanol en vinagres de vino oscila entre 40-90 mg/l, en vinagres de sidra entre 40- 380 mg/l.



3.3.1.11. Acetoína

La acetoína es un compuesto que se origina en el vinagre por la acción de las bacterias acéticas sobre distintas sustancias como el 2,3-butilenglicol, ácido aspártico, glicerol, láctico, malónico y fumárico, entre otros. La Norma de Calidad del vinagre establece que en un vinagre vínico la concentración de este parámetro no debe ser inferior a 30 mg/l, sin delimitar un máximo. El Pliego de Condiciones de la DOP “Vinagre de Montilla-Moriles” establece un valor mínimo de 100 mg/l (BOJA núm. 249, Anexo III, 22 de diciembre de 2011).

El método oficial de análisis es el método descrito en el BOE núm. 167, de 29 de agosto de 1979, establecido por el Ministerio de La Presidencia (BOE, 1979).

Importancia enológica:

La acetoína o acetilmetilcarbinol, es un compuesto característico que se acumula durante el proceso de acetificación, muy útil para diferenciar vinagres de origen fermentativo, genuinos, de los vinagres artificiales, siendo mayor en los vinagres de vino (200-600 mg/l) (Troncoso y Guzmán, 1987).

El tipo de fermentación aplicada parece influir significativamente en la cantidad de acetoína formada. Así, en la fermentación con generadores rellenos de virutas de madera se forman cantidades de acetoína bastante superiores a las formadas en la fermentación sumergida (Quiñones, 2006).

3.4. Calidad sensorial de los vinagres

Si hablamos de calidad sensorial, hablamos de una cualidad que se ve afectada por la subjetividad; ya que, ésta, es determinada por los sentidos, y



cada individuo presenta umbrales sensitivos diferentes en función de cómo los percibe.

Por tanto, la percepción se puede considerar como la capacidad de los organismos para obtener información sobre su ambiente a partir de los efectos que los estímulos producen sobre los sistemas sensoriales, lo cual les permite interactuar adecuadamente con su ambiente.

Para determinar la calidad de los vinagres se utiliza un panel profesional de catadores los cuales analizan la calidad sensorial de cada muestra en función de una normativa o parámetros preestablecidos. Dado que los parámetros de calidad se ven afectados por la percepción de cada catador, es importante saber cómo varía esa percepción según cada individuo y cuáles son los factores por los que se ve afectada.

Los sentidos que intervienen en la cata son la vista, el olfato, el gusto y el tacto, según se refleja en la Tabla 3.1. No obstante, el oído puede estar entre los sentidos implicados en la cata ya que, el sonido al caer en la copa acompaña a la cata. Sin embargo, no es un sentido preponderante en la cata y a veces puede resultar hasta molesto, ya que interfiere en los demás sentidos disminuyendo la atención (Peynaud, 1987).



Tabla 3.1. Sentidos utilizados en la cata de vinagre

Órgano	Sentido y sensaciones	Caracteres percibidos	Carácter analizado
Ojo	Vista Sensaciones visuales	Color, limpidez, fluidez	Aspecto
Nariz	Olfato (vía nasal directa) Sensaciones olfativas	Aromas, <i>bouquet</i>	Olor
Boca	Olfato (vía retronasal) Sensaciones olfativas	Aroma de boca	
	Gusto Sensaciones gustativas	Sabor y gusto	Gusto complejo
	Sensibilidad química	Astringencia, causticidad, burbujeo	
	Sensibilidad táctil	Consistencia	Tacto
	Sensibilidad térmica	Temperatura	

Fuente: Peynaud, 1987.

El primer sentido que interviene es el de la vista. Por ella sabemos de la limpidez y del color del vinagre, de su intensidad y matiz. La primera impresión es importante porque puede influir en las siguientes: inevitablemente el catador se predispone contra un vinagre turbio o de color anormal, así el color oscuro de un vinagre blanco delata su oxidación (López, 1998). En fase visual también se puede apreciar de forma aproximada el grado de azúcar residual del vinagre que se está catando. Al usarse reducciones de vinagre (“arope”) para su elaboración, este queda impregnado en las paredes de la superficie y en la parte superior de la copa mojada se forma una delgada capa de líquido coloreando la copa.



El segundo sentido interesado es el del olfato, que es muy importante en la cata. El olfato reconoce y clasifica los productos volátiles de las moléculas difundidas en el aire, a condición de que sean solubles en la mucosa olfativa y estén dotadas de olor. La mucosa pituitaria es muy sensible a los vapores irritantes, buena prueba de ello se tiene al oler un vinagre con un contenido elevado de anhídrido sulfuroso.

Las sustancias aromáticas pertenecen a diversas familias químicas: alcoholes, aldehídos, cetonas, ácidos, ésteres, terpenos y otros compuestos. Dentro de una misma serie, las sustancias tienen un coeficiente de volatilidad tanto más importante cuanto más voluminosa es su molécula y más elevado su número de átomos de carbono. Los alcoholes con mayores moléculas son los más volátiles y los más aromáticos. Paradójicamente, las sustancias más ligeras son las menos volátiles. Esta ley es válida hasta diez átomos de carbono; por encima de este número las sustancias son poco volátiles y tienen menos olor. Para un mismo radical carbonado, los ésteres son más volátiles y más aromáticos que los aldehídos, que a su vez son más volátiles que los alcoholes y los ácidos son los menos volátiles y menos aromáticos. (Cedrón-Fernández, 2004).

Las sustancias volátiles que componen el olor del vinagre son innumerables. Por cromatografía de gases se han detectado más de quinientas, de las que se han identificado menos de la mitad. Cuantitativamente se pueden valorar unas sesenta.

Los aromas suelen clasificarse en tres grupos:

- Primarios o varietales: son aquellos que proceden de las variedades de uvas con que se haya elaborado el vino transformado en vinagre.
- Secundarios: son aquellos que proceden de la fermentación alcohólica y acética.
- Terciarios o bouquet: son los aromas debidos al envejecimiento y la crianza.



Las sensaciones percibidas cuando el vinagre se introduce en la copa no pertenecen exclusivamente al sentido del gusto, ya que también participa en gran parte el olfato, por la denominada vía retronasal, es lo que se suele denominar aroma gustativo o aroma de boca. Los órganos receptores gustativos estimulables por las sustancias sápidas del vinagre están localizados en la lengua. Las demás zonas de la cavidad bucal son prácticamente insensibles al gusto y sólo recogen sensaciones táctiles y térmicas. Existen cuatro sabores elementales: amargo, ácido, dulce y salado. Todos los sabores, puros o mezclados, se clasifican dentro de estas cuatro categorías.

No todos los sabores tardan el mismo tiempo en apreciarse ya que para que una sustancia sea sávida debe ser soluble en la saliva. Cuando se cata un vinagre que contiene en disolución los cuatro sabores elementales, éstos no se perciben al mismo tiempo. Se dice que el tiempo de reacción, de excitación, es diferente según los gustos y evolucionan de forma distinta. El sabor dulce se percibe de forma inmediata una vez en contacto con la lengua, la reacción es prácticamente instantánea. La intensidad del sabor dulce alcanza su máximo en cuanto transcurre el primer segundo, disminuyendo luego progresivamente para desaparecer pasados unos diez segundos. Los sabores salados y ácidos se perciben también rápidamente, pero tienen mayor grado de persistencia. En cuanto al gusto amargo es lento en su desarrollo, pero aumenta y se mantiene más tiempo en la boca, incluso una vez retirado el líquido de ésta. Las primeras impresiones recibidas son muy diferentes de las últimas. Se pueden distinguir tres fases: en la primera denominada de ataque, de dos o tres segundos de duración, predominan los sabores dulces; en la segunda denominada de evolución, con una duración de entre cinco y doce segundos, aparecen los tres sabores restantes: ácido, salado y amargo; en la fase final predominan los ácidos y amargos (Peynaud, 1987).

La función del tacto es importante; por él se conoce el grado de temperatura, la consistencia, la viscosidad, la untuosidad y el cuerpo de un



vinagre. Incluso determinados “gustos” son en realidad sensaciones táctiles, reacciones de las mucosas de la cavidad bucal, como por ejemplo la causticidad y el calor del alcohol y la astringencia de los taninos.

3.4.1. Percepción del aroma

Para que una sustancia produzca sensación de olor debe alcanzar la pituitaria amarilla en cantidad suficiente para desencadenar una respuesta a que recoja el cerebro. Esto difícilmente puede lograrse si la sustancia no es relativamente volátil por lo que se puede considerar que las sustancias no volátiles son inodoras y que las sustancias responsables del aroma tienen volatibilidad contrastada. Como consecuencia inmediata, el estudio del aroma se ha orientado durante muchos años al conocimiento de la composición química de sus componentes volátiles (Callejón et al., 2009).

En general, el aroma de cualquier materia está compuesto por uno o más compuestos volátiles que están presentes en concentraciones superiores a las de su umbral de detección olfativa en su correspondiente matriz (Delahunty et al., 1996). Este umbral de detección se define como la concentración mínima de la sustancia capaz de ser percibida por la media de la población (Meilgaard et al., 1999). Así, sustancias con un umbral de detección muy bajo pueden contribuir enormemente al aroma, aún en concentraciones muy bajas, y es posible que otras sustancias presentes en concentración muy alta no contribuyan al olor, al ser su umbral de detección muy alto. Por tanto, para poder comprender la contribución de cualquier compuesto volátil sobre el aroma, no basta con saber si ese compuesto está presente o ausente, sino también conocer cómo se percibe ese compuesto a una concentración dada (Delahunty et al., 1996).

Se puede distinguir entre compuestos que participan (aromas activos) y que no participan (aromas inactivos) en el aroma global del producto, según el valor de actividad aromática de un compuesto (VAO) en una matriz



determinada, que se define como relación entre la concentración de la sustancia y su umbral de olfacción y se expresa en unidades de aroma (Ferreira et al., 2003; Zeller y Rychlik, 2007). Se considera que una sustancia no participa en el aroma si su valor de aroma es menor que la unidad, y si que lo hace cuando dicho valor es mayor a uno, siendo la participación tanto mayor cuanto mayor es el valor del aroma (Grosch, 1994).

La aplicación de los conceptos y datos de valores de actividad aromática debe hacerse con precaución ya que, si bien permite juzgar de una manera objetiva la contribución de los distintos compuestos aromáticos, no tiene en cuenta ciertas limitaciones: fundamentalmente no considera los efectos sinérgicos y antagónicos de los odorantes, y no tiene en cuenta la ley psicofísica de percepción o ley de Stevens (Stevens, 1957). El valor de la actividad aromática supone que la percepción es directamente proporcional a la intensidad del estímulo, y eso no es correcto.

3.4.2. Percepción del gusto

Las moléculas relacionadas con el gusto tienen un papel importante tanto en la cavidad bucal, como también en otros tejidos relacionados con el tracto respiratorio, el estómago, los intestinos, el páncreas, el hígado, los riñones y el cerebro (Yamamoto e Ishimaru, 2013). El sistema del gusto humano funciona como un guardián del sistema digestivo para asegurar el consumo de nutrientes esenciales para la supervivencia y el funcionamiento del organismo, al tiempo que se rechazan los alimentos potencialmente dañinos o tóxicos (Simón et al., 2006).

El avance en el estudio de los receptores gustativos ha llevado a aceptar la existencia de cinco gustos básicos: dulce, salado, ácido, amargo y umami (Jinap y Hajeb, 2010; Foster et al., 2014). Pruebas psicofísicas de umbrales de detección demuestran la existencia del gusto a grasa, ocasionado por ácidos



grasos de diferente longitud de cadena (Mattes, 2009) y diferente saturación como el esteárico, el oleico y el linoleico (Chale-Rush et al., 2007).

3.4.3. Percepción del color

En el caso de la modalidad visual, la percepción puede entenderse como la obtención de conocimiento del mundo físico que nos rodea a partir de la disposición óptica, es decir, el complejo patrón de la luz reflejada por los diferentes elementos que lo componen.

El resultado de la percepción (información sobre el entorno) es algo muy distinto de aquello de lo que se parte (la disposición luminosa concreta que en cada momento llega a los ojos). Es por ello, que como otros muchos aspectos denominados "cognitivos", la percepción puede entenderse como procesamiento de información: una serie de operaciones que transforman un elemento de entrada (la luz) en otro de "salida" (información sobre el entorno).

En la percepción del color de los seres humanos influyen cinco factores. Estos son:

- La longitud de onda: definida como la distancia entre dos picos consecutivos de una onda. El color blanco refleja por igual todas las longitudes de onda del espectro visible. El color negro absorbe todas las longitudes de onda del espectro visible. Cuando un objeto absorbe algunas longitudes de onda y refleja otras, se dice que ha tenido lugar una reflexión selectiva. La cantidad de luz reflejada por una superficie es la reflectancia.
- El área circundante: La apariencia de un color puede cambiar según el color de las áreas circundantes, el color de una superficie viene determinado no sólo por la luz que refleja (longitud de onda e intensidad), sino también por la luz reflejada por las superficies próximas o adyacentes.



- El estado de adaptación del observador: la percepción del color también puede variar mediante la adaptación, que puede ser a la luz, que hace disminuir la sensibilidad de los conos; a la oscuridad, que hace aumentar la sensibilidad de los conos; selectiva a un color o rango estrecho de longitud de onda, tras lo cual el color al que hemos adaptado un ojo (exposición durante 1 minuto) se percibirá con menor brillo y saturación que el mismo color visto con el ojo no adaptado.
- La cantidad de iluminación que incide sobre el objeto da lugar a que lo percibamos con mayor o menor brillo. Por ejemplo, ante una camisa blanca los sujetos afirman que es blanca tanto a la luz del sol como ante la débil iluminación de la luz de la luna, aunque, en este segundo caso, la perciben mucho más oscura. La tendencia a percibir los objetos con un color constante, a pesar del cambio en las condiciones de iluminación recibe el nombre de constancia del color.
- La porción de la retina sobre la que incide el estímulo distal, dado que, por la composición del ojo, dependiendo de la zona, cambia el estímulo.

3.4.4. Proceso de cata

Entre los criterios de calidad de la mayoría de los alimentos, según se refleja en el Código Alimentario (Presidencia del Gobierno, 1967), se hace referencia a sus características organolépticas. Ello pone de manifiesto que en el control de calidad de cualquier alimento es imprescindible recurrir al análisis sensorial. El análisis sensorial consiste en examinar los caracteres organolépticos de un producto, en nuestro caso el vinagre, por los sentidos.

Es normal en Enología utilizar el término cata como sinónimo de análisis sensorial. Sin embargo, para los puristas los dos términos no son exactamente lo mismo. Ellos consideran que la cata es un caso particular de



otra prueba más general, que es el análisis sensorial, definida como “conjunto de métodos y técnicas que permiten percibir, identificar y apreciar mediante los órganos de los sentidos, cierto número de propiedades llamadas organolépticas de los alimentos” (Peynaud, 1987).

Hoy día el término cata tiene numerosas definiciones; una forma muy restrictiva es aquella que define la cata como la apreciación, mediante el sentido del gusto y el olfato, de las cualidades de un producto. La Asociación Francesa de Normalización mediante la normativa internacional (ISO 3591-1977, ISO, 1977) define la cata como la operación que consiste en experimentar, analizar y apreciar los caracteres organolépticos de un producto.

Una de las definiciones más aceptada en Enología corresponde a Ribéreau-Gayon y Peynaud (1961) quienes definen que “catar es probar con atención un producto cuya calidad queremos apreciar, es someterlo a nuestros sentidos, en particular al del gusto y al del olfato; es tratar de conocerlo buscando sus diferentes defectos y sus cualidades, con el fin de expresarlos; es estudiar, analizar, definir, juzgar y clasificar”. Es una definición muy completa y precisa ya que marca perfectamente las cuatro fases del acto de catar: la observación por medio de los sentidos, la descripción de las percepciones, la comparación con relación a normas determinadas y el juicio razonado.

Para realizar su cata es importante conocer al producto en sí y del mismo modo sus principales descriptores, ya que como en todos los análisis es necesario básicamente conceptualizar, abstraer, describir y sistematizar para poder evaluar del mejor modo posible.

La cata puede tener varias formas según los casos, puede ser simple y limitada o bien, detallada y profunda. Se puede catar para determinar el tipo de vinagres; en este caso, para valorar su calidad, para estimar su valor comercial, reconocer su origen, para comparar vinagres entre sí, para clasificarlos, para



estudiar el efecto de determinadas prácticas o tratamientos, o bien simplemente por el placer de beber. Se puede hablar, por tanto, de dos tipos de cata:

- Cata hedonista: es una apreciación global, que tiende a explicar el placer o desagrado experimentados al probar un vinagre.
- Cata analítica: es una cata detallada y profunda para apreciar los diferentes defectos y virtudes del vinagre, clasificarlo y juzgarlo.

La cata de vinagres puede realizarse como consumidor aficionado o como profesional. Los primeros buscan la satisfacción que proporciona la cata y se rodean de las condiciones en las que se valoran mejor las cualidades del producto a la temperatura más adecuada, en un ambiente cómodo y relajado, e incluso en el transcurso de una comida. El profesional, sin embargo, cata con espíritu crítico, buscando eventuales defectos, apreciando las cualidades, identificando variedad, técnicas de elaboración y crianza, es decir, juzgando y clasificando ese producto (Galán Soldevilla et al., 2015).

En los últimos años la cata ha tomado gran importancia en la elaboración y en control de calidad de los vinos y vinagres y es el complemento perfecto e insustituible de su análisis físico-químico. En las Denominaciones de Origen Protegidas (DOP) los vinos y vinagres para ser calificados deben superar un comité de calificación que determine que ese producto tiene las características y calidades de esa DOP.

Dentro de lo que son las catas, el vinagre suele ser bastante complejo para analizar, tanto sea desde su perspectiva más descriptiva (en la que el sujeto analiza con la finalidad de reconocer y detectar todos los estímulos posibles) hasta el análisis más discriminativo, en el que se comparan y diferencian entre algunas de las muestras.

El vinagre resulta un producto difícil de catar, debido a las sensaciones intensas que provoca. El alto contenido en acético tiende a enmascarar el resto



de los aromas y se precisa cierta familiarización con el producto para proceder a su cata. De hecho, no existe siquiera consenso en cómo ha de catarse el vinagre. El análisis sensorial requiere un panel bien entrenado y la elección de atributos concretos que sean útiles para diferenciar muestras con el mayor grado de aciertos posibles (Tsfaye et al., 2002).

Entre los aspectos sensoriales del vinagre se tiene en cuenta su color, si es brillante u opaco, más claro o más oscuro, su limpidez, si sus aromas se presentan agresivos, pungentes, acéticos, vinosos, ahumados, persistentes, frutal, floral o herbáceo y en boca si el contenido de ácido acético oculta los demás sabores, si tiene mucha acidez o es equilibrado, su sensación punzante, si tiene robustez y finalmente si la última impresión es armoniosa y equilibrada para definir ciertamente si la muestra presenta valorados atributos.

En cuanto al entrenamiento del panel, se utilizan disoluciones de diferentes concentraciones de los compuestos más característicos del vinagre de vino, preparadas en 7% de ácido acético para conseguir percibir una sensación similar al vinagre en sí mismo. Debido a la agresividad del ácido acético se ha establecido que el número de muestras que se pueden examinar en cada sesión es de cuatro y que los replicados se debían de hacer en diferentes días, para no agotar a los catadores (Tsfaye et al. 2009).

El análisis descriptivo de las muestras se basa en evaluar los atributos previamente seleccionados por el panel. Los atributos más utilizados para describir las muestras de vinagre son: color, intensidad aromática, olor a madera, olor herbáceo, olor a frutas, olor a acetato de etilo, olor a vino, sensación punzante (Tsfaye y Troncoso, 2010).

Lo cierto es que la cata de vinagre suele aportar ciertas semejanzas con la del vino en cuanto a la estructura y su consideración temática de métodos empleados, y se lo puede catar de dos formas, con una cuchara blanca, preferentemente de cerámica, o pipeta transparente, en las que si bien no se



expresan tanto los aromas, se puede servir una buena medida del vinagre para probar bien en boca, o en las tradicionales copas de vino de degustación que permite inclinar la copa, y luego ver su color, viscosidad, limpidez, percibiendo aromas y sabores que nos expresen un panorama organoléptico general del vinagre.

3.5. La tecnología NIRS para el control de calidad y trazabilidad en vinagres

El descubrimiento de la región espectral del infrarrojo cercano se atribuye a Sir William Herschel, cuando en 1800 haciendo pasar la luz solar por un prisma tomó la temperatura de la región contigua a la zona rojiza del espectro visible (Herschel, 1800). El termómetro demostró la existencia de una forma de luz invisible más allá del color rojo. Sin embargo, el desarrollo y aplicación de métodos espectroscópicos para la resolución de problemas analíticos se demoró algunos años, debido a las características espectrales de lo que se conoce hoy en día como región NIR. No fue hasta 1881 cuando Abney y Festing documentaron los primeros espectros NIR de líquidos orgánicos en el intervalo espectral de 700 a 1200 nm. En 1954, Wilbur Kaye demostró el potencial de esta técnica con fines analíticos.

El primer impulso importante no fue hasta la década de los 60, cuando Karl Norris (Birth y Norris, 1958) empezó a usar esta técnica para el estudio de matrices complejas de origen vegetal. Sus trabajos se orientaron en el campo agroalimentario e impulsaron el interés por la espectroscopía NIR.

Los avances en el campo de la electrónica y la óptica proporcionaron, a partir del año 1970, la aparición de nuevos instrumentos que permitirían el registro de los espectros completos, con una mayor rapidez y reproducibilidad (Henry, 1999). Otro aspecto clave en el desarrollo de la técnica fueron los avances acaecidos en el campo de la informática; la posibilidad de usar ordenadores con mayor y mejor capacidad de cálculo permitió obtener y



almacenar una gran cantidad de información espectral, que a la vez podía ser tratada con las técnicas quimiométricas implementadas en los equipos, extrayendo así la información analítica relevante.

En la Espectroscopía de Reflectancia en el Infrarrojo Cercano (NIRS) la radiación infrarroja penetra muestras sin preparación, modificación o dilución (Nikolich et al., 2001) siendo una técnica que se caracteriza por ser no destructiva, no contaminante, rápida y que permite la determinación simultánea de varios compuestos. La determinación de propiedades de índole cualitativa y cuantitativa se aplica a una gran variedad de sectores productivos y es una alternativa a los análisis tradicionales de laboratorio para el control de calidad de alimentos (Osborne et al., 1993; Thyholt e Isaksson, 1997; Williams y Norris, 2001; Cen y He, 2007; Cozzolino et al., 2007; Nicolaï et al., 2007; Shiroma y Rodríguez-Saona, 2009; Bobelyn et al., 2010; Lee et al., 2011; Lin et al., 2011; Sánchez y Pérez-Marín, 2011; Jamshidi et al., 2012; Sánchez et al., 2013; Zhang et al., 2013; Marín-Darias, 2015).

3.5.1. Bases teóricas

La tecnología NIRS se basa en la absorción producida cuando la radiación procedente del infrarrojo cercano, comienza a vibrar a la misma frecuencia específica que los enlaces moleculares de la muestra en cuestión (Shenk et al., 2008).

Un haz de luz incide sobre la muestra a analizar, la cual en función de los enlaces X-H presentes, correspondiendo X a átomos de carbono, oxígeno o nitrógeno, interaccionará con ellos absorbiendo una determinada radiación electromagnética en el rango del infrarrojo cercano, de 780 a 2500 nm (Shenk et al., 2008).

Cuando la luz incide en una muestra, una parte de los fotones puede transmitirse a través de la misma, y el resto se absorbe por algunos enlaces



covalentes que actúan como resortes oscilantes, acoplados con la frecuencia o longitud de onda exacta de la radiación lumínica (Mieres et al., 2000; Cajarville et al., 2003). Debe producirse un cambio en el momento dipolar de la molécula como consecuencia de su vibración. Al absorber energía, los enlaces de las moléculas vibran en dos formas fundamentales: se extienden, aumentando la distancia interatómica a lo largo del eje entre dos átomos (lo que ocurre a frecuencias más altas o a menor longitud de onda), o se doblan (a frecuencias más bajas o mayor longitud de onda) cambiando el ángulo de enlace entre dos átomos (Workman, 1996).

Cuando se trata de especies homonucleares (H_2 , O_2 , N_2), el momento dipolar no se altera durante la vibración o rotación y, en consecuencia, este tipo de compuestos no absorben en el infrarrojo (Skoog et al., 2001).

Las vibraciones moleculares son el origen de las bandas de absorción fundamentales en la región del infrarrojo medio, mientras que en el infrarrojo cercano se localizan bandas de absorción que se corresponden con sobretonos y combinaciones de las bandas fundamentales (Miller, 2001; Benson, 2003).

Existen distintos tipos de interacción de la luz monocromática producida por un instrumento NIRS con el material a analizar. Así, se pueden producir los siguientes fenómenos: reflexión, refracción, absorción, difracción y transmisión (Shenk et al., 2008).

Dentro de la reflexión o reflectancia, se puede distinguir entre la reflectancia especular y la reflectancia difusa. La primera de ellas se refiere a la radiación incidente que cambia su dirección al llegar a la superficie de la sustancia, por tanto, no aporta información alguna sobre el producto irradiado. La reflectancia difusa, sin embargo, corresponde a la parte de la luz incidente que llega a la muestra, penetra unos milímetros en la misma y es dispersada debido a las interacciones con las partículas que contiene la muestra; ésta sí contiene información sobre la muestra (Dahm y Dahm, 2001).



La radiación dispersa se refiere a aquella parte de la luz incidente que interacciona con la muestra pero que en su movimiento a través de la misma, en múltiples direcciones, no llega a ser reflejada y, por tanto, no alcanza los detectores (Dahm y Dahm, 2001).

Los instrumentos NIR, previamente calibrados, realizan una comparación entre ambas energías, la incidente y la reflejada de manera difusa, siendo capaces de relacionar dicho cociente con la concentración de un constituyente determinado, ya que los grupos funcionales que absorben radiación NIR están a su vez relacionados con las características químicas, físicas y sensoriales del producto (Birth y Hecht, 1987; Shenk y Westerhaus, 1995a; Olinger et al., 2001).

La tecnología NIRS se basa en la conocida ley de Lambert-Beer, que establece que la absorbancia a cualquier longitud de onda es proporcional al número o concentración de moléculas absorbentes presentes en el camino recorrido por la radiación (Murray, 1993). Por ello, los valores de absorbancia obtenidos de una muestra se pueden relacionar con la concentración de especies existentes en la muestra, siempre y cuando absorban radiación NIR.

La representación de los valores de absorbancia a las diferentes longitudes de onda del rango NIR da lugar a una curva denominada espectro NIR el cual es el resultado de los diferentes sobretonos, bandas de combinación y absorciones electrónicas de radiación de los grupos funcionales presentes en las moléculas de la muestra (Burns y Ciurczak, 1992; Shenk y Westerhaus, 1995a; Bertrand y Dufour, 2000).

Los espectros NIR resultantes son muy complejos de interpretar. El hecho de que varios enlaces moleculares estén involucrados en los diferentes tipos de absorciones de la radiación NIR, significa que dichas absorciones pueden ser utilizadas para aportar información analítica de los enlaces



moleculares o de grupos funcionales específicos (Williams y Norris, 2001; Burns y Ciurczak, 1992; Shenk y Westerhaus, 1995a; Naes et al., 2004). Para poder extraer dicha información de los espectros NIR se hace necesario el uso de métodos de análisis multivariante.

Para extraer información química relevante y singular de cada muestra, es necesario recurrir al uso de algoritmos matemáticos de pretratamiento de la señal espectral (Bertrand y Dufour, 2000). Como consecuencia de la radiación dispersa o efecto “Scatter”, de acuerdo con la teoría de Kubelka-Munck (1931) que establece la relación entre la radiación incidente, reflejada y dispersada, en los espectros NIR se pueden encontrar efectos aditivos, efectos multiplicativos y curvaturas de la línea base, la cual es definida por Bertrand y Dufour (2000) como la línea que une los puntos del espectro para los cuales no se observan picos de absorción.

Los efectos aditivos provocan espectros idénticos, pero desplazados verticalmente, manteniéndose paralelos, mientras que los efectos multiplicativos provocan desplazamientos verticales proporcionales al valor de la absorbancia en cada punto del espectro original. La curvatura de la línea base es un efecto específico de cada espectro, por lo que requiere una corrección individual para cada uno (Fernández de Simón et al., 2003).

A pesar de todas las ventajas que presenta esta tecnología, conviene conocer las fuentes de error con el fin de minimizar su efecto. Dichas fuentes de error fueron clasificadas por Williams y Norris (2001) en los siguientes grupos:

- a) Relacionados con el instrumento (relación señal/ruido, exactitud y precisión en la longitud de onda, linealidad de la señal, tipo y tamaño de la cápsula, etc.).
- b) Relacionados con la muestra (homogeneidad, densidad, textura, granulometría, estabilidad ante fluctuaciones en temperatura, etc.).



- c) Operacionales (preparación de muestra, errores del analista, estrategias y procedimientos estadísticos empleados, etc.).

La selección de las muestras para la calibración, la preparación de dichas muestras y el método de laboratorio tomado como referencia son los errores más significativos y frecuentes (Williams y Norris, 2001).

3.5.2. Instrumentación

Los instrumentos NIRS permiten registrar el espectro, tanto de muestras sólidas como de líquidas o gaseosas. La versatilidad en cuanto al tipo de producto y atributo es una de las características de esta tecnología. La variabilidad en la presentación de la muestra conlleva que exista una gran variedad de accesorios para presentar la muestra al instrumento. La naturaleza y tipo de producto condicionan el modo de análisis más apropiado.

Existen distintos modos de análisis NIRS dependiendo de la disposición de los detectores con respecto a la forma de presentación de la muestra, conocidos como transmitancia, reflectancia, transflectancia e interactancia (Shenk y Westerhaus, 1995a).

En el caso de la transmisión, la luz incidente ilumina un lado de la muestra, y la luz transmitida a través de la misma puede ser detectada por los detectores situados en el lado opuesto. El uso más común de este sistema es para analizar sólidos de baja densidad, muestras líquidas y semilíquidas (Kawano, 2008).

En el caso de la reflexión, más conocida como reflectancia, la luz incidente ilumina la superficie de la muestra, la cual debe ser opaca, y los detectores recogen la reflectancia difusa procedente de la muestra (Kawano, 2008).



La transflectancia, por su parte, combina los dos modos anteriores. Así, la luz incidente es transmitida a través de la muestra hasta una superficie totalmente reflectante que devuelve la radiación transmitida otra vez a través de la muestra hasta los detectores. Por ello, se la denomina también a esta modalidad de doble transmisión (Pérez-Marín, 2005).

Por último, la modalidad de interactancia-reflectancia hace alusión al uso de una sonda de fibra óptica constituida por anillos concéntricos, siendo el exterior de los mismos por el que se ilumina la muestra y el interior por el que se devuelve la energía reflejada de la muestra. Para la recogida del espectro NIR, la sonda debe contactar con la superficie de la muestra (Kawano, 2008).

El avance en el perfeccionamiento de la instrumentación NIRS, ha ido evolucionando desde finales de los años sesenta hasta nuestros días. Los cambios más relevantes que se han producido en los instrumentos NIRS son aquellos relacionados con la mejora de la relación señal/ruido, la precisión en la longitud de onda, la disponibilidad de diferentes sistemas de interacción de la radiación con la muestra y la existencia de una gran variedad de accesorios (cápsulas y cubetas de diferente forma, diferentes tipos de fibras ópticas para su utilización “in-line”, “on-line”, “at-line”, etc.) y de diseños más ergonómicos y portátiles.

Un espectrofotómetro NIR está constituido por los siguientes componentes: una fuente de radiación, un dispositivo para la discriminación de longitudes de onda, un sistema de presentación de muestra y uno o varios detectores que convierten la energía radiante en señal eléctrica (Coates y Ramani, 2006). Con la ayuda de un amplificador de alta tensión y bajo ruido, la señal procedente de los detectores es amplificada. Posteriormente, esta señal será convertida en digital mediante un convertidor analógico-digital, y por último, la señal digital es transmitida a un ordenador para su procesado.



3.5.3. Análisis quimiométrico de datos espectroscópicos NIRS

La tecnología NIRS supone una rápida adquisición de gran cantidad de datos que se deben evaluar e interpretar para transformarlos en información útil. La quimiometría, disciplina que tiene esta finalidad, contempla todos aquellos procesos que transforman señales analíticas y datos complejos en información. Para ello utiliza métodos de origen matemático, estadístico y otros procedentes del campo de la lógica formal para conseguir sus fines, por lo que se sitúa en un campo interdisciplinar (Casale et al., 2010).

La Espectroscopía NIR es una técnica ampliamente usada como método de análisis cuantitativo y cualitativo, para lo cual es necesario el desarrollo de modelos de predicción.

3.5.3.1. Análisis cuantitativo de datos espectroscópicos NIRS

El modelo quimiométrico relaciona la información espectral de las muestras que constituyen el colectivo de aprendizaje con sus valores para el parámetro en estudio, proporcionados por un método de referencia. Una vez desarrollado el modelo, éste permite predecir el contenido de otras muestras de características similares a las incluidas en el grupo de entrenamiento o calibración.

En general, en los espectros NIR, existen normalmente componentes o efectos no deseados, conocidos como “ruidos”, los cuales tienen diferente origen y afectan de diferentes formas al espectro. Los componentes de la instrumentación (ruido instrumental), las variaciones de temperatura, humedad y otras condiciones ambientales durante el registro (ruido ambiental) o bien las variaciones en la señal debidas a la naturaleza de la muestra, pueden ser algunas de las causas del ruido.



Para poder eliminar el “ruido” presente en la señal y poder así extraer información química relevante de cada muestra es necesario recurrir al uso de pretratamientos de la señal espectral, que permiten separar la información meramente química de las variaciones de origen físico (textura, tamaño, geometría de las partículas, etc.).

Entre estos pretratamientos están el promediado de espectros, la derivación, el suavizado espectral, la corrección de la radiación dispersa o efecto “Scatter”, (Barnes et al., 1989; Dhanoa et al., 1994; Heise y Winzen, 2004; Naes al., 2004; Nicolai et al., 2007). Se suelen combinar con normalidad varios métodos de pretratamiento de la señal para eliminar en mayor cuantía el ruido espectral y mejorar la calidad de los resultados. Son habituales combinaciones de SNV-DT o DT-SNV y su combinación con derivadas.

Una vez realizados estos pretratamientos se procederá al desarrollo de ecuaciones de calibración que sean capaces de predecir parámetros de calidad de otras muestras con características similares a las incluidas en el colectivo de calibración (Shenk y Westerhaus, 1995b; Williams y Sobering, 1996). Es por ello por lo que otro aspecto muy importante a tener en cuenta es que los datos de referencia de las muestras obtenidos por vía húmeda deben ser lo más precisos posibles, ya que los resultados obtenidos por un método secundario como la tecnología NIRS tendrán una precisión similar al del método de análisis convencional usado como referencia y que dio origen a la calibración.

En definitiva, los modelos matemáticos que se van a emplear deberán realizar una estimación eficiente y ser capaces de resolver el problema de colinealidad, bastante acusada cuando se trabaja con información espectroscópica NIRS, provocando la inestabilidad de las predicciones (Naes, 1992; Pérez-Marín et al., 2007).

Previo al desarrollo de las calibraciones y con el objetivo de estudiar la población de muestras de la que se dispone se realiza un Análisis de



Componentes Principales (ACP). Con este algoritmo se consigue sintetizar la información espectral, detectar muestras anómalas, obtener información sobre las variables (longitudes de onda) más importantes e indicaciones sobre el tipo de modelo que es más adecuado para ese colectivo de muestras.

El objetivo último del ACP es hallar las direcciones que explican la máxima variabilidad de las muestras y utilizarlas como nuevos ejes de coordenadas, llamados componentes principales (CP's). De esta forma se reduce la dimensionalidad de un espacio de "k" dimensiones a un espacio de "a" dimensiones ($a < k$). Cada componente principal contiene información de diferente relevancia, describiendo la fuente de variación más importante de los datos.

Existen algoritmos matemáticos como CENTER o SELECT, contenidos en el software WinISI (Infrasoft International, Port Matilda, PA, EE.UU.), que permiten el estudio de la diversidad espectral y la definición del grupo de calibración. El algoritmo CENTER permite identificar muestras con espectros muy diferentes al de la media de la población, mientras que el algoritmo SELECT es capaz de seleccionar el número de muestras que se le indiquen, abarcando toda la variabilidad posible, tanto espectral como físico-química, obteniéndose así una alta variabilidad en la estructura del colectivo de calibración. Ambos algoritmos se basan en la realización de un análisis de componentes principales (ACP), seguido del cálculo de distancias entre los espectros de las distintas muestras en un espacio n-dimensional, a través de la distancia de Mahalanobis (Shenk y Westerhaus, 1995b, 1996). Estos procedimientos permiten detectar aquellas muestras con comportamiento diferente, denominadas "anómalas" (outliers), cuya anomalía puede ser causada por la información espectroscópica o físico-química.

La detección, interpretación y posible eliminación de estas muestras anómalas es una etapa crítica en el desarrollo de modelos de predicción, debido



a la gran influencia que provoca su presencia en los resultados del mismo (Williams y Norris, 2001).

Estos procedimientos previos se realizan para definir el colectivo de calibración, ya sea para la construcción de ecuaciones de calibración (análisis cuantitativo) como para modelos de clasificación (análisis cualitativo).

Cuando se trabaja con información NIRS es fundamental el uso de métodos multivariantes para poder relacionar la información de múltiples variables con el parámetro o parámetros de interés.

La mayoría de las técnicas matemáticas aplicadas para el desarrollo de calibraciones se basan en métodos lineales de ajuste, aunque también existen algoritmos no lineales.

Los métodos lineales obtienen una relación lineal entre la señal espectral y la concentración de cada componente de interés que se quiere determinar de la muestra. Esto se basa en asumir que la relación entre la absorbancia y la concentración del analito establecida por la ley de Lambert-Beer es lineal.

Los métodos de regresión más empleados en las aplicaciones cuantitativas NIRS son la Regresión lineal Múltiple (RLM ó MRL), la regresión por Componentes Principales (RCP ó PCR), la regresión mediante Mínimos Cuadrados Parciales (PLS ó RMCP) y la regresión mediante Mínimos Cuadrados Parciales Modificada (MPLS ó RMCPM), siendo estas dos últimas las más empleadas en aplicaciones agroalimentarias (Shenk y Westerhaus, 1995b; Pérez-Marín et al., 2007).

La regresión lineal múltiple utiliza en su totalidad las longitudes de onda del espectro para realizar el ajuste del modelo, seleccionando algunas variables espectrales del espectro NIR completo. Las longitudes de onda



seleccionadas son aquellas que presentan una correlación más elevada entre el valor de absorbancia a una longitud de onda determinada y el dato de referencia correspondiente (Martens y Naes, 1989; Workman, 1992).

La regresión en componentes principales realiza una reducción de las variables originales utilizando las componentes principales calculadas mediante un análisis ACP. Con las nuevas variables ortogonales entre sí realiza un ajuste de regresión múltiple. Este algoritmo solo usa la información espectral para calcular las nuevas variables, por lo que éstas son las que mejor representan la matriz de datos, pero no necesariamente son las más adecuadas para estimar los parámetros de interés a predecir (Massart et al., 1998).

La regresión de mínimos cuadrados parciales (PLS) parte de la premisa de que la información espectral es función de unas pocas variables linealmente independientes, teniendo en cuenta para el cálculo de dichas variables no solo la información espectral sino además el valor de referencia del parámetro medido para cada muestra (Westerhaus et al., 2004).

El método de regresión MPLS es una variante del PLS y aporta la ventaja de que los residuos NIR a cada longitud de onda son divididos por la desviación estándar de los residuales a esa longitud de onda, antes de calcular el siguiente factor. Se dice que este método es a menudo más estable y preciso que el algoritmo PLS, siendo el número de factores de la regresión seleccionado por validación cruzada (Shenk y Westerhaus, 1995a).

La validación cruzada es un algoritmo que selecciona diferentes colectivos de calibración y validación dentro de una población específica. El procedimiento consiste en dividir el colectivo de calibración en grupos (dependiendo del número de muestras). Cada grupo de validación es predicho una vez con la ecuación desarrollada a partir del resto de grupos. Este procedimiento además previene el sobreajuste del modelo (Shenk y Westerhaus, 1995a; Williams, 2001).



En relación a los estadísticos utilizados para la evaluación de la calidad de los modelos desarrollados, el más habitual es el error típico o ET, el cual estima la capacidad predictiva del modelo para un colectivo de muestras nuevas. Normalmente en la construcción de un modelo quimiométrico se utiliza un colectivo de calibración, en el que el ET será de calibración (ETC) y uno de validación externa, en el que el ET será de predicción (ETP).

El error típico de calibración (ETC) se define como la desviación típica de los residuales (diferencia entre el valor aportado por el método de referencia y el valor estimado por la ecuación) para el colectivo de calibración (Williams, 2001). Sin embargo, suele sobreestimar la capacidad real de predicción de una ecuación al ser únicamente un estimador del error del modelo quimiométrico empleado (Mark y Workman, 1991; Shenk y Westerhaus, 1995b).

El error típico de predicción (ETP) es conocido como la desviación típica de las diferencias, para un colectivo de validación, entre el valor determinado mediante el método de referencia y el valor estimado mediante el análisis NIRS y es el estadístico más empleado para estimar la capacidad de predicción de una ecuación de calibración NIRS (Mark y Workman, 1991; Shenk y Westerhaus, 1995b; Williams, 2001; Wise et al., 2006).

Otro estadístico importante es el Error Típico de Validación Cruzada (ETVC); éste evalúa los resultados obtenidos de la validación cruzada. Shenk y Westerhaus (1996) indican que el ETVC es el mejor estimador de la capacidad predictiva de una ecuación, y que es equivalente al error típico de predicción (ETP) medio de 10 grupos de validación elegidos al azar.

Otros estadísticos también empleados son el Ratio of Standard Error of Performance to Standard Deviation (RPD), que mide la relación entre la desviación típica de los datos de referencia de un determinado constituyente y el ETVC para el colectivo de validación cruzada; y el estadístico Ratio of



standard error of performance to range of standard data (RER), que establece la relación entre el rango de los datos de referencia de un determinado constituyente y el ETVC para el colectivo de validación cruzada (Williams, 2001).

Williams (2001), considera que el RPD es un estadístico sencillo y que permite la evaluación del ETVC o del ETP en términos de la desviación típica de los datos de referencia para la población en estudio. De hecho, la eficiencia del análisis NIRS viene definida por la consistencia de las desviaciones de los datos predichos con respecto a los datos de referencia, esto es, el ETP o ETVC. Por tanto, si ETP o ETVC son similares a la desviación típica (o incluso superiores), significaría que la calibración no estaría prediciendo los valores correctamente. Estos estadísticos deben ser inferiores a la desviación típica. Williams (2001) señala que valores del RPD comprendidos entre 3 y 5 indican predicciones NIRS eficientes.

El estadístico RER, anteriormente definido, es otra forma de estandarizar el ETP y el ETVC. El valor del RER debería ser tan alto como fuera posible, pero puede ser aumentado de forma ficticia por una presencia de muestras extremas en concentración lo cual le resta utilidad y consistencia. Esto no ocurre cuando para estandarizar el ETP o ETVC se utiliza la desviación típica, es decir, utilizando el RPD.

Un estadístico de uso tradicional es el Coeficiente de Variación (CV), que relaciona la desviación típica con la media. El tamaño e interpretación del CV depende parcialmente de la fuente de los datos, es decir, que se trate de datos de vía húmeda, datos predichos NIRS, datos de parámetros “funcionales” como dureza, digestibilidad, etc. (Williams, 2001).

Otro de los estadísticos utilizados es el coeficiente de determinación de calibración (R^2) o porcentaje de la variación existente en el grupo de calibración que puede ser explicado por la regresión.



3.5.4. Aplicaciones de la tecnología NIRS en el aseguramiento de la calidad en vinagres

En el campo de la industria enológica, pese a la gran cantidad de estudios realizados, uno de los principales problemas de la utilización de la tecnología NIRS en vinagres es el reducido número de aplicaciones que se han desarrollado sobre dicho producto. Así, diferentes estudios muestran aplicaciones de la Espectroscopía NIR tanto para la determinación de parámetros como acidez, pH, grado alcohólico y acetoína, entre otros, como para la clasificación en función de su materia prima, origen, embotellado, periodo de envejecimiento, proceso de elaboración y variedades.

Yano et al. (1997) aplicaron la tecnología NIRS para la determinación simultánea de las concentraciones de acidez volátil y etanol durante la fermentación de vinagre de arroz. El estudio se llevó a cabo utilizando un equipo monocromador en modo transmitancia en la región espectral 400-2500 nm. Los excelentes resultados que obtuvieron para los parámetros acidez volátil y etanol ($r^2 = 0,94$, $r^2 = 0,99$, respectivamente), indican que la tecnología NIRS puede ser un método útil para el seguimiento y control de la fermentación de vinagre de arroz.

Sáiz-Abajo et al., (2006) empleando un instrumento monocromador en modo reflectancia demostraron la idoneidad de la espectroscopía NIR para monitorizar diferentes procesos industriales tales como dilución y control de calidad en el producto final en la industria vinagrera. Para ello llevaron a cabo la determinación de parámetros relacionados con la calidad del vinagre como son acidez total, fija y volátil, cenizas y extracto seco en vinagres de vino obteniendo resultados satisfactorios (ETP = 0,54 g/100 ml; ETP = 0,59 g/100 ml; ETP = 0,59 g/100 ml; ETP = 0,39 g/l; ETP = 0,004 g/l). Es interesante señalar que los modelos de predicción fueron desarrollados con un reducido número de muestras (n = 54).



En 2008, González-Sáiz et al., llevaron a cabo el seguimiento de las concentraciones de sustrato y producto en el proceso de fermentación acética de vinagre de cebolla mediante espectroscopía NIR. Para ello utilizaron un equipo monocromador en modo reflectancia en el rango espectral 1100-2500 nm. Los resultados obtenidos para acidez volátil ($r^2 = 0,99$; ETVC = 0,22 g/100ml), etanol ($r^2 = 0,99$; ETVC = 0,20 % vol.) y biomasa ($r^2 = 0,95$; ETVC = $4,29 \cdot 10^{-3}$ %) sugieren que la tecnología NIRS podría ser utilizada en aplicaciones de rutina en la producción de vinagre de cebolla.

Junto con acidez y sólidos solubles totales, el pH es el parámetro más estudiado en vinagre. Liu et al., (2008) realizaron un estudio en el que combinando la tecnología NIR con quimiometría investigaron la rápida determinación del contenido de sólidos solubles totales y pH en vinagre de arroz. Utilizaron un equipo de red de diodos en modo transmitancia en la región espectral 325-1075 nm. Tras unos excelentes resultados obtenidos para el pH ($r^2 = 0,99$; ETP = 0,01), los autores indican que puede ser considerada como una técnica rápida y precisa para la determinación de estos parámetros.

Chen et al., (2012) llevaron a cabo la determinación del parámetro acidez total. Realizaron el estudio en vinagres envejecidos, aromáticos y vinagres de arroz y obtuvieron excelentes resultados ($r^2 = 0,97$ y ETP = 0,25 g/100 ml), empleando un instrumento FT-NIR en modo transmitancia y un rango 1000-2500 nm. Este trabajo mostró que la espectroscopía NIR tiene potencial para la medida de contenido total de ácidos en vinagre.

Por su parte, Fan et al. (2012) aplicaron la tecnología NIRS junto con métodos de selección de longitud de onda para predecir el contenido total de ácidos en vinagre. Utilizaron para ello un instrumento FT-NIR en modo transmitancia en la región del espectro 1000-2500 nm. Dichos autores obtuvieron excelentes resultados ($r^2 = 0,99$; ETP = 0,13 g/100 ml) por lo que concluyeron que utilizando NIRS con métodos de selección de longitudes de



onda (CARS) se obtiene una rápida y efectiva alternativa a los métodos clásicos para la predicción del contenido total de ácidos en vinagre.

Posteriormente, Ji-Yong et al., (2013) también estudiaron la viabilidad del uso de esta tecnología para la determinación de la acidez total en vinagres envejecidos, aromáticos, de arroz, de fruta y balsámicos. Para ello utilizaron un instrumento FT-NIR en modo transmitancia y en el rango espectral 1000-2500 nm, confirmando la viabilidad de la misma para llevar a cabo dicha predicción, a partir de los resultados obtenidos ($r^2 = 0,92$; ETP= 0,32 g/100 ml).

Por su parte, De la Haba et al., (2014) estudiaron la viabilidad del uso de la tecnología NIRS para la predicción de los principales parámetros de calidad (acidez total, acidez fija, acidez volátil, pH, extracto seco, cenizas, acetoína, metanol, polifenoles totales, color y grado alcohólico) en 70 muestras de vinagre pertenecientes a la Denominación de Origen “Montilla-Moriles”, utilizando para ello dos instrumentos NIR monocromadores (FOSS NIRSystems SY I y SY II), que trabajan en la región espectral de 400 a 2500 nm y un equipo de red de diodos (CORONA 45 VIS+NIR), que comprende la región de 500-1690 nm. Los resultados obtenidos por estos autores muestran la idoneidad de uso de la tecnología NIRS como herramienta de control de calidad y trazabilidad en la industria vinagrera.



Capítulo 4: Material y Métodos



Capítulo 4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. Muestras de vinagre

El material utilizado en esta Tesis doctoral estuvo constituido por 107 muestras de vinagres pertenecientes a la DOP “Vinagre de Montilla-Moriles”, que también fueron utilizados para el análisis sensorial.

Una vez recibidos los vinagres en el laboratorio, éstos fueron conservados a 4°C y un 85 % de humedad relativa hasta el día siguiente, en el que se llevaron a cabo los análisis NIRS y de referencia. Antes de llevar a cabo las determinaciones analíticas, las muestras fueron dispuestas a temperatura ambiente al objeto de estabilizar la temperatura del producto hasta la temperatura de 20 °C, temperatura óptima para la realización de los ensayos.

Una vez realizada la toma de espectros NIR, se llevaron a cabo las determinaciones analíticas de los parámetros objeto de estudio: masa volúmica, azúcares reductores, acidez total y pH.

4.2. Determinación de parámetros físico-químicos de calidad en vinagres

La determinación de la calidad físico-química de los vinagres se efectuó en primer lugar mediante técnicas de análisis destructivo tradicional.

La masa volúmica fue determinada por aerometría (DOUE, 1990). La acidez total fue medida por titración empleando para ello un titrador automático (Crison Micro TT 2050, Crison, Alella, Barcelona, España) y siguiendo la resolución OENO 52-2000 revisada por OIV-OENO 597-2018 (IOV, 2018). Los azúcares reductores fueron medidos por titración empleando un titrador automático (Crison Micro TT 2050, Crison, Alella, Barcelona, España) (Rebelein, 1973). El pH fue medido por potenciometría empleando un titrador



automático (Crison Micro TT 2050, Crison, Alella, Barcelona, España). Todas las determinaciones analíticas fueron realizadas inmediatamente después de la toma de espectros NIR y por duplicado, llevándose a cabo el cálculo del error típico de laboratorio (ETL) a partir de dichos duplicados.

4.3. Toma de datos espectrales

Los espectros NIR de los vinagres fueron recogidos en transfectancia ($\log(1/R)$) empleado para ello el instrumento monocromador FNS-6500 SY-I (FOSS NIRSystems, Silver Spring, MD, Estados Unidos). Se utilizó una cápsula circular (3,75 cm de diámetro) de 0,1 mm de paso óptico y fondo de material reflectante, en este caso oro.

El FNS-6500 SY-I proporcionan valores de absorbancia entre 400 y 2500 nm, cada 2 nm, cubriendo tanto la región del visible como la del infrarrojo cercano y está equipado con un módulo de giro el cual rota la cápsula. Se tomaron 2 espectros por muestra los cuales fueron posteriormente mediados.

4.4. Procesado de datos y desarrollo de modelos predictivos de calidad físico-química utilizando la regresión en mínimos cuadrados parciales modificada

El programa informático WinISI II ver. 1.5 fue empleado para el tratamiento quimiométrico de los datos (Infrasoft International LLC, Port Matilda, PA, EE. UU.) (ISI, 2000).

Un paso previo al desarrollo de calibraciones NIRS, es la determinación de la estructura y variabilidad espectral de la población de muestras objeto de estudio. Se utilizó el algoritmo CENTER incluido el programa informático WinISI II para el estudio de la diversidad espectral y la definición del grupo de calibración (Shenk y Westerhaus, 1991). El algoritmo



realiza un análisis de componentes principales (ACP) y calcula la distancia de las muestras (espectros) al centro de este nuevo espacio n-dimensional, utilizando la distancia de Mahalanobis (GH). Aquellas muestras con un valor de dicho estadístico mayor a 3 se consideraron “outliers” o anómalas espectrales (Shenk y Westerhaus, 1995a).

El algoritmo CENTER fue aplicado en la región espectral 400-2500 nm. Asimismo, se aplicaron los tratamientos matemáticos Standard Normal Variate (SNV) y Detrend (DT) para la corrección de los fenómenos de radiación dispersa, junto con el tratamiento de derivación 1,5,5,1 (donde el primer dígito indica el orden de la derivada; el segundo indica el “gap” o longitud del segmento de derivación en “data points”; el tercero representa el número de “data points” usados en el “suavizado”; el cuarto dígito se refiere al segundo “suavizado” (Shenk y Westerhaus, 1995b).

A continuación, y una vez ordenadas las muestras por distancia al centro de la población, 3 de cada 4 muestras fueron seleccionadas para constituir el colectivo de calibración mientras que las muestras restantes formaron el colectivo de validación.

Las ecuaciones de predicción de los parámetros químicos seleccionados fueron obtenidas usando como método de regresión el de mínimos cuadrados parciales modificados (MPLS) (Shenk y Westerhaus, 1995a). Para todos los modelos desarrollados se aplicaron los pretratamientos SNV + DT para la corrección de la radiación dispersa (Barnes et al., 1989) y los tratamientos de derivación: 1,5,5,1; 2,5,5,1 (Shenk y Westerhaus, 1995b). Asimismo, y para el desarrollo de dichos modelos se estudiaron 2 regiones espectrales: Vis/NIR: 400-2500 nm y solo NIR: 1100-2500 nm.

Los estadísticos empleados en la evaluación y elección de los mejores modelos obtenidos utilizando la regresión MPLS fueron: el coeficiente de regresión de calibración (R^2_c), el error típico de calibración (ETC), el



coeficiente de regresión de validación cruzada (R^2_{vc}) y el error típico de validación cruzada (ETVC). Además, también fue calculado el estadístico “Residual Predictive Deviation” para validación cruzada (RPD_{cv}), calculado como el cociente entre la desviación típica (DT) del colectivo de calibración final, una vez eliminados los anómalos T, y el ETVC. Este estadístico permite que el ETVC sea estandarizado, facilitando la comparación de resultados con colectivos de medias diferentes (Williams, 2001).

Una vez que las mejores ecuaciones para cada uno de los parámetros analizados fueron seleccionadas por criterios estadísticos y al objeto de determinar el rango de trabajo más adecuado del instrumento FNS-6500 SY-I, los valores del ETVC obtenidos fueron comparados estadísticamente haciendo uso de la prueba F de Fisher (Massart et al., 1988; Naes et al., 2002). El valor del estadístico F se calcula como:

$$F = \frac{ETVC_2}{ETVC_1}$$

Siendo $ETVC_1 < ETVC_2$.

El valor de F se compara con el valor $F_{crítico} (1-\alpha, n1-1, n2-1)$ obtenido de la tabla de la distribución F, donde α es el nivel de significación de la prueba, $n1$ el número de veces que se repite la medida con el método 1 y $n2$ el número de veces que se repite la medida con el método 2. Si $F > F_{crítico}$ se considera que las diferencias entre los ETVCs comparados son significativas.

Una vez seleccionada la mejor región de trabajo del instrumento, las mejores ecuaciones obtenidas para dicha región fueron sometidas a un proceso de validación externa siguiendo el protocolo establecido por Windham et al. (1989).



4.4. Determinación de parámetros sensoriales de calidad en vinagres

El análisis sensorial es un método directo, normalizado y muy sensible para apreciar las características sensoriales de los vinos, que actualmente no se puede reemplazar por ninguna otra técnica. El análisis sensorial es, por tanto, una técnica que aporta una valiosa información que permite, un conocimiento más complejo de las características de los alimentos, y que hace posible una adecuada elaboración de los mismos, con el objetivo de satisfacer las demandas de los consumidores a los que va dirigido (González-Viñas, 2008).

Con la doble finalidad de analizar y cuantificar cada una de las características organolépticas de los vinagres elaborados bajo la DOP “Vinagre de Montilla-Moriles”, procedentes de distintos tratamientos, y determinar si había diferencias entre los mismos, se realizó un análisis sensorial descriptivo, que consistió en realizar una descripción cualitativa y cuantitativa de cada vinagre mediante la utilización de unas fichas de cata.

Se diseñó una ficha de cata, que fue una modificación de la elaborada por López (2004) para describir y comparar vinos blancos jóvenes monovarietales procedentes de tratamientos de riego y no riego. El vinagre resulta un producto difícil de catar, debido a las sensaciones intensas que provoca. El alto contenido en acético tiende a enmascarar el resto de los aromas y se precisa cierta familiarización con el producto para proceder a su cata. De hecho, no existe siquiera un consenso oficial (Norma UNE) que regule cómo se ha de catar el vinagre de vino. El análisis sensorial requiere de un panel bien entrenado y de la elección de atributos concretos que sean útiles para diferenciar muestras con el mayor grado de aciertos posibles.

Para la realización de las pruebas sensoriales se contó con un grupo de diez catadores expertos. Previamente, los catadores que iban a formar el panel de cata de la presente investigación recibieron un pequeño entrenamiento para



familiarizarse con este tipo de vinagres y con la utilización de la ficha de cata que se iba a emplear en la valoración de los diferentes vinagres elaborados.

Como todos los catadores son expertos y amplios conocedores de la cata de vinos y vinagres elaborados en la D.O.P. Montilla-Moriles, las sesiones de entrenamiento buscaban especialmente familiarizarlos con la ficha de cata diseñada para este trabajo. Debido a la agresividad del ácido acético, el número máximo de muestras a “examinar” o “catar” en cada sesión fue de cinco, para no agotar así a los catadores.

El análisis descriptivo de las muestras se basa en evaluar los atributos previamente seleccionados por el panel. Los atributos más utilizados para describir las muestras de vinagre han sido: color, limpidez, intensidad aromática olfativa y gustativa, evaluación de la calidad y de la materia prima, etc. La calidad final obtenida en los vinagres de vino dependerá tanto de la calidad de la materia prima de partida, como del proceso de su elaboración.

En líneas generales resulta relativamente fácil apreciar diferencias sensoriales entre los productos elaborados por métodos tradicionales e industriales a gran escala. Para la caracterización y evaluación de la calidad en los vinagres de vino es preciso determinar toda una serie de compuestos y su análisis sensorial. Los compuestos aromáticos tienen un efecto decisivo en la calidad de los vinagres. El aroma es una fracción compleja que contiene muchos compuestos con un amplio intervalo de volatilidad, polaridad y concentración.

Las sesiones de cata de los vinos se realizaron por la mañana, a las 12:00 horas, en una sala específica para tal actividad y se utilizaron copas normalizadas para la cata de vinos (norma UNE 87022/92). La temperatura de presentación de los vinagres fue de 18°C, la temperatura de la sala estaba regulada a 20°C y la humedad relativa al 60 %. Se utilizó luz blanca con una luminosidad superior a los 300 lux.



Los distintos tipos de vinagres catados, así como su periodo de envejecimiento se indican en la Tabla 4.1.

Tabla 4.1. Vinagres de la DOP “Vinagre de Montilla-Moriles” analizados sensorialmente

Tipo	Periodo de envejecimiento				
	0	1	2	3	4
Secos	6	5	4	6	5
Semi (Semisecos-semidulces)	2	4	3	2	4
Dulces	2	9	7	7	8
Dulces balsámicos	2	8	7	8	8

0: Vinagre base, sin crianza (0 meses); 1: Vinagre de crianza “Crianza”: solera y criaderas (mín. 6 meses); 2: Vinagre de crianza “Reserva”: solera y criaderas (mín. 2 años); 3: Vinagre de crianza solera y criaderas “Gran reserva” (mín. 10 años); 4: Vinagre de crianza añada “Añada” (mín. 3 años).

Las fichas de cata y las tablas de puntuaciones obtenidas se diseñaron para valorar los aspectos que se consideran más importantes en la caracterización sensorial de este tipo de vinagres, teniendo presente que todos los vinagres se han procesado de forma similar mediante técnicas cuidadas de elaboración, por lo que no aparecen defectos importantes, tales como sabores u olores extraños (aromas a disolvente o pegamento). En ella los 10 catadores analizan diez parámetros sensoriales clasificados en tres fases distintas: visual, olfativa, gustativa y sensación final.

En la fase visual se han evaluado dos parámetros: el color y la limpidez, transparencia o turbiedad. La forma de hacerlo es por contraste sobre un papel blanco y mirando a través de la copa. Al hablar de limpidez se pueden utilizar diferentes términos para definirla, tales como brillante, transparente,



luminoso, etc. Se dice que un vinagre es transparente cuando tiene un alto grado de limpidez.

En la fase olfativa se valoraron los siguientes parámetros: carácter de la materia prima, la intensidad, la calidad de los aromas y complejidad. Como la fase olfativa es muy importante, los catadores procuran dar una pasada a la copa de vinagre, bajo sus narices, pero sin dejarla directamente inmóvil, para evitar que los vapores saturen o dejen al catador sin pituitaria.

Existe una gran cantidad de sustancias que intervienen en el aroma de los vinagres, contribuyendo al mismo en mayor o menor medida. La complejidad aromática está determinada por los diferentes aromas que se mezclan en el vinagre; los aromas primarios procedentes de la materia prima utilizada, los aromas secundarios generados por el microbiota del vinagre en la fermentación y aromas terciarios procedentes de la crianza del vinagre.

En la fase gustativa se valoraron los siguientes parámetros: la intensidad gustativa, la calidad y la complejidad. Se trata de probar el vinagre, lo cual puede hacerse con una pipeta, dejando unas gotas de vinagre sobre la intersección de los dedos índice y pulgar, y procediendo a lamerlas, o bien bebiendo unas gotas de la pipeta o directamente de la copa.

Al terminar estas tres fases, se valora la sensación final. El conjunto de las tres fases analizadas, la armonía del vinagre. Y la suma total de las tres fases y de la sensación final dará el valor organoléptico de cada vinagre clasificándose en la categoría: excelente, muy bueno, bueno, regular o insuficiente.

Se determinaron 10 parámetros sensoriales: color, limpidez, carácter de la materia prima, intensidad olfativa, calidad olfativa, composición olfativa, intensidad gustativa, calidad gustativa, composición gustativa de calidad en vinagre y sensación final.



1. Color: Mediante este parámetro se intenta clasificar el conjunto de muestras por la percepción visual que generan y que a su vez se interpreta, se distinguen las distintas longitudes de onda que captan la parte visible del espectro electromagnético.
2. Limpidez: Grado de enturbiamiento del vino. Dependerá de las partículas en suspensión, la ausencia de éstas presentará un grado de limpidez óptimo, si presenta un aspecto opaco será un vino "velado".
3. Carácter de la materia prima: Estilo o rasgo que identifica a un vinagre o grupo de vinagres. Es otorgado por los componentes de los que procede.
4. Intensidad olfativa: Nivel de precepción de los aromas.
5. Calidad olfativa: Grado en el que el conjunto de características del aroma es medido y corresponden a lo esperado en el tipo de vinagre analizado.
6. Composición olfativa: Medida de la complejidad de los diferentes aromas inherentes en un vinagre.
7. Intensidad gustativa: Nivel de percepción de los sabores.
8. Calidad gustativa: Grado en el que el conjunto de características del sabor es medido y corresponden a lo esperado en el tipo de vinagre analizado.
9. Composición gustativa: Medida de la complejidad de los diferentes sabores inherentes en un vinagre.



10. Sensación final: Medida de la armonía. Valoración del equilibrio entre las fases analizadas.

Para ello se procedió a una cata a ciegas de las diferentes muestras mediante un panel de 10 catadores expertos, que mediante una ficha de cata (Fig. 4.1) en la que se fueron apuntando los resultados, realizaron la clasificación de las muestras según los parámetros antes mencionados.

Fecha:								
Nº de Catador:								
Categoría de Muestra:								
Nº de Muestra:								
		Excelente	Muy bueno	Bueno	Regular	Insuficiente	Sumas Parciales	Observaciones
Fase Visual	Color	5	4	3	2	1		
	Limpidez	5	4	3	2	1		
Fase Olfativa	Carácter de la materia prima	8	7	6	4	2		
	Intensidad	8	7	6	4	2		
	Calidad	10	9	8	6	4		
Fase Gustativa	Complejidad	16	14	12	10	8		
	Intensidad	8	7	6	4	2		
	Calidad	10	8	6	4	2		
Sensacion Final	Complejidad	16	14	12	10	8		
		14	12	10	8	6		
		SUMA TOTAL						

Figura 4.1. Ficha de cata utilizada por el panel de catadores.

Fuente: elaboración propia, 2019.

En la ficha de cata se pueden diferenciar cinco partes principales que se corresponden con las tres fases en las que se divide el proceso de cata: fase visual, fase olfativa, fase gustativa y sensación final o armonía. En cada parte hay unas propiedades con las cuales se puede discriminar la calidad de cada muestra.

Como se aprecia en la citada figura, en la parte visual toman importancia la limpidez, el color y el aspecto. La limpidez es una propiedad existente o no en una muestra, sin haber rangos o una escala para su medición, por ello se puntúa con un 1 o con un 5, sin valores intermedios. El color, en cambio, debe ser medido según una escalera de valores teniendo en cuenta su tonalidad, pero siempre respecto al color teórico que debería tener; esto es, un vinagre de manzana y otro de uva pasificada nunca tendrán tonalidades



parecidas, por lo cual no deberán ser comparados. Finalmente, la propiedad aspecto hace referencia a lo vivo o apagado que está un vinagre.

En la segunda parte, la correspondiente a la fase olfativa, la franqueza olfativa se clasifica desde excelente hasta insuficiente, según el nivel de capacidad de diferenciar con claridad los aromas que tiene la muestra a analizar. La intensidad, también medida de excelente a insuficiente, es el grado de fuerza en el que se manifiestan los aromas y su nivel de captación por el catador. También es importante la intensidad positiva; esto es, que se manifiesten adecuadamente los aromas, pero sin solapar o interrumpir otros. Por último, la calidad olfativa es la suma de la franqueza y la intensidad, pero de una forma en la que tanto la variedad de aromas como su intensidad sean óptimas.

En la fase gustativa, la franqueza gustativa va desde excelente hasta insuficiente, según el nivel de capacidad de diferenciar los aromas, de una forma clara, por las papilas gustativas en una muestra. La persistencia, es la duración de los sabores al paso por la boca durante esta fase.

En la sensación final o armonía, también con una escala de máximo y mínimo, se consiste en la existencia de una sintonía entre todas las propiedades a analizar. La calidad gustativa, al igual que la olfativa, es la suma de una forma óptima de las demás propiedades.

Y por último la suma total que clasificará al vinagre como excelente (entre 87 y 100), muy bueno (entre 86 y 73), bueno (entre 72 y 55) regular (entre 54 y 37) e insuficiente (menor o igual a 36).

Se analizaron los 117 vinagres con una repetición, en 14 sesiones. En cada una sólo se analizaron de 10 a 15 vinagres, debido a la naturaleza ácida de las muestras, ya que tales niveles de acidez provocan una pronta saturación de los receptores olfativos y gustativos.



En primer lugar, se sirvieron los vinagres de forma aleatoria sobre catavinos numerados para mantener así el anonimato y evitar sugerir a los catadores por su procedencia, marca o materia prima. Con ello se realizó una primera fase visual observando las diferencias en colores, tonalidades, limpieza o brillo entre las diferentes muestras (García-Parrilla, 2010).

La fase olfativa, se realizó directamente desde el catavino, olfateando cada una de las muestras el tiempo que fuera requerido y apuntando los resultados en la ficha de cata.

Por último, en la fase gustativa se utilizaron pipetas *Pasteur* de plástico de 3 ml con las cuales se tomó parte de la muestra que posteriormente fue testada por el panel de cata, pudiendo rociarse directamente en la boca o sobre la piel de la mano para su posterior ingesta.

Esta metodología de cata siguió los pasos de la ya establecida cata de vino, ya que al provenir de la misma materia prima y tener un mayor desarrollo o estar más asentada, permite seguir un orden lógico durante el proceso. La falta de bibliografía e información al respecto también condiciona el adoptar metodologías ya existentes para el desarrollo del método de análisis mediante la cata en vinagres (norma UNE 87024-1:1995, para jueces de laboratorio y entrenados). La participación de personas para medir propiedades sensoriales es análoga al uso de cualquier instrumento para medir parámetros químicos (Durán-Guerrero, 2008).

Para profundizar más en la influencia que los tratamientos aplicados pudieran tener en los vinagres de vino elaborados, se desarrollaron los perfiles sensoriales según fueran dulces o secos, con o sin envejecimiento. Así, se trabajó con el mismo panel de 10 catadores expertos que establecieron los descriptores típicos que caracterizan a los vinagres clase. De esta prueba se



obtienen las fichas específicas de los vinagres de vino dulces, con o sin crianza, y de los vinagres de vino secos, con o sin crianza (véase Anexo I).



Capítulo 5:

Resultados y Discusión



Capítulo 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Caracterización de los colectivos NIRS de calibración y validación

Se aplicó el algoritmo CENTER para llevar a cabo el análisis de la población de vinagres disponible, considerando como muestras anómalas espectrales aquellas que presentaron un valor de la distancia de Mahalabonis (GH) superior a 3.

En este caso no se detectó ninguna muestra como anómala espectral. Por tanto, el colectivo inicial de 107 vinagres fue dividido en dos colectivos: colectivo de calibración (80 muestras) y colectivo de validación (27 muestras), respectivamente.

En la Tabla 5.1 se muestran los estadísticos: número de muestras, rango, media, desviación típica (DT) y coeficiente de variación (CV) para los colectivos de calibración y validación empleados. Para todos los parámetros analizados, los rangos del colectivo de validación están incluidos en los del colectivo de calibración.



Tabla 5.1. Características de los colectivos de calibración y validación y error típico de laboratorio

Parámetro	Estadísticos	Colectivo de calibración	Colectivo de validación
Masa volúmica (g/L)	N ^a	80	27
	Rango	1012-1137	1013-1126
	Media	1063,10	1065,11
	DT ^b	44,16	45,61
	CV ^c (%)	4,15	4,28
	ETL ^d	0,27	
Azúcares reductores (g/L)	N	80	27
	Rango	8,25-358,5	16,30-314,45
	Media	132,64	147,72
	DT	118,92	122,09
	CV (%)	89,66	82,65
	ETL	1,26	
Acidez total (g ácido acético/100 mL vinagre)	N	80	27
	Rango	4,20-19,0	5,05-17,1
	Media	7,70	7,53
	DT	2,89	2,98
	CV (%)	37,53	39,57
	ETL	0,10	
pH	N	80	27
	Rango	2,40-5,77	2,54-3,36
	Media	2,79	2,82
	DT	0,41	0,21
	CV (%)	14,70	7,45
	ETL	0,01	

^a Numero de muestras.

^b Desviación típica.

^c Coeficiente de variación.

^d Error típico de laboratorio.



El parámetro que presentó una mayor variabilidad fue el contenido en azúcares reductores ($CV_c = 89,66\%$; $CV_p = 82,65\%$) debido a que ambos colectivos estuvieron constituidos por vinagres secos, semidulces y dulces, mientras que el parámetro con menor variabilidad fue la masa volúmica ($CV_c = 4,15\%$; $CV_p = 4,28\%$) debido a que todos los vinagres habían completado el proceso de fermentación.

5.2. Modelos de calibración para la predicción de parámetros de calidad físico-química en vinagres de vino de la DOP “Vinagre de Montilla-Moriles”

En la Tabla 5.2 se muestran los estadísticos de las mejores ecuaciones obtenidas para los parámetros químicos de calidad analizados con el instrumento FNS-6500 SY-I, para los dos rangos espectrales estudiados, empleando distintos pretratamientos de la señal espectral. Para cada uno de los parámetros estudiados se obtuvieron un total de 2 modelos de calibración, seleccionándose el mejor de ellos por criterios estadísticos, teniendo en cuenta aquellos que presentaron valores más bajos del ETVC y del CV, y valores más altos de R^2_{vc} , y del RPD.



Tabla 5.2. Estadísticos de calibración de los mejores modelos obtenidos para la predicción de calidad química en vinagres

Parámetro	Rango espectral (nm)	Tratamiento matemático	N ^a	Términos	Rango	ETC ^b	R ² _c	ETVC ^d	R ² _{vc} ^e	RPD _{vc} ^f	F	F _{crítico}
Masa volúmica (g/L)	400-2500	2,5,5,1	73	4	1112-1137	3,66	0,99	4,09	0,99	10,69	1,10	1,47
Azúcares reductores (g/L)	400-2500	1,5,5,1	74	4	1112-1137	3,99	0,99	4,30	0,99	10,11		
Acidez total (g ácido acético/100 mL vinagre)	400-2500	2,5,5,1	72	4	8,25-332,50	7,25	0,99	8,03	0,99	14,05	1,01	1,48
	1100-2500	1,5,5,1	72	4	8,25-332,50	7,32	0,99	7,98	0,99	14,14		
	400-2500	1,5,5,1	74	8	4,20-12,60	0,38	0,97	0,50	0,95	4,50	1,13	1,47
	1100-2500	2,5,5,1	73	7	4,20-12,60	0,31	0,98	0,47	0,95	4,64		
pH	400-2500	1,5,5,1	72	5	2,43-3,10	0,10	0,68	0,11	0,60	1,55	1,19	1,47
	1100-2500	1,5,5,1	74	6	2,43-3,25	0,11	0,66	0,12	0,59	1,50		

^a Número de muestras.

^b Error típico de calibración.

^c Coeficiente de determinación para calibración.

^d Error típico de validación cruzada.

^e Coeficiente de determinación para validación cruzada.

^f “Residual predictive deviation” para validación cruzada, Relación DT/ETVC



Para el parámetro masa volúmica, los modelos obtenidos presentan una capacidad predictiva excelente de acuerdo con lo indicado por Shenk y Westerhaus (1996) y Williams (2001). Asimismo, Nicolai et al. (2007) señalan que valores de RPD_{vc} superiores a 3 indican que el modelo presenta una excelente capacidad predictiva.

En la literatura científica no se ha encontrado ningún artículo de investigación que aborde la determinación de dicho parámetro en vinagre de vino empleando la tecnología NIRS. No obstante, la determinación de la masa volúmica relacionada con el contenido en sólidos solubles (principalmente polifenoles y azúcares reductores) es importante en vinagres con mucho color o con un alto contenido en azúcares ya que éstos se caracterizan por presentar mayores valores de este parámetro, siendo su determinación muy fácil en la bodega. Además, dicho parámetro es utilizado en las bodegas para la conversión de peso a volumen tanto en expediciones como en compras.

En relación con el parámetro azúcares reductores la capacidad predictiva de los modelos desarrollados puede ser considerada como excelente si se tienen en cuenta los valores de R^2_{vc} , y del RPD_{vc} obtenidos, de acuerdo con los valores indicados por Shenk y Westerhaus (1996), Williams (2001) y Nicolai et al. (2007) para dichos estadísticos.

Ningún artículo científico ha sido publicado basado en la determinación de dicho parámetro en vinagre de vino empleando la tecnología NIRS. Sin embargo, la determinación de dicho parámetro de forma no destructiva resulta de gran importancia en las bodegas a la hora de llevar a cabo la calificación de vinagres, existiendo en la actualidad un enorme interés hacia la producción de vinagres dulces al ser en potencia notable competidor de otros productores europeos por su gran calidad, riqueza organoléptica y precios más reducidos a igualdad de calidad.



En relación con los elevados valores del coeficiente de determinación de validación cruzada obtenidos para este parámetro es importante tener en consideración lo indicado por Fearn (2014) quién señala que, si bien el estadístico R^2_{vc} puede ser útil para establecer la capacidad predictiva de un determinado modelo, es necesario tener en cuenta que este estadístico presenta algunas limitaciones. La principal limitación del mismo es su dependencia del rango y de la desviación típica del colectivo de calibración. En este caso concreto al estar constituido el colectivo de calibración por vinagres secos, semidulces y dulces en cuanto a criterio de dulzor y en cuanto al criterio de envejecimiento vinagres de poca crianza y vinagres con alto nivel de crianza, la desviación típica de dicho colectivo es prácticamente igual a la media, siendo igualmente el rango del parámetro muy amplio.

En relación con el parámetro acidez total, la capacidad predictiva del modelo desarrollado es también excelente si se consideran los valores de R^2_{vc} y RPD_{vc} (Shenk y Westerhaus, 1996; Williams, 2001; Nicolai et al., 2007).

La determinación no destructiva de dicho parámetro es muy importante para la industria. Así, los vinagres que destacan por su alta acidez total corresponden a vinagres con largos periodos de envejecimiento, como son los de crianza, donde se ha evaporado gran cantidad de agua. Sin embargo, también aparecen otros vinagres que no llegan al mínimo de acidez total establecido por la norma de calidad para la elaboración y la comercialización de los vinagres (BOE, 2012). Estos bajos grados acéticos se deben, bien a que no ha terminado el proceso de acetificación, o bien a la adición reciente de vino fresco a las criaderas, con lo que se diluye su contenido en ácido acético (López et al., 2003).

Los resultados obtenidos son inferiores a los obtenidos por De la Haba et al. (2014) ($RPD_{vc} = 8,35$), empleando el mismo instrumento monocromador.



En relación con el parámetro pH, la capacidad predictiva del modelo permite diferenciar entre valores altos, medios y bajos del parámetro (Shenk y Westerhaus, 1996; Williams, 2001). Si se tiene en cuenta el valor de RPD_{vc} obtenido y de acuerdo con Nicolaï et al. (2007), el modelo permitiría diferenciar entre valores altos y bajos del citado parámetro.

Es importante tener en consideración que durante el proceso de envejecimiento del vinagre se suele producir un descenso del pH inicial. Asimismo, indicar que valores de pH inferiores a 3, dificultan el desarrollo de las bacterias acéticas. Al igual que ha de considerarse que la aportación durante la crianza de mostos de Pedro Ximénez o Moscatel para elaborar vinagres dulces amparados por la DOP, hacen que el pH inicial se vea aumentado.

Los resultados de los modelos predictivos en este trabajo son similares a los obtenidos por Bao et al. (2013) y De la Haba et al. (2014).

Dardenne (2010) y Fearn (2014) han demostrado que el estadístico RPD_{vc} empleado en la mayoría de los artículos NIR de investigación es igual a $1/\sqrt{(1 - R^2_{vc})}$ y depende en igual medida, como en el caso del R^2_{vc} , del rango que presenta el colectivo de calibración. Así, en la Tabla 5.2 se puede apreciar la correlación existente entre los valores altos y bajos R^2_{vc} y RPD_{vc} para los parámetros analizados. Así, mientras que para los parámetros masa volúmica, azúcares reductores y acidez total se obtienen modelos con valores de R^2_{vc} comprendidos entre 0,95 y 0,99 y de RPD_{vc} entre 4,64 y 14,14, para el parámetro pH se obtienen valores de $R^2_{vc} = 0,59$ y $RPD_{vc} = 1,50$, para los modelos desarrollados en la región de 1100 a 2500 nm.

Finalmente, se procedió a determinar la mejor región de trabajo del instrumento FNS-6500 SY-I para los parámetros analizados. Los resultados de los tests F de Fisher realizados se muestran en la Tabla 5.2.



Para todos los parámetros analizados no se detectaron diferencias significativas ($P < 0,05$) entre los valores de ETVC obtenidos en las dos regiones espectrales consideradas. Dado que un futuro sería interesante incorporar parámetros analíticos relacionados con el color del vinagre, se decidió trabajar con el rango completo del instrumento, 400-2500 nm.

5.3. Validación de los modelos de calibración desarrollados

La Tabla 5.3 muestra los estadísticos de validación externa de los mejores modelos obtenidos para la predicción de parámetros de calidad química en vinagres, en el rango espectral comprendido entre 400 y 2500 nm.

Tabla 5.3. Estadísticos de validación para las mejores ecuaciones para la predicción de calidad química de vinagres de la DOP “Vinagre de Montilla-Moriles”. Rango espectral 400-2500 nm.

Parámetro	N ^a	ETP ^b	ETP _(c) ^c	Sesgo	R ² _p ^d	Pendiente	Límites ^e	
							ETP _(c) = 1,3 · SEC	Sesgo = ± 0,6 · SEC
Masa volúmica (g/L)	27	3,23	2,96	-1,42	0,99	1,00	4,76	± 2,20
Azúcares reductores (g/L)	27	13,97	14,17	1,31	0,99	1,01	9,43	± 4,35
Acidez total (g ácido acético/100 mL vinagre)	27	1,42	1,43	-0,20	0,80	0,85	0,49	± 0,23
pH	27	0,22	0,20	0,11	0,22	0,75	0,13	± 0,06

^a Error típico de predicción.

^b Error típico de predicción corregido para el sesgo.

^c Coeficiente de determinación para la validación externa.

^d Límites de control establecidos en el protocolo de Windham et al. (1989).

Fuente: elaboración propia.

Windham et al. (1989) establecen las condiciones que deben cumplir los modelos para su utilización en la predicción de parámetros de calidad en rutina. De acuerdo a dicho protocolo, ninguno de los parámetros analizados



podría ser utilizado en rutina puesto que no cumplen con alguno de los límites establecidos. Así, el parámetro masa volúmica presenta un valor para el sesgo superior al límite de control (-1,42 versus $\pm 0,40$); los parámetros azúcares reductores y acidez total presentan valores superiores tanto del ETP(c) como del sesgo ($ETP_{(c)} = 14,17 \text{ g/L}$ y $1,33 \text{ g ácido acético/100 mL vinagre}$ y sesgo = $1,31$ y $-0,35$, respectivamente) con relación a los valores de control ($9,42 \text{ g/L}$ y $0,49 \text{ g ácido acético/100 mL vinagre}$, respectivamente, para el ETP(c) límite y $\pm 4,35$ y $\pm 0,23$, respectivamente, para el sesgo límite). Asimismo, y para la acidez titulable la pendiente ($0,64$) es inferior a la establecida en el protocolo ($0,9-1,1$). Finalmente, el parámetro pH no cumple ninguno de los cuatro límites establecidos ($ETP_{(c)}$, sesgo, R^2_p y pendiente) por dicho protocolo.

Asimismo, la comparación de los valores de los estadísticos ETL (Tabla 5.1) y ETP (Tabla 5.3) para cada uno de los parámetros analizados confirma que los modelos desarrollados no pueden ser utilizados en rutina debido a que los valores del ETP superan entre 11 y 18 veces el valor del ETL calculado (Westerhaus, 1989; Williams, 2001).

Esta Tesis doctoral constituye, por tanto, una primera aproximación a la implantación de la tecnología NIRS para el control de calidad de vinagres de la DOP “Vinagre de Montilla-Moriles”, siendo necesario disponer de colectivos de calibración amplios y que reflejen la variabilidad del producto para así poder obtener modelos más robustos que puedan ser utilizados en rutina.

5.4. Principales longitudes de onda para la predicción de los parámetros de calidad físico-químicos analizados en vinagres de vino de la DOP “Vinagre de Montilla-Moriles”

Las principales longitudes de onda para la determinación de los parámetros de calidad: masa volúmica, azúcares reductores, acidez total y pH en vinagres de vino blanco pertenecientes a la DOP “Vinagre de Montilla-Moriles” fueron determinadas mediante “loading weight” (Fig. 5.1),



correspondientes a las mejores ecuaciones obtenidas para la predicción de dichos parámetros.

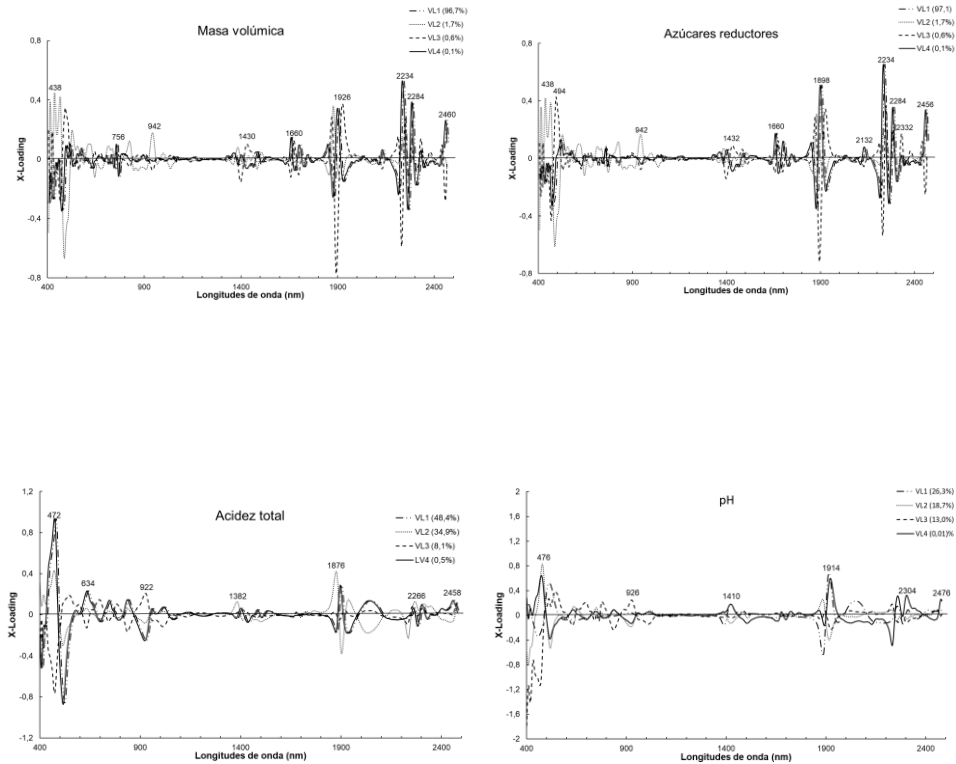


Figura 5.1. “Loadings” para los parámetros masa volúmica, azúcares reductores, acidez total y pH.

Para el parámetro masa volúmica, la representación de las 4 primeras variables latentes empleadas en la construcción del modelo de calibración (Fig. 5.1) mostró que las áreas del espectro que ejercen mayor influencia en el ajuste del modelo fueron 468, 494, 948, 1448, 1664, 1930, 2234, 2282, y 2458 nm, relacionadas con la presencia de antocianos y clorofila en la región del visible y con agua e hidratos de carbono en la región del infrarrojo (Williams, 2001; Shenk et al., 2008).



Para el parámetro azúcares reductores, las áreas del espectro con mayor influencia fueron: 436, 494, 946, 1436, 1660, 1898, 2130, 2234, 2284, 2332 y 2456 nm, relacionados con los pigmentos colorantes (antocianos y clorofila) en la región del visible y con agua, hidratos de carbono y proteínas (región NIR) (Williams, 2001; Shenk et al., 2008). Es importante señalar que de las longitudes de onda que ejercen influencia en este parámetro lo hacen igualmente en el caso del parámetro masa volúmica.

Para el parámetro acidez total, las principales longitudes de onda detectadas son: 476, 634, 926, 1382, 1876, 2042, 2266 y 2458 nm, relacionadas con los pigmentos colorantes naranjas y verdes y con agua, hidratos de carbono y proteínas (Williams, 2001; Shenk et al., 2008), similares a las de pH, ya que ambos parámetros están estrechamente relacionados.

5.5. Características organolépticas de los vinagres embotellados de la DOP “Vinagre de Montilla-Moriles”

En la tabla 5.4, se indican las puntuaciones medias obtenidas para los distintos atributos seleccionados en las fichas de cata, incluidas en el Anexo I, para los distintos tipos de vinagres clasificados en función de su contenido en azúcar (dulzor).



Tabla 5.4. Puntuaciones obtenidas en la cata descriptiva para cada atributo en los vinagres según su contenido en azúcar (dulzor)

Fase	Atributo	Grupos			
		Seco	Semi (Semisecos- semidulces)	Dulces	Dulces balsámicos
Visual	Color	2,9	3,6	4,1	3,8
	Limpidez	3,1	3,4	3,7	3,6
Olfativa	Materia Prima	6,1	6,4	6,6	7,1
	Intensidad	5,8	6,6	6,7	6,9
	Calidad	7,7	8,1	8,2	8,7
	Complejidad aromática	11,8	12,2	12,7	13,4
Gustativa	Intensidad	6,1	6,3	6,5	6,6
	Calidad	6,2	7,0	7,0	7,6
	Complejidad	11,9	12,4	12,8	12,8
Armonía		10,0	10,8	11,2	11,3
Valor Total		71,6	76,8	79,5	81,8

En la totalidad de los 107 vinagres evaluados y clasificados en función de su contenido en azúcar (dulzor), se han encontrado diferencias para todos los atributos sensoriales analizados.

En la fase visual, los vinagres más valorados corresponden a los dulces, seguidos de los dulces balsámicos, siendo los vinagres secos los puntuados con valores más bajos, seguidos éstos por el grupo denominado de los semi.

En los diferentes atributos juzgados en la fase olfativa, fueron los vinagres dulces balsámicos y dulces los que obtuvieron mayor puntuación frente a los secos y semi.



Asimismo, existen igualmente diferencias entre los cuatro tipos de vinagres en la fase gustativa de la cata. Así, los vinagres más valorados corresponden a los dulces balsámicos, seguidos de los dulces, siendo los menos valorados los secos, seguidos por los semi. En intensidad gustativa, volvieron a destacar los dulces balsámicos, frente a los vinagres secos y semi que obtuvieron puntuaciones más bajas, quedando los dulces en posición intermedia. En calidad gustativa, destacan de nuevo los dulces balsámicos, frente a los secos que obtuvieron una puntuación más baja, quedando los semi y dulces en posición intermedia. En complejidad gustativa, destacan los vinagres dulces y dulces balsámicos, frente a los secos que obtuvieron una puntuación más baja, quedando los semi en posición intermedia.

Respecto a la armonía, fueron los vinagres dulces balsámicos los que obtuvieron puntuaciones más altas, seguidos de los dulces, siendo los peor valorados los vinagres secos y semi.

Según la suma total de los valores medios asignados a los vinagres según en su contenido en azúcar, los vinagres semi, dulces y dulces balsámicos son clasificados como muy buenos.

En la tabla 5.5, se indican las puntuaciones medias obtenidas para los distintos atributos seleccionados en las fichas de cata, incluidas en el Anexo I, para los distintos tipos de vinagres clasificados según su sistema de crianza y tipo de envejecimiento.



Tabla 5.5. Puntuaciones obtenidas en la cata descriptiva para cada atributo en los vinagres de vino según su sistema de crianza y tipo de envejecimiento.

Fase	Atributo	Sistema de crianza y tipo de envejecimiento				
		0	1	2	3	4
Visual	Color	3,5	3,7	3,3	3,7	4,0
	Limpidez	3,6	3,4	3,2	3,9	3,6
Olfativa	Materia Prima	6,8	6,8	6,2	6,2	6,8
	Intensidad	6,5	6,8	6,5	6,9	6,9
	Calidad	8,2	8,4	8,3	7,9	8,7
	Complejidad aromática	13,4	12,4	12,8	12,9	12,9
Gustativa	Intensidad	6,7	6,1	6,2	6,4	6,8
	Calidad	7,5	6,7	6,3	6,8	7,6
	Complejidad	13,1	11,7	12,4	13,1	13,2
Armonía/Sensación final		11,5	10,6	10,0	12,5	11,4
Valor Total		77,8	66,0	75,2	80,3	81,9

0: Vinagre base, sin crianza (0 meses); 1: Vinagre de crianza “Crianza”: solera y criaderas (mín. 6 meses); 2: Vinagre de crianza “Reserva”: solera y criaderas (mín. 2 años); 3: Vinagre de crianza solera y criaderas “Gran reserva” (mín. 10 años); 4: Vinagre de crianza añada “Añada” (mín. 3 años).

En la fase visual, los vinagres más valorados corresponden a los que presentan una crianza con añada (grupo 4), seguidos de los grupos 3 y 1, siendo los menos valorados los vinagres de los grupos 0 y 2.

Si analizamos los diferentes atributos juzgados en la fase olfativa, los vinagres con añada (grupo 4) obtuvieron mayor puntuación, seguidos de los vinagres de los grupos 0, 1 y 2, siendo los menos valorados los vinagres con crianza en solera y criaderas un mínimo de 10 años (grupo 3). En materia prima, destacan por igual los vinagres de los grupos 0, 1 y 4, frente a los del grupos 2 y 3. En intensidad olfativa, destacan los vinagres de crianza tipo añada



(grupo 4) y los vinagres del gran reserva (grupo 3), seguidos del grupo 1, quedando en una posición final los vinagres de los grupos 0 y 2. En calidad olfativa, destacan de nuevo los vinagres del grupo 4, seguidos de los de los grupos 1, 2 y 0, siendo los peor valorados los del grupo 3. Por último, en complejidad olfativa, destacan los vinagres base para crianza (grupo 0), siendo los peor valorados los del grupo 1, quedando en una posición intermedia los grupos 2, 3 y 4.

Asimismo, existen diferencias significativas entre los cuatro tipos de vinagres en la fase gustativa de la cata, así los vinagres más valorados corresponden a los del grupo 4, seguidos de los del grupo 0, siendo los peores valorados los del grupo 3, seguidos por los grupos 1 y 2. En intensidad y calidad gustativa, volvieron a destacar los de los grupos 4 y 0, frente a los vinagres del grupo 3 que obtuvieron puntuaciones más bajas, quedando los de los grupos 1 y 2 en posición intermedia. En complejidad gustativa, destacan los vinagres de los grupos 4, 3 y 0, frente a los de los grupos 1 que obtuvieron una puntuación más baja, quedando los del grupo 2 en posición intermedia.

Respecto a la armonía, los vinagres del grupo 3 los que obtuvieron mayor puntuación frente a los grupos 0 y 4 fueron los que obtuvieron puntuaciones intermedias, a los que le siguieron los del grupo 1, siendo los menos valorados los del grupo 2.

La suma total de los valores medios asignados a los vinagres según sistema de crianza y periodo de envejecimiento indica que los vinagres de los grupos 0, 2, 3 y 4 se clasifican como muy buenos, siendo el grupo 4 el mejor valorado.



Capítulo 6:

Conclusiones

Capítulo 6. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en los diferentes ensayos que constituyen esta Tesis Doctoral permiten establecer las siguientes conclusiones:

1. Los vinagres de vinos amparados por la DOP “Vinagre de Montilla-Moriles” analizados en este trabajo, presentaron una gran heterogeneidad en sus características fisicoquímicas, destacando principalmente su variabilidad respecto los parámetros azúcares reductores y acidez total, consecuencia del origen de la materia prima utilizada y del proceso de concentración llevado a cabo durante la crianza en madera.
2. La Espectroscopía NIR combinada con métodos quimiométricos adecuados podría ser empleada para la determinación de la masa volúmica, azúcares reductores y la acidez total en vinagres de vino, parámetros de gran importancia en el seguimiento del proceso de fermentación del citado producto, así como en la detección de fraudes en las industrias vinagreras.
3. Los modelos predictivos NIRS de calidad fisicoquímica desarrollados para vinagres de vino de la DOP “Vinagre de Montilla-Moriles” facilitarán la toma de decisiones en tiempo real a lo largo de todo el proceso de elaboración y en el posterior envejecimiento en madera de los citados vinagres. No obstante, los resultados obtenidos deben ser considerados preliminares, siendo necesario en un futuro incrementar la robustez de los modelos obtenidos, lo que permitirá el uso en rutina de dicha tecnología en las industrias vinagreras.



4. Los vinagres de vino con envejecimiento analizados presentaron en la fase visual coloraciones que van desde un amarillo dorado hasta un color caoba muy intenso, casi azabache en los dulces. En la fase olfativa dichos vinagres presentaron aromas de ésteres, especialmente de acetato de etilo, equilibrada sensación acética con aromas primarios muy definidos, notas varietales de fruta madura que recuerdan a la uva “Pedro Ximénez” y que los hace diferenciarse del resto de vinagres amparados por otras denominaciones de origen, especialmente en los vinagres dulces balsámicos con aromas de uva pasificada y raspón del racimo recuerdan al vino Pedro Ximénez. Asimismo, presentan potentes aromas especiados, torrefactos y empireumáticos característicos de la crianza en botas de madera de alto grado de vejez típicas de la Denominación de Origen Protegida Vinagre de Montilla-Moriles. En boca, se muestran bien estructurados, de alta intensidad y larga persistencia.

5. Los vinagres de vino pertenecientes a la DOP más valorados por el panel de expertos fueron los vinagres dulces con crianza tipo “añada”, con un rango de vejez entre 3 y 50 años. En estos vinagres al someterse a un envejecimiento oxidativo de forma estática las características organolépticas son intrínsecas a la añada en cuestión, siendo los menos valorados los vinagres secos de poca crianza (inferior a 24 meses) en madera.



Capítulo 7: Recomendaciones finales y futuros trabajos de investigación



Capítulo 7. RECOMENDACIONES FINALES Y FUTUROS TRABAJOS DE INVESTIGACIÓN

A partir del desarrollo de la presente Tesis Doctoral se podrían realizar distintos trabajos de investigación, destinados al control de los procesos de elaboración, calidad y trazabilidad en los vinagres de vino amparados por la DOP “Vinagres de Montilla-Moriles”, y que se pudieran aplicar igualmente a vinagres de otras denominaciones.

Por otro lado, se debería buscar la consolidación del mercado nacional, fomentando la cultura del vinagre en los hogares y comenzar que sean valorados a nivel internacional. Pero esto debe ir unido al control de los procesos y a la calidad de los productos obtenidos. Para ello se debería publicitar mejor las bondades de unos vinagres de vino únicos en el mundo y ponerlos en valor a nivel gastronómico.

Asimismo, también se deben frenar las malas prácticas de la competencia en el sector vinagrero español, e incluso a nivel internacional, que pasa inevitablemente por la colaboración de los organismos oficiales (UE, gobierno español, autonomías, etc.), quienes deberían dar el mismo trato de favor al buen vinagre que al buen vino.

Entre las futuras líneas de investigación que podrían seguir al presente trabajo, estarían la “Detección de adulteraciones fraudulentas de vinagres de vino”, incluidos los balsámicos, utilizando el Análisis de Espectrometría de Masas de Relaciones Isotópicas, cuyo objetivo sería la identificación de sustancias adulteradoras del vinagre, así como la Espectroscopía NIR; el análisis de compuestos aromáticos en muestras de vinagres andaluces para establecer indicadores de calidad, mediante técnicas analíticas como NIRS y sensoriales, para conseguir describir el olor de los vinagres analizados basándose en su composición química.



Finalmente, resulta importante destacar la versatilidad que presentan los vinagres de vino amparados por una DOP, como por ejemplo son los elaborados por la DOP “Vinagres de Montilla-Moriles, a través de catas y degustaciones de la mano de profesionales del sector enológico-vinagrero, aumentando así el nivel de conocimiento sobre las bondades de dichos productos a nivel nacional y de la Unión Europea, y participando en campañas, jornadas y ferias gastronómicas internacionales.



Capítulo 8: Bibliografía



Capítulo 8. BIBLIOGRAFÍA

- Abney, W., Festing, E.R. 1881. On the influence of the atomic grouping in the molecules of organic bodies on their absorption in the infra-red region of the spectrum. *Philosophical Transactions of the Royal Society* 172, 887–918.
- Adams, M.R. 1985. Vinegar. En: Wood, B.J.B. (Ed.). *Microbiology of Fermented Foods*. IFT Press. New York, EE.UU. pp. 1–45.
- Baena-Ruano, S. 2013. Algunos aspectos metodológicos en la investigación sobre el proceso de elaboración de vinagre de vino. Tesis Doctoral. Universidad de Córdoba, España.
- Bao, Y., Liu F., Kong, W., Sun, D.W., He, Y., Qiu, Z. 2013. Measurement of soluble solid contents and pH of white vinegars using VIS/NIR spectroscopy and least squares support vector machine. *Food and Bioprocess Technology*, 1–8.
- Barnes, R.J., Dhanoa, M.S., Lister, S.J. 1989. Standard Normal Variate transformation and De-trending of near infrared diffuse reflectance spectra. *Applied Spectroscopy* 43, 772–777.
- Benson, I.B. 2003. Near infrared absorption technology for analysing food composition. En: Lees, M. (Ed.). *Food Authenticity and Traceability*. CRC Press, Woodhead Publishing Limited. Cambridge, U.K. pp. 101–130.
- Berthollet, C.L. 1803. *Ensayo de Estática Química*.
- Bertrand, D., Dufour, E. 2000. *La Spectroscopie Infrarouge et ses Applications Analytiques*. Editions TEC & DOC. Paris, France.
- Birth, G.S., Hecht, H.G. 1987. The physics of Near-Infrared Reflectance. En: Williams P.C., Norris, K.H. (Eds.). *Near Infrared Technology in the Agricultural and Food Industries*. American Association of Cereal Chemist. St. Paul, Minnesota, USA. pp. 1–14.
- Birth, G.S., Norris, K.H. 1958. An instrument using light transmittance for non-destructive measurement of fruit maturity. *Food Technology* 12, 592–595.



- Bobelyn, E., Serba, A.S., Nicu, M., Lammertyn, J., Nicolai, B.M., Saeys, W. 2010. Postharvest quality of apple predicted by NIR-spectroscopy: study of the effect of biological variability on spectra and model performance: *Postharvest Biology and Technology* 55, 133–143.
- Boerhaave, H. 1732. *Elementa Chemiae, Quae Anniversario Labore Docuit in Publicis, Privatisque Scholis*.
- Boletín Oficial del Estado (BOE). 1977. Orden de 31 de enero de 1977, por la que se establecen los Métodos Oficiales de Análisis de Aceites y Grasas, Cereales y Derivados, Productos Lácteos y Productos Derivados de la Uva. *Boletín Oficial del Estado* No 167, de 14 de julio de 1977, pp. 15800–15808.
- Boletín Oficial del Estado (BOE). 1979. Orden de 31 de julio de 1979, por la que se establecen Métodos Oficiales de Análisis de Aceites y Grasas, Productos Cárnicos, Cereales y Derivados Fertilizantes, Productos Fitosanitarios, Productos Lácteos, Piensos, Aguas y Productos Derivados de la Uva. *Boletín Oficial del Estado* No 207, de 29 de agosto de 1979, pp. 20221–20247.
- Boletín Oficial del Estado (BOE). 2009. Resolución de 16 de noviembre de 2009, por la que se concede la protección nacional transitoria a la Denominación de Origen Protegida «Vinagre de Montilla-Moriles». *Boletín Oficial del Estado* No 310, de 25 de diciembre de 2009, pp. 109885–109898.
- Boletín Oficial del Estado (BOE). 2012. Real Decreto 661/2012, de 13 de abril, por el que se establece la norma para la elaboración y la comercialización de los vinagres. *BOE* nº 100, de 26 de abril de 2012, pp. 32031–32036.
- Boletín Oficial de la Junta de Andalucía (BOJA). 2011. Anexo III. Pliego de Condiciones de la Denominación de Origen Protegida «Vinagre De Montilla-Moriles». *BOJA* núm. 249, 22 de diciembre 2011, pp. 161–166.



- Bourgeois, J., Barja, F. 2006. Biological contaminations and fermentation stoppages in vinegars: causes and preventive means. En: García, I. (Ed.). Segundas Jornadas de I+D+I en la Elaboración de Vinagre. Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba. Córdoba, España. pp. 33–38.
- Bourgeois, J., McColl, I., Barja, F. 2006. Ácido fórmico, ácido acético y metanol: sus repercusiones en la autenticidad de los vinagres. En: García, I. (Ed.). Segundas Jornadas de I+D+I en la Elaboración de Vinagre. Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba. Córdoba, España. pp. 231–238.
- Burns, D.A., Ciurczak, E.W. 1992. Handbook of Near Infrared Analysis. Practical Spectroscopy Series 13. Marcel Dekker, Inc. New York, EE.UU.
- Cajarville, C., Repetto, J.L., Curbelo, A., Soto, C., Cozzolino, D. 2003. Determination of dry matter (DM) and nitrogen (N) degradability in forages by near infrared reflectance spectroscopy (NIRS). Proceedings British Society of Animal Science. Annual Meeting. pp. 15.
- Callejón, R.M., Tesfaye, W., Torija, M.J., Mas, A., Troncoso, A.M., Morales, M.L. 2009. Volatile compounds in red wine vinegars obtained by submerged and surface acetification in different woods. Food Chemistry 113, 1252–1259.
- Casale, M., Oliveri, P., Armanino, C., Lanteri, S., Forina, M. 2010. NIR and UV-VIS spectroscopy, artificial nose and tongue: Comparison of four fingerprinting techniques for the characterization of Italian red wines. Analytica Chimica Acta 668, 143–148.
- Cedrón-Fernández, M. T. 2004. Estudio analítico de compuestos volátiles en vino. Caracterización quimiométrica de distintas denominaciones de origen. Tesis Doctoral. Universidad de La Rioja, España.
- Cen, H., He, Y. 2007. Theory and application of near infrared reflectance spectroscopy in determination of food quality. Trends in Food Science and Technology 18, 72–83.



- Chale-Rush, A., Burgess, J., Mattes, R. 2007. Multiple routes of chemosensitivity to free fatty acids in humans. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 292, 206–212.
- Chen, Q., Ding, J., Cai, J., Zhao, J. 2012. Rapid measurement of total acid content (TAC) in vinegar using near infrared spectroscopy based on efficient variables selection algorithm and nonlinear regression tools. *Food Chemistry* 135, 590–595.
- Coates, J., Ramani, M. 2006. Making NIR your essential instrument. *Laboratory Equipment* 43, 50–52.
- Codex Alimentarius. 1987. Codex-Stan-162-1987. Norma del Codex para el Vinagre.
- Columela. (60-70 d.C.). *Res Rústica*.
- Conner, H.A., Allgeier, R.J. 1976. Vinegar: Its history and development. *Advances in Applied Microbiology* 20, 82–133.
- Cozzolino, D., Kwiatkowski, M.J., Waters, E.J., Gishen, M. 2007. A feasibility study on the use of visible and short wavelengths in the near-infrared region for the non-destructive measurement of wine composition: *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 387, 2289–2295.
- Dahm, D.J., Dahm, K.D. 2001. The physics of near-infrared scattering. En: Williams, P., Norris, K. (Eds.). *Near Infrared Technology in the Agricultural and Food Industries*. 2nd Edition. American Association of Cereal Chemist. St. Paul, Minnesota, EE.UU. pp. 1–18.
- Dardenne, P. 2010. Some considerations about NIR spectroscopy: closing speech at NIR-2009. *NIR News* 21, 8–14.
- Davies, C.V. 2015. Estudio de los procesos biotecnológicos de acetificación para la producción de vinagre de naranja y vinagre de arándanos. Tesis Doctoral. Universidad de Valencia, España.
- De la Haba, M.J., Arias, M., Ramírez, P., López, M.I., Sánchez, M.T. 2014. Characterizing and authenticating Montilla-Moriles PDO vinegars using NIRS technology. *Sensors* 14, 3528–3542.



- Delahunty, C.M., Piggott, J.R., Conner, J.M., Paterson, A. 1996. Comparison of dynamic flavour release from hard cheese and analysis of headspace volatiles from the mouth with flavour perception during consumption. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 71, 273–281.
- Denominación de Origen Protegida (DOP) “Vinagre de Montilla-Moriles”, 2008. <https://www.montillamoriles.es/>. Accessible 10.03.2020.
- Dhanoa, S., Lister, S.J., Sanderson R., Barnes, R.J. 1994. The link between multiplicative scatter correction (MSC) and standard normal variate (SNV) transformations of NIR spectra. *Journal of Near Infrared Spectroscopy* 2, 43–47.
- Diario Oficial de las Comunidades Europeas (DOCE). 1990. Reglamento (CEE) N° 2676/90 de la Comisión de 17 de septiembre de 1990 por el que determinan los métodos de análisis comunitarios aplicables en el sector del vino. DOCE» núm. 272, de 3 de octubre de 1990, pp. 1–192.
- Diario Oficial de la Unión Europea (DOUE). 2008. Reglamento (CE) n° 479/2008 del Consejo, de 29 de abril de 2008, por el que se establece la organización común del mercado vitivinícola, se modifican los Reglamentos (CE) n° 1493/1999, (CE) n° 1782/2003, (CE) n° 1290/2005 y (CE) n° 3/2008 y se derogan los Reglamentos (CEE) n° 2392/86 y (CE) n° 1493/1999. DOUE núm. 148, de 6 de junio de 2008, pp. 1–61.
- Diario Oficial de la Unión Europea (DOUE). 2015. Reglamento de Ejecución (UE) 2015/48 de la Comisión, de 14 de enero de 2015, por el que se inscribe una denominación en el Registro de Denominaciones de Origen Protegidas y de Indicaciones Geográficas Protegidas [Vinagre de Montilla-Moriles (DOP)]. J L 9, 15.1.2015, pp. 11–16.
- Durán-Guerrero, E. 2008. Control de los procesos de elaboración, calidad y trazabilidad del Vinagre de Jerez. Tesis Doctoral. Universidad de Cádiz, España.



- Fan, W., Shan, Y., Li, G., Lv, H., Li, H., Liang, Y. 2012. Application of competitive adaptive reweighted sampling method to determine effective wavelengths for prediction of total acid of vinegar. *Food Analytical Methods* 5, 585–590.
- Fearn, T. 2014. The overuse of R2. *NIR News* 25, 32.
- Fernández, V. 2003. Métodos de Procesamiento de la Señal Espectroscópica NIR: Aplicación al Análisis Cuantitativo y Cualitativo de Productos Agroalimentarios. Tesis Doctoral. Universidad de Córdoba, España.
- Fernández de Simón, B., Cadahía, E., Jalocho, J. 2003. Volatile compounds in Spanish red wine aged in barrels made of Spanish, French, and American oak wood. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51, 7671–7678.
- Fernández-Pachón, M.S., Villano, D., Troncoso, A.M., García-Parrilla, M.C. 2008. Antioxidant activity of phenolic compounds: from in vitro results to in vitro evidence. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 48, 649–671.
- Ferreira, A.C.S., Barbe, J.C., Bertrand, A. 2003. 3-hydroxy-4,5-dimethyl-2(5H)-furanone: A key odorant of the typical aroma of oxidative aged Port wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51, 4356–4363.
- Foster, S., Roura, E., Thomas, W., Mirza, N. 2014. Extrasensory perception: Odorant and taste receptors beyond the nose and mouth. *Pharmacology & Therapeutics* 142, 41–61.
- Galán-Soldevilla, H., Ruiz Pérez-Cacho, P., de la Haba Ruiz, M., Uclés Gálvez, J.C. 2015. Perfil sensorial de vinagres de Montilla-Moriles. VII Simposio del Salmorejo Cordobés: el Vinagre.
- García-García, I., Santos-Dueñas, I.M., Jiménez-Ot, C., Jiménez-Hornero, J.E., Bonilla-Venceslada, J.L. 2009. Vinegar engineering. Solieri, L., Giudici, P. (Eds.), *Vinegars of the World*. Springer. Milan, Italy. pp. 97–120.
- García-Parrilla, M.C. 2010. Análisis sensorial descriptivo del vinagre de vino: procedimiento de cata y fiabilidad de los nuevos atributos. *Journal of sensory Studies* 25 (2): 216-230, abril de 2010.



- García-Parrilla, M.C., Heredia, F.J., Troncoso, A.M. 1998. The influence of the acetification process on the phenolic composition of wine vinegars. *Sciences des Aliments* 18, 211–221.
- Gerard, L.M. 2015. Caracterización de bacterias del ácido acético destinadas a la producción de vinagres de frutas. Tesis Doctoral. Universidad de Valencia, España.
- Ghommidh, C., Navarro J.M., Durand, G. 1982. A study of acetic acid production by immobilized *Acetobacter* cells: oxygen transfer. *Biotechnology Bioengineering* 24, 605–617.
- González-Sáiz, J.M., Estaban-Díez, I., Sánchez-Gallardo, C., Pizarro, C. 2008. Monitoring of substrate and product concentrations in acetic fermentation processes for onion vinegar production by NIR spectroscopy: Value addition to worthless onions. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 391, 2937–2947.
- González-Viñas, M.A. 2008. Evaluación de la opinión de los consumidores sobre distintos alimentos mediterráneos. Universidad de Castilla La Mancha, España.
- Grosch, W. 1994. Determination of potent odourants in foods by aroma extract dilution analysis (AEDA) and calculation of odour activity vales (OAVs). *Flavour and Fragrance Journal* 9, 147–153.
- Gutsche, C.D., Pasto, D.J. 1979. *Fundamentos de Química Orgánica*. Editorial Reverté. Barcelona, España.
- Guzmán, M. 1998. *El Vinagre, Características, Atributos y Control de Calidad*. Ed. Díaz de Santos. Madrid, España.
- Heise, H.M., Winzen, R. 2004. Chemometrics in near-infrared spectroscopy. En: Siesler, H.W., Ozaki, Y., Kawata, S., Heise, H.M. (Eds.). *Near Infrared Spectroscopy. Principles, Instruments, Applications*. Wiley-VCH. Weinheim, Germany. pp. 125–162.
- Henry, C.M. 1999. Near-IR gets the job done. *Analytical Chemistry* 71, 625–628.
- Herschel, W. 1800. Experiments on the refrangibility of the invisible rays of the sun. *Philosophical Transactions of the Royal Society* 2, 284–292.



- International Organisation of Vine and Wine (IOV). 2015. Resolución OIV-OENO 527-2015: “Determinación de la distribución del deuterio en el ácido acético del vinagre de vino por resonancia magnética nuclear (RMN)”. Organización Internacional de la Viña y el Vino, 10 de julio de 2015.
- International Organisation of Vine and Wine (IOV). 2018. Compendium of Methods of Analysis of Wine Vinegars. Wine vinegars - Determination of total acidity content <http://www.oiv.int/en/technical-standards-and-documents/methods-of-analysis/compendium-of-methods-of-analysis-of-wine-vinegars> (accessible 10.03.2020).
- ISI. 2000. The Complete Software Solution Using a Single Screen for Routine Analysis, Robust Calibrations, and Networking; Manual. FOSS NIRSystems/TECATOR. Infracsoft International, LLC. Sylver Spring, MD, EE.UU.
- ISO. 1977. ISO 3591:1977. Sensory analysis -- Apparatus -- Wine-tasting glass.
- Jamshidi, B., Minaei, S., Mohajerani, E., Ghassemian, H. 2012. Reflectance Vis/NIR spectroscopy for nondestructive taste characterization of Valencia oranges. *Computers and Electronics in Agriculture* 85, 64–69.
- Jinap, S., Hajeb, P. 2010. Glutamate. Its applications in food and contribution to health. *Appetite* 55, 1–10.
- Ji-Yong, S., Xiao-bo, Z., Xiao-wei, H., Jie-wen, Z., Yanxiao, L., Limin, H., Jianchun, Z. 2013. Rapid detecting total acid content and classifying different types of vinegar based on near infrared spectroscopy and least-squares support vector machine. *Food Chemistry* 138, 192–199.
- Kawano, S. 2008. Sampling and sample presentation. En: Siesler, H.W., Ozaki, Y., Kawata, S., Heise, H.M. (Eds.). *Near-Infrared Spectroscopy. Principles, Instruments, Applications*. Wiley-VCH. Weinheim, Germany. pp. 115–124.
- Kaye, W. 1954. Near-infrared spectroscopy: I. Spectral identification and analytical applications. *Spectrochimica Acta* 6, 257–340.



- Kennedy, J.F., Humphrey, J.D., Barker, S.A. 1980. Application of living immobilized cells to the acceleration of the continuous conversion of ethanol (wort) to acetic acid (vinegar)-hydrous titanium (IV) oxide immobilized *Acetobacter* species. *Enzyme Microbiology and Technology* 2, 209–216.
- Kubelka, P., Munck, F. 1931. Ein Beitrag zur Optik der Farbanstriche. *Zeitschrift Für Technische Physik* 11, 593–601.
- Kützing, F.T. 1837. Microscopische Untersuchungen über die Hefe und Essigmutter, nebst mehreren andern dazu gehörigen vegetabilischen Gebilden, *Journal für Praktische Chemie* 11, 385–409.
- Labbé-Pino, M. 2007. Tratamientos postfermentativos del vinagre: conservación en botella, envejecimiento acelerado y eliminación de plomo. Tesis Doctoral. Universidad Rovira i Virgili, España.
- Lavoisier, A. 1789. *Traité Élémentaire de Chimie*. Paris.
- Lee, M.J., Seo, D.Y., Lee, H.E., Wang, I.C., Kim, W.S., Jeong, M.Y., Choi, G.J. 2011. In line NIR quantification of film thickness on pharmaceutical pellets during a fluid bed coating process. *International Journal of Pharmaceutics* 403, 66–72.
- Liebig, J. 1840. *Química Orgánica y su Aplicación a la Agricultura y a la Fisiología*. Taylor and Walton. London.
- Lin, H., Zhao, J., Sun, L., Chen, Q., Zhou, F. 2011. Freshness measurement of eggs using near infrared (NIR) spectroscopy and multivariate data analysis. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 12, 182–186.
- Liu, F., He, Y., Wang, L. 2008. Comparison of calibrations for the determination of soluble solids content and pH of rice vinegars using visible and short-wave near infrared spectroscopy. *Analytica Chimica Acta* 610, 196–204.
- Llaguno-Marchena, C., Polo, M.C. 1991. *El Vinagre de Vino*. Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Madrid, España.



- López, I. 2004. Ensayos comparativos del comportamiento enológico de las variedades autóctonas de Montilla-Moriles en la elaboración de vinos jóvenes afrutados. Tesis Doctoral. Universidad de Córdoba.
- López, M.M. 1998. Viticultura, Enología y Cata para Aficionados, 2ª edición. Mundi-Prensa (Ed.). Madrid, España.
- López, I., Morales, J., Ramírez, P., Jiménez, B. 2003. Estudio de la calidad de los vinagres de la provincia de Córdoba. En: García, I. (Ed.). Segundas Jornadas de I+D+I en la Elaboración de Vinagre. Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba. Córdoba, España. pp. 231–238.
- Marín-Darias, D. 2015. Determinación de parámetros químicos que definen la calidad de la fruta bomba (*Carica papaya* L.) mediante espectroscopía VIS/NIR. Tesis Doctoral. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas, Santa Clara, Cuba.
- Mark, H., Workman, J. 1991. Statistics in Spectroscopy. Academic Press, Inc. San Diego, EE.UU.
- Martens, H., Naes, T. 1989. Multivariate Calibration. John Wiley and Sons Inc. Chichester, UK.
- Martínez-Montalvo, M.C. 2004. La elaboración del vinagre en el s. XIX. Discordia y enfrentamiento químico-biológico. En: Español-González, L., Escribano-Benito, J.J., Martínez-García, M.A. Historia de las Ciencias y de las Técnicas. Vol. 2, 687–702.
- Massart, D.L., Vandeginste, B.G.M., Deming, S.M., Michotte, Y., Kaufman, L. 1988. Chemometrics: a Textbook. Data Handling in Science and Technology 2. Elsevier Science. Amsterdam, The Netherlands.
- Mattes, R. 2009. Oral detection of short-, medium-, and long-chain free fatty acids in humans. Chemical Senses 34, 145–150.
- Meilgaard, M., Civille, G.V., Carr, B.T. 1999. Sensory Evaluation Techniques. CRC Press, Boca Raton, FL, USA.



- Mieres, J., Cozzolino D., Acosta, Y. 2000. Determinación del valor nutritivo del ensilaje de maíz mediante infrarrojo cercano NIRS. XVI Reunión Latinoamericana de Producción Animal (ALPA). Montevideo, Uruguay.
- Miller, C.E. 2001. Chemical principles of near-infrared technology. En: Williams, P., Norris, K. (Eds.). Near Infrared Technology in the Agricultural and Food Industries. 2nd Edition. America Association of Cereal Chemists, Inc. St. Paul, Minnesota, EE.UU. pp. 19–38.
- Moreno-Rojas, R. 2015. El vinagre: un condimento muy saludable. En: VII Simposio del salmorejo cordobés. El vinagre.
- Mitchell, C. 1916. Vinegar: Its Manufacture and Examination. C. Griffin & Company, limited. London.
- Murray, I. 1993. Forage analysis by Near Infra-Red Reflectance Spectroscopy. En: Davies, A., Baker, R.D., Grant, S.A., Laidlaw, A.S. (Eds.). Sward Measurement Handbook, Second Ed. British Grassland Society. Reading, England. pp. 285–312.
- Naes, T. 1992. Progress in multivariate calibration. En: Hildrum, K.I., Isaksson, T., Naes, T., Tandberg, A. (Eds.). Near Infrared Spectroscopy. Bridging the Gap between Data Analysis and NIR Applications. Ellis Horwood Limited. Chichester, West Sussex, UK. pp. 51–60.
- Naes, T., Isaksson, T., Fearn, T., Davies, A. 2002. A User-friendly Guide to Multivariate Calibration and Classification. NIR Publications, Chichester, UK.
- Naes, T., Isaksson, T., Fearn, T., Davies, A. 2004. A User-Friendly Guide to Multivariate Calibration and Classification. NIR Publications. Chichester, UK.
- Namba A., Kimura K., Nagai S., 1985. Vinegar production by *Acetobacter rancens* cells fixed on a hollow fiber module. *Journal of Fermentation Technology* 63, 175–179.



- Nicolai, B.M., Beullens, K., Bobelyn, E., Peirs, A., Saeys, W., Theron, K.I., Lammertyn, J. 2007. Nondestructive measurement of fruit and vegetable quality by means of NIR spectroscopy: a review. *Postharvest Biology and Technology* 46, 99–118.
- Nikolich, K., Sergides, C., Pittas, A. 2001. The application of near infrared reflectance spectroscopy (NIRS) for the quantitative analysis of hydrocortisone in primary materials. *Journal of the Serbian Chemical Society* 66, 189–198.
- Normalización Española (UNE). 1992. Norma UNE 87022/1992. Análisis sensorial. Utensilios. Copa para la degustación de vino.
- Normalización Española (UNE). 1995. Norma UNE 87024-1:1995. Análisis sensorial. Guía general para la selección, entrenamiento y control de jueces. Parte 1: Catadores.
- Olinger, J.M., Griffiths, P.R., Burger, T. 2001. Theory of diffuse reflectance in the NIR region. En: Burns, D.A., Ciurczac, E.W. (Eds.). *Handbook of Near-Infrared Analysis*. 2nd edition, revised and expanded. Marcel Dekker. New York, EE.UU. pp. 19–51.
- Osborne, B.G., Fearn, T., Hindle, P. 1993. *Practical NIR Spectroscopy with Applications in Food and Beverage Analysis*. Longman Scientific and Technical. London, UK.
- Palenzuela-Domínguez, N. 2003. *Los Mercaderes Burgaleses en Sevilla a Fines de la Edad Media (Serie Historia y Geografía)*. Universidad de Sevilla. Sevilla, España.
- Panreac. 1999. *Productos Derivados de la Uva, Aguardientes y Sidras. Métodos Oficiales de Análisis*. PANREAC QUÍMICA S.A. Barcelona, España.
- Pérez-Marín, D. 2005. *Tecnología NIRS para la certificación y trazabilidad de piensos compuestos*. Tesis Doctoral. Universidad de Córdoba, España.
- Pérez-Marín, D., Garrido-Varo, A., Guerrero, J.E. 2007. Non-linear regression methods in NIRS quantitative analysis. *Talanta* 72, 28–42.
- Persoon, C.H. 1822. *Mycologia Europaea*. 1, 1-358.
- Peynaud, E. 1987. *El Gusto del Vino*. Mundi-Prensa, ed. Madrid, España.



- Presidencia del Gobierno. 1967. Decreto 2484/1967, de 21 de septiembre, por el que se aprueba el texto del Código Alimentario Español. BOE num. 248, de 17 de octubre de 1967, pp. 14180–14187.
- Quiñones, G., 2006. Diseño de una planta industrial de elaboración integral de vinagre. Proyecto Fin de Carrera. Universidad de Cádiz, España.
- Rebelein, H. 1973. Rapid method for the determination of the alcohol, sugar and total SO₂ contents (by distillation) in wine and fruit juices and also for determining blood alcohol *Chemie, Mikrobiologie, Technologie der Lebensmittel* 2, 112–121.
- Ribéreau-Gayon, J., Peynaud, E. 1961. *Traité d'Œnologie*, Tomo 2. Béranger, Paris, Francia.
- Sáiz-Abajo, M.J. 2005. Caracterización, clasificación y detección de fraudes en vinagres mediante técnicas multivariantes. Tesis Doctoral. Universidad de La Rioja, España.
- Sáiz-Abajo, M.J., González-Sáiz, J.M., Pizarro, C. 2006. Prediction of organic acids and other quality parameters of wine vinegar by near-infrared spectroscopy. A feasibility study. *Food Chemistry* 99, 615–621.
- Sánchez, M.T., Pérez-Marín, D. 2011. Nondestructive measurement of fruit quality by NIR spectroscopy. En: Vázquez, M., Ramírez, J.A. (Eds.). *Advances in Post-Harvest Treatments and Fruit Quality and Safety*. Nova Science Publishers Inc. Hauppauge, NY, EE.UU. pp. 101–163.
- Sánchez, M.T., Garrido-Varo, A., Guerrero, J.E., Pérez-Marín, D. 2013. NIRS technology for fast authentication of green asparagus grown under organic and conventional production systems. *Postharvest Biology and Technology* 85, 116–123.
- Shenk, J.S., Westerhaus, M.O. 1991. Population structuring of near infrared spectra and modified partial least squares regression. *Crop Science* 31, 1548–1555.
- Shenk, J.S., Westerhaus, M.O. 1995a. *Analysis of Agriculture and Food Products by Near Infrared Reflectance Spectroscopy*. Monograph, NIRSystems, Inc. 12101 Tech Road, Silver Spring, MD 20904, EE.UU.



- Shenk, J.S., Westerhaus, M.O. 1995b. Routine Operation, Calibration, Development and Network System Management. Manual. NIRSystems Inc. Silver Spring, MD, EE.UU.
- Shenk, J.S., Westerhaus M.O. 1996. Calibration the ISI way. En: Davies, A.M.C., Williams, P. (Eds.). Near Infrared Spectroscopy: the Future Waves. NIR Publications. Chichester, West Sussex, UK. pp. 198–202.
- Shenk, J.S., Workman, J., Westerhaus, M. 2008. Application of NIR spectroscopy to agricultural products. En: Burns, D.A., Ciurezac, E.W. (Eds.), Handbook of Near Infrared Analysis. CRC Press, Taylor & Francis Group. Boca Raton, FL, USA. pp. 347–386.
- Shiroma, C., Rodríguez-Saona, L. 2009. Application of NIR and MIR spectroscopy in quality control of potato chips: Journal of Food Composition and Analysis 22, 596–605.
- Simón, S., de Araujo, I., Gutiérrez, R., Nicolelis, MA. 2006. The neural mechanisms of gustation: A distributed processing code. Nature Reviews. Neuroscience 7, 890–901.
- Skoog, D.A., Holler, F.J., Nieman, T.A. 2001. Principios de Análisis Instrumental. Mc Graw-Hill. Madrid, España.
- Steinkraus, K.H. 1996. Handbook of Indigenous Fermented Foods. 2nd Edition Revised and Enlarged. Marcel Dekker. New York, NY. 776 p.
- Stevens, S.S. 1957. On the psychophysical law. Psychological Review 64, 153–181.
- Suárez, J.A., Íñigo, B. 2008. Microbiología Enológica: Fundamentos de Vinificación. 3^a Ed. Mundi Prensa. Madrid, España.
- Sudraud, P. 1958. Interpretation des courbes d'absorption des vins rouges. Annales de Technologie Agricole 7, 203–208.
- Tesfaye, W., Troncoso, A. 2010. Vinegar. Encyclopedia of Biotechnology in Agriculture and Food 1, 675–679.
- Tesfaye, W., Morales, M.L., García-Parrilla, M.C., Troncoso, A.M. 2002. Wine vinegar: technology, authenticity and quality evaluation. Trends in Food Science and Technology, 13, 12–21.



- Tesfaye, W., Morales, M.L., García-Parrilla, M.C., Troncoso, A.M. 2009. Jerez Vinegar. En: *Vinegars of the World*, Solieri L., Giudici, P. (Eds). Springer-Verlag, Milán, Italia, pp. 179.
- Thyholt, K., Isaksson, T. 1997. Near infrared spectroscopy of dry extracts from high moisture food products on solid support a review. *Journal of Near Infrared Spectroscopy* 5, 179–193.
- Troncoso, A.M., Guzmán, M. 1988. Constituyentes característicos de los vinagres vínicos andaluces. *Alimentaria* 41, 49–51.
- Villano, D., Fernández-Pachón, P.S., Troncoso, A.M., García-Parrilla, M.C. 2005. Comparison of antioxidant activity of wine phenolic compounds and metabolitos in vitro. *Analytica Chimica Acta* 538, 391–398.
- Westerhaus, M.O., Workman, J., Reeves III, J.B., Mark, H. 2004. Quantitative analysis. En: Roberts, C.A., Workman, J., Reeves III, J.B. (Eds.). *Near-Infrared Spectroscopy in Agriculture*. ASA, CSSA y SSSA, Inc. Madison, Wisconsin, USA. pp. 133–174.
- Williams, P.C. 2001. Implementation of near-infrared technology. In: Williams, P.C., Norris, K.H. (Eds.), *Near-Infrared Technology in the Agricultural and Food Industries*. AACC Inc., St. Paul, MN, USA, pp. 145–169.
- Williams, P.C., Norris, K. 2001. *Near-Infrared Technology in the Agricultural and Food Industries*. 2nd edition. American Association of Cereal Chemists, Inc. St. Paul, Minnesota, EE.UU.
- Williams, P.C., Sobering, D. 1996. How do we do it: a brief summary of the methods we use in developing near infrared calibrations. En: Davies, A.M.C., Williams, P.C. (Eds.). *Near Infrared Spectroscopy: The Future Waves*. NIR Publications. Chichester, West Sussex, UK. pp. 185–188.
- Windham, W.R., Mertens, D.R., Barton II, F.E. 1989. Protocol for NIRS calibration: sample selection and equation development and validation. In: Martens, G.C., Shenk, J.S., Barton II, F.E. (Eds.), *Near Infrared Spectroscopy (NIRS): Analysis of Forage Quality*. Agriculture Handbook, vol. 643. USDA-ARS, US Government Printing Office, Washington, DC, USA, pp. 96–103.



- Wise, B.M., Gallagher, N.B., Bro, R., Shaver, J.M. 2006. PLS Toolbox Version 4 for Use with MATLAB. Eigenvector Research. Wenatchee, EE.UU.
- Workman, J.J. 1992. NIR Spectroscopy calibration basics. En: Burns, D.A., Ciurezak, E.W. (Eds.). Handbook of Near Infrared Analysis. Practical Spectroscopy Series, Volume 13. Marcel Dekker, Inc. New York, EE.UU. pp.247–280.
- Workman, J.J. 1996. Interpretative Spectroscopy for near infrared. En: Davies, A.M.C., Williams, P. (Eds.). Near Infrared Spectroscopy: The Future Waves. Proceedings of the 7th International Conference on Near Infrared Spectroscopy. NIR Publications. Chichester, UK, pp. 6–13.
- Yamamoto, K., Ishimaru, Y. 2013. Oral and extra-oral taste perception. Seminars in Cell & Developmental Biology 24, 240–246.
- Xandri-Tagueña, J.M. 1977. Fermentaciones Vínicas, Iniciación a la Cervecería y Vinagrería Vínica. Universidad Politécnica de Madrid. Madrid, España.
- Yano, T., Aimi, T., Nakano, Y., Tamai, M. 1997. Prediction of the concentrations of ethanol and acetic acid in the culture broth of a rice vinegar fermentation using near-infrared spectroscopy. Journal of Fermentation and Bioengineering 84, 461–465.
- Zeller, A., Rychlik, M. 2007. Impact of estragole and other odorants on the flavour of anise and tarragon. Flavour and Fragrance Journal 22, 105–113.
- Zhang, X., Li, W., Yin, B., Chen, W., Kelly, D.P., Wang, X., Zheng, K., Du, Y. 2013. Improvement of near infrared spectroscopic (NIRS) analysis of caffeine in roasted Arabica coffee by variable selection method of stability competitive adaptive reweighted sampling (SCARS): Spectrochimica Acta-Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy 114, 350–356.



Anexo I: Fichas de Cata



	FICHA DE CATA	Revisión: 01
	VINAGRE DULCE PX	Fecha: 08.09.2017 Página 153

Instrucciones:

Evalúe la muestra a través del sentido de la vista de acuerdo a la Guía para el evaluador.

Para cada descriptor a continuación, rodee con un círculo el número de la derecha que considere más acorde con su nivel de intensidad percibido de acuerdo a la escala; o bien, a la presencia (SI) o ausencia (NO) de la cualidad.

(*) Para la evaluación del Color utilizar la correspondiente gama de color (formato GC).

10	Extremadamente perceptible
9	
8	Fuertemente perceptible
7	
6	
5	Moderadamente perceptible
4	
3	
2	Ligeramente perceptible
1	
0	Imperceptible

Cod. muestra:	Evaluador:
----------------------	-------------------

FASE VISUAL

LIMPIO	NO	SI
BRILLANTE	NO	SI

COLOR (*)	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
------------------	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	----

(*) DE CAOBA INTENSO A AZABACHE

Observaciones:

Firma:

	FICHA DE CATA	Revisión: 01
	VINAGRE SECO	Fecha: 08.09.2017 Página 155

Instrucciones:

Evalúe la muestra a través del sentido de la vista de acuerdo a la Guía para el evaluador.

Para cada descriptor a continuación, rodee con un círculo el número de la derecha que considere más acorde con su nivel de intensidad percibido de acuerdo a la escala; o bien, a la presencia (SI) o ausencia (NO) de la cualidad.

(*) Para la evaluación del Color utilizar la correspondiente gama de color (formato GC).

10	Extremadamente perceptible
9	
8	Fuertemente perceptible
7	
6	
5	Moderadamente perceptible
4	
3	
2	Ligeramente perceptible
1	
0	Imperceptible

Cod. muestra:	Evaluador:
----------------------	-------------------

FASE VISUAL

LIMPIO	NO	SI
BRILLANTE	NO	SI
TRANSPARENTE	NO	SI

COLOR (*)	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
------------------	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	----

(*)DE AMBARINO A CAOBA INTENSO

Observaciones:

Firma:

FICHA DE CATA

VINAGRE DULCE PEDRO XIMENEZ

Instrucciones:

Evalúe la muestra a través del sentido del olfato y del gusto siguiendo los pasos y la técnica que se indican en la Guía para el evaluador.

Para cada descriptor a continuación, rodee con un círculo el número de la derecha que considere más acorde con su nivel de intensidad percibido de acuerdo a la escala.

10	Extremadamente perceptible
9	
8	
7	Fuertemente perceptible
6	
5	Moderadamente perceptible
4	
3	
2	Ligeramente perceptible
1	
0	

Fecha:	Cod. muestra:	Evaluador:
--------	---------------	------------

FASE OLFATIVA

INT. OLFATIVA	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	ACETATO DE ETILO	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
SENSACIÓN ACETICA	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	ESPECIADO	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
FRUTAL	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	TORREFACTO	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
AROMA A CRIANZA	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	EMPIREUMATICOS	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
UVA PASIFICADA	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	RASPON	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10

FASE GUSTATIVA

INT. GUSTATIVA	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	SENSACION GLICERICA	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
ATAQUE ACETICO	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	UNTUOSIDAD	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
AMARGOR	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		Muy corta 1-3 seg.	Corta 4-5 seg.	Media 6-8 seg.	Larga 9-11 seg.	Muy larga >11 seg.						
DULZOR	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	PERSISTENCIA	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
SALINIDAD	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10												

Observaciones:

Firma:

FICHA DE CATA

VINAGRE SECO CON ENVEJECIMIENTO

Instrucciones:

Evalúe la muestra a través del sentido del olfato y del gusto siguiendo los pasos y la técnica que se indican en la Guía para el evaluador.

Para cada descriptor a continuación, rodee con un círculo el número de la derecha que considere más acorde con su nivel de intensidad percibido de acuerdo a la escala.

10	Extremadamente perceptible
9	
8	Fuertemente perceptible
7	
6	
5	Moderadamente perceptible
4	
3	
2	Ligeramente perceptible
1	
0	Imperceptible

Fecha:	Cod. muestra:	Evaluador:
--------	---------------	------------

FASE OLFATIVA

INT. OLFATIVA	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	ACETATO DE ETILO	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
SENSACIÓN ACÉTICA:	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	HUMEDAD	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
FRUTAL	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	FRANQUEZA	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
AROMA CRIANZA:																							
ESPECIADO																							
TORREFACTO	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
EMPIREUMATICO																							

FASE GUSTATIVA

INT. GUSTATIVA	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	SENSACION GLICERICA	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
ATAQUE ACETICO	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	UNTUOSIDAD	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
AMARGOR	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		Muy corta 1-3 seg.	Corta 4-5 seg.	Media 6-8 seg.	Larga 9-11 seg.	Muy larga >11 seg.						
DULZOR	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	PERSISTENCIA	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
SALINIDAD	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10												

Observaciones:

Firma:

