



UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE CATALUNYA
BARCELONATECH

Departament d'Enginyeria Electrònica

DESARROLLO DE UN SISTEMA DE MEDIDA ULTRASÓNICO PARA MONITORIZAR EL PROCESO DE FERMENTACIÓN MALOLÁCTICA DEL VINO TINTO EN UN AMBIENTE INDUSTRIAL

Tesi doctoral presentada per a
l'obtenció del títol de Doctor per la
Universitat Politècnica de Catalunya,
dins el Programa de Doctorat en
Enginyeria Electrònica

Daniel Fernando Novoa Díaz

Director: Dr. Jordi Salazar Soler

Barcelona, Mayo de 2014

*A mis padres, a la memoria de mis abuelos, a mi sobrino y a las
mujeres de mi vida a Ana, a Olga y a Adriana.*

AGRADECIMIENTOS

Son muchas las historias y precedentes que han acontecido para llegar a este momento, historias que no significan nada si no fuese por todas las personas que las han acompañado y a quienes me es grato expresar mis totales y sinceros agradecimientos.

En primer lugar y sin lugar a dudas, deseo expresar mi completa gratitud a mi director de Tesis, Dr. Jordi Salazar Soler, de quien, desde el primer contacto, siempre recibí su total apoyo, orientación, conocimientos y paciencia; su dedicación, colaboración, sugerencias y disponibilidad han sido fundamentales para la realización de este trabajo.

Gracias al Dr. Miguel J. García Hernández quien como responsable del grupo (*Grup Sistemes Sensors*), y a pesar de sus múltiples compromisos y actividades, siempre estuvo dispuesto a colaborar con toda su experiencia y conocimientos al avance de este trabajo. Agradecimiento especial Al Dr. Javier García Álvarez a quien, desafortunadamente, esto de los recortes le han impedido seguir con una labor que, a simple vista se nota, disfruta y lleva a cabo excelentemente. Igualmente, agradecer a los profesores del grupo, Dr. Antoni Turo y Dr. Juan Antonio Chávez, y a Merche con quien siempre se puede contar allí en el laboratorio.

También, he de expresar mi gratitud al Dr. Miguel Ángel Amer, quién si no para pasar unas amenas tardes de viernes en el laboratorio, cuando llegaba el momento de organizar el fin de semana, allí estábamos nosotros recopilando datos. Gracias por todos tus valiosos aportes y enseñanzas Miguel.

Gracias a la gente de INCAVI (especialmente a Anna Puig Pujol) y a la gente del grupo de investigación ENOBIOTEC (Áreas de Tecnología de Alimentos y Microbiología de la Escuela Técnica Superior de Ingenierías Agrarias) de la Universidad de Valladolid (Campus de Palencia), por su ayuda y disposición en todo lo referente a las pruebas de campo y medidas de parámetros de interés enológico convencionales.

Asimismo, retrocediendo un poco en el tiempo, quiero manifestar mi agradecimiento al Dr. Diego Ramírez Muñoz de la Universidad de Valencia, la primera persona de quien recibí un 'bienvenido' en el inicio de esta aventura por el llamado viejo mundo y quien terminaría convirtiéndose en mi Director de lo que antes era el 'Trabajo de Investigación' para obtener el DEA (Diploma de Estudios Avanzados). Indudablemente, un excelente académico con la puerta de su despacho siempre abierta para echar una mano. También, de la misma universidad, a las profesoras Dra. Silvia Casans y Dra. Edith Navarro; al profesor invitado Dr. Enrique Castro quien, con su sabor cubano, siempre alegraba las tardes valencianas en el laboratorio.

Siguiendo por Valencia, agradecer a mis amigos y compañeros Henry Matilla Chacón y Johana Balaguera, sin vuestra valiosa ayuda y orientación, mi proceso de adaptación inicial hubiese sido mucho, pero mucho, más lento y complicado. No puedo saltarme a mi amigo (casi hermano mayor) Antonio y su chica Daniela, simplemente todo lo que he recibido de vosotros no tiene precio.

Infinitas gracias a mi familia, la mejor muestra de que más de 9000 kilómetros no son barrera para hacer sentir el cariño y apoyo incondicional. A mis padres, todo es poco para agradecerles. A mis hermanas, sea donde sea, siempre estaremos juntos. A mis familiares, por reforzar aquella premisa de "la familia siempre será lo más importante".

Gracias a todos mis amigos en los dos lados del océano, a los que han estado prácticamente desde tiempos memorables y a los que se han venido agregando con el avance de esta historia llamada vida. La mejor amistad es aquella que, a pesar de los años, en cada reencuentro parece que sólo han pasado dos días.

No puede faltar un reconocimiento a todos mis compañeros de trabajo porque, más allá de una relación laboral, todas estas horas que pasamos juntos de alguna manera terminan convirtiéndonos en una pequeña gran familia y si no fuese por vuestra colaboración, no hubiese sido posible hacer compatible esta etapa de dos trabajos.

Finalmente, gracias a ti Ana, porque, de diversas maneras, tu luz siempre ha iluminado mi trayecto. El camino no ha sido fácil, pero llevas 20 años mejorando, sabia y dulcemente, los peores paisajes, mi admiración total se queda contigo mujer.

ÍNDICE

RESUMEN	V
ABSTRACT	VII
LISTA DE FIGURAS.....	IX
LISTA DE TABLAS	XV
LISTA DE SÍMBOLOS.....	XVII
LISTA DE ACRÓNIMOS.....	XIX
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 INTERÉS	1
1.2 ESTADO DEL ARTE	3
1.3 OBJETIVOS.....	5
1.4 MARCO DE TRABAJO.....	6
1.5 ESTRUCTURA DE LA TESIS	6
CAPÍTULO 2. LA FERMENTACIÓN MALOLÁCTICA EN EL VINO TINTO.....	9
2.1 INTRODUCCIÓN.....	9
2.2 LAS BACTERIAS LÁCTICAS DEL VINO	11
2.3 INFLUENCIA DE LA FML EN LA COMPOSICIÓN DEL VINO TINTO	14
2.3.1 Ventajas que aporta la FML al vino tinto.....	15
2.3.1.1 Disminución de la acidez.....	15
2.3.1.2 Mejora del perfil organoléptico.....	15
2.3.1.3 Estabilidad microbiológica.....	17
2.3.2 Desventajas de la FML.....	17
2.4 FACTORES QUE INFLUYEN EN LA FML	18
2.4.1 Interacción levaduras-bacterias.....	18
2.4.2 Etanol.....	19
2.4.3 Dióxido de azufre.....	19
2.4.4 Ácidos grasos de cadena media.....	20
2.4.5 pH	20
2.4.6 Temperatura	21
2.4.7 Requerimientos nutricionales.....	21
2.5 CONTROL Y SEGUIMIENTO DE LA FML.....	22
2.5.1 Control por inoculación de cepas comerciales: FML inducida	22
2.5.1.1 Inoculación secuencial	24
2.5.1.2 Co-inoculación e inoculación durante la FA.....	24
2.5.2 Monitorización de la FML	25
2.5.2.1 Medida de la acidez volátil.....	25

2.5.2.2 Población microbiana.....	25
2.5.2.3 Niveles de concentración de los ácidos málico y láctico	26
2.6 RESUMEN.....	28
CAPÍTULO 3. DISEÑO Y DESCRIPCIÓN DEL SENSOR DE MEDIDA ULTRASÓNICO	29
3.1 INTRODUCCIÓN.....	29
3.2 PRINCIPIOS DE MEDIDA	30
3.2.1 Técnica de reflexión.....	30
3.2.2 Técnica de transmisión (through-transmission).....	31
3.2.3 Técnica de pulso-eco.....	32
3.3 MÉTODO PROPUESTO PARA MEDIR VELOCIDAD DE PROPAGACIÓN ULTRASÓNICA EN EL VINO TINTO.....	33
3.3.1 Solución propuesta.....	35
3.4 CONSIDERACIONES DEL DISEÑO.....	38
3.4.1 Cálculo de longitudes.....	38
3.4.2 Dimensionamiento y redimensionamiento del buffer rod	42
3.4.3 Análisis de amplitudes	43
3.5 MODELO CIRCUITAL DEL SISTEMA DE MEDIDA PROPUESTO	46
3.5.1 Caracterización eléctrica del transductor	46
3.5.2 Caracterización eléctrica del buffer rod, del medio líquido y del reflector	48
3.5.3 Caracterización eléctrica del sistema de medida completo	49
3.5.3.1 Ejemplos de simulaciones.....	50
CAPÍTULO 4. TÉCNICAS DE PROCESADO PARA OBTENER VELOCIDAD Y VARIACIONES DE VELOCIDAD DE SEÑALES ULTRASÓNICAS.....	55
4.1 DETERMINACIÓN DE LA VELOCIDAD.....	55
4.1.1 Incertidumbre en la determinación del tiempo de vuelo	56
4.2 RELACIÓN DE MÉTODOS PARA OBTENER VARIACIONES DEL TIEMPO DE VUELO	56
4.2.1 Método del umbral.....	56
4.2.2 Método del cruce por cero	59
4.2.2.1 Cruce por cero con interpolación.....	61
4.2.3 Método del máximo	61
4.2.3.1 Máximo con interpolación	62
4.2.4 Método de la correlación cruzada	63
4.2.5 Método de la diferencia de fases.....	63
4.2.6 Método de la diferencia de pendientes.....	64
4.2.7 Comparación del desempeño de los métodos mediante simulaciones	65
4.2.7.1 Resultados obtenidos y discusión	68
4.2.8 Comparación del desempeño de los métodos mediante prueba experimental	74
CAPÍTULO 5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	79

5.1	INTRODUCCIÓN.....	79
5.2	PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA PRUEBAS EN LABORATORIO	79
5.2.1	Reactivos.....	79
5.2.2	Mezclas	81
5.2.3	Muestras de vino tinto.....	82
5.3	SISTEMA ULTRASÓNICO DE MEDIDA.....	83
5.3.1	Set-up para la adquisición de datos.....	83
5.3.2	Sensor ultrasónico.....	86
5.3.2.1	<i>Transductor ultrasónico</i>	87
5.3.2.2	<i>Buffer rod y reflector</i>	88
5.3.2.3	<i>Sensores ultrasónicos</i>	89
5.3.3	Monitorización de la temperatura	92
5.4	PROCESAMIENTO DE LAS SEÑALES ULTRASÓNICAS.....	95
5.4.1	Cálculo de la velocidad de propagación ultrasónica	96
5.4.2	Error estimado en la medida de la velocidad de propagación ultrasónica.....	97
5.5	PRUEBAS EN PLANTAS PILOTO Y BODEGAS	99
5.5.1	INCAVI	99
5.5.2	Universidad de Valladolid.....	100
5.5.3	Bodega Vega de Ribes.....	101
5.5.4	Bodega Torre del Veguer.....	101

CAPÍTULO 6. CARACTERIZACIÓN Y MONITORIZACIÓN ULTRASÓNICA DE LA FML EN EL VINO TINTO..... 103

6.1	INTRODUCCIÓN.....	103
6.2	CONSECUENCIAS DE LOS EFECTOS DE LA FML EN LA PROPAGACIÓN DE ONDAS DE ULTRASONIDO.....	104
6.2.1	Influencia de la temperatura en la velocidad de propagación de los ultrasonidos.....	104
6.2.2	Comportamiento de los ultrasonidos ante variaciones en la concentración de los ácidos málico y láctico	107
6.2.2.1	<i>Mezcla binaria de agua y ácido málico</i>	107
6.2.2.2	<i>Mezcla binaria de agua y ácido láctico</i>	108
6.2.2.3	<i>Mezclas ternarias de agua, ácido láctico y ácido málico</i>	108
6.2.3	Comportamiento de los ultrasonidos ante variaciones en la concentración de los ácidos málico y láctico en presencia de etanol.....	110
6.2.3.1	<i>Mezclas binarias de agua y etanol ante variaciones de temperatura</i>	110
6.2.3.2	<i>Influencia de la evaporación del etanol en la mezcla binaria agua-etanol</i>	112
6.2.3.3	<i>Mezcla ternaria de agua, etanol y ácido málico</i>	114
6.2.3.4	<i>Mezcla ternaria de agua, etanol y ácido láctico</i>	116
6.2.3.5	<i>Mezclas cuaternarias de agua, etanol, ácido málico y ácido láctico</i>	117
6.2.4	Comportamiento de los ultrasonidos ante variaciones de turbidez	119
6.2.5	Comportamiento de los ultrasonidos ante CO ₂ disuelto.....	120

6.3	MONITORIZACIÓN DE LA FML EN PLANTAS PILOTO Y BODEGAS.....	121
6.3.1	Medidas en colaboración con el INCAVI.....	121
6.3.1.1	<i>Conjunto1, velocidad de los ultrasonidos y monitorización de parámetros enológicos convencionales</i>	121
6.3.1.2	<i>Conjunto2, velocidad de los ultrasonidos y monitorización de parámetros enológicos convencionales</i>	125
6.3.1.2.1	<i>Variaciones de temperatura durante la monitorización de la FML</i>	128
6.3.1.2.2	<i>Análisis correlativo de los resultados obtenidos</i>	129
6.3.2	Medidas en colaboración con la Universidad de Valladolid.....	131
6.3.2.1	<i>Medidas de parámetros enológicos convencionales</i>	132
6.3.2.1.1	<i>Evolución de las concentraciones de ácido málico y ácido láctico</i>	132
6.3.2.1.2	<i>Evolución del pH y la acidez total</i>	134
6.3.2.1.3	<i>Evolución de la turbidez y el crecimiento de bacterias</i>	135
6.3.2.2	<i>Monitorización de la fermentación maloláctica mediante ondas de ultrasonido</i>	137
6.3.2.3	<i>Análisis correlativo de los resultados obtenidos</i>	138
6.3.2.4	<i>Análisis comparativo de los resultados obtenidos</i>	140
6.3.2.4.1	<i>Evolución teórica de la velocidad, primera propuesta</i>	141
6.3.2.4.2	<i>Variaciones de temperatura durante la monitorización de la FML</i>	142
6.3.2.4.3	<i>Evolución teórica de la velocidad, segunda propuesta</i>	145
6.3.3	Medidas en la bodega Vega de Ribes	151
6.3.4	Medidas en la bodega Torre del Veguer	153
CAPÍTULO 7. CONCLUSIONES Y APORTACIONES DE LA TESIS.....		155
7.1	CONCLUSIONES.....	155
7.2	CONTRIBUCIONES ORIGINALES	157
7.3	PUBLICACIONES DERIVADAS DE LA TESIS	158
7.4	OTRAS PUBLICACIONES	160
7.5	LÍNEAS FUTURAS DE INVESTIGACIÓN.....	161
BIBLIOGRAFÍA		163

RESUMEN

En este trabajo se ha contribuido al desarrollo de un sistema de medida basado en técnicas de ultrasonidos para el análisis y monitorización, en tiempo real, de la fermentación maloláctica (FML) en el vino tinto elaborado a nivel semi-industrial e industrial.

En el sector vinícola, la importancia e interés por la FML se debe a la gran influencia que ésta ejerce sobre los perfiles organolépticos y sensoriales del vino, ayudando a definir, en gran parte, la calidad del producto final. Caracterizado, principalmente, por la conversión del ácido málico en ácido láctico llevada a cabo por las bacterias ácido-lácticas (BAL), este proceso suele ser monitorizado a través de técnicas analíticas en laboratorios; técnicas que presentan algunos inconvenientes en cuanto a costes, velocidad de respuesta y oportunidad de ser incorporadas a líneas de producción (son *off-line*). Por el contrario, las características del método de medida por ultrasonidos desarrollado en esta Tesis, ofrecen la oportunidad de superar estas dificultades aportando, además, otras ventajas asociadas a esta clase de tecnología (no invasiva, no destructiva, higiene, precisión, etc.).

Como pieza fundamental del sistema de medida, se lleva a cabo el diseño y fabricación de un sensor ultrasónico, que mide velocidad de propagación, basado en una técnica de transmisión y reflexión de ondas de ultrasonidos (pulso-eco). Igualmente, se aprovechan las ventajas aportadas por el mecanismo conocido como *buffer rod* para facilitar, por un lado, el acondicionamiento de las señales de interés (ecos) y por otro, el acoplamiento y puesta en marcha del sistema en los grandes tanques de acero inoxidable donde se deposita el vino durante su elaboración. Además, se realiza un estudio comparativo de diversos métodos aptos para el procesado de la información ultrasónica recopilada, clasificándolos por su relación precisión-coste computacional de tal forma que facilite una correcta elección de acuerdo a los recursos del sistema de medida donde se pretendan aplicar.

En cuanto a los experimentos realizados, en laboratorio el sistema demuestra una adecuada sensibilidad para la detección de cambios cuando, sobre soluciones acuosas e hidroalcohólicas, se llevan a cabo variaciones en los niveles de concentración de los ácidos málico y láctico. Igualmente, su funcionamiento es adecuado para la caracterización ultrasónica de soluciones hidroalcohólicas cuando varía la temperatura ante diferentes concentraciones de alcohol o para detectar cambios en parámetros como la turbidez de las mezclas. A nivel de pruebas de campo, el comportamiento de la velocidad de propagación ultrasónica muestra una alta correlación con varios de los parámetros convencionales que suelen medirse durante la FML (concentraciones de ácidos málico y láctico, acidez volátil, población de bacterias, etc.), demostrando la utilidad del sistema en la predicción *on-line* del final del proceso maloláctico.

Predicción que se caracteriza por un comportamiento prácticamente invariable de la velocidad cuando la FML va llegando a su final, o nulo cuando las BAL no cumplen con el proceso.

Como punto crítico en la aplicación del sistema de medida en campo, encontramos el difícil control sobre la temperatura del vino, parámetro que se ve influenciado por las variaciones de la temperatura ambiente y por los propios cambios que genera el proceso en sí. Este aspecto obliga a monitorizar detalladamente dicho parámetro para, de ser necesario, aplicar las correspondientes compensaciones a los resultados ultrasónicos.

Con todos los resultados obtenidos, se demuestra la viabilidad de utilizar ondas de ultrasonidos para la monitorización de la FML del vino tinto, con posibilidades de inclusión en un sistema de control en tiempo real.

Palabras clave: vino tinto, fermentación maloláctica, bacterias ácido-lácticas, ácidos málico y láctico, ultrasonidos, velocidad ultrasónica, procesado de señales acústicas, tiempo de vuelo, monitorización on-line.

ABSTRACT

This work is a contribution to a measuring system based on ultrasonic techniques to analyse and monitor, in real time, malolactic fermentation (MLF) in red wine, both at industrial and semi-industrial level.

In the wine sector, MLF is of great importance due to its influence over wine organoleptic and sensory profiles, for it largely defines the quality of the final product. This process, whose main feature is that lactic acid bacteria (LAB) convert malic acid into lactic acid, is monitored, generally, in labs with analytical techniques. These techniques have several drawbacks; however, regarding costs, response times and chances to be included in production lines (they are off-line). On the contrary, the characteristics of the ultrasonic measuring method developed in this Thesis overcomes those and provides other advantages associated to this kind of technology (non-invasive, non-destructive, hygiene and accuracy among others).

The main measuring instrument is the ultrasonic sensor, which has been designed and manufactured for measures ultrasonic propagation velocity. It is based on a transmission and reflection of ultrasonic waves technique (pulse-echo). Besides, a buffer rod is used to allow both signal conditioning (echoes) and also the coupling and start of the system in the big stainless steel tanks where the wine is kept during its production. Moreover, several methods to process the collected ultrasonic information are compared and classified according to their computing cost-precision relationship in order to facilitate selection depending on available resources.

Regarding lab experiments, the system has proved an appropriate accuracy to detect variations when, in aqueous and hydroalcoholic solutions, lactic and malic acid levels of concentration are changed. It also works in the ultrasonic characterization of hydroalcoholic solutions when temperatures vary with different alcohol concentrations or to detect parameter changes such as turbidity. Regarding field tests, the behaviour of the ultrasonic propagation velocity is clearly related to several conventional parameters that are measured during MLF (malic and lactic acid concentrations, volatile acidity, bacteria population, etc.), which proves the usefulness of the system when predicting the end of the process on-line. This prediction shows a constant behaviour in ultrasonic propagation velocity when MLF is reaching the end, or none at all when LABs do not perform the process.

The breaking point of the system in field tests is control over wine temperature. This parameter is influenced by variations on room temperature and changes generated by the process itself. Temperature must be precisely monitored in order to apply, when necessary, the corresponding compensations to ultrasonic results.

The results confirm the feasibility of using ultrasonic waves to monitor the MLF of red wine, even the possibility to include them in a real time control system.

Key words: red wine, malolactic fermentation, lactic-acid bacteria, malic and lactic acids, ultrasound, ultrasonic velocity, acoustic signal processing, time of flight, on-line monitoring.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 Ecuación global de la reacción maloláctica.	11
Figura 2.2 Ciclo de crecimiento de las levaduras, bacterias acéticas (<i>Gluconobacter</i> , <i>Acetobacter</i>) y BAL (<i>Oenococcus</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Pediococcus</i>) en el vino durante su fabricación y almacenamiento (adaptado de Lallemand Inc., 2005).	12
Figura 2.3 Fotografía obtenida con microscopio electrónico de <i>Oenococcus oeni</i> (Imagen tomada de www.rubliweb.ch).	14
Figura 2.4 Desarrollo de una FML y formación de diacetilo (adaptado de Shimazu <i>et al.</i> , 1985).	17
Figura 3.1 Técnica de reflexión para medir la impedancia acústica Z de un determinado medio.	31
Figura 3.2 Técnica de transmisión para medir atenuación y velocidad de propagación ultrasónica.	32
Figura 3.3 Técnica de pulso-eco para medir atenuación y velocidad de propagación ultrasónica en un determinado medio.	33
Figura 3.4 Técnica de medida ultrasónica propuesta para obtener la velocidad de propagación en un medio líquido usando ecos y <i>buffer rod</i>	36
Figura 3.5 Representación temporal de las señales ultrasónicas utilizadas para medir velocidad de propagación mediante la técnica de medida propuesta.	36
Figura 3.6 Técnica de medida ultrasónica propuesta para obtener la velocidad de propagación en el vino tinto durante la FML.	37
Figura 3.7 Imagen de un tanque de fermentación de vino tinto con capacidad para 100 l. Se señala en rojo el sensor ultrasónico diseñado que es acoplado a través de un agujero roscado DN50.	37
Figura 3.8 Representación de las señales registradas por el transductor ultrasónico para un dimensionamiento tradicional de la longitud del <i>buffer rod</i> y de la distancia BR-reflector.	38
Figura 3.9 Representación de las señales recibidas y registradas por el transductor ultrasónico cuando se redimensiona el <i>buffer rod</i> para conseguir una menor longitud en el mismo.	42
Figura 3.10 Análisis de amplitudes para explicar lo que sucede a una onda ultrasónica incidente en la interfase entre materiales con diferente impedancia acústica.	44
Figura 3.11 Cerámica piezoeléctrica con resonancia en modo espesor.	46
Figura 3.12 Circuito eléctrico equivalente de una cerámica piezoeléctrica con resonancia en modo espesor como la de la Figura 3.11.	47
Figura 3.13 Equivalente eléctrico del bloque correspondiente al <i>buffer rod</i> , medio líquido y reflector. ...	48
Figura 3.14 Equivalente eléctrico para simulación con Pspice del sistema de medida ultrasónico.	49
Figura 3.15 $ECO1$ y $ECO2$ obtenidos mediante simulación cuando el <i>buffer rod</i> es de acero (longitud 347,4 mm) y la distancia BR-reflector es 50 mm.	51
Figura 3.16 $ECO1_1$, $ECO1_2$ y $ECO2$ obtenidos mediante simulación cuando el <i>buffer rod</i> es de acero (longitud 115,8 mm) y la distancia BR-reflector es 50 mm.	52
Figura 3.17 $ECO1$ y $ECO2$ obtenidos mediante simulación cuando el material del <i>buffer rod</i> es PEAD (longitud 142,5 mm) y la distancia BR-reflector es 50 mm.	53
Figura 3.18 $ECO1_1$, $ECO1_2$ y $ECO2$ obtenidos mediante simulación cuando el material del <i>buffer rod</i> es PEAD (longitud 47,5 mm) y la distancia BR-reflector es 50 mm.	53

Figura 4.1 Relación entre el tiempo de vuelo aparente TOF_a visualizado por el osciloscopio y la variación del tiempo de vuelo entre señales consecutivas ΔTOF	57
Figura 4.2 Método del <i>umbral</i> para obtener el TOF de una onda de ultrasonidos.	58
Figura 4.3 Método del <i>umbral</i> para obtener variaciones del TOF entre ondas de ultrasonido similares y consecutivas.	59
Figura 4.4 Método del <i>cruce por cero</i> para obtener variaciones del TOF entre onda de ultrasonidos similares y consecutivas (a) Vista completa de la onda a procesar; (b) Vista ampliada del tramo marcado como 2 en (a).....	60
Figura 4.5 Vista ampliada del tramo marcado como 2 en la Figura 4.4.a para detallar el método del <i>cruce por cero con interpolación</i> con el cual obtener variaciones del <i>TOF</i> entre ondas de ultrasonidos similares y consecutivas mediante interpolación lineal.....	61
Figura 4.6 Método del <i>máximo</i> para obtener variaciones del <i>TOF</i> entre ondas de ultrasonidos similares y consecutivas.	62
Figura 4.7 Vista ampliada del tramo marcado como 2 en la Figura 4.5 para detallar el método del <i>máximo con interpolación</i> con el cual obtener variaciones del TOF entre ondas de ultrasonidos similares y consecutivas mediante interpolación parabólica.	62
Figura 4.8 Método de la <i>diferencia de pendientes</i> para obtener variaciones del <i>TOF</i> entre señales ultrasónicas a) Espectro de potencia de la señal a procesar; b) Espectro de fase de la señal a procesar.	65
Figura 4.9 Forma de onda de un eco ultrasónico experimental y un eco simulado.	66
Figura 4.10 Variación acumulada del <i>TOF</i> experimental.	75
Figura 4.11 a), b) y c) Tres ecos consecutivos donde el del medio presenta una anomalía en su inicio. ..	77
Figura 4.12 Respuesta de los 8 métodos ante una anomalía esporádica presentada en la señal central dentro de un conjunto de 9 ecos recopilados.	78
Figura 5.1 a) Etanol y b) Ácido málico utilizados para preparar las mezclas en laboratorio.	80
Figura 5.2 a) Ácido láctico y b) Ácido tartárico utilizados para preparar las mezclas en laboratorio.	80
Figura 5.3 Vasos de precipitado para preparar soluciones acuosas y soluciones hidroalcohólicas.	81
Figura 5.4 a) Balanza digital COBOS y b) Pipeta de microlitros GILSON utilizados para obtener las cantidades necesarias de reactivos a mezclar en laboratorio.	82
Figura 5.5 Esquema del sistema ultrasónico para obtener variaciones de velocidad y/o velocidad de propagación en pruebas de laboratorio.	83
Figura 5.6 Esquema del sistema ultrasónico para obtener variaciones de velocidad y/o velocidad de propagación en pruebas de campo.	84
Figura 5.7 Sistema de conmutación de 4 canales controlable vía USB mediante aplicación software en PC a) Vista frontal y b) Vista interna.	85
Figura 5.8 Almacenamiento de la información recopilada por el sistema de medida ultrasónico para cada canal activo.....	86
Figura 5.9 Esquema general del sensor ultrasónico diseñado para medir velocidad de propagación.....	86
Figura 5.10 Funcionamiento general de un transductor ultrasónico de contacto (emisor-receptor) generador de ondas longitudinales (Imagen tomada de www.olympusNDT.com).	87

Figura 5.11 Transductor ultrasónico PANAMETRIC ACCUSCAN A102S-RM (izquierda) y transductor ultrasónico de la familia GENERAL ELECTRIC B1F (derecha) (Imagen tomada de www.olympusNDT.com).	87
Figura 5.12 Representación del orden en que serán detectados los ecos de interés ($ECO1_1$ y $ECO2$) según la longitud del <i>buffer rod</i> y la distancia <i>BR-reflector</i> definidas.....	89
Figura 5.13 Sensor ultrasónico diseñado y construido para pruebas en laboratorio.....	90
Figura 5.14 Sensor ultrasónico diseñado y construido para ser acoplado en tanques de almacenamiento de vino tinto a) Vista interna y b) Acabado final.	90
Figura 5.15 Conjunto de 4 sensores ultrasónicos diseñados y construidos para ser acoplado en tanques de almacenamiento de vino tinto.....	91
Figura 5.16 Sensores ultrasónicos acoplados a tanques de fermentación de acero inoxidable y 100 l de capacidad.....	91
Figura 5.17 Baño de circulación de temperatura constante OMEGA HCTB-3030 usado para controlar la temperatura de las muestras durante las pruebas en laboratorio.....	93
Figura 5.18 Termómetro digital FLUKE 1551A Ex.	93
Figura 5.19 Detalle del acoplamiento del sensor de temperatura termistor NTC al sensor ultrasónico a) Tamaño del termistor, b) Montaje junto al transductor y <i>buffer rod</i> , c) Sensor ultrasónico con sensor de temperatura listo para ser montado en tanque de acero inoxidable.	94
Figura 5.20 Representación del agujero hecho a cada <i>buffer rod</i> para acoplar el termistor NTC.	94
Figura 5.21 Forma de onda registrada por el osciloscopio digital y almacenada cada vez que el sistema ultrasónico lleva a cabo una medida en el canal seleccionado.	95
Figura 5.22 Variaciones de la velocidad de los ultrasonidos registradas por el sistema de medida en agua destilada a 22,5 °C durante 104 minutos.	98
Figura 5.23 Montaje realizado para monitorizar FML's en la bodega experimental de INCAVI.....	99
Figura 5.24 Montaje realizado para monitorizar FML's en la planta piloto de la Universidad de Valladolid (Campus de Palencia).	100
Figura 5.25 Montaje realizado para monitorizar la FML del vino elaborado en la bodega Vega de Ribes.	101
Figura 5.26 Montaje realizado para monitorizar la FML del vino elaborado en la bodega Torre del Veguer.	102
Figura 6.1 Velocidad de propagación de los ultrasonidos en agua destilada en función de la temperatura dentro del rango 19-30 °C.....	105
Figura 6.2 Velocidad de propagación de los ultrasonidos en una muestra de vino tinto Merlot en función de la temperatura dentro del rango 20-31 °C.....	106
Figura 6.3 Comportamiento de la velocidad ultrasónica medida a 22°C en la mezcla binaria agua-ácido málico con diferentes valores de concentración.	107
Figura 6.4 Comportamiento de la velocidad ultrasónica medida a 22°C en la mezcla binaria agua-ácido láctico con diferentes valores de concentración.	108

Figura 6.5 Evolución de la velocidad ultrasónica medida a 22°C en mezclas ternarias agua-ácido láctico-ácido málico manteniendo fija la concentración de láctico mientras varía la concentración de málico.	109
Figura 6.6 Evolución de la velocidad de propagación ultrasónica en el alcohol etílico (96% de pureza) ante variaciones de temperatura dentro del rango 19-31 °C.	111
Figura 6.7 Comportamiento de la velocidad ultrasónica ante variaciones de temperatura para mezclas agua-etanol con diferente grado alcohólico volumétrico (% vol.).....	112
Figura 6.8 Tasas de variación de la velocidad respecto a la temperatura (m/s por °C) en función del grado alcohólico volumétrico dentro del rango comprendido entre 0 y 15 % vol.	113
Figura 6.9 Velocidad de los ultrasonidos a 22,5°C en una mezcla binaria agua-etanol al 12% vol. durante el transcurso del tiempo.....	114
Figura 6.10 Montaje <i>Prueba-Referencia</i> para aplicar compensaciones a las medidas de velocidad en mezclas que involucren alguna concentración fija de etanol.....	115
Figura 6.11 Evolución de la velocidad ultrasónica a 22°C en una solución hidroalcohólica al 12% vol. añadiendo diferentes concentraciones de ácido málico.	115
Figura 6.12 Evolución de la velocidad ultrasónica a 22°C en una solución hidroalcohólica al 12% vol. añadiendo diferentes concentraciones de ácido láctico.	116
Figura 6.13 Evolución de la velocidad ultrasónica medida a 22°C en mezclas de agua-etanol-ácido láctico-ácido málico para distintas concentraciones de ácido málico y manteniendo fija la concentración de etanol (12% vol.) mientras varía la concentración de láctico.....	117
Figura 6.14 Evolución de la velocidad de propagación ultrasónica a 22°C en función de la turbidez para muestras de vino de la variedad Merlot.....	120
Figura 6.15 Evolución de la velocidad ultrasónica durante el desarrollo de la FML vs. Evolución de las concentraciones de los ácidos málico y láctico para el vino almacenado en <i>Tanque1-Te</i> (T1).	122
Figura 6.16 Evolución de la velocidad ultrasónica durante el desarrollo de la FML vs. Evolución de las concentraciones de los ácidos málico y láctico para el vino almacenado en <i>Tanque2-Te</i> (T2).	122
Figura 6.17 Evolución de la velocidad ultrasónica durante el desarrollo de la FML vs. Evolución de las concentraciones de los ácidos málico y láctico para el vino almacenado en <i>Tanque3-Me</i> (T3).	123
Figura 6.18 Evolución de la velocidad ultrasónica durante el desarrollo de la FML vs. Evolución de las concentraciones de los ácidos málico y láctico para el vino almacenado en <i>TanqueA-Te</i> (TA).	125
Figura 6.19 Evolución de la velocidad ultrasónica durante el desarrollo de la FML vs. Evolución de las concentraciones de los ácidos málico y láctico para el vino almacenado en <i>TanqueB-Me</i> (TB).	126
Figura 6.20 Evolución de la velocidad ultrasónica durante el desarrollo de la FML vs. Evolución de las concentraciones de los ácidos málico y láctico para el vino almacenado en <i>TanqueC-Te</i> (TC).	126

Figura 6.21 Evolución de la población de BAL durante el desarrollo de la FML para el vino almacenado en *TanqueA-Te* (TA), *TanqueB-Me* (TB) y *TanqueC-Te* (TC)..... 127

Figura 6.22 Evolución de la acidez volátil durante el desarrollo de la FML para el vino almacenado en *TanqueA-Te* (TA), *TanqueB-Me* (TB) y *TanqueC-Te* (TC). 128

Figura 6.23 Evolución de temperatura durante el desarrollo de la FML para el vino almacenado en *TanqueA-Te* (TA), *TanqueB-Me* (TB) y *TanqueC-Te* (TC). 129

Figura 6.24 Evolución de la velocidad de los ultrasonidos en el vino de *TanqueA-Te* (TA) compensada en temperatura (Vel_{comp}). 131

Figura 6.25 Evolución de la concentración de los ácidos málico y láctico durante el desarrollo de la FML en el vino almacenado en *Tanque1* (T1)..... 133

Figura 6.26 Evolución de la concentración de los ácidos málico y láctico durante el desarrollo de la FML en el vino almacenado en *Tanque2* (T2)..... 133

Figura 6.27 Evolución del pH y la acidez total durante el desarrollo de la FML en el vino almacenado en *Tanque1* (T1)..... 135

Figura 6.28 Evolución del pH y la acidez total durante el desarrollo de la FML en el vino almacenado en *Tanque2* (T2)..... 135

Figura 6.29 Evolución de la turbidez y el crecimiento de bacterias durante el desarrollo de la FML en el vino almacenado en *Tanque1* (T1). 136

Figura 6.30 Evolución de la turbidez y el crecimiento de bacterias durante el desarrollo de la FML en el vino almacenado en *Tanque2* (T2). 136

Figura 6.31 Evolución de la velocidad ultrasónica durante el desarrollo de la FML del vino almacenado en *Tanque1* (T1) y *Tanque2* (T2). 137

Figura 6.32 Evolución de la velocidad ultrasónica durante el desarrollo de la FML del vino almacenado en *Tanque1* (T1) y *Tanque2* (T2) vs. Evolución de las concentraciones de los ácidos málico y láctico del vino en *Tanque1* (T1)..... 138

Figura 6.33 Evolución teórica y experimental de la velocidad ultrasónica ($Vel_{teó1}$, Vel_{exp}) vs. Concentración de los ácidos málico y láctico para el vino almacenado en *Tanque1* (T1). 142

Figura 6.34 Evolución teórica y experimental de la velocidad ultrasónica ($Vel_{teó1}$, Vel_{exp}) vs. Concentración de los ácidos málico y láctico para el vino almacenado en *Tanque2* (T2). 142

Figura 6.35 Evolución de la temperatura en el vino contenido en *Tanque1* (T1) y *Tanque2* (T2) durante el desarrollo de la FML. 143

Figura 6.36 Evolución teórica de la velocidad ultrasónica ($Vel_{teó1}$ y $Vel_{teó2}$) vs. Velocidad experimental (Vel_{exp}) para el vino almacenado en *Tanque1*. 146

Figura 6.37 Evolución teórica de la velocidad ultrasónica ($Vel_{teó1}$ y $Vel_{teó2}$) vs. Velocidad experimental (Vel_{exp}) para el vino almacenado en *Tanque2*. 146

Figura 6.38 Evolución de la temperatura para el vino almacenado en *Tanque1* (T1), original y filtrada. 147

Figura 6.39 Evolución de la temperatura para el vino almacenado en *Tanque2* (T2), original y filtrada. 148

Figura 6.40 Evolución de las velocidades para el vino almacenado en *Tanque1* (T1) y *Tanque2* (T2), originales y filtradas. 148

Figura 6.41 Evolución teórica ($Vel_{teó1}$, $Vel_{teó2}$) y experimental filtrada ($Vel_{exp-filt}$) de la velocidad ultrasónica vs. Concentración de los ácidos málico y láctico en el vino de *Tanque1* (T1)..... 149

Figura 6.42 Evolución teórica ($Vel_{teó1}$, $Vel_{teó2}$) y experimental filtrada ($Vel_{exp-filt}$) de la velocidad ultrasónica vs. Concentración de los ácidos málico y láctico en el vino de *Tanque2* (T2)..... 149

Figura 6.43 Evolución teórica ($Vel_{teó1}$, $Vel_{teó2}$), experimental (Vel_{exp}) y experimental compensada (Vel_{comp}) de la velocidad ultrasónica vs. Concentración de los ácidos málico y láctico en el vino de *TanqueA* (TA) para las medidas *conjunto2* realizadas con INCAVI..... 150

Figura 6.44 Evolución teórica ($Vel_{teó1}$, $Vel_{teó2}$), experimental (Vel_{exp}) y experimental compensada (Vel_{comp}) de la velocidad ultrasónica vs. Concentración de los ácidos málico y láctico en el vino de *TanqueB* (TB) para las medidas *conjunto2* realizadas con INCAVI..... 150

Figura 6.45 Evolución teórica ($Vel_{teó1}$, $Vel_{teó2}$), experimental (Vel_{exp}) y experimental compensada (Vel_{comp}) de la velocidad ultrasónica vs. Concentración de los ácidos málico y láctico en el vino de *TanqueC* (TC) para las medidas *conjunto2* realizadas con INCAVI..... 151

Figura 6.46 Velocidad de propagación ultrasónica vs. Concentración de los ácidos málico y láctico en el vino Cabernet Sauvignon elaborado en la bodega Vega Ribes. 152

Figura 6.47 Velocidad de propagación ultrasónica registrada durante la monitorización de la FML en el vino Petit Sirah (bodega Torre del Veguer)..... 153

LISTA DE TABLAS

Tabla 2.1 Resumen de los problemas potenciales asociados con FMLs sin control (adaptado de Lallemand Inc., 2005) (*);4-VP: 4-vinil-fenol; 4-VG: 4-vinil-guaiacol; 4-EP: 4-etil-fenol; 4-EG: 4-etil-guaiacol.	23
Tabla 2.2 Recopilación de métodos usados para monitorizar el ácido málico y la FML (adaptado de Lerm <i>et al.</i> , 2010).....	27
Tabla 3.1 Parámetros físicos y acústicos y parámetros eléctricos de los materiales considerados para el análisis mediante simulaciones.....	51
Tabla 4.1 RMSE para señales con SNR de 15 dB; variando sólo el retardo, primer valor sin etapa de filtrado y segundo valor con etapa de filtrado.	69
Tabla 4.2 RMSE para señales con SNR de 15 dB; variando el retardo y la amplitud, primer valor sin etapa de filtrado y segundo valor con etapa de filtrado.	70
Tabla 4.3 RMSE para señales con SNR de 35 dB; variando sólo el retardo, primer valor sin etapa de filtrado y segundo valor con etapa de filtrado.	71
Tabla 4.4 RMSE para señales con SNR de 35 dB; variando el retardo y la amplitud, primer valor sin etapa de filtrado y segundo valor con etapa de filtrado.	72
Tabla 4.5 Relación de tiempos de ejecución usando como referencia el método del <i>umbral</i>	74
Tabla 4.6 Raíz del error cuadrático medio de resultados experimentales usando el método de la <i>diferencias de fases</i> como referencia.....	75
Tabla 5.1 Características de interés enológico del lote de vino tinto Merlot utilizado para pruebas en laboratorio.	82
Tabla 5.2 Características físicas de los transductores ultrasónicos utilizados.	88
Tabla 5.3 Características acústicas y físicas del material plástico Polietileno de alta densidad (<i>PEAD</i>). ...	88
Tabla 5.4 Longitud del <i>buffer rod</i> y distancia <i>BR</i> -reflector para los 5 sensores ultrasónicos diseñados. ...	92
Tabla 6.1 Valores de temperatura medidos durante la toma de muestras para el análisis enológico del vino contenido en cada uno de los tanques de fermentación.	124
Tabla 6.2 Coeficiente de correlación de Pearson y p-valor (segunda cantidad entre paréntesis) calculados entre las medidas llevadas a cabo durante la FML de cada tanque (convencionales y ultrasónicas de forma indiferente).	130
Tabla 6.3 Características analíticas del vino tinto Tempranillo antes y después de llevarse a cabo el proceso de FML.....	132
Tabla 6.4 Coeficiente de correlación de Pearson y p-valor (segunda cantidad entre paréntesis) calculados entre las medidas llevadas a cabo durante la FML de cada tanque (convencionales y ultrasónicas de forma indiferente).....	139

LISTA DE SÍMBOLOS

A	Área
A_0	Amplitud de la señal inicial
A_E	Amplitud del eco
A_i	Amplitud de la onda incidente
A_r	Amplitud de la onda reflejada
A_t	Amplitud de la onda transmitida
BR	Buffer rod
c	Velocidad de propagación
C	Capacidad
C^D	Constante de elasticidad
$conc$	Nivel de concentración de un elemento
D	Distancia
d	Distancia
d_r	Distancia recorrida
E	Eco
exp	Valor experimental
F	Fuerza
f	Frecuencia
f_1	Frecuencia inferior del ancho de banda
f_2	Frecuencia superior del ancho de banda
I	Corriente eléctrica
k	Factor de escala
K_i	Coefficiente de transferencia de calor
L	Longitud
L	Inductancia
LEN	Longitud
l	Espesor de la cerámica piezoeléctrica
$líq$	Medio líquido
M	Masa
M_e	Vino elaborado con uva de la variedad Merlot
$máx$	Valor máximo
$mín$	Valor mínimo
N	Número de puntos de la señal
n	n-cantidad
P	Presión
q	Calor
Q_m	Factor de calidad mecánico
R	Coefficiente de reflexión
R	Resistencia eléctrica

R^2	Coefficiente de determinación
r	Radio
ref	Valor de referencia
$refl$	Reflector
S	Superficie
t	Tiempo
T	Período
T	Coefficiente de transmisión
T	Temperatura
T_e	Vino elaborado con uva de la variedad tempranillo
T_s	Período de muestreo
$teó$	Valor teórico
TOF	Tiempo de vuelo (Time of Flight)
TOF_a	Tiempo de vuelo aparente
V	Tensión eléctrica
V_{pp}	Voltaje pico a pico
Vel	Velocidad
v	Velocidad
ω	Frecuencia angular
x, y, z	Coordenadas espaciales
$x(t)$	Señal en el dominio del tiempo
$X(f)$	Transformada de Fourier de la señal $x(t)$
Z	Impedancia acústica
α	Coefficiente de atenuación
θ	Retardo
δ	Elemento diferencial
δ_e	Factor de disipación dieléctrica
Δ	Variación
$\Delta\tau$	Diferencia de tiempo
ε_a	Error absoluto
ε_r	Error relativo
ε^S	Permitividad a tensión constante
$\varphi(f)$	Espectro de fase
ρ	Densidad
τ'	Factor de corrección de tiempo

LISTA DE ACRÓNIMOS

<i>AGCM</i>	Ácidos grasos de cadena media
<i>ATP</i>	Adenosina trifosfato
<i>AV</i>	Acidez volátil
<i>BAL</i>	Bacterias ácido-lácticas
<i>BR</i>	Buffer rod
<i>CE</i>	Electroforesis capilar (Capillary Electrophoresis)
<i>CPU</i>	Unidad central de procesamiento (Central Processing Unit)
<i>CSIC</i>	Consejo Superior de Investigaciones Científicas
<i>DFT</i>	Transformada discreta de Fourier (Discrete Fourier Transform)
<i>DN</i>	Diámetro nominal
<i>EG</i>	Etil-guaiacol
<i>EP</i>	Etil-fenol
<i>FA</i>	Fermentación alcohólica
<i>FFT</i>	Transformada rápida de Fourier (Fast Fourier Transform)
<i>FML</i>	Fermentación maloláctica
<i>FT-IR</i>	Espectroscopia de infrarrojos (Fourier-Transform Infrared)
<i>HPLC</i>	Cromatografía líquida de Alta Presión (o eficacia) (High-Pressure Liquid Chromatography)
<i>INCAVI</i>	Institut Català de la Vinya i el Vi
<i>NTC</i>	Coefficiente de temperatura negativo (Negative Temperature Coefficient)
<i>OCM</i>	Organización Común de los Mercados Agrícolas
<i>OIV</i>	Organización internacional de la Viña y el Vino (International Organisation of Vine and Wine)
<i>PC</i>	Cromatografía en papel (Paper Chromatography)
<i>PE</i>	Polietileno
<i>PEAD</i>	Polietileno de alta densidad
<i>PID</i>	Proporcional-Integrador-Derivador
<i>PRT</i>	Platinum Resistance Thermometers
<i>PVC</i>	Policloruro de vinilo (Polyvinyl Chloride)
<i>RMSE</i>	Raíz del error cuadrático medio (Root Mean Square Error)
<i>RTD</i>	Detector de temperatura resistivo (Resistance Temperature Detector)
<i>SNR</i>	Relación señal-ruido (Signal-to-noise ratio)
<i>TLC</i>	Cromatografía en capa fina (Thin Layer Chromatography)
<i>TOF</i>	Tiempo de vuelo (Time of Flight)
<i>UE</i>	Unión Europea
<i>UFC</i>	Unidad Formadora de Colonias
<i>USB</i>	Bus serie universal (Universal Serial Bus)
<i>VG</i>	Vinil-guaiacol
<i>VP</i>	Vinil-fenol

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Interés

El sector vinícola europeo no es ajeno a las demandas de desarrollo, modernización y automatización que durante las últimas décadas ya se han ido produciendo en la mayoría de industrias de la alimentación, más aún cuando la Unión Europea (UE), principal productor, consumidor y exportador mundial de vino tinto, empieza a notar cómo sus países con mayor potencial vinícola van perdiendo progresivamente competitividad ante nuevos mercados emergentes. Como prueba de ello, encontramos las propuestas que en junio de 2007 acogió la Comisión Europea para impulsar una reforma de gran alcance de la Organización Común del Mercado (OCM) del vino, reforma centrada en los objetivos clave de mejorar la competitividad de los productores europeos de vino y fortalecer la reputación de la calidad del vino de la UE como el mejor del mundo (EU Comisión, 2006).

Teniendo en cuenta que la competitividad esta cada vez más determinada por criterios como el óptimo aprovechamiento de recursos, el avance en gestión, el perfeccionamiento de procesos, la mejora en la flexibilidad de la producción y la reducción de costes, residuos generados y consumo de energía. Es necesario, aparte de incorporar en los sistemas de producción vinícola nuevas herramientas útiles y disponibles, ir más allá adaptando, integrando y desarrollando nuevas tecnologías que aborden y contribuyan a mejorar las diferentes etapas del proceso de fabricación del vino. Todo ello, cumpliendo en cada momento con las exigencias requeridas para obtener un producto final de alta calidad.

Por otro lado, de las diferentes fases que componen el proceso de elaboración del vino, se puede concluir que son dos los fenómenos biológicos que sobresalen. El primero, llamado fermentación alcohólica (FA), es llevado a cabo por la acción de cepas de levaduras y el segundo, conocido como fermentación maloláctica (FML), debe su acción al trabajo de cepas de bacterias ácido-lácticas (BAL).

El hecho de ser la etapa en la que se consigue la concentración de etanol necesaria para otorgar el grado de alcohol que identifica y caracteriza al vino, hace que la FA sea de inevitable desarrollo en todas las clases de vinos tintos. Por el contrario, aunque la FML no es una etapa

estrictamente obligatoria, sus aportes de vital importancia en aspectos como la reducción de la acidez, convirtiendo el ácido málico en ácido láctico, y la contribución a la formación de una amplia gama de componentes de color, sabor y aroma que, adecuadamente controlados, serán positivos para el vino, le adjudican una condición prácticamente de indispensable en la fabricación de la inmensa mayoría de vinos tintos. Adicionalmente, la importancia de la fermentación maloláctica queda reflejada en varios artículos y revisiones que diferentes autores han escrito a lo largo de los últimos veinte años, uniendo esfuerzos para aclarar, explicar y perfeccionar el proceso, con el fin de obtener un control óptimo que concluya en una mayor calidad y estabilidad del producto final (Versari *et al.*, 1999; Maicas, 2001; Costello *et al.*, 2003; Larsen *et al.*, 2003; Alexandre *et al.*, 2004; Comitini *et al.*, 2005; Carreté *et al.*, 2006; Osborne & Edwards, 2006; Alcaide-Hidalgo *et al.*, 2007; Gamella *et al.*, 2010; Ruiz *et al.*, 2010; Abrahamse & Bartowsky, 2011).

Precisamente, conseguir un control eficiente de la FML se ha convertido en uno de los parámetros analíticos más críticos durante la fabricación del vino tinto, motivado principalmente por el hecho de que una FML mal realizada puede llevar a que el vino se vea expuesto a desarrollos microbianos y desviaciones sensoriales indeseadas, dañinas, irreversibles e incluso insalubres. Además, tiempos de fermentación demasiado largos e innecesarios retrasaran los procesos subsecuentes, incrementando costes y generando riesgos de daño en el vino.

Habitualmente, la tarea de monitorización y control de la FML se lleva a cabo tomando algunas muestras de vino para medir determinados parámetros de interés enológico guía. En especial, se miden los niveles de concentración de los ácidos málico y láctico mediante métodos y técnicas que, entre otras cosas, no están diseñados para trabajar en tiempo real y cuyo coste se ve extremadamente incrementado a medida que mejoran en precisión, desempeño y velocidad. De esta manera, pequeños y medianos fabricantes, que sólo pueden permitirse contar con los métodos de monitorización más económicos y limitados, deben recurrir a laboratorios externos para conseguir datos finales precisos, dando oportunidad a que se produzcan importantes retrasos (algunas veces superiores a 24 horas) entre la toma de muestras y la recepción de resultados, afectando la pronta y oportuna toma de decisiones. Al mismo tiempo, no disponer de un sistema de seguimiento en tiempo real está impidiendo la incorporación de la monitorización a sistemas de control *on-line*.

De esta manera, existen motivos suficientes para pensar en la puesta en marcha de una estrategia mejorada que sea capaz de proporcionar en tiempo real las medidas necesarias para monitorizar y controlar la FML. Asimismo, los parámetros que indican la calidad del vino podrían ser cuidadosamente monitorizados durante todo el proceso de fermentación y sobre la

base de la información reportada, se podrían llevar a cabo en el menor tiempo posible las correspondientes acciones preventivas o correctivas.

En este sentido, en las técnicas analíticas basadas en ondas de ultrasonidos de baja intensidad (alta frecuencia) podría estar la solución al reto presentado. Las señales ultrasónicas son ricas en información y bastante apropiadas para la caracterización de líquidos, semilíquidos, sistemas multifase, sustancias ópticamente opacas y suspensiones densas; siendo capaces de penetrar recipientes y paredes de recámaras de procesos sin ser significativamente degradadas por éstos y por un amplio rango de condiciones particulares en cada caso. Además, a lo largo de los últimos años, las tecnologías ultrasónicas ya se han aplicado a diversas fases de la industria alimentaria, aportando mejoras en aspectos como higiene, fiabilidad, costes, seguridad, portabilidad y rapidez de respuesta entre otros, e igualmente, consolidando sus posibilidades como parte de sistemas no destructivos para el análisis, monitorización, control y procesamiento en tiempo real (Lee *et al.*, 2004; Salazar *et al.*, 2004; Elvira *et al.*, 2005; Cobus *et al.*, 2007; Fernández *et al.*, 2008; Mizrach, 2008; Elvira *et al.*, 2009; Theriault *et al.*, 2009; Ting *et al.*, 2009; Aouzale *et al.*, 2010; Cereser & Laux, 2010; García-Álvarez *et al.*, 2011).

En consecuencia, apoyados en las ventajas mencionadas en el párrafo anterior y teniendo en cuenta que las propiedades de propagación de las ondas ultrasónicas son sensibles a los cambios físico-químicos del medio de propagación, es adecuado pensar que los cambios en densidad, compresibilidad, turbidez y viscosidad que producen en el vino la actividad y desarrollo de las BAL durante la FML, puedan llegar a ser registrados y caracterizados con ondas ultrasónicas. Es por tanto de interés, estudiar y evaluar la posibilidad y viabilidad del uso de los ultrasonidos como instrumentación para la monitorización y control de esta etapa fermentativa del vino tinto.

1.2 Estado del arte

Aunque las técnicas ultrasónicas han estado disponibles durante más de 50 años, ha sido lentamente que han ido pasando del uso casi exclusivo de áreas especiales o seleccionadas como los desarrollos militares, la oceanografía, la medicina, la ingeniería y la aeronáutica, a ser parte activa en múltiples sectores industriales como el de la alimentación; donde se han convertido en una útil herramienta bien sea para alterar (ultrasonidos de alta intensidad y baja frecuencia) o, como será el caso de la presente Tesis, para monitorizar (ultrasonidos de baja intensidad y alta frecuencia) las propiedades físicas y/o químicas en diversas clases de alimentos.

Actualmente, debido al creciente interés dentro de la industria alimentaria por los métodos de análisis no destructivos y en tiempo real para el control de calidad y la

monitorización de procesos durante las diferentes fases de producción, la tecnología ultrasónica de baja intensidad ha abierto un amplio abanico de posibilidades con aplicaciones que, además de los requisitos iniciales, han demostrado proporcionar medidas higiénicas, rápidas, no invasivas, fiables, exactas, y asequibles (Mc Clements, 1997; Povey, 1999).

De esta manera, podemos encontrar aplicaciones para las más diversas tareas como el estudio de la coagulación de la leche a partir de parámetros acústicos (Bachaman *et al.*, 1978; Nassar *et al.*, 2001; Benedito *et al.*, 2002); el análisis de los componentes del huevo (yema, clara gruesa y clara fina) para diseñar un dispositivo ultrasónico de control de calidad (Povey & Wilkinson, 1980); el estudio del proceso de maduración en los quesos a través de la medida de velocidad con el método *through-transmission* y la detección de grietas en el mismo con la técnica *pulse-echo* (Benedito *et al.*, 2001); el análisis de los cambios que se producen en las propiedades acústicas de las masas de pan cuando son amasadas (Letang *et al.*, 2001; Salazar *et al.*, 2002; Elmehdi *et al.*, 2004; Álava *et al.*, 2007); el estudio ultrasónico de la fermentación en masas de pan (Elmehdi *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2004) y el estudio de batidos mediante técnicas de reflexión para analizar la gravedad específica (Fox *et al.*, 2004) y las alteraciones en su impedancia acústica (Salazar *et al.*, 2004; Gómez *et al.*, 2008), entre otros.

Respecto a los trabajos relacionados con procesos de fermentación, Winder *et al.* (1970) fueron de los primeros en estudiar el contenido de alcohol y extracto en vinos mediante ultrasonidos; en este caso, aunque no estudiaron en sí la fermentación alcohólica, los autores determinaron una relación empírica entre parámetros ultrasónicos y las concentraciones de alcohol y sólidos solubles señalando que, en medios fermentativos, estas concentraciones son las que determinan principalmente la velocidad del sonido. Más recientemente, Becker *et al.* (2001) utilizaron una técnica ultrasónica para determinar la densidad durante la fermentación de la cerveza; con este trabajo, los autores desecharon la posibilidad de obtener una relación teórica entre densidad y velocidad de propagación ultrasónica, siendo conscientes de la falta de un modelo representativo para mezclas y soluciones líquidas. Finalmente, Van Sint Jan *et al.* (2008) presentaron un método basado en ultrasonidos para medir simultáneamente contenido de azúcar y alcohol en soluciones hidroalcohólicas que simulaban mosto fermentativo en un ambiente semi-industrial.

Por otra parte, es destacable el trabajo realizado por el grupo del Dr. D. Francisco Montero de Espinosa en el Departamento de Señales, Sistemas y Tecnologías Ultrasónicas del Instituto de Acústica (CSIC) quienes, en Resa *et al.* (2004), demostraron que los cambios ocurridos durante el transcurso de una fermentación alcohólica de varias mezclas acuosas, pueden ser monitorizados de forma *on-line* midiendo la velocidad de las ondas ultrasónicas propagándose a través del medio fermentativo. Además, en Resa *et al.* (2005), propusieron una

aproximación semiempírica para describir la densidad y velocidad de mezclas líquidas con bajas concentraciones de alcohol (menores del 20%), logrando mejorar los modelos teóricos disponibles.

En lo que respecta a la FML en el vino tinto, actualmente no se encuentran trabajos que relacionen el uso de técnicas ultrasónicas con el estudio y análisis de este proceso; siendo lo más aproximado, algunos estudios recientes que han demostrado el gran potencial de los ultrasonidos en la monitorización de reacciones químicas y procesos biológicos tales como el crecimiento de microorganismos (Elvira *et al.*, 2007; Sierra *et al.*, 2010). Igualmente, pruebas ultrasónicas preliminares llevadas a cabo sobre diferentes muestras de vinos, desarrolladas por el Grupo Sistemas Sensores de la UPC, indicaron que las señales utilizadas sólo fueron significativamente afectadas en aquellas muestras que estaban experimentando la FML.

1.3 Objetivos

La presente Tesis tiene como objetivo general contribuir al análisis y control de la FML en el vino tinto mediante el uso de técnicas basadas en ultrasonidos de baja intensidad. La viabilidad del uso de estas técnicas deberá permitir establecer las bases metodológicas y especificaciones técnicas que lleven al desarrollo y aplicación de un futuro sistema de medida, on-line, con el cual monitorizar y controlar, en tiempo real, este proceso fermentativo en entornos industriales. La consecución de este objetivo general estará condicionada al logro de los siguientes objetivos parciales:

- Estudio de la propagación de las ondas de ultrasonidos en mezclas hidroalcohólicas y en presencia de concentraciones de ácidos málico y láctico, para el posterior análisis de las relaciones existentes entre los procesos químicos que pueden ocurrir en estos líquidos y el comportamiento físico de dichas ondas mecánicas.
- Diseño, desarrollo y validación de un sensor ultrasónico para medir velocidad de propagación en el vino tinto con consideraciones de trabajo en tanques de fermentación de acero inoxidable.
- Estudio y caracterización del efecto de diversas propiedades del vino (grado alcohólico, turbidez, temperatura, concentración de CO₂,...) en la propagación de las ondas de ultrasonidos.
- Caracterización de la sensibilidad del sistema de medida ultrasónico a los cambios en las concentraciones de los ácidos málico y láctico.

- Validación del sistema de medida de ultrasonidos en procesos de FML reales (en ambiente semi-industrial e industrial).

1.4 Marco de trabajo

Esta Tesis Doctoral se engloba dentro de una parte de la actividad investigadora que lleva a cabo el Grupo de Sistemas Sensores de la Universidad Politécnica de Cataluña, en el que se integra el autor, dedicada al análisis no destructivo de diversos materiales utilizando técnicas ultrasónicas.

Por el lado de los productos alimenticios, esta actividad investigadora se ha visto reflejada en el adelanto de proyectos como el desarrollo de un sensor reológico por ultrasonidos para evaluar masas (proyecto RHEDOUGH); la caracterización ultrasónica de estructuras viscoelásticas (proyecto VISCOTUL, CICYT ref. AGL2005-05192-C04-04); el análisis de ultrasonidos en masas de pan derivadas del trigo (proyecto RHEDOUGH, CRAFT QLK1-CT-2001-70377) y la ampliación al estudio de otras masas viscoelásticas alimenticias como las masas batidas y las masas de pan libres de gluten (proyecto VISCOTUL, CICYT ref. AGL2005-05192-C04-04).

Finalmente, el presente estudio se ha realizado a través del proyecto DPI2009-14468-C02-01, proyecto WINESONIC, financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad y ha contado con la colaboración de los grupos de investigación enológica de INCAVI y de la Universidad de Valladolid, Campus Palencia, ENOBIOTEC.

1.5 Estructura de la Tesis

La estructura de la presente Tesis Doctoral es de la siguiente manera:

- En el capítulo 2 se revisan los conceptos teóricos básicos relacionados con la FML en el vino tinto. Se empieza por describir en qué consiste y cómo ha evolucionado el entendimiento del fenómeno a través de los años. Posteriormente, se describen las diferentes clases de BAL que pueden llevar a cabo el proceso, los diversos factores que, de una u otra manera, influyen en la actividad de dichas bacterias durante el desarrollo del proceso maloláctico, las formas de inoculación y las ventajas e inconvenientes que la FML puede aportar a las características organolépticas del vino tinto. Finalmente, se revisan los parámetros y métodos de medida convencionales usados por los elaboradores de vino para controlar y monitorizar la FML.

- En el capítulo 3 se lleva a cabo un estudio previo para el diseño y desarrollo del sensor de medida de variaciones de velocidad y/o velocidad ultrasónica, con orientación al uso en tanques de fermentación de acero inoxidable. El estudio empieza con el análisis de tres técnicas de medida ultrasónicas que podrían ser adoptadas. Posteriormente, se presenta una propuesta de una técnica, más apropiada para este caso, basada en la combinación del principio de funcionamiento de la técnica de reflexión con el aprovechamiento de las ventajas que ofrece el mecanismo conocido como *buffer rod*. Dada la importancia del papel que desempeñará el *buffer rod* en todo el sistema de medida, se lleva a cabo un detallado estudio para definir su correcto dimensionamiento y para elegir la gama de materiales más adecuada para su fabricación. Igualmente, se presenta un método de 'redimensionamiento' con el que se puede reducir, favorablemente, la longitud del *buffer rod*, beneficiando el diseño de buffers más pequeños, livianos y con mejor relación señal-ruido. Por último, se adapta y utiliza un modelo de circuito eléctrico equivalente con el cual se puede simular el desempeño del sensor ultrasónico junto con los otros componentes que hacen parte del sistema de medida.
- En el capítulo 4 se lleva a cabo el análisis, teórico y experimental, de un conjunto de técnicas útiles para procesar la información ultrasónica recopilada. Específicamente, se seleccionan técnicas, en el dominio del tiempo y de la frecuencia, con las cuales se pueden obtener variaciones de velocidad y/o velocidad, se describe el principio de funcionamiento de cada una e igualmente, sus ventajas e inconvenientes. Finalmente, se compara el desempeño de cada técnica de procesado, primero a través de un algoritmo de simulación con ayuda de Matlab® y posteriormente, mediante el procesado de un conjunto de datos obtenidos de forma experimental. El cálculo de la raíz del error cuadrático medio y la medida del tiempo de ejecución empleado por cada técnica, son los dos criterios usados para llevar a cabo el estudio comparativo.
- En el capítulo 5 se describen los medios, físicos y químicos, utilizados para el desarrollo de este trabajo. En primer lugar, se detallan los reactivos, muestras y elementos usados para preparar las diferentes mezclas necesarias durante las pruebas en laboratorio. Posteriormente, se describen las características del sistema de medida ultrasónico, empezando por la instrumentación electrónica que interviene, el programa para el control automático y, apoyados en el desarrollo presentado en el Capítulo 3, finalizando con la descripción completa de cada uno de los elementos que formaran partes del sensor ultrasónico

diseñado y fabricado (transductor, *buffer rod* y *reflector*). Igualmente, dada la necesidad de monitorizar el comportamiento de la temperatura durante la toma de datos, se describe la inserción de un sensor de temperatura al sensor ultrasónico. Finalmente, se describen las pruebas de campo a las que será sometido el sistema de medida ultrasónico.

- En el capítulo 6 se presentan los resultados y el análisis de todas las pruebas llevadas a cabo en laboratorio y en campo. Con ayuda de distintas mezclas (binarias, ternarias y cuaternarias), se lleva a cabo la caracterización ultrasónica de diferentes parámetros de interés enológico que intervienen durante la FML. Posteriormente, usando el mismo sistema de medida, se realiza la monitorización de la FML en vinos tintos en proceso de elaboración, almacenados en tanques de acero inoxidable y ubicados en dos plantas piloto y en dos bodegas. Los resultados ultrasónicos obtenidos son correlacionados con los datos de los principales parámetros de interés enológico que influyen en el desarrollo de la FML y que se obtienen mediante el uso de métodos de medida convencionales.
- En el capítulo 7 se recogen las conclusiones principales derivadas de los resultados obtenidos, se enumeran las aportaciones originales más significativas de este trabajo, al igual que las publicaciones y contribuciones a congresos. Finalmente, se plantean futuros campos de investigación surgidos a raíz de la realización de esta Tesis Doctoral.

2. LA FERMENTACIÓN MALOLÁCTICA EN EL VINO TINTO

2.1 Introducción

La fermentación maloláctica (FML) es considerada, después de la fermentación alcohólica (FA), el segundo fenómeno biológico más importante que transcurre durante la elaboración del vino tinto y, en pocas palabras, se define como el metabolismo del ácido málico, realizado por la acción de las bacterias ácido-lácticas (BAL) presentes en el vino de forma natural (FML espontánea) o inducida (FML inducida), que finaliza con la formación de ácido láctico, dióxido de carbono (CO₂) y en menor cantidad, dependiendo de ciertos factores adicionales, de algunos metabolitos secundarios que pueden beneficiar o perjudicar el vino elaborado.

Para llegar a esta consideración, un gran número de investigaciones y discusiones han tenido que transcurrir desde el momento en que Freiherr von Babo, en el siglo XIX, describiese la manifestación de una segunda fermentación en los vinos jóvenes, fermentación en la cual se liberaba CO₂ y se daba origen a una renovada turbidez en el vino elaborado. En aquel momento, von Babo relacionó tal actividad a la fusión de la grasa de la fermentación alcohólica y desde entonces, hasta aproximadamente las dos primeras décadas del siglo XX, la FML fue considerada como un proceso perjudicial para la vinificación (Krieger, 2006a).

Dentro de este lapso de tiempo, dedicado al descubrimiento, entendimiento y estudio del nuevo fenómeno fermentativo, destacan aportaciones como la de M. Berthelot y A. De Fleurieu quienes, pasada la segunda mitad del siglo XIX, empezaron a reportar una fuerte disminución de la acidez total del vino comparado con la del mosto original. Igualmente, y unos años más adelante, Louis Pasteur consiguió aislar algunas bacterias del vino, siendo el primero en mencionar parte de los efectos con los que, a día de hoy, se sigue caracterizando y relacionando a la FML: la producción de gas y lo que él consideró como una pérdida de sabor. Pasteur asoció estos efectos como nocivos para el vino, dejando un precedente suficientemente influyente, resumido en la frase «las levaduras hacen el vino y las bacterias lo destruyen», con el que consiguió frenar el desarrollo científico en este tema (Riberau Gayon, 1985).

Por otra parte, las primeras evidencias de la naturaleza biológica del proceso vienen de la mano de P. Kulisch que, en 1889, propone a algunas levaduras como las responsables de la disminución en la acidez total en el vino. Dos años más adelante, H. Müller-Thurgau corrige tal afirmación formulando que las responsables no eran levaduras sino bacterias y, empezando el siglo XX, es A. Koch quien realiza una confirmación experimental cuando consigue inducir la FML al inocular bacterias previamente aisladas del vino. Igualmente, a comienzos del siglo XX, Kunz pone en evidencia el simultáneo incremento de ácido láctico a medida que disminuye la presencia de ácido málico (Krieger, 2006a; Romero, 2010).

Posteriormente, Ferré en 1922 fue uno de los primeros autores que citan a la FML como un proceso beneficioso y esencial en la tarea de elaborar vinos de calidad, abriendo la senda a numerosos trabajos donde diversos autores hacen sus estudios, valoraciones y recomendaciones sobre la FML, centrados en aspectos como la influencia que ejercen algunos factores físicos y químicos, los beneficios y/o perjuicios que puede proporcionar esta etapa al proceso de elaboración del vino y las alternativas tecnológicas para potenciarla.

Por consiguiente, aunque históricamente la FML fue descrita como un fenómeno caprichoso que no era del todo comprendido, pero que repercutía una gran importancia en el producto final, el conjunto de investigaciones llevadas a cabo ha logrado proporcionar muchas ideas acerca de la complejidad y funcionalidad que rodea a las bacterias causantes y al proceso en sí. No obstante, sigue siendo muy importante tener presente que ante todo, la FML es un fenómeno biológico que siempre estará sujeto a las limitaciones ambientales, físicas y químicas que la naturaleza ha dado a su desarrollo.

En cuanto a la viticultura, hasta hace poco, los productores de vino se conformaban con que la FML ocurriera espontáneamente siguiendo el curso de la naturaleza «FML espontánea», algo que generalmente ocasionaba un descontrol del proceso con resultados finales inciertos y que no siempre eran los deseados. Actualmente, la explicación de estos resultados negativos se facilita gracias a los conocimientos que se han ido acumulando entorno a lo que ocurre durante la vinificación.

El vino, por su propia naturaleza, posee una acidez total y un contenido de alcohol relativamente alto, pH bajo y, a menudo, una cierta cantidad de dióxido de azufre (SO₂), aspectos que lo convierten en un medio poco adecuado para el crecimiento de determinados microorganismos. Por lo tanto, un vino que ha sido objeto de una FML espontánea, es porque sus BAL han logrado superar las dificultades antes mencionadas, aunque esto no es garantía para que se produzca una fermentación predecible con los perfiles organolépticos y sensoriales deseados. Al fin y al cabo, aunque se sepa que las bacterias lácticas están presentes en cantidad suficiente, son éstas y no los enólogos, las que tienen el máximo control sobre la calidad y

resultados finales. Adicionalmente, las cosas pueden empeorar aún más en el caso que sea una cepa de BAL no adecuada la que se imponga durante el proceso, pues todo el vino posterior que se elabore en esa bodega puede correr el riesgo de presentar las características negativas asociadas a esa cepa espontánea.

Por lo tanto, la respuesta a los inconvenientes derivados de las cepas de BAL espontáneas viene de la mano de los estudios más actuales y avanzados sobre la FML, conocimientos con los que se ha podido dotar a la industria del vino de una poderosa herramienta para entender, controlar e incluso predecir todo este proceso fermentativo.

De esta manera, la clave del éxito está en la denominada «FML inducida», es decir, una fermentación basada en la inoculación controlada de cepas de BAL conocidas y confiables. Estas bacterias, para estar disponibles en el mercado, son cuidadosamente seleccionadas de la naturaleza por presentar características sobresalientes en aspectos como capacidad para crecer y prosperar en el vino, tolerando los componentes que podrían inhibirlas, compatibilidad con las cepas de levaduras usadas durante la FA, requerimientos nutricionales viables y, de igual forma, por proporcionar atributos sensoriales positivos, aromas y sabores deseados, mejorar la sensación en el paladar y tener poca disponibilidad para generar productos metabólicos indeseados (Krieger, 2006b).

2.2 Las bacterias lácticas del vino

Desde el punto de vista teórico, la FML consiste en la descarboxilación del ácido L-málico, ácido dicarboxílico, en ácido L-láctico, ácido monocarboxílico, acompañada por la producción y desprendimiento de CO₂. En la Figura 2.1 se puede observar la ecuación general de esta reacción.

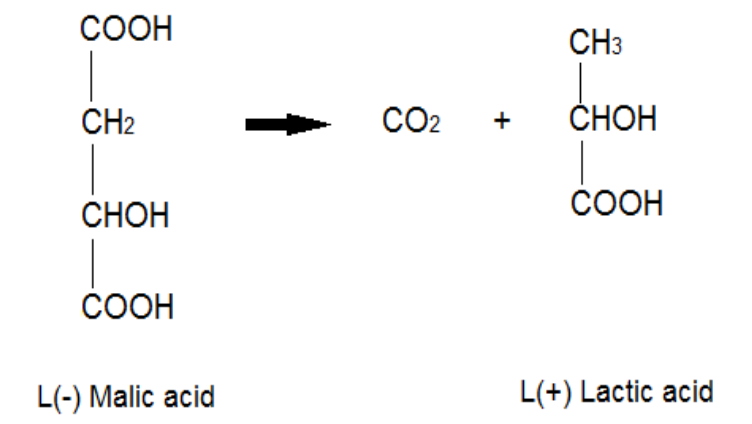


Figura 2.1 Ecuación global de la reacción maloláctica.

El proceso está catalizado por una enzima altamente específica «la enzima maloláctica» y es desencadenado por la acción de las BAL (Bauer & Dicks, 2004). En el vino, el origen natural de estas bacterias se encuentra en la uva, específicamente, se suelen hallar sobre la superficie de las uvas y de las hojas de la vid (Wibowo *et al.*, 1985).

En la Figura 2.2 se observa un ejemplo de cómo suelen evolucionar de forma natural las BAL durante la vinificación. El ciclo parte de las cantidades reducidas que se hallan en las uvas y que a lo largo de las primeras fases del proceso se desarrollan, dentro del mosto, en número y en variedad. Durante la FA se presenta una primera fase de muerte causada principalmente por el bajo pH y el elevado contenido de etanol, llegando a reducirse notablemente la población total de bacterias.

Una vez terminada la FA y tras una fase de latencia, cuya duración dependerá de las propiedades del vino, comienza la fase de proliferación, caracterizada por el crecimiento exponencial de las BAL sobrevivientes. Cuando la población llega a una determinada cantidad, comienza la FML (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2000). Durante este proceso, la población crecerá un poco más y se estabilizará hasta la llegada de la fase terminal donde la cantidad de bacterias disminuye paulatinamente. Una vez terminada la FML, la supervivencia de las BAL residuales dependerá en buena medida de las condiciones del vino y del tratamiento aplicado al mismo (Krieger, 2006a).

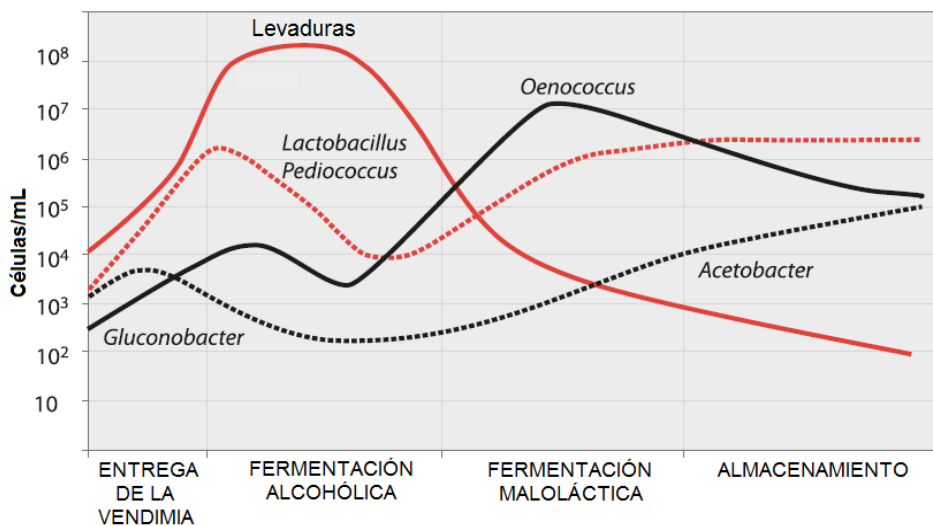


Figura 2.2 Ciclo de crecimiento de las levaduras, bacterias acéticas (*Gluconobacter*, *Acetobacter*) y BAL (*Oenococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus*) en el vino durante su fabricación y almacenamiento (adaptado de Lallemand Inc., 2005).

Por otro lado, es acertado pensar en la existencia de un conjunto variado de especies de BAL capaces de llevar a cabo el proceso maloláctico.

Oenococcus (antes *Leuconostoc oenos*), *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Lactobacillus*, son los principales géneros a los que pertenecen las BAL aisladas del vino (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2000). Además, por el metabolismo que llevan a cabo sobre las *hexosas*, se dividen en homofermentativas, heterofermentativas y heterofermentativas facultativas.

Las homofermentativas metabolizan la glucosa y/o fructosa por la vía glicolítica de Embden-Meyerhof-Parnas para obtener ácido láctico (2 moles de ácido láctico y 2 moles de ATP por cada mol de *hexosa* metabolizada), las heterofermentativas obtienen dióxido de carbono, etanol, ácido acético y ácido láctico con el metabolismo de los mismos azúcares siguiendo la vía de Warburg-Dickens (1 mol de CO₂, 1 mol de etanol o ácido acético y 1 mol de ácido láctico por cada mol de *hexosa* consumido) y las heterofermentativas facultativas pueden utilizar cualquiera de las dos vías dependiendo del tipo de azúcar disponible (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2000).

Las bacterias del género *Pediococcus* son homofermentativas, las del género *Leuconostoc* son heterofermentativas y los *lactobacillus* pueden presentar los dos comportamientos encontrándose divididos en tres grupos (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2000). Los del grupo 1 se denominan «Homofermentativos estrictos» y nunca han sido detectados en el vino. El grupo 2 se conoce como « Heterofermentativos facultativos», al que pertenecen los *lactobacillus* que convierten una molécula de glucosa en dos moléculas de ácido láctico y fermentan las *pentosas* convirtiéndolas en ácido láctico y ácido acético. Por último, están los del grupo 3, denominados «Heterofermentativos estrictos» y conformado por aquellas bacterias que fermentan la glucosa en ácido láctico, ácido acético, etanol y dióxido de carbono y, de igual forma, las *pentosas* las fermentan en ácido láctico y ácido acético (Krieger, 2006c; Romero 2010).

Aunque morfológica, bioquímica y metabólicamente las BAL suelen ser un grupo heterogéneo, fisiológicamente son lo contrario, constituyendo un conjunto bastante homogéneo que comparte varias características generales como los requerimientos nutritivos complejos, con necesaria presencia en el medio de aminoácidos y vitaminas que no son capaces de sintetizar, no movilidad por ausencia de flagelos, no esporuladas, microaerófilas o anaerobias facultativas y la presencia de un metabolismo exclusivamente fermentativo, entre otras (Romero, 2010).

De especial interés para el desarrollo de la presente Tesis es el hecho de que la especie de BAL que garantiza la FML en la mayoría de los vinos de todas las regiones del mundo es la *Oenococcus oeni* (*O. oeni*) (Wibowo *et al.*, 1985), una bacteria anaerobia facultativa de forma

esférica (coco) que puede formar cadenas filamentosas (Figura 2.3) y que se caracteriza por ser la que mejor se adapta al fuerte entorno del medio: altos niveles de alcohol, bajo pH y marcada presencia de dióxido de azufre (SO₂) y, de igual forma, por el positivo perfil organoléptico que pueden llegar a producir (Liu, 2002). Estas características la convierten en la especie de BAL preferida para conducir la FML y con la cual se hacen las pruebas experimentales necesarias durante esta investigación.

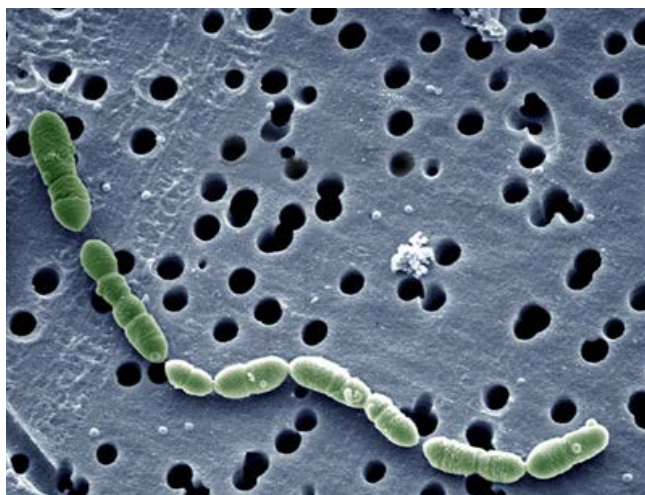


Figura 2.3 Fotografía obtenida con microscopio electrónico de *Oenococcus oeni* (Imagen tomada de www.rubliweb.ch).

2.3 Influencia de la FML en la composición del vino tinto

Entrando más en detalle, es importante tener en cuenta que la FML no es sólo la transformación del ácido málico en ácido láctico y CO₂. Adicionalmente, apoyadas en el vino como medio de crecimiento, las BAL, a través de sus procesos metabólicos, juegan un importante papel eliminando algunos componentes y produciendo otros nuevos.

De esta manera, la actividad metabólica de las BAL influye en los compuestos de aroma, en el control de la acidez y en la estabilidad biológica del producto final. Por lo tanto, llevar a cabo la FML es recomendable cuando se requiere reducir la acidez del vino y mejorar sus características organolépticas, sobre todo en regiones frías donde las uvas contienen altos niveles de ácidos orgánicos. Además, su puesta en marcha se ve impulsada, entre otras cosas, por las preferencias de los consumidores en gran parte del mundo que se van inclinando hacia vinos de acidez moderada.

Estos motivos, son suficientes para hacer de la FML un proceso deseado en casi todos los vinos tintos y para ciertos estilos de vinos blancos. No obstante, el cultivo de las BAL en el vino debe ser rigurosamente controlado para asegurar que trabajen bacterias que no produzcan malos sabores, malos olores ni compuestos que puedan tener repercusión en la salud humana e

igualmente, en la mayoría de los casos, es importante que la FML se complete rápidamente con un final claramente definido. De esta manera, se ahorrará tiempo de proceso y se aportará en la estabilidad inicial del vino, evitando que las BAL residuales continúen con procesos metabólicos indeseados.

2.3.1 Ventajas que aporta la FML al vino tinto

2.3.1.1 Disminución de la acidez

Una de las herramientas con la que cuentan los vitivinicultores para reducir la acidez del vino es la FML. De esta manera, se puede conseguir reducciones que varían entre 0,1% a 0,3% y aumentos del pH de 0,1 a 0,3 unidades. En teoría, durante la FML, se dice que con el metabolismo de 134 g de ácido málico se producen 90 g de ácido láctico y 44 g de CO₂, por lo tanto, teniendo en cuenta que el ácido málico es agresivo de gusto acervo mientras que el láctico es mucho más suave, es de esperar que esta suavidad sea transmitida al vino.

Los vinos producidos en regiones de climas fríos, se ven beneficiados con la reducción de la acidez porque las bayas presentan, por naturaleza, altas concentraciones de ácidos orgánicos. Al contrario, los vinos de pH alto, típicos de regiones cálidas, tienen una baja acidez y, en este caso, la FML puede contribuir de sobremanera en reducirla aún más, dando resultado a vinos planos e insípidos que además pueden permitir el desarrollo de bacterias perjudiciales. Pese a esto, en muchos casos se lleva a cabo el proceso maloláctico porque, como ya se mencionó, los vinos de acidez moderada son deseados y, como se verá más adelante, la FML estabiliza microbiológicamente al vino y los aportes que produce en las características organolépticas de éste son ampliamente notables (Catania & Avagnina de del Monte, 1994).

2.3.1.2 Mejora del perfil organoléptico

La actividad bacteriana en el vino implica el consumo y la producción de componentes que afectan directamente la calidad sensorial de éste. La FML, al producir ácido láctico, ácido suave característico de la leche, a partir del ácido málico, ácido agresivo característico de la manzana, está contribuyendo, en términos generales, a la obtención de un vino más suave y mantecoso. Además, el trabajo fermentativo de las BAL en el vino no sólo se limita a la producción de ácido láctico; éstas también son capaces de producir otros compuestos con importante incidencia aromática que, de forma controlada y normalmente a bajas concentraciones, aportan complejidad al aroma del vino (Bartowsky & Henschke, 2004).

Son tres los mecanismos que proponen Bartowsky & Henschke (1995) por medio de los cuales las BAL serían capaces de modificar las características de aroma y sabor en el vino. En primer lugar, la capacidad de las BAL de producir compuestos volátiles a través del metabolismo de algunos componentes de la uva como azúcares y aminoácidos. En segunda

instancia, alteraciones en la uva y/o levaduras que deriven en metabolismos secundarios por parte de las bacterias y por último, el metabolismo de otros compuestos de sabor (Lerm *et al.*, 2010).

Por otro lado, dentro de los principales compuestos aromáticos, asociados con la FML, que contribuyen de forma general al perfil de aroma en el vino tinto, se suelen encontrar: los compuestos carbonílicos, los ésteres, los compuestos con contenido de azufre y nitrógeno, los fenoles volátiles y los ácidos grasos volátiles.

Dentro de los compuestos carbonílicos, el diacetilo es considerado uno de los más importantes que se produce durante la FML. Éste aporta, principalmente, caracteres de mantequilla y nuez al vino (Bartowsky & Henschke, 1995). El diacetilo se forma como un compuesto intermedio durante el metabolismo que sufre el ácido cítrico por parte de las BAL y conociendo los factores que influyen en su concentración, se podrá contar con las herramientas adecuadas para manipular y controlar su nivel de concentración final o, lo que es lo mismo, controlar el impacto que éste tiene sobre el aroma final del vino.

Precisamente, uno de estos factores es la identificación del momento exacto en que finaliza la FML, ya que el metabolismo del ácido cítrico, durante la FA/FML secuencial, sólo comienza a partir de este momento, es decir, la máxima concentración de diacetilo empezará a producirse a partir del instante en que la cantidad de ácido málico llegue a su valor mínimo (Bartowsky & Henschke, 1995, 2004).

La Figura 2.4 muestra un ejemplo del desarrollo de una FML, en ésta se puede observar la estrecha relación entre la formación y posterior degradación del diacetilo con la evolución de las BAL y el metabolismo del ácido cítrico y del ácido málico. En la misma figura, se puede comprobar que la producción máxima de diacetilo ocurre cuando el ácido málico ha sido metabolizado y la reducción posterior cuando se metaboliza el ácido cítrico (Catania & Avagnina de del Monte, 2007).

En cuanto a los ésteres, éstos están asociados con los aromas frutales del vino y, aunque la actividad esterasa de las BAL aún es tema de investigación, cada vez es más evidente que la FML y las BAL en el vino tienen la capacidad de alterar el contenido de ésteres (Matthews *et al.*, 2004). Los ésteres más importantes presentes en la FML son el *etil lactato* y el *dietil succinato* (Ugliano & Moio, 2005). El primero, por su sabor a frutas y aromas de mantequilla y crema, aporta significativas características al perfil aromático del vino, al igual que contribuye a mejorar la sensación producida en boca (Ugliano & Moio, 2005). El segundo, de igual forma, participa aportando aromas de fruta y melón en el vino.

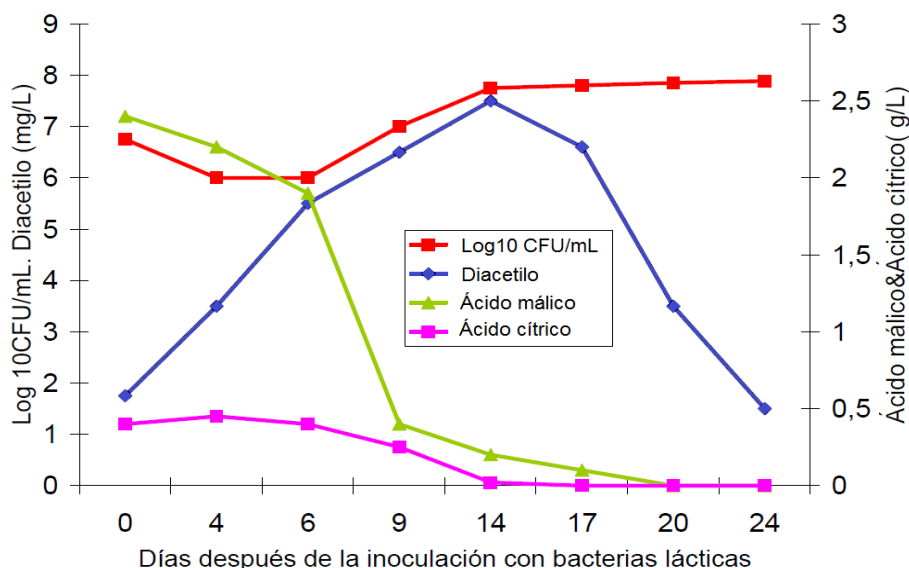


Figura 2.4 Desarrollo de una FML y formación de diacetilo (adaptado de Shimazu *et al.*, 1985).

Finalmente, se reafirma el hecho de que la FML influye fuertemente en el carácter sensorial del vino, aportando en aspectos como el aumento del atributo mantecoso, la reducción del carácter herbáceo, la modificación de la frutuosidad y ayudando a mejorar la persistencia del sabor y sensación en boca. Dada la importancia de estos factores en las propiedades aromáticas del vino, es esencial para el enólogo comprender la formación de los compuestos involucrados, los aspectos que incitan su aparición y la forma de manipular su producción.

2.3.1.3 Estabilidad microbiológica

En sentido microbiológico, los vinos que experimentan la FML son más estables que los que no lo hacen. Al hablar de estabilidad microbiológica se refiere a que, una vez finalizado el proceso maloláctico, se reduce el riesgo de que la FML siga su desarrollo en la botella con la correspondiente formación de gas (CO₂) en la misma, junto a otros efectos negativos. No obstante, siempre se debe tener presente que la estabilidad microbiológica después de la FML no es nunca absoluta.

2.3.2 Desventajas de la FML

No siempre la FML es beneficiosa y, contrariamente a lo ya mencionado, en ocasiones puede ser responsable de cambios no deseados en las propiedades organolépticas del vino y/o en la generación de aminas biógenas (Romero, 2010). Productos derivados de la descarboxilación de los amino ácidos, por parte de las BAL, que son indeseables por sus posibles efectos tóxicos sobre el consumidor. Generalmente, estas reacciones adversas están fuertemente influenciadas por la especie de BAL que lleva a cabo la FML, incluso habiendo diferencias entre cepas de la misma especie, y por parámetros como el pH del vino.

Por lo tanto, para situaciones en las que es conveniente prevenir la FML, la mejor alternativa, aunque no la más fácil, es la de impedir el desarrollo de las BAL. Dentro de las opciones implementadas para esta tarea, se suele recurrir a alternativas como la adición de componentes antimicrobianos como el SO₂, la lisozima o el uso de cepas de levadura capaces de producir bacteriocinas agentes también antimicrobianos (Bauer & Dicks, 2004).

2.4 Factores que influyen en la FML

Es muy amplia la lista de elementos que, de una u otra forma, hacen presencia e influyen en la supervivencia y crecimiento de las BAL en el vino y por consiguiente, que intervienen en el desarrollo de la FML.

Para un mejor entendimiento, se suelen dividir estos factores en tres categorías: los relacionados con la composición física y química del vino, los parámetros asociados con la vinificación y los generados por las interacciones microbianas entre las BAL y los otros microorganismos presentes en el vino. A pesar de esta variedad, en la mayoría de los casos la diferencia entre conseguir aportes positivos y prevenir los negativos está directamente relacionada con el nivel de conocimiento que se tenga de cada uno y de las opciones y herramientas con las que se cuente para mantenerlos debidamente controlados.

Teniendo en cuenta que la FML se ve afectada por parámetros como la temperatura, la presencia de azúcares residuales, la formación de diversos metabolitos, e incluso, la clase de pesticida usado para prevenir la formación de hongos en la uva y que la importancia de cada uno depende generalmente de las condiciones particulares de elaboración, en las siguientes secciones se hace una breve descripción de algunos de los parámetros que suelen ser más relevantes.

2.4.1 Interacción levaduras-bacterias

La interacción entre las levaduras usadas para la FA y las BAL de la FML tiene un efecto directo sobre el crecimiento de estas últimas y su actividad maloláctica.

El grado y la complejidad de estas interacciones puede deberse a tres factores. El primero envuelve las posibles combinaciones entre cepas de levaduras y bacterias que pueden realizarse, ya que existe una amplia variedad de ambas con diferentes características que las hacen más o menos compatibles. El segundo comprende la absorción y liberación de nutrientes por parte de las levaduras que generalmente actúan primero, afectando a su vez a los nutrientes disponibles para las BAL. El tercero se relaciona con la capacidad de las levaduras para producir metabolitos, que bien pueden tener un efecto estimulador o inhibidor/tóxico sobre las BAL (Alexandre *et al.*, 2004).

2.4.2 Etanol

Al ser el principal metabolito producido por las levaduras durante la FA y presentar efectos adversos sobre el crecimiento y actividad metabólica de las BAL, el etanol desempeña un importante papel en la habilidad de éstas para sobrevivir al ambiente hostil del vino y conseguir realizar con éxito la FML. Al igual que otros factores inhibidores de las BAL, los efectos inhibitorios del etanol están relacionados sinérgicamente con la temperatura. Ante una alta concentración de etanol, la temperatura óptima de crecimiento de las BAL decrece y, de forma inversa, las altas temperaturas disminuyen la capacidad de las BAL para soportar un incremento en las concentraciones de etanol (Bauer & Dicks, 2004). Niveles de etanol de 10% a 14% (v/v), combinados con una temperatura de 25 °C o superior, inhibirían casi por completo el crecimiento de las BAL y, para un óptimo desarrollo de las mismas, manteniendo estos mismos niveles de etanol, se necesitaría una temperatura entre 18 °C y 20 °C (Lerm *et al.*, 2010).

Al igual que la temperatura, la selección de las cepas y la forma de activación antes de inocularlas en el vino, son otros de los factores influyentes en la forma con que las BAL son capaces de tolerar las diferentes concentraciones de etanol. Por ejemplo, *Lactobacillus plantarum*, especie frecuentemente usada para llevar a cabo la FML aparte de *O. oeni*, no sobrevive a concentraciones de etanol superiores a 8% (v/v). En cambio, ciertas cepas seleccionadas de *O. oeni* pueden realizar la FML en vinos con grados alcohólicos superiores a 14% (v/v).

2.4.3 Dióxido de azufre

El dióxido de azufre (SO₂) es un compuesto aceptado e insustituible en la vinificación. Debido, principalmente, a sus importantes acciones como antioxidante y antiséptico, es común agregar SO₂ en el mosto (50 a 100 mg/l) al principio del proceso de vinificación para inhibir el crecimiento de levaduras autóctonas y/o bacterias, especialmente bacterias del ácido acético (Bauer & Dicks, 2004).

En el vino, se suele encontrar SO₂ en equilibrio en tres formas posibles, las formas moleculares (no iónicas) SO₂ y H₂SO₃ (ácido sulfuroso), la forma monodisociada (ion bisulfito, HSO₃⁻¹) y la forma bidisociada (ion sulfito, SO₃⁻²). El equilibrio que mantienen estas tres formas es altamente dependiente del pH y por consiguiente, también lo será la actividad del compuesto frente a las distintas acciones que posee. El SO₂ molecular se considera la forma más inhibitoria que actúa sobre las BAL, es la única forma de SO₂ que puede atravesar las paredes celulares de las bacterias por medio de difusión y su eficacia es mayor ante valores de pH bajos. Una vez se ubique dentro de las células, el SO₂ molecular se convierte en bisulfito y puede reaccionar con diversos componentes celulares como pueden ser las proteínas, afectando de esta manera el

crecimiento de las BAL (Carreté *et al.*, 2002). Igualmente, la acción antimicrobiana del SO₂ puede también influir en toda la actividad maloláctica (Wibowo *et al.*, 1985).

Aparte del SO₂ que se agrega durante el proceso de vinificación, las levaduras también son capaces de producir cantidades significantes del compuesto (King & Beelman, 1986). Por consiguiente, y en especial si se requiere realizar la FML, es esencial que el vinicultor, además de tener en cuenta la cantidad de SO₂ agregado en las diferentes etapas de elaboración del vino, también se preocupe por los posibles niveles de SO₂ producido por las levaduras. La concentración total de SO₂ aportada por estas dos fuentes influirá, tanto en la supervivencia y proliferación de las BAL, como en la iniciación de la FML (Henick-Kling & Park, 1994; Alexandre *et al.*, 2004; Lerm *et al.*, 2010).

2.4.4 Ácidos grasos de cadena media

Los ácidos grasos de cadena media (AGCM), formados por el metabolismo de las levaduras, comprenden los ácidos hexanoicos, octanoicos, decanoicos y dodecanoicos, siendo unos de los principales productos que inhiben el crecimiento de las BAL y el desarrollo de la FML (Lonvaud-Funel *et al.*, 1988). Estos efectos inhibitorios son altamente dependientes del nivel de concentración, tipo de ácido graso, cepa de levadura y BAL utilizada, al igual que del pH del vino en cuyo caso su efecto es mayor con valores bajos (Carreté *et al.*, 2002; Alexandre *et al.*, 2004).

En esta ocasión, para el éxito final de la FML en el vino, de nuevo se hace presente la importancia de seleccionar las cepas de levadura y BAL más adecuadas. A la elección de cepas compatibles que den como resultado ninguno o muy pocos efectos antagónicos entre pares levadura-BAL, se le debe agregar que las levaduras produzcan niveles muy bajos de SO₂ y AGCM.

2.4.5 pH

La importancia del pH del vino en la FML, radica en el papel que desempeña cuando llega el momento de establecerse qué especie de BAL es capaz de sobrevivir y desarrollarse durante la vinificación. De esta manera, el pH es un factor determinante en la tasa de crecimiento de las bacterias y en la actividad maloláctica. En cuanto a la iniciación y desarrollo de la FML, vinos con pH de 3,3 o superior, generalmente, presentan pocos problemas y tardan menos tiempo en completar el proceso; mientras que los de pH de valor inferior, pueden experimentar algunas dificultades como la necesidad de contar con más días de fermentación (Rosi *et al.*, 2003). *O. oeni*, es por lo general la especie de BAL dominante en las FMLs de los vinos con pH por debajo de 3,5 ya que favorece su crecimiento, mientras que para valores superiores destacan los *Lactobacillus* y *Pediococcus*.

De esta manera, el pH del vino presenta un número de efectos decisivos sobre la FML y las BAL y es importante tener en cuenta que además de su influencia directa, las relaciones entre pH, SO₂ y AGCM, como se ha mencionado en apartados anteriores, es un asunto crucial para entender el efecto de estos parámetros sobre la supervivencia, crecimiento y desarrollo de las BAL en el vino (Lerm *et al.*, 2010).

2.4.6 Temperatura

La temperatura es un parámetro que influye en la capacidad de supervivencia, la tasa de crecimiento, la duración de la fase de latencia y el número de población de las BAL presentes en el vino, así como en la habilidad de éstas para iniciar y completar la FML (Bauer & Dicks, 2004).

El rango de temperatura óptimo para el crecimiento de la especie *O. oeni* está comprendido entre 27 °C y 30 °C, aunque en el caso del vino, debido a la presencia del etanol, la temperatura óptima de crecimiento se reduce a valores entre 20 °C y 23 °C (Bauer & Dicks, 2004). De igual forma, 20 °C es considerada la temperatura óptima tanto para el crecimiento de *O. oeni*, como para el eficiente metabolismo del ácido málico en la vinificación. Temperaturas por debajo de 18 °C, empiezan a producir retardos en el inicio e incrementos en el tiempo de duración de la FML y temperaturas inferiores a 16 °C, inhiben el crecimiento de *O. oeni* al tiempo que generan una reducción de la actividad celular (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006).

En consecuencia, para asegurar la rápida iniciación, finalización y eficiencia de la FML, es necesario monitorizar y controlar la temperatura de fermentación manteniéndola dentro del rango de valores que optimizan el crecimiento y la actividad maloláctica de las BAL, 18 a 22 °C, (Lerm *et al.*, 2010).

2.4.7 Requerimientos nutricionales

Además de los parámetros fisicoquímicos que ya se han mencionado, el nivel nutricional del vino es también un factor crucial para determinar el éxito con el que las BAL llevarán a cabo la FML y, por lo tanto, disponer de ciertos nutrientes se convierte en una tarea casi obligatoria, influida principalmente por las limitadas capacidades biosintéticas de las BAL (Théodore *et al.*, 2005). Este es el caso de las proteínas, de cuya hidrólisis las BAL son capaces de liberar aminoácidos esenciales para mantener sus requisitos de supervivencia y crecimiento (Matthews *et al.*, 2004).

Igualmente, los vinos con un bajo nivel de nutrientes podrían agobiar el crecimiento de las BAL. Esta situación se puede agravar si además se hace uso de cepas de levadura con una alta demanda de nutrientes, o por el hecho de que ciertas cepas de levadura son propensas a

producir mayores concentraciones de SO₂ en ambientes deficientes de nutrientes (Théodore *et al.*, 2005). Para superar estas dificultades, se propone la co-inoculación de algún cultivo iniciador de maloláctica o la adición de algún nutriente bacteriano. Finalmente, la adecuada selección de cepas, tanto de levadura como de BAL, sigue siendo una efectiva herramienta en la prevención de futuros problemas que involucren el nivel nutricional del mosto o del vino (Lerm *et al.*, 2010).

2.5 Control y seguimiento de la FML

Una vez reconocida la influencia positiva que la FML llega a ejercer sobre varios de los parámetros de calidad del vino y de incluir su ejecución como una etapa indispensable dentro del proceso de elaboración, el siguiente paso que corresponde a los profesionales de la viticultura está relacionado con la búsqueda de las mejores alternativas para controlar y mejorar el desarrollo y resultados de esta fermentación. Históricamente, los elaboradores de vino se han basado en los sentidos físicos de la vista, olfato, gusto y, en algunos casos, sonido, para recibir informes sobre el progreso de la FML. Actualmente, la industria reconoce que estos parámetros, aunque importantes, no son suficientes para definir adecuadamente el progreso de la FML. Los sentidos altamente refinados y hábiles de un experto enólogo, siempre serán el eje principal de la producción de vinos de calidad, pero éstos continuamente podrán ser reforzados con la ayuda de técnicas analíticas de laboratorio y de nuevas tecnologías en desarrollo. Por otro lado, cabe resaltar que ante FMLs problemáticas, retardadas o paradas, es indispensable disponer de un riguroso control y seguimiento que asegure la ausencia de efectos dañinos e indeseables.

La FML sin control, especialmente la que se lleva a cabo en medios con pH mayores de 3,5, normalmente generarán una variada serie de descriptores negativos y alteraciones indeseables en el vino. En la Tabla 2.1 se puede observar, de forma resumida, la descripción de los principales de estos potenciales problemas.

2.5.1 Control por inoculación de cepas comerciales: FML inducida

A pesar de que los elaboradores de vino disponen de varias opciones para inducir y controlar la FML, es la inoculación de cepas de BAL comerciales o seleccionadas en laboratorios el método más eficaz, recomendable y ampliamente utilizado por la mayoría de viticultores. De esta forma, se consigue un mayor control sobre la ocurrencia y velocidad de la FML, sumado a la posibilidad de obtener una buena influencia en cuanto al aroma y la calidad del vino (Krieger, 2006c). Además, con el uso de cultivos iniciadores seleccionados, se logra reducir el potencial de alteración por otras BAL y/o bacteriófagos, se garantiza un inicio rápido de la FML y se tiene un mejor control de la producción de compuestos de sabor, aroma y olor en el vino.

Problema	Condición para que ocurra	Microorganismos implicados	Componente modificado	Componente creado	Efectos en el vino
Degradación del ácido tartárico	Vinos tintos y blancos con pH > 3,5 y baja acidez total	Pediococcus, Lactobacillus, Oenococcus	Ácido tartárico	Ácido láctico, ácido acético, CO ₂ ,	Disminución de la acidez, acidez volátil, pérdida de color, turbiedad
				Acetamida (poco común)	
Descomposición de la glicerina	Vinos tintos y blancos con bajo grado de alcohol y pH alto	<i>L. casei</i> , <i>L. fructivorans</i> , <i>L. hilgardii</i>	Glicerina	Acroleína	Amargor
			Glicerina (en presencia de glucosa)	Ácidos láctico y acético	Acidez volátil
FA paralizada	Vinos tintos y blancos con azúcar residual de la FA estancada que puede ser metabolizada por las BAL	BAL del mosto	Azúcares fermentables	Ácidos láctico y acético	Incremento de la acidez total, acidez volátil, pérdida de la complejidad y equilibrio, turbiedad
			Fructosa	Manitol	
Metabolismo de azúcares no fermentables en vinos secos	Vinos secos, especialmente tintos con pH alto	BAL del mosto	Arabinosa, xilosa, glucosa, fructosa	Ácido acético	Acidez volátil
Producción de fenoles volátiles	Vinos tintos con pH alto	Algunos <i>Pediococcus</i> y <i>Lactobacillus</i>	Ácido cumárico	4-VP, 4-VG, 4-EP, 4-EG(*)	Incluye aroma de sudor de caballo, olor a establo, cuero, asfalto, moho, medicina y humo
Mousiness	Oxidación con pH alto	<i>Lactobacillus</i> , <i>Oenococcus oeni</i>	Ácidos AA (lisina, ornitina), azúcares	Piridinas	Mousiness
Enmascaramiento de aromas varietales	Vinos tintos y blancos	Ciertas sepas malolácticas	Ácidos orgánicos, azúcares, aminoácidos	Lactato de etilo, acetato de etilo	A bajos niveles: máscaras de carácter frutal. A altos niveles: aromas de nuez, caramelo, levadura y piel húmeda
				Diacetilo	
Formación de carbamato de etilo (CE)	Vinos con alto grado de alcohol y alto pH	BAL	Arginina en presencia de la urea producida por las levaduras (FA)	Citrulina y carbamil-fosfato (precursores del CE), carbamato de etilo	Problemas sobre la salud humana
Formación de aminas biogénicas	Vinos con alto pH	BAL	Algunos aminoácidos	Histidina	Problemas sobre la salud humana
				Putrecina, cadaverina	Aromas sucios, putrefactos, carnosos y avinagrados

Tabla 2.1 Resumen de los problemas potenciales asociados con FMLs sin control (adaptado de Lallemand Inc., 2005) (*):4-VP: 4-vinil-fenol; 4-VG: 4-vinil-guaiacol; 4-EP: 4-etil-fenol; 4-EG: 4-etil-guaiacol.

Aunque varios estudios demuestran que diferentes cepas de BAL tienen distintos efectos sensoriales en el vino y que la FML inducida se impone frente a la FML espontánea, la influencia de la programación temporal para incorporar las bacterias, así como el nivel de inoculación, no se terminan de comprender del todo, siendo actualmente objeto de diferentes discusiones (Krieger, 2006b).

Precisamente, la literatura relacionada con la FML suele describir tres posibles escenarios para realizar la inoculación de las BAL seleccionadas que inducirán la fermentación: la inoculación después de completada la FA o inoculación secuencial, la inoculación simultánea de levaduras y BAL o co-inoculación y la inoculación durante la FA. Con cada una de estas opciones, las BAL encontrarán una diferente composición en el medio, algo que será drásticamente influyente en su desarrollo y actividad metabólica (Rosi *et al.*, 2003).

2.5.1.1 Inoculación secuencial

La inoculación de las BAL después de completada la FA, es la forma tradicional y generalmente empleada para llevar a cabo la FML. De esta manera, se consigue evitar las interacciones adversas entre levaduras y bacterias, y se aprovecha que la concentración de azúcar residual es poca para minimizar el riesgo de producción de ácido acético y otros metabolitos indeseados (Costello, 2006). A pesar de estas ventajas, la inoculación secuencial también acarrea algunos inconvenientes que pueden poner en riesgo su viabilidad, inconvenientes que pueden ser atribuibles a las altas concentraciones de etanol, pH de valores bajos, reducción de nutrientes, niveles altos de SO₂ y producción de algunos compuestos antimicrobianos por parte de las levaduras.

2.5.1.2 Co-inoculación e inoculación durante la FA

En cuanto a las discusiones en torno a las otras dos opciones de inoculación: co-inoculación e inoculación durante la FA, es fácil encontrar opiniones y resultados bastante contradictorios. Por ejemplo, para Henick-Kling & Park (1994) y Alexandre *et al.* (2004), la inoculación simultánea puede presentar posibles riesgos como el desarrollo de interacciones indeseables entre levaduras y bacterias, producción de ácido acético y ácido D-láctico, la interrupción de la FA y la producción de malos olores. Por el contrario, Jussier *et al.* (2006) compararon los resultados de la inoculación simultánea con los de la inoculación secuencial y no detectaron impactos negativos ni diferencias en la calidad final del vino (Lerm *et al.*, 2010).

Entre las ventajas adjudicadas a la co-inoculación, se pueden encontrar la aclimatación de las BAL a los altos niveles de etanol, la reducción del contenido de nitrógeno al final de la FA, tiempos de duración de la FML más cortos (Zapparoli *et al.*, 2009), impedimento de la proliferación de BAL indeseables y mayor eficiencia de la FML en vinos con condiciones complicadas, pH bajo pH (Krieger, 2006c).

Por el lado de la inoculación durante la FA, ésta se describe como una práctica menos común que incluso llega a reportar un fuerte antagonismo entre levaduras y BAL cuando suele llevarse a cabo (Rosi *et al.*, 2003). Con esta clase de inoculación, la población de bacterias suele mostrar un drástico decremento atribuido a factores como el consumo de nutrientes por parte de las levaduras, acumulación de SO₂, producción de etanol, producción de metabolitos tóxicos y reducción del pH.

En consecuencia, la última palabra en cuanto al momento ideal para inducir la FML por inoculación de BAL seleccionadas aún no está dicha. Si bien la inoculación después de completada la FA es la más utilizada, el momento más adecuado para la inoculación por cepas comerciales dependerá de factores como la composición del vino, la cepa de levadura empleada, los contenidos de SO₂ y alcohol, los valores de pH y temperatura y las técnicas de vinificación aplicadas (Bauer & Dicks, 2004).

2.5.2 Monitorización de la FML

Son varios los parámetros de interés enológico que suelen ser medidos durante el desarrollo de la FML: pH, población microbiana, acidez total, acidez volátil, turbidez, grado alcohólico volumétrico; pero indudablemente, es la medida de los niveles de concentración de los ácidos málico y láctico, el procedimiento indispensable para realizar una adecuada monitorización de esta etapa fermentativa.

2.5.2.1 Medida de la acidez volátil

La acidez volátil (AV) es, junto al nivel de concentración de ácido málico, uno de los principales parámetros químicos que suelen controlarse durante el progreso FML. El aumento de la AV es un fuerte indicador de la actividad bacteriana en el vino y, cuando se produce en grandes cantidades, generalmente es atribuible al crecimiento de bacterias indeseables. En otras palabras, es de esperar pequeños incrementos de la AV como consecuencia natural del crecimiento de las BAL, pero aumentos muy rápidos de la AV pueden considerarse como una señal de advertencia de que grandes cantidades de bacterias no deseadas están creciendo en el vino. De esta manera, un habitual y cuidadoso seguimiento del nivel de la AV a lo largo de la FML es una tarea de suma importancia que puede realizarse con cierta facilidad a través de un análisis común de laboratorio (Kollar & Brown, 2006).

2.5.2.2 Población microbiana

El seguimiento de la población microbiana facilita al enólogo el control de la FML ayudando a predecir y evitar posibles problemas. Los principales objetivos a cubrir son mantener identificadas las BAL responsables de la FML, conocer los daños que pueden estar sufriendo y determinar cuál es la población microbiana viable. Esto suele llevarse a cabo usando

técnicas microbiológicas como el recuento en placa, la medida de la turbidez, el recuento de microorganismos por epifluorescencia o la microscopía. De igual manera, con ayuda de técnicas moleculares se pueden identificar y diferenciar, de una forma muy precisa y fiable, las BAL presentes en el vino (Bartowsky & Henschke, 1999).

2.5.2.3 Niveles de concentración de los ácidos málico y láctico

Medir la reducción del ácido málico y/o el incremento del ácido láctico, son las opciones más utilizadas para monitorizar el progreso de la FML en el vino tinto. Las técnicas analíticas disponibles para el seguimiento de estos niveles de concentración son bastante variadas, pudiendo encontrarse métodos de uso habitual como la cromatografía en papel (PC, *Paper Chromatography*), la cromatografía en capa fina (TLC, *Thin Layer Chromatography*), reflectancia y los *kits* de análisis enzimáticos, y métodos más avanzados y complejos como la espectroscopia de infrarrojo por Transformada de Fourier (FT-IR, *Fourier-Transform Infrared*), la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC, *High-Performance Liquid Chromatography*) y la electroforesis capilar (CE, *Capillary Electrophoresis*). Todos estos métodos presentan características particulares que los hacen diferir en aspectos importantes como exactitud, tiempo de análisis empleado y costes de adquisición e implementación (Lerm *et al.*, 2010).

Por los bajos costes que representan, las técnicas de cromatografía en papel y TLC suelen ser los métodos de más amplio uso en la mayoría de pequeñas y medianas bodegas. Desafortunadamente, estos métodos suelen presentar poca exactitud y son los más lentos. Por el contrario, HPLC y CE son los métodos con mejor exactitud y rapidez, aunque su implementación requiere mayor esfuerzo y la adquisición de equipos de alto coste. Por otro lado, el análisis enzimático estaría en capacidad de cumplir dos de los requisitos primordiales para una buena monitorización de la FML, resultados rápidos y precisos, pero, a pesar de ser un método más económico que HPLC, CE y FT-IR, el coste que supone es aún relativamente alto.

En la Tabla 2.2 se resume, con información obtenida de Lerm *et al.* (2010), las ventajas y desventajas de las técnicas de monitorización mencionadas anteriormente.

Un detalle importante, ya mencionado y que se corrobora con la información de la Tabla 2.2, es la total ausencia de un método de monitorización que proporcione los resultados en tiempo real y sin necesidad de tomar muestras en el vino, características necesarias para la puesta en marcha de futuros sistemas de control *on-line* que ayuden a mejorar el desarrollo y desempeño de la FML.

Método y descripción	Ventajas	Desventajas
Cromatografía en papel (PC) - Método para seguir visualmente la reducción de ácido málico - Separa los compuestos en base a su polaridad - De uso común en bodegas pequeñas y medianas	- Fácil de usar - Es un indicador del progreso de la FML simple, asequible y de bajo coste	- Estrictamente cualitativo - No indicado para confirmar el final de la FML - Poco preciso - Tiempo de respuesta lento - Tiempo de procesado largo - Para muestras pequeñas requiere pre-tratamiento - Poca estabilidad de los reactivos
Cromatografía en capa fina (TLC) - Características similares al anterior, pero usando laminas TLC en lugar de papel	- Fácil de usar - Mejor desempeño que el PC - Alta estabilidad de los reactivos - Simple, asequible y de bajo coste - Resultados en una hora. Mucho más rápido que el método PC	- Estrictamente cualitativo - No indicado para confirmar el final de la FML - Poco preciso
Análisis enzimático - Método basado en el uso de enzimas que reaccionan específicamente con el ácido L-málico. Empleando un espectrofotómetro UV-visible, se va monitorizando dicha actividad enzimática - Es el método de uso más común en las bodegas medianas y grandes	- Cuantitativo - Excelente precisión - Kits de fácil disposición - Cuantifica niveles muy bajos de ácido málico. Indicado para confirmar el final de la FML - Resultados en 30 minutos	- Complejidad alta, requerimientos de personal capacitado - Coste alto - Después de activados, la vida útil de los reactivos es muy corta - Requiere el uso de micro pipetas precisas que demandan ajuste y re-calibración periódica - Necesidad de un adecuado pre-tratamiento para las muestras. Las muestras turbias deben ser centrifugadas, las de color oscuro decoloradas
Reflectancia - Es una técnica de reciente innovación, desarrollada por Merck (Reflectoquant®), basada en la fotometría de reflectancia - Utiliza tiras reactivas de test para el análisis de varios componentes del vino	- Semi-cuantitativo con precisión relativa del 10% - Su coste equivale solo a una parte de un espectrofotómetro o a la mitad del coste de un kit enzimático - Es de fácil uso y no requiere conocimientos especiales - Actualmente es el método más rápido disponible (5min/muestra) - Alta estabilidad de los reactivos	- Solo mide niveles relativos de ácido málico, no indicado para confirmar el final de la FML - El rango de operación es de 1 a 60 mg/L, por lo que, algunas muestras deben ser diluidas o decoloradas - Necesita ser calibrado con un método de referencia
Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) - Separación de componentes basados en la polaridad y en la interacción con la fase estacionaria o fase sólida	- Muy preciso	- Coste extremadamente alto - No está recomendado para el uso diario en las bodegas
Espectroscopia de infrarrojos (FT-IR) - Basado en el uso del espectro de infrarrojos para cuantificar parámetros del vino	- Buena precisión - Usa muestras de poco volumen - Tiempos de análisis cortos, entrega rápida de resultados	- Equipamiento costoso - La precisión depende de valores de referencia y curva de calibración
Electroforesis capilar (CE)	- Precisión alta - Tiempos de análisis cortos, entrega rápida de resultados	- Coste extremadamente alto - No está recomendado para el uso diario en las bodegas

Tabla 2.2 Recopilación de métodos usados para monitorizar el ácido málico y la FML (adaptado de Lerm *et al.*, 2010).

2.6 Resumen

La FML es un segundo proceso fermentativo que suele llevarse a cabo en la gran mayoría de los vinos tintos. Desarrollada por las BAL, se caracteriza, principalmente, por la transformación del ácido málico en ácido láctico, aunque también suele venir acompañada por la aparición de otros metabolitos.

Al igual que la FA, la FML puede ser inducida de forma espontánea, por medio de las bacterias nativas que se encuentran en la vid, o de forma controlada, a través de la inoculación de bacterias comerciales cuidadosamente seleccionadas. Así, sea cual sea el caso y una vez se inicie el proceso, la FML suele quedar definida por tres fases características:

- *Fase de crecimiento celular*: En esta fase no se metaboliza ácido málico o, dado el caso de que se haga, este metabolismo se lleva a cabo a un ritmo muy lento (las BAL tienen que crecer en el vino a una tasa de 1-100 millones ufc/ml para que la degradación del ácido málico empiece a ser rápida). No obstante, durante esta fase existe un consumo de los azúcares residuales de la FA (hay azúcares que las levaduras son incapaces de consumir y transformar en alcohol) y una ligera producción de ácido acético.

- *Fase estacionaria I*: En esta fase el número de BAL que crecen son iguales a las que mueren, por lo que la población de bacterias entra en un estado estacionario. Esta es la fase de degradación rápida de ácido málico y consecuente producción de ácido láctico. Además, ya no se degradan azúcares porque las bacterias prefieren el ácido málico como fuente de carbono.

- *Fase estacionaria II*: Finalmente, cuando el nivel de concentración de ácido málico en el vino llega a unos valores mínimos y, prácticamente, se suspende la degradación del mismo, se considera que la FML ha llegado a su fin. En este momento, es recomendable y necesario terminar completamente con la FML, es decir, se deben llevar a cabo etapas posteriores como el trasiego y sulfitado para impedir que el proceso siga teniendo lugar en los vinos ya que se pone en riesgo la calidad y condiciones de salud del producto final. Igualmente, en esta fase se va degradando el ácido cítrico y se produce ácido acético, también disminuye el número de BAL las cuales van muriendo y sus restos o lías sedimentándose en el fondo del depósito. Además, es posible una contaminación por otros microorganismos que pueden alterar al vino.

Midiendo la reducción del ácido málico y/o el incremento del ácido láctico, son las formas habituales para monitorizar el progreso de la FML en el vino. Estas medidas suelen llevarse a cabo, utilizando muestras del vino, mediante diversas técnicas analíticas disponibles. Técnicas que pueden ser relativamente económicas, sencillas, pero poco exactas y lentas, o de gran precisión y rapidez, pero de costes elevados y en cualquier caso, todas requieren un tiempo de ejecución que impiden su aplicación en sistemas de control on-line.

3. DISEÑO Y DESCRIPCIÓN DEL SENSOR DE MEDIDA ULTRASÓNICO

3.1 Introducción

A través del uso de tecnologías basadas en ultrasonidos, la industria alimentaria se ha beneficiado de importantes ventajas con las que ha logrado renovar, entre otras cosas, la manera de realizar análisis, seguimientos y controles; de forma no invasiva, no destructiva, higiénica y muy rápida; en una gran variedad de productos y procesos que le conciernen.

Para este caso, el principio de funcionamiento de los sistemas de medida por ultrasonidos se basa en caracterizar acústicamente, midiendo parámetros como velocidad de propagación c , atenuación α , e impedancia acústica Z , algunos de los cambios físicos y/o químicos que el alimento experimenta durante su crecimiento (frutas, verduras, carnes, etc.) o elaboración (bebidas, quesos, masas de pan, etc.). En otras palabras, aprovechar cambios en el alimento que puedan llegar a alterar sistemáticamente la forma como se propagan, atenúan y/o reflejan las ondas de ultrasonido en éste.

Contar con un adecuado y correcto seguimiento de dichas características acústicas es una importante tarea que requiere, para el diseño de un sistema de medida, tener en cuenta diversos aspectos tales como: estado físico del alimento (sólido, líquido o viscoelástico — aquellos que presentan propiedades de sólidos, elasticidad, y de líquidos, viscosidad—); influencia de factores ambientales; dimensiones y materiales de recipientes, tanques y cualquier otra clase de medio de almacenamiento; técnica de medida aplicada y forma como se exciten los transductores ultrasónicos que se empleen.

Precisamente, por el lado de la excitación, existe la posibilidad de utilizar señales continuas o pulsadas. La aplicación de señales eléctricas continuas al transductor suele ser útil para conseguir que los ultrasonidos viajen a través de materiales altamente atenuantes, facilitando y permitiendo el análisis ultrasónico de esta clase de materiales. Sin embargo, al excitar a un transductor con este tipo de señales, se expone a que experimente incrementos de temperatura indeseados que, generalmente, se verán reflejados en el medio bajo análisis;

influyendo sobre las propiedades acústicas que se quieren medir y por consiguiente, llevando a una pérdida de fiabilidad y repetibilidad de las medidas con técnicas ultrasónicas.

Por otro lado, el empleo de señales eléctricas pulsadas de alta frecuencia (pulso o tren de pulsos), se ha convertido en uno de los métodos más usados para medir parámetros acústicos en diversos materiales, una opción muy práctica hoy en día que, a través del control de parámetros como la amplitud, el número de pulsos y el ciclo de trabajo o ratio de repeticiones, evita los inconvenientes de la excitación continua; facilitando los sistemas y las medidas con ultrasonidos. Teniendo en cuenta estas razones, la opción de excitación pulsada será la que se maneje durante el desarrollo de las medidas experimentales de esta Tesis.

3.2 Principios de medida

Complementario al uso de la excitación pulsada en los transductores, se pueden destacar las técnicas de medida ultrasónica de *reflexión*, *transmisión* y *pulso-eco*, como útiles alternativas a la hora de medir alguno de los parámetros acústicos ya mencionados (velocidad de propagación, impedancia acústica y atenuación).

3.2.1 Técnica de reflexión

Por su principio de funcionamiento, la técnica de *reflexión* es apropiada para medir la impedancia acústica Z_{medio} de una muestra o medio bajo test, característica muy útil cuando se trata del análisis de materiales y/o alimentos que presentan alta atenuación acústica y por consiguiente, dificultan el paso de las ondas ultrasónicas a través de cualquier muestra.

Como se puede observar en la Figura 3.1, usando un único transductor, emisor-receptor, se emite un tren de pulsos ultrasónico de amplitud A_0 para que se propague, hasta alcanzar la muestra a analizar, a través de un camino acústico de referencia conocido como *buffer rod (BR)*. Generalmente, este buffer es un cilindro sólido fabricado con un adecuado material que presente pérdidas reducidas e impedancia acústica Z_{BR} conocida. Además, el material utilizado para el buffer debe estar permitido para el contacto directo con alimentos.

Cuando la señal emitida A_0 alcanza la interfase *BR-muestra* con amplitud A_i , donde se presenta una intencionada discontinuidad de impedancias acústicas, parte de ésta es transmitida a través de la muestra con amplitud A_t y parte es reflejada hacia el transductor con amplitud A_r . Midiendo los valores de amplitud de las señales ultrasónicas incidente A_i y reflejada A_r , el cálculo de la impedancia acústica del medio bajo test Z_{medio} se podrá llevar a cabo de la siguiente forma:

$$Z_{medio} = \rho_{medio} \cdot c_{medio} = Z_{BR} \cdot \left(\frac{1+R}{1-R} \right). \quad (3.1)$$

Donde, ρ_{medio} es la densidad del medio bajo test, c_{medio} es la velocidad de los ultrasonidos en el medio bajo test y R es el coeficiente de reflexión calculado a través de la relación entre las amplitudes medidas:

$$R = \frac{A_r}{A_i}. \quad (3.2)$$

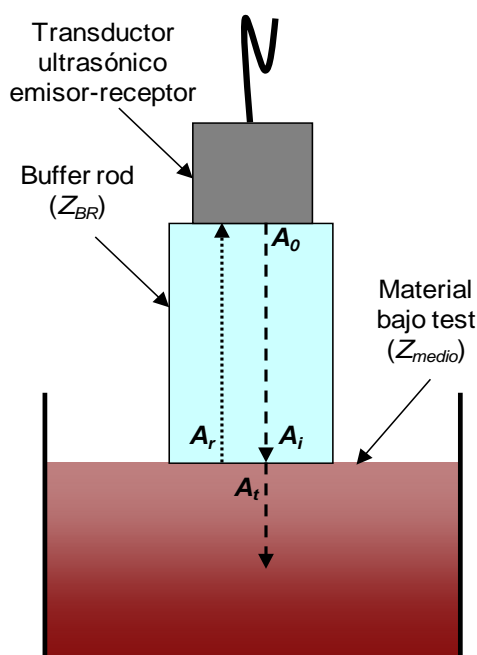


Figura 3.1 Técnica de reflexión para medir la impedancia acústica Z de un determinado medio o muestra.

La principal ventaja de esta técnica es que permite el análisis de medios con alto nivel de atenuación acústica. Por lo tanto, con esta clase de materiales, la técnica no es apropiada para medir los parámetros de atenuación y velocidad de propagación.

3.2.2 Técnica de transmisión (through-transmission)

La técnica de *transmisión* permite obtener los parámetros acústicos de atenuación y/o velocidad de propagación de un determinado medio bajo análisis, pero no su impedancia acústica.

En esta ocasión, Figura 3.2, usando dos transductores, uno emisor y otro receptor, situados en caras opuestas de la muestra, se emite un tren de pulsos ultrasónico de amplitud A_1 que al atravesar el medio será recibido con amplitud A_2 . De esta manera, el coeficiente de

atenuación α_{medio} que actúa sobre la señal inicial es el del medio bajo test y se puede obtener mediante la relación:

$$A_2 = A_1 \cdot e^{-d \cdot \alpha_{medio}} . \tag{3.3}$$

Donde d corresponde a la distancia recorrida por la señal ultrasónica en el medio.

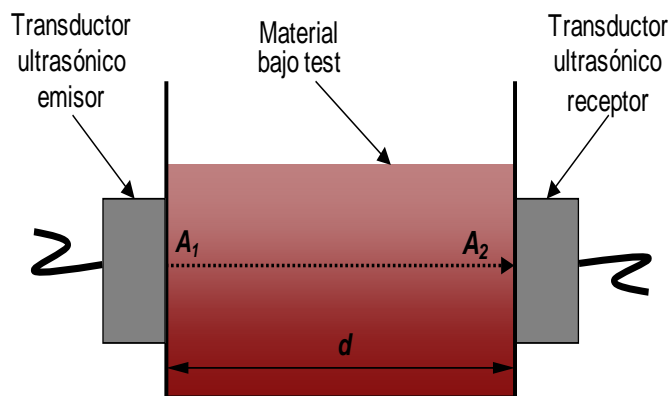


Figura 3.2 Técnica de transmisión para medir atenuación y/o velocidad de propagación ultrasónica.

De forma similar, usando la misma configuración, la velocidad de propagación ultrasónica en el medio bajo test c_{medio} , se puede calcular midiendo el tiempo t que tarda la señal en viajar de un transductor al otro, es decir, en recorrer la distancia d :

$$c_{medio} = \frac{d}{t} . \tag{3.4}$$

En este caso, es necesario que el medio bajo análisis permita una adecuada propagación de la señal de ultrasonidos, limitando la aplicación de esta técnica a materiales con una atenuación media-baja y/o a distancias de recorrido muy cortas según sea conveniente.

3.2.3 Técnica de pulso-eco

La técnica de *pulso-eco*, en términos generales, estaría configurada para cumplir la misma tarea de la técnica de *transmisión*, con la diferencia de emplear un único transductor emisor-receptor.

Como se observa en la Figura 3.3, el principio de funcionamiento de la técnica se basa en el uso de una lamina reflectora puesta, a una determinada distancia d , en paralelo al transductor. De esta manera, el tren de pulsos ultrasónico de amplitud inicial A_1 se propaga a

través del medio, choca contra el reflector y es devuelto hacia el transductor como un eco que es recibido y registrado con amplitud A_2 .

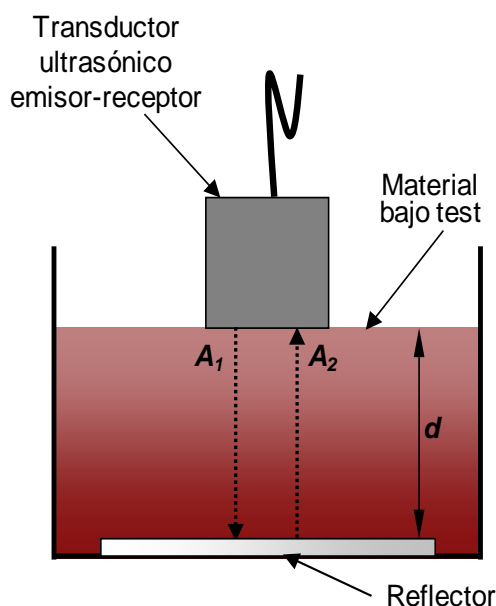


Figura 3.3 Técnica de pulso-eco para medir atenuación y/o velocidad de propagación ultrasónica en un determinado medio bajo test.

Por consiguiente, en esta ocasión la señal emitida realiza el recorrido d dos veces, ida y vuelta, modificando las ecuaciones para el cálculo de la atenuación α_{medio} y velocidad de propagación c_{medio} como sigue:

$$A_2 = A_1 \cdot e^{-2 \cdot d \cdot \alpha_{medio}} ; \quad (3.5)$$

$$c_{medio} = \frac{2 \cdot d}{t} . \quad (3.6)$$

De igual manera, se hace más evidente la limitación de la técnica en cuanto a los materiales atenuantes y las distancias largas, ya que es necesario que la señal emitida pueda realizar adecuadamente el doble trayecto. Por lo tanto, el método se hace poco útil para medios muy opacos al paso de los ultrasonidos, siendo más adecuado para medios poco atenuantes.

3.3 Método propuesto para medir velocidad de propagación ultrasónica en el vino tinto

Los tres métodos anteriores son útiles para la medida de impedancia acústica, atenuación y/o velocidad de propagación en diversos materiales. Teniendo en cuenta que en esta Tesis el principal medio a analizar es el vino tinto (medio líquido), a través de la información

suministrada por el comportamiento de la velocidad de propagación ultrasónica c , la primera reacción sería la de elegir entre las técnicas de *transmisión* y de *pulso-eco*, sabiendo que ambas permiten medir de forma directa y sencilla el mencionado parámetro acústico.

Sin embargo, hay que recordar que uno de los objetivos propuestos en este trabajo, es el de dejar planteado el diseño de un sistema de medida ultrasónico apto para operar a nivel industrial, es decir, que pueda hacer el seguimiento directo de todo el proceso maloláctico en los tanques de fermentación instalados en las bodegas donde se elabora el vino tinto. Por tanto, es necesario que dicho diseño sea capaz de trasladar la aplicación de estas técnicas de medida, inicialmente limitadas al ambiente de trabajo de laboratorio, a un uso final en bodega. Precisamente, los vinos en el momento de llevar a cabo la FML están almacenados, generalmente, en grandes tanques cilíndricos de acero inoxidable que pueden llegar a medir más de un metro de diámetro y varios metros de altura.

Por consiguiente, la configuración para la técnica de *transmisión* de la Figura 3.2, implicaría el posicionamiento de los dos transductores en extremos opuestos y lejanos del tanque. Adicionalmente, por normas de higiene y seguridad alimentaria, y para evitar el contacto del vino con cualquier material que pueda alterar las características que va adquiriendo durante su elaboración, los transductores tendrían que estar sujetos por el lado exterior del tanque.

Esta última condición complicaría aún más el funcionamiento deseado para el sistema de medida ultrasónico ya que los tanques, por su material de fabricación y elevado tamaño, actuarían como grandes disipadores de las ondas ultrasónicas. Además, la diferencia entre las impedancias acústicas del acero inoxidable y del vino tinto, como se estudiará más adelante, hacen que la señal incidente sea reflejada casi por completo en la interfase entre estos dos materiales. Estas limitaciones pueden llegar a impedir la transmisión de una adecuada porción de los ultrasonidos al vino e igualmente, también harían posible que la mayor parte de la señal de ultrasonidos incidente se propague por la superficie del tanque, llegando al receptor incluso antes que la débil porción de señal que se transmitiría por el vino.

De igual manera, la técnica de *pulso-eco* de la Figura 3.3 tampoco es apropiada para su directa aplicación. Esta técnica implicaría el contacto físico entre transductor y medio bajo test, algo que, como ya se ha mencionado, no está permitido principalmente por motivos de higiene y salud. Una posible solución tendría que pasar por la ubicación del transductor en alguna parte del exterior del tanque y por lo tanto, nuevamente se presenta el mismo inconveniente que con la técnica de *transmisión*, sumando el agravante que la distancia a recorrer se podría duplicar dependiendo, principalmente, del lugar donde se pudiera instalar el *reflector*.

3.3.1 Solución propuesta

Para el análisis ultrasónico proyectado en esta Tesis y buscando superar los inconvenientes descritos en la sección anterior, se propone combinar la utilidad del mecanismo *buffer rod*, empleado en la técnica de *reflexión*, con el principio de funcionamiento de la técnica de *pulso-eco*.

El uso de *buffer rods* para la caracterización acústica de materiales, es una útil herramienta que aporta varios beneficios a los sistemas de medida:

- En primer lugar, los *buffer rods* pueden desempeñar la función de línea de retardo. Es decir, agregan una conveniente separación entre las señales útiles para el análisis y el fuerte ruido añadido durante la generación de los pulsos de excitación, permitiendo y facilitando medidas más precisas (Coupland, 2004).
- En segundo lugar, conociendo previamente sus propiedades acústicas, los *buffer rods* pueden ser usados como un elemento de referencia con el fin de obtener la impedancia acústica del material o medio analizado (Mc Clements & Fairley, 1991; Julio *et al.*, 1995).
- En tercer lugar, la presencia de *buffer rods* evita el contacto directo del material bajo test con el transductor ultrasónico. Algo estrictamente necesario con el fin de satisfacer las normas de seguridad e higiene establecidas en las pruebas con productos alimenticios.

En este último caso, si el buffer está hecho con el mismo material del recipiente que contiene o almacena el producto alimenticio, o con un material neutro y aceptado para pruebas con alimentos, éste puede llegar a considerarse como una irregularidad en la forma de dicho recipiente, manteniendo vigente las definiciones de no-destructivo y no-invasivo que dan gran valor a las pruebas con ultrasonidos.

De esta manera, en la Figura 3.4 se puede observar la configuración completa de la técnica de medida propuesta. Cabe anotar que este primer esquema está orientado para realizar pruebas en laboratorio, es decir, para llevar a cabo las diferentes medidas preliminares en pequeñas muestras de trabajo.

Así, excitando al transductor con una señal sinusoidal pulsada (*sine burst*), un tren de pulsos ultrasónico de amplitud inicial A_0 recorre el *buffer rod* hasta llegar, con amplitud A_i , a la interfase *BR-líquido*. En ese momento, debido a la diferencia entre impedancias acústicas Z , una parte de la señal incidente A_i es reflejada hacia el transductor para ser detectada y registrada como un primer eco *ECO1*, de amplitud A_{E1} , y la otra es transmitida a través del líquido con amplitud A_t . Esta segunda onda, recorre la distancia d , rebota en el *reflector*, recorre de nuevo d , llega a la interfase *líquido-BR* y nuevamente una parte es reflejada mientras la otra se transmite

a través del *buffer rod* para, finalmente, ser detectada y registrada por el transductor como un segundo eco *ECO2*, de amplitud A_{E2} (Figura 3.5).

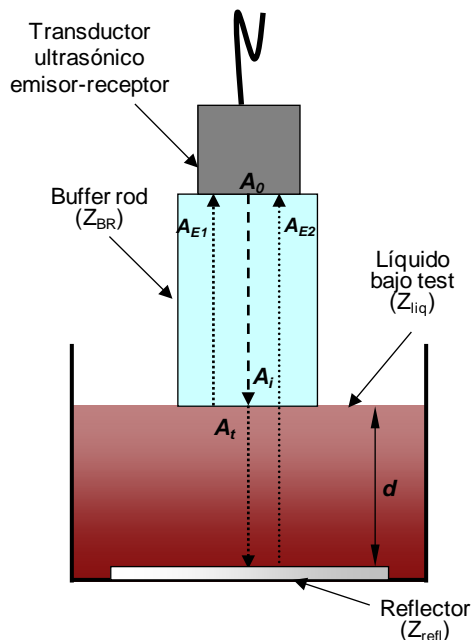


Figura 3.4 Técnica de medida ultrasónica propuesta para obtener la velocidad de propagación en un medio líquido usando ecos y *buffer rod*.

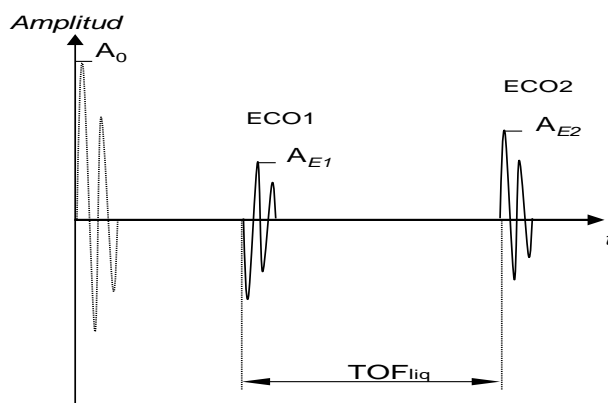


Figura 3.5 Representación temporal de las señales ultrasónicas utilizadas para medir velocidad de propagación mediante la técnica de medida propuesta.

Una vez se tenga el registro de los dos ecos *ECO1* y *ECO2*, el cálculo de la velocidad de propagación ultrasónica en la muestra líquida c_{liq} se puede realizar con ayuda de la Ec. (3.6). En este caso, t se conoce como el tiempo de vuelo en el medio líquido TOF_{liq} y corresponde al tiempo que tarda la señal transmitida en recorrer dos veces la distancia d ó, lo que es igual, al intervalo de tiempo comprendido entre los orígenes de *ECO1* y *ECO2* en la Figura 3.5.

$$c_{liq} = \frac{2 \cdot d}{TOF_{liq}} \quad (3.7)$$

Finalmente, en la Figura 3.6 se observa la forma alternativa para aplicar esta técnica de medida en un tanque de fermentación. Como se puede notar y será ampliado más adelante cuando se hable del acondicionamiento mecánico del sistema, básicamente la idea consiste en la misma configuración de la Figura 3.4, pero puesta en posición horizontal y con una parte del *buffer rod* introducido en el tanque mediante el aprovechamiento del agujero roscado DN50 que estos suelen tener, Figura 3.7.

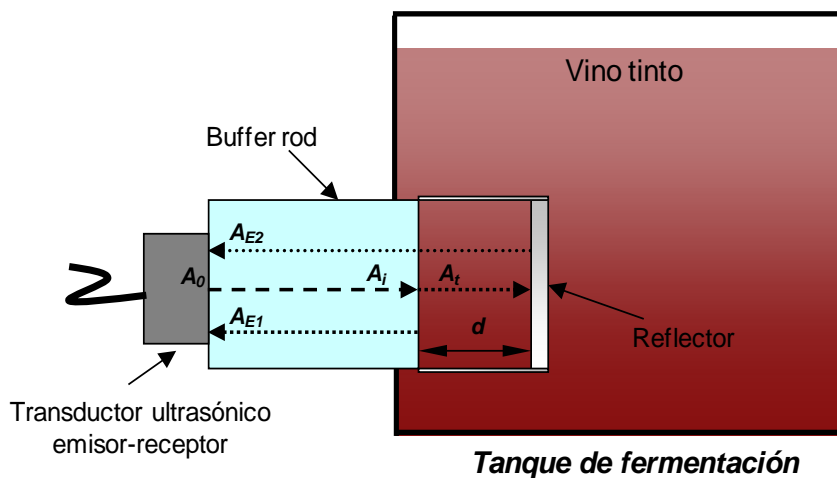


Figura 3.6 Técnica de medida ultrasónica propuesta para obtener la velocidad de propagación en el vino tinto durante la FML.



Figura 3.7 Imagen de un tanque de fermentación de vino tinto con capacidad para 100 l. Se señala en rojo el sensor ultrasónico diseñado que es acoplado a través de un agujero roscado DN50.

En cuanto al *reflector*, éste se ubica en el interior del tanque a una apta y previamente calculada distancia d del *buffer rod*, permitiendo un adecuado recorrido, ida y vuelta, de la señal ultrasónica, al igual que la libre y suficiente circulación de vino entre los dos.

3.4 Consideraciones del diseño

Uno de los puntos clave para el completo desarrollo del sistema de medida ultrasónico propuesto en el apartado anterior, tiene que ver con el correcto diseño y fabricación del *buffer rod* a emplear. Como ya se ha mencionado, el *buffer rod* suele ser un cilindro sólido hecho de un material con características acústicas conocidas y, en casos como el de los alimentos, que pueda usarse para el contacto directo con el medio o muestra a analizar.

Por otra parte, la relación entre la longitud del *buffer rod* y la distancia a la cual se debe ubicar el *reflector*, es otro factor de vital importancia, motivado principalmente, porque estas longitudes definirán el instante en que los ecos de interés serán detectados por el transductor, la separación temporal que habrá entre ellos e influirán en la amplitud de cada uno.

3.4.1 Cálculo de longitudes

Teniendo presentes las Figuras 3.4, 3.5, 3.6 y 3.8, sería normal pensar que la longitud del *buffer rod* L_{BR} y la distancia d *BR-reflector*, deben ser calculadas de forma tal que faciliten la recepción de *ECO2* después de la recepción del primer *ECO1* ($ECO1_1$), pero antes de que se produzca un segundo *ECO1* ($ECO1_2$). Este último, es el eco que se origina cuando $ECO1_1$ se refleja al chocar con el transductor ultrasónico y comienza una vez más todo el proceso de recorridos por el *buffer rod* y por el medio líquido.

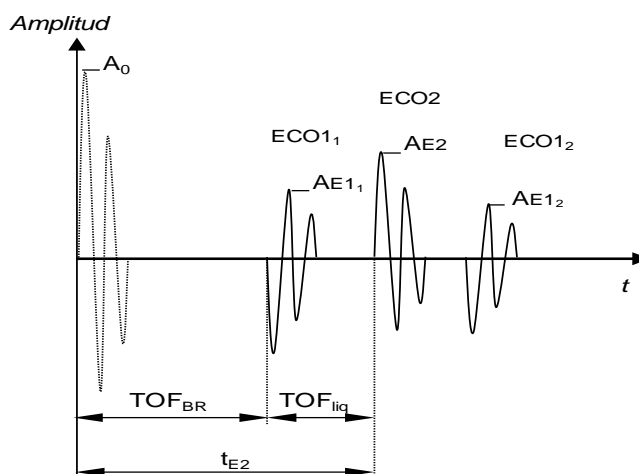


Figura 3.8 Representación de las señales registradas por el transductor ultrasónico para un dimensionamiento tradicional de la longitud del buffer rod y de la distancia BR-reflector.

Por lo tanto, el período de tiempo comprendido entre los dos $ECO1$ es el intervalo en el cual se desea ubicar a $ECO2$. Éste será el que defina los tiempos límites $t_{E2(mín)}$ y $t_{E2(máx)}$ dentro de los cuales $ECO2$ debe ser detectado por el transductor. Estos tiempos se pueden expresar de la siguiente forma:

$$t_{E2(mín)} = TOF_{BR} + T_{ECO1} \quad y \quad (3.8)$$

$$t_{E2(máx)} = 2 \cdot TOF_{BR} + T_{ECO2} \quad (3.9)$$

Donde, TOF_{BR} es el tiempo de vuelo empleado en hacer el doble recorrido por el *buffer rod* y T_{ECO1} y T_{ECO2} son los tiempos de duración de $ECO1$ y $ECO2$ respectivamente.

Expresando las Ecs. (3.8) y (3.9) en términos del camino acústico de cada eco obtenemos:

$$\frac{2 \cdot d_{mín}}{c_{líq}} + \frac{2 \cdot L_{BR}}{c_{BR}} = \frac{2 \cdot L_{BR}}{c_{BR}} + T_{ECO1} \quad y \quad (3.10)$$

$$\frac{2 \cdot d_{máx}}{c_{líq}} + \frac{2 \cdot L_{BR}}{c_{BR}} = 2 \cdot \frac{2 \cdot L_{BR}}{c_{BR}} - T_{ECO2} \quad (3.11)$$

Donde, c_{BR} y $c_{líq}$ son las velocidades de propagación de los ultrasonidos en el *buffer rod* y en el medio líquido respectivamente y $d_{mín}$ y $d_{máx}$ son la mínima y la máxima distancia permitidas entre *buffer rod* y *reflector*.

Finalmente, despejando las Ecs. (3.10) y (3.11) en función de $d_{mín}$ y $d_{máx}$:

$$d_{mín} = T_{ECO1} \cdot \frac{c_{líq}}{2} \quad y \quad (3.12)$$

$$d_{máx} = L_{BR} \cdot \frac{c_{líq}}{c_{BR}} - T_{ECO2} \cdot \frac{c_{líq}}{2} \quad (3.13)$$

De esta manera, se puede dimensionar la distancia d *BR-reflector*, de acuerdo a una longitud de *buffer rod* fija. Sin embargo, en muchas aplicaciones, cuando las limitaciones geométricas de los recipientes son un inconveniente, lo que suele ser fijo es dicha distancia d . Por lo tanto, lo necesario es encontrar la manera de dimensionar consecuentemente la longitud del *buffer rod*.

Otra forma de dimensionar la distancia d en el medio bajo test, o distancia *BR-reflector*, podría ser a través del nivel de incertidumbre deseado en la medida de la velocidad de

propagación c_{liq} . Este nivel de incertidumbre puede ser calculado a través del análisis de propagación de errores en medidas independientes (Reissland, 1989). Considerando la Ec. (3.7), el cálculo del error relativo en la medida de la velocidad de propagación ultrasónica del medio bajo test (líquido) $\varepsilon_r(c_{liq})$, se puede aproximar como la suma en cuadratura del error relativo en la medida de la distancia d $\varepsilon_r(d)$ y del error relativo en la determinación del tiempo de vuelo en el medio $\varepsilon_r(TOF_{liq})$.

$$\varepsilon_r(c_{liq}) \approx \sqrt{\varepsilon_r(d)^2 + \varepsilon_r(TOF_{liq})^2} . \quad (3.14)$$

En nuestro caso, al igual que en muchos otros, es posible conseguir una medida muy precisa de la distancia d y ésta no suele ser modificada durante el desarrollo de las pruebas a realizar (Benedito *et al.*, 2000; Elvira *et al.*, 2005). De esta manera, los errores cometidos al medir la distancia d sólo afectan la exactitud de la determinación de la velocidad, pero no su precisión. Por lo tanto, se puede considerar que los cambios en la velocidad de propagación en el medio bajo test serán debidos, prácticamente, a los cambios que ocurran en el tiempo de vuelo de los ecos recibidos.

Además, para la aplicación de este trabajo, monitorización de la FML, como en algunos otros, monitorización de la fermentación alcohólica (Becker *et al.*, 2001; Lamberti *et al.*, 2009) o monitorización en procesos de coagulación (Bakkali *et al.*, 2001), se considera más importante la correcta medida de las variaciones en el comportamiento de la velocidad de propagación que obtener exactamente el valor absoluto de ésta.

Así, para análisis ultrasónicos enfocados en el seguimiento de la velocidad de propagación, el error relativo en la medida de las variaciones de este parámetro puede ser, a efectos prácticos, aproximado al error en la medida del tiempo de vuelo, descartando el error en la medida de la distancia. Por lo tanto, de la Ec (3.14):

$$\frac{\varepsilon_a(c_{liq})}{c_{liq}} \approx \frac{\varepsilon_a(TOF_{liq})}{TOF_{liq}} . \quad (3.15)$$

Siendo $\varepsilon_a(c_{liq})$ el error absoluto en la velocidad de propagación ultrasónica en el medio líquido y $\varepsilon_a(TOF_{liq})$ el error absoluto en la determinación del tiempo de vuelo en el mismo medio o resolución temporal de las medidas.

Por lo tanto, conociendo el valor típico, o una aproximación, de la velocidad de propagación ultrasónica c_{liq} en el medio bajo test, la resolución temporal usada para las medidas y limitando el error en la medida de la velocidad $\varepsilon_a(c_{liq})$ a un nivel deseable. El valor mínimo del

tiempo de vuelo requerido para viajar a través del medio analizado puede obtenerse de la Ec. (3.15):

$$TOF_{líq_{\min}} = \frac{c_{líq}}{\varepsilon_a(c_{líq})} \cdot \varepsilon_a(TOF_{líq}). \quad (3.16)$$

De igual forma, con el cálculo de $TOF_{líq_{\min}}$ y usando la Ec. (3.7), se puede obtener la distancia d_{BR} -reflector mínima necesaria:

$$d_{\min} = \frac{c_{líq} \cdot TOF_{líq_{\min}}}{2}. \quad (3.17)$$

Posteriormente, el cálculo de la longitud mínima $L_{BR_{\min}}$ necesaria para el diseño del *buffer rod* se puede realizar mediante la siguiente ecuación:

$$L_{BR_{\min}} = \frac{d_{\min} \cdot c_{BR}}{\beta \cdot c_{líq}}, \quad (3.18)$$

siendo β un parámetro con el que se puede establecer la posición de $ECO2$ entre los dos $ECO1$. Por ejemplo, lo más común es $\beta = 0,5$ de tal forma que la posición de $ECO2$ en la Figura 3.8, sea en el centro del período temporal limitado por $ECO1_1$ y $ECO1_2$.

Finalmente, en un trabajo preliminar hecho por el grupo de investigación al que está vinculado el autor de esta Tesis, se presenta una útil propuesta a través de la cual es posible conseguir importantes reducciones en la longitud del *buffer rod* calculada originalmente con la Ec. (3.18) (García-Álvarez *et al.*, 2013).

El procedimiento se basa en el hecho de que al reducir la longitud $L_{BR_{\min}}$, los $ECO1$, que únicamente recorren el *buffer rod*, verán disminuido el trayecto que deben realizar. Por lo tanto, como se observa en la Figura 3.9, antes de que se reciba y registre el primer $ECO2$, se habrá dado oportunidad a que se origine y reciba por lo menos un $ECO1$ más ($ECO1_2$).

De esta manera, dentro de lo que se puede llamar un redimensionamiento del *buffer rod* tradicional, se llega a una nueva ecuación parecida a la Ec. (3.18), pero con la opción de llevar a cabo el cálculo de longitudes de acuerdo a la n -cantidad de ecos $ECO1$ que estarán por delante del primer eco $ECO2$.

$$L_{BR_n} = \frac{d \cdot c_{BR}}{c_{líq} \cdot (n - \beta)}. \quad (3.19)$$

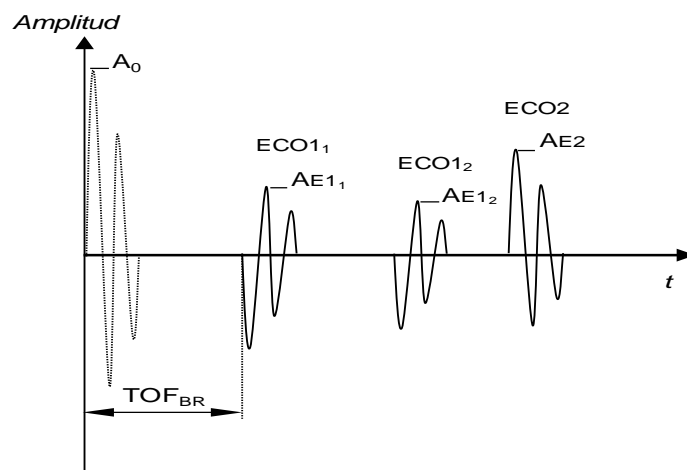


Figura 3.9 Representación de las señales recibidas y registradas por el transductor ultrasónico cuando se redimensiona el *buffer rod* para conseguir una menor longitud en el mismo.

Los resultados obtenidos con este trabajo demostraron que se puede lograr una satisfactoria reducción, hasta un 85%, en la longitud tradicional de *buffer rods* metálicos y plásticos. Además, también se ha podido comprobar una mejora en la relación señal-ruido. Dos ventajas que son aprovechadas, como se verá en los próximos apartados, para el diseño del sistema de medida final.

3.4.2 Dimensionamiento y redimensionamiento del *buffer rod*

Teniendo presente las ventajas descritas para valorar el uso de *buffer rods* en el análisis ultrasónico de productos alimenticios de la sección 3.3.2 y todo lo concerniente al cálculo de longitudes de la sección anterior. Se puede deducir que la acertada elección del material con el cual mecanizar el cilindro buffer, es un importante factor que influye en su dimensionamiento y posterior aplicabilidad.

Como primera opción, buscando mantener la completa homogeneidad entre el sistema de medida y los recipientes de almacenamiento, se tendría que considerar el uso del acero inoxidable, material con el cual están hechos la mayoría de tanques de fermentación industriales para vinos.

Por lo tanto, conociendo que la velocidad de propagación del sonido en el acero inoxidable $c_{BRacero}$ es 5790 m/s; asumiendo 1500 m/s como valor estimado de la velocidad de propagación en un medio líquido similar al vino tinto c_{liq} ; fijando en ± 1 m/s el error absoluto de dicha velocidad $\varepsilon_a(c_{liq})$; trabajando con un período de muestreo de 40 ns (resolución temporal o $\varepsilon_a(TOF_{liq})$) y con ayuda de las Ecs. (3.16), (3.17) y (3.18); se obtiene que la longitud mínima necesaria L_{BRmin} para un *buffer rod* tradicional debe ser de 347,4 mm.

Adicionalmente, teniendo en cuenta que el diámetro típico de un transductor ultrasónico de 1 MHz es 25,4 mm; que el lado del cilindro, como mínimo, debe cubrir todo este diámetro y que la densidad ρ del acero inoxidable es 8030 kg/m³; el peso del *buffer rod* en este primer diseño sería de 1,41 kg. Este valor puede verse incrementado en más del doble, concretamente a 3,17 kg, sólo con el hecho de aumentar 1,5 veces el radio del buffer con respecto al del transductor, una práctica recomendada y necesaria con el fin de reducir la interferencia acústica producida en los bordes del cilindro (Adamowski *et al.*, 1998; Hoppe *et al.*, 2003; Garcia-Alvarez *et al.*, 2006; Garcia-Alvarez *et al.*, 2007).

Buffer rods de dimensiones y pesos como los calculados antes, pueden presentar importantes dificultades al momento de querer adaptarlos y acoplarlos a un tanque de fermentación, siendo aún más complicado su implementación en recipientes como los disponibles para pruebas de laboratorio. Por lo tanto, aplicando el redimensionamiento de la Ec. (3.19), se conseguiría reducir la longitud original de 347,4 mm a valores menores como 115,8 mm (para $n = 2$) o 69,5 mm (para $n = 3$).

Estas mejoras en longitud, implícitamente representan una importante reducción en el peso del componente. Sin embargo, como se verá en el siguiente apartado, la interfase *acero-líquido* es poco apropiada cuando es necesario que una buena parte de la señal ultrasónica incidente sea transmitida al siguiente material, requisito indispensable para un análisis a través de velocidad de propagación como el que se propone.

Una segunda opción para el mecanizado del *buffer rod* se presenta con la posibilidad de usar alguna clase de material plástico. Teniendo en cuenta que este material debe mostrar un comportamiento neutro y ser aceptado para el desarrollo de pruebas con alimentos, el polietileno *PE* ($c_{PE} = 1950$ m/s, $\rho_{PE} = 920$ kg/m³, $Z_{PE} = 1,79$ MRayl) o el polietileno de alta densidad *PEAD* ($c_{PEAD} = 2430$ m/s, $\rho_{PEAD} = 960$ kg/m³, $Z_{PEAD} = 2,33$ MRayl), son dos alternativas igual de validas.

Con estos plásticos y manteniendo las mismas consideraciones iniciales usadas en los cálculos con acero inoxidable ($c_{liq} = 1500$ m/s, $\varepsilon_a(c_{liq}) = \pm 1$ m/s, $\varepsilon_a(TOF_{liq}) = 40$ ns, diámetro = 25,4 mm) se conseguirían, en primera instancia, *buffer rods* de dimensiones 117 mm - 55 g en el caso del *PE* y 145,8 mm - 71 g usando *PEAD*. Valores de longitud que, con el redimensionamiento de la Ec. (3.19), se pueden reducir a 39 mm y 48,6 mm (con $n = 2$) para el *PE* y el *PEAD* respectivamente.

3.4.3 Análisis de amplitudes

Como ya se ha adelantado, la elección de un material apropiado para la fabricación del *buffer rod* que se usará en el sistema de medida a diseñar, además de las dimensiones físicas,

dependerá en gran parte del comportamiento que presente la interfase *BR-líquido* ante la señal incidente A_i generada desde el transductor ultrasónico.

Mediante la Figura 3.10 se puede interpretar y explicar, teóricamente, dicho comportamiento a través de las impedancias acústicas Z de los materiales involucrados y de los respectivos coeficientes de reflexión R y de transmisión T presentes en cada interfase.

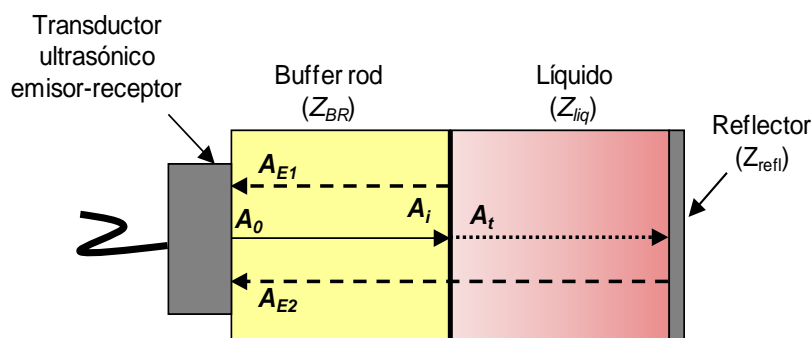


Figura 3.10 Análisis de amplitudes para explicar lo que sucede a una onda ultrasónica incidente en la interfase entre materiales con diferente impedancia acústica.

De esta manera, asumiendo incidencia normal y sin tener en cuenta las atenuaciones de los materiales ($A_0 = A_i$), el cálculo de los diferentes coeficientes de reflexión y transmisión que afectarán a la amplitud de la señal inicial A_0 durante su trayectoria, y que influyen en la amplitud de las dos señales de interés A_{E1} y A_{E2} (*ECO1* y *ECO2* respectivamente), se puede realizar mediante las siguientes ecuaciones:

$$R_{BR} = \frac{Z_{líq} - Z_{BR}}{Z_{líq} + Z_{BR}}; \quad (3.20)$$

$$T_{BR \rightarrow líq} = \frac{2 \cdot Z_{líq}}{Z_{líq} + Z_{BR}}; \quad (3.21)$$

$$R_{líq} = \frac{Z_{refl} - Z_{líq}}{Z_{refl} + Z_{líq}} \text{ y} \quad (3.22)$$

$$T_{líq \rightarrow BR} = \frac{2 \cdot Z_{BR}}{Z_{BR} + Z_{líq}}. \quad (3.23)$$

Siendo R_{BR} y $T_{BR \rightarrow líq}$ los coeficientes de reflexión y transmisión en la interfase *BR-líquido*, $R_{líq}$ el coeficiente de reflexión en la interfase *líquido-reflector* y $T_{líq \rightarrow BR}$ el coeficiente de transmisión en la interfase *líquido-BR*.

Entonces, si inicialmente se supone que el material para el *buffer rod* y para el *reflector* es acero inoxidable ($Z_{BR} = 46$ MRayl) y el líquido es vino tinto ($Z_{líq} \approx 1,2$ MRayl (valor representativo tomado como el punto intermedio entre la impedancia acústica del agua 1,51 MRayl y la del etanol 0,89 MRayl)); sustituyendo en las Ecs. (3.20), (3.21), (3.22) y (3.23) se obtienen valores para los coeficientes de reflexión y de transmisión de: $R_{BR} = -0,95$ (el signo negativo representa un cambio de fase), $T_{BR \rightarrow líq} = 0,05$, $R_{líq} = 0,95$ y $T_{líq \rightarrow BR} = 1,95$.

Por consiguiente, el cálculo aproximado de las de amplitudes A_{E1} y A_{E2} se pueden obtener multiplicando los respectivos coeficientes de reflexión y de transmisión que actuaran sobre A_0 en cada caso:

$$A_{E1} = R_{BR} \cdot A_0 = -0,95 \cdot A_0 \quad \text{y} \quad (3.24)$$

$$A_{E2} = (T_{BR \rightarrow líq} \cdot R_{líq} \cdot T_{líq \rightarrow BR}) \cdot A_0 = 0,09 \cdot A_0. \quad (3.25)$$

Como se puede concluir, este resultado es poco conveniente ya que la mayor parte de la amplitud de la onda inicial se verá reflejada antes de recorrer el medio líquido y por lo tanto, la porción de señal transmitida se ve convertida en una onda muy débil que debe recorrer aún más distancia, atravesando dos medios que en la práctica influirán con sus respectivos coeficientes de atenuación (α_{BR} y α_{vino}).

Por otro lado, asumiendo un *buffer rod* de PEAD ($Z_{BR} = 2,33$ MRayl), un reflector de acero inoxidable ($Z_{refl} = 46$ MRayl) y vino tinto como líquido ($Z_{líq} = 1,2$ MRayl). Los valores de los mismos coeficientes de reflexión y de transmisión cambian a: $R_{BR} = -0,32$, $T_{BR \rightarrow líq} = 0,68$, $R_{líq} = 0,95$ y $T_{líq \rightarrow BR} = 1,32$, modificando los valores de amplitud A_{E1} y A_{E2} de la siguiente manera:

$$A_{E1} = R_{BR} \cdot A_0 = -0,32 \cdot A_0 \quad \text{y} \quad (3.26)$$

$$A_{E2} = (T_{BR \rightarrow líq} \cdot R_{líq} \cdot T_{líq \rightarrow BR}) \cdot A_0 = 0,85 \cdot A_0. \quad (3.27)$$

Resultados que muestran una distribución más adecuada de la amplitud de la señal inicial y que pueden garantizar un óptimo recorrido por el líquido sin temor a que las atenuaciones de los materiales hagan que *ECO2* sea imperceptible para el transductor o inútil a la hora de realizar el procesado de la información.

De esta manera, teniendo en cuenta los resultados anteriores, se hace evidente que el uso de materiales plásticos presenta importantes ventajas, tanto físicas como técnicas, que los hacen la opción más apropiada para la fabricación del *buffer rod* necesario en el diseño del sistema propuesto.

3.5 Modelo circuital del sistema de medida propuesto

La utilización de herramientas de simulación, es una alternativa muy útil a la hora de realizar el diseño de un sistema de medida acústico como el que se propone en esta Tesis Doctoral. La introducción de cualquier cambio en el transductor, *buffer rod* y/o *reflector* (dimensiones, materiales, frecuencia de trabajo, etc.) o en la distancia entre *buffer* y *reflector*, acarrearía una gran carga de trabajo y dinero al tener que adquirir y/o fabricar un componente nuevo si no se dispusiera de una herramienta alternativa como la simulación de todo el sistema de medida.

Con este precedente, en esta sección se presentan los modelos circuitales de los principales elementos que componen el sistema de medida. De esta manera, posteriormente, el sistema completo se podrá poner a prueba todas las veces que sean necesarias para su depuración, mediante un software de simulación de circuitos eléctricos como PSpice (Cadence Design Systems Inc., San José, CA, U.S.A). Práctica que ya acumula muchos años y es ampliamente utilizada (Hutchens & Morris, 1984; Morris & Hutchens, 1986).

3.5.1 Caracterización eléctrica del transductor

El elemento sensible y básico de un transductor ultrasónico es una cerámica piezoeléctrica. Dicho elemento, con resonancia en modo espesor, puede ser representado mediante un circuito equivalente de tres puertos (Leach, 1994; Puttmer *et al.*, 1999; Turo *et al.*, 1999). Dos de estos puertos son mecánicos y corresponden a las caras de la cerámica, caracterizadas por la fuerza F (F_1 y F_2) aplicada a cada cara y la velocidad v (v_1 y v_2). El tercero es un puerto eléctrico cuyas variables son la tensión V_3 y la corriente I_3 , Figura 3.11.

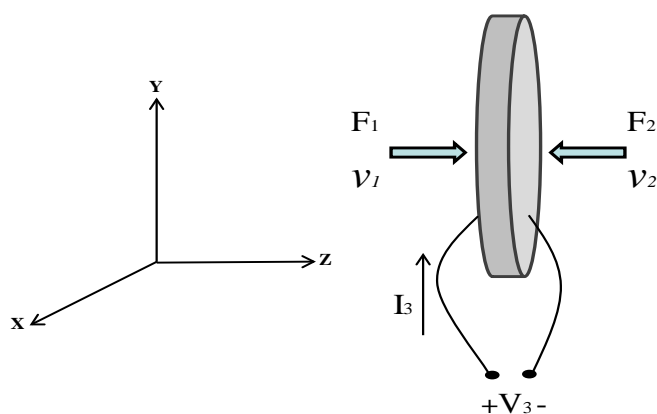


Figura 3.11 Cerámica piezoeléctrica con resonancia en modo espesor.

Ya que el radio de la cerámica es mucho mayor que su espesor, se puede considerar que el frente de onda plano se propaga en la dirección del eje z . Siendo este eje, la única dimensión a tener en cuenta en el desarrollo del modelo.

De esta manera, la Figura 3.12 representa el circuito eléctrico equivalente de una cerámica piezoeléctrica con resonancia en modo espesor. Como se puede observar, el circuito está constituido por una línea de transmisión con pérdidas acompañado de cuatro fuentes controladas, dos de tensión y dos de corriente.

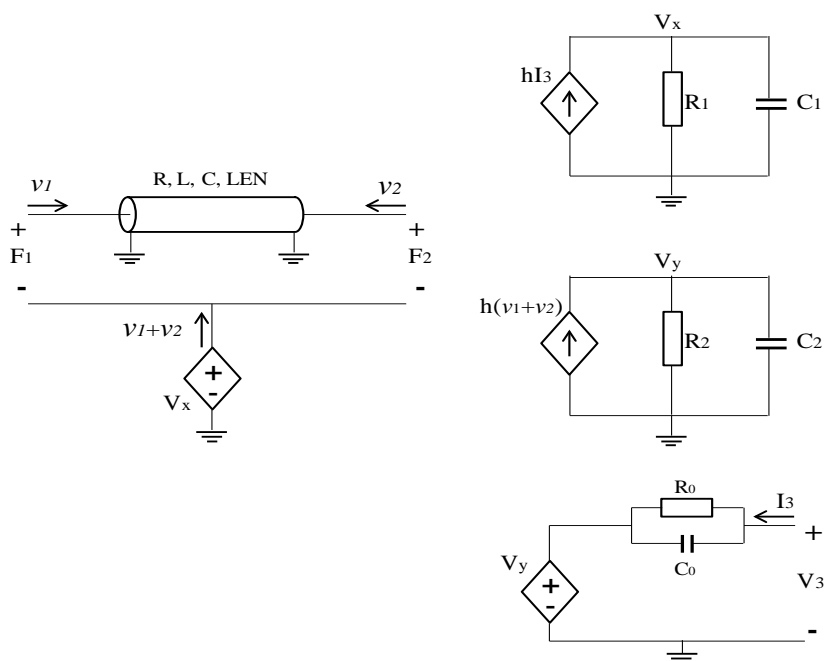


Figura 3.12 Circuito eléctrico equivalente de una cerámica piezoeléctrica con resonancia en modo espesor como la de la Figura 3.11.

Igualmente, las pérdidas eléctricas se contemplan mediante R_0 y las mecánicas mediante la resistencia distribuida de la línea de transmisión R . Cabe mencionar que dentro de las características que diferencian este circuito del de Leach, encontramos el cambio de la línea de transmisión sin pérdidas por una con pérdidas y la modificación que se hace para poder utilizar los terminales de los puertos mecánicos de forma diferencial. Concretamente, esto último se consigue al no conectar la fuente V_x (acoplamiento de la parte eléctrica a la acústica) directamente a la conexión de tierra de la línea de transmisión (Turo *et al.*, 1999).

Los parámetros a calcular para el circuito de la Figura 3.12 comprenden:

$$R_0 = \frac{1}{\omega \cdot C_0 \cdot \tan \delta_e} \tag{3.28}$$

Siendo δ_e el factor de disipación dieléctrica, ω la frecuencia angular y C_0 la capacidad estática de la cerámica. Esta última calculada como:

$$C_0 = \frac{\varepsilon^S \cdot A}{l}. \quad (3.29)$$

Donde, ε^S corresponde a la permitividad a tensión constante, A es el área y l el espesor de la cerámica.

De otro lado, los parámetros de la línea de transmisión con pérdidas se calculan con:

$$R = \frac{\omega \cdot \rho \cdot A}{Q_m}; \quad (3.30)$$

$$C = \frac{1}{A \cdot C^D}; \quad (3.31)$$

$$L = A \cdot \rho \quad y \quad (3.32)$$

$$C^D = \frac{Z^2}{\rho}. \quad (3.33)$$

Siendo Q_m el factor de calidad mecánico, ρ la densidad, Z la impedancia característica y C^D la constante de elasticidad del material piezoeléctrico (Deventer *et al.*, 2000).

3.5.2 Caracterización eléctrica del buffer rod, del medio líquido y del reflector

El bloque que corresponde al *buffer rod*, al medio líquido y al *reflector*, dentro del circuito eléctrico equivalente, estará adecuadamente representado mediante tres líneas de transmisión con pérdidas conectadas en serie, Figura 3.13. Usando las Ecs. (3.30), (3.31), (3.32) y (3.33), se calculan los parámetros necesarios de cada línea mediante los datos específicos de los materiales y componentes usados en cada caso de estudio: acero, polietileno, vino tinto, etanol, ácidos, agua, etc.

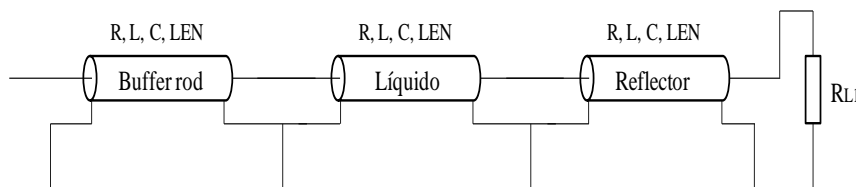


Figura 3.13 Equivalente eléctrico del bloque correspondiente al buffer rod, medio líquido y reflector.

R_{L1} hace la función de una carga eléctrica final cuyo valor de resistencia es similar a la impedancia acústica del material con el que estará en contacto el lado opuesto del reflector (generalmente vino en nuestro sistema de medida) (Deventer *et al.*, 2004).

3.5.3 Caracterización eléctrica del sistema de medida completo

En la Figura 3.14 se observa el circuito completo con todos los componentes que hacen parte del sistema de medida a simular con ayuda de algún software especializado como PSpice.

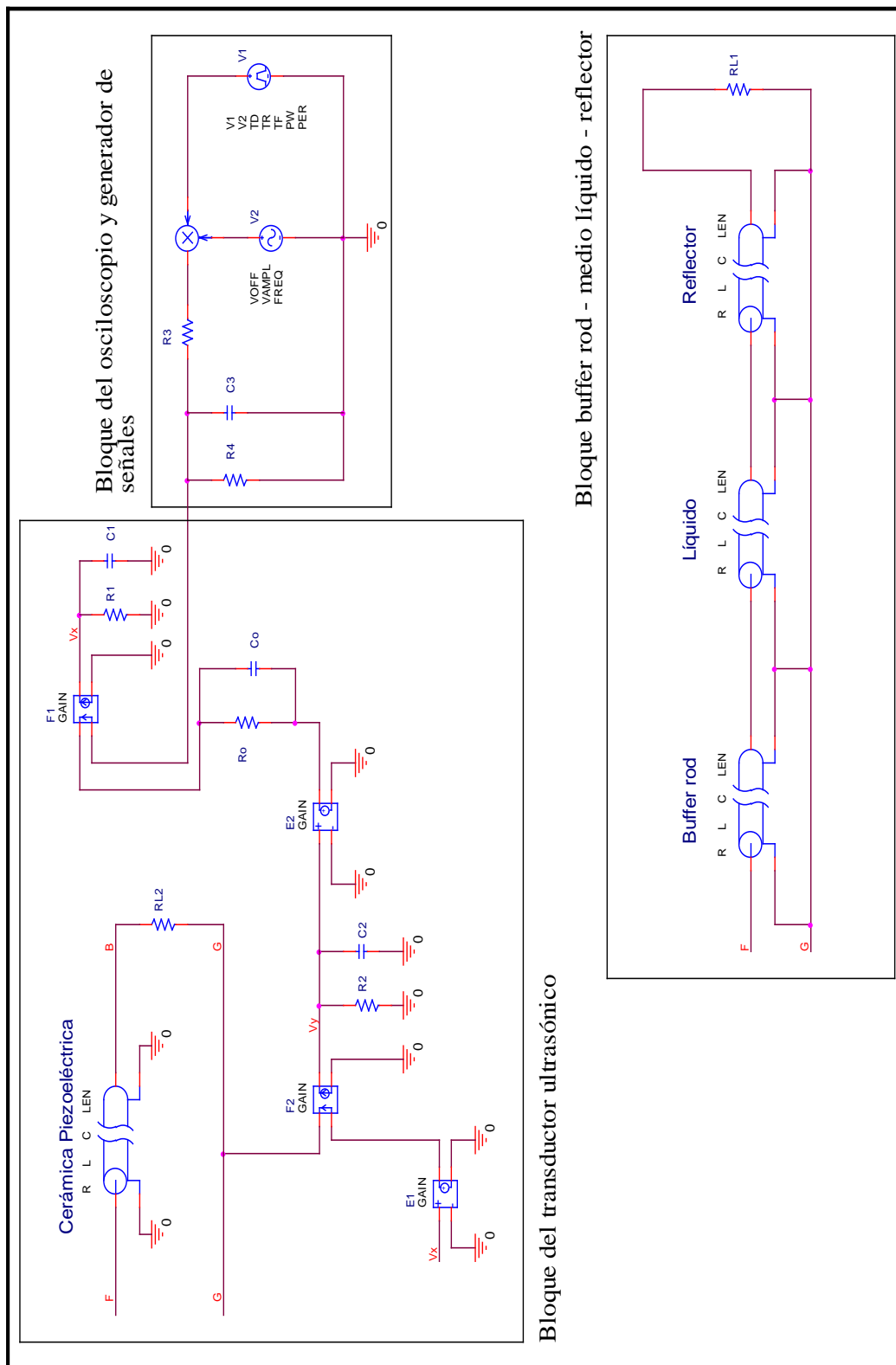


Figura 3.14 Equivalente eléctrico para simulación con Pspice del sistema de medida ultrasónico.

El bloque correspondiente a la electrónica que acompaña al sistema de medida está representado por la resistencia R_3 , de valor equivalente a la impedancia de salida del generador de señales, y un condensador C_3 y resistencia R_4 , equivalentes a la impedancia de entrada de un osciloscopio digital. Igualmente, RL_2 es una resistencia de carga que representa la impedancia acústica del material con el que este en contacto el lado del transductor ultrasónico que no esté conectado al circuito equivalente del sistema de medida.

Es así que, por medio de este circuito equivalente, se pueden obtener datos preliminares de importante ayuda en el diseño del sistema de medida, permitiendo el desarrollo de múltiples simulaciones con cualquier combinación entre materiales, dimensiones geométricas y longitudes de los componentes que lo conforman.

3.5.3.1 Ejemplos de simulaciones

Como ya se ha mencionado, usando PSpice se pueden realizar simulaciones que permitan algunos análisis previos sobre el sistema de medida en desarrollo. Aprovechando las facilidades que dicho software ofrece, es posible cambiar y/o combinar parámetros que definen, entre otros, aspectos como el tipo de material y las dimensiones de los principales elementos que intervienen y están representados en el circuito eléctrico de la Figura 3.14. De esta forma, se pueden poner a prueba, validar o modificar consideraciones del diseño como las descritas en el apartado 3.4, facilitando la elección de la configuración más apropiada en el momento de llevar a cabo el montaje físico final y por lo tanto, contribuyendo al respectivo ahorro de tiempo, esfuerzo y dinero.

Precisamente, en esta ocasión se presentan los resultados obtenidos al simular las dos configuraciones del bloque *BR-líquido-reflector* que fueron utilizadas en el apartado 3.4 para calcular la longitud necesaria del *buffer rod* L_{BR} y analizar el comportamiento en amplitud de las señales de interés (ecos detectados), todo, según características acústicas de los materiales asignados a cada uno de los tres componentes.

Repasando, para la primera configuración se consideró que el *buffer rod* fuese de acero, el medio líquido similar al agua y el *reflector* de acero y para la segunda, el material del buffer fue sustituido por un plástico (*PE* y *PEAD*). Además, el cálculo de la longitud del *buffer rod* se llevo a cabo dos veces para cada material considerado, inicialmente con el fin de obtener la llamada longitud tradicional (apartado 3.4.1) y luego, aplicando el redimensionamiento para reducir de forma favorable y adecuada dicho valor de longitud (apartado 3.4.2).

En la Tabla 3.1 se pueden observar algunos parámetros físicos y acústicos (densidad ρ , velocidad del sonido c e impedancia acústica Z) necesarios para calcular el valor de los parámetros eléctricos de las líneas de transmisión con pérdidas (inductancia L , capacitancia C y

resistencia R) con las que se caracterizan cada uno de los componentes empleados en estas simulaciones según el material del que estén constituidos (apartados 3.5.1 y 3.5.2). Así, para esta ocasión, se considera que el diámetro de la cerámica piezoeléctrica es 25 mm y el material que la representa el PZT-4, el diámetro de los elementos restantes se establece en 41 mm, el medio líquido se representa con las características del agua a 30°C y, de los dos plásticos mencionados, se trabaja con el PEAD.

MATERIAL	ρ (kg/m ³)	c (m/s)	Z (MRayl)	L (H)	C (nF)	R (k Ω)	Q_m
Acero	8030	5790	46	10,6	2,8	141,15	
Agua (30°C)	1000	1509	1,51	1,32	220,5	0,15	
PZT-4	7500	4600	34,5	3,7	12,9	46,3	500
PEAD	960	2430	2,33	1,9	93,9	49,6	

Tabla 3.1 Parámetros físicos y acústicos y parámetros eléctricos de los materiales considerados para el análisis mediante simulaciones.

La Figura 3.15 contiene las formas de onda $ECO1$ y $ECO2$, resultantes de llevar a cabo la simulación de la primera configuración mencionada, cuando se considera que la longitud obtenida es para un *buffer rod* tradicional ($L_{BRacero} = 347,4$ mm), es decir, para el caso en que el receptor detecta un sólo $ECO1$ antes de la recepción de $ECO2$.

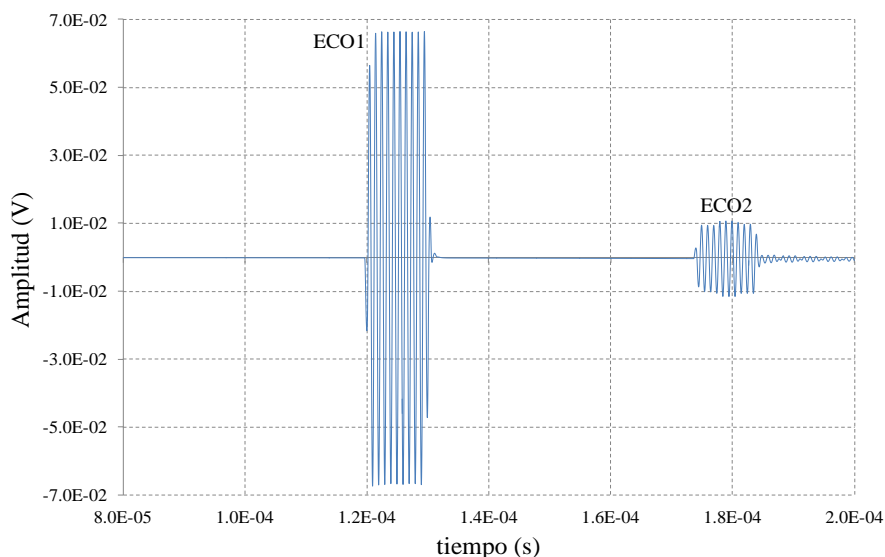


Figura 3.15 $ECO1$ y $ECO2$ obtenidos mediante simulación cuando el *buffer rod* es de acero (longitud 347,4 mm) y la distancia *BR-reflector* es 50 mm.

Como se observa, con este diseño, la recepción de $ECO1$ ocurre, aproximadamente, pasados 119 μ s y la de $ECO2$ pasados 173 μ s, con lo cual se establece una suficiente separación temporal (final de $ECO1$ e inicio de $ECO2$) que evitaría cualquier interferencia entre ellos y

permite la medida del *TOF* en el medio líquido. Por otro lado, como se mencionó en su momento, este caso implica la necesidad de un *buffer rod* de gran longitud y peso. Además, se corrobora que el uso de un *buffer rod* de acero conlleva a que *ECO1* tenga mucha más amplitud que *ECO2* (apartado 3.4.3), circunstancia poco conveniente para la aplicación diseñada.

La Figura 3.16 muestra las formas de onda *ECO1* y *ECO2* cuando se lleva a cabo la simulación de la misma configuración anterior, pero usando la longitud obtenida con el redimensionamiento del *buffer rod* ($L_{BRacero} = 115,8$ mm para $n = 2$ en Ec. (3.23)), es decir, para el caso en que se permite la recepción de dos *ECO1* ($ECO1_1$ y $ECO1_2$) antes de la llegada de *ECO2*.

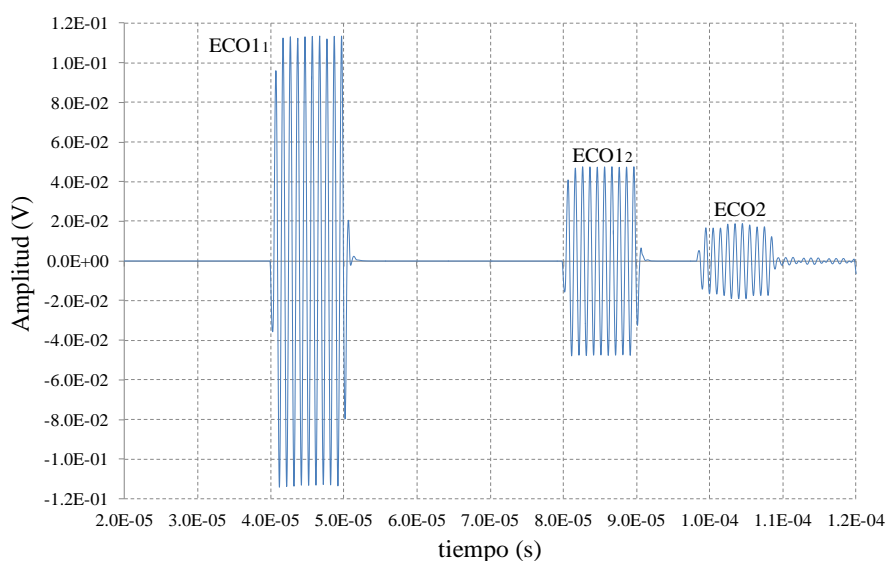


Figura 3.16 $ECO1_1$, $ECO1_2$ y $ECO2$ obtenidos mediante simulación cuando el *buffer rod* es de acero (longitud 115,8 mm) y la distancia *BR-reflector* es 50 mm.

De esta forma, se reduce el tiempo de llegada del primer *ECO1* ($ECO1_1$) a 40 μ s y el de *ECO2* a 98 μ s aproximadamente y, en la franja de tiempo intermedia entre estos dos ecos, se ubica adecuadamente el segundo *ECO1* ($ECO1_2$) de tal forma que no produzca interferencia alguna al medir el *TOF* en el medio líquido. Por lo tanto, aplicando el redimensionamiento, la longitud necesaria para el *buffer rod* se reduce convenientemente en algo más de la mitad, pero se sigue manteniendo el inconveniente en cuanto a amplitudes que deriva del uso de un *buffer rod* de acero.

Pasando a la segunda configuración, cambio del material del *buffer rod* de acero a *PEAD*, en la Figura 3.17 se pueden observar las formas de onda *ECO1* y *ECO2* usando la longitud calculada para el llamado *buffer rod* tradicional ($L_{BRPEAD} = 142,5$ mm).

De esta manera, *ECO1* se detecta pasados 118 μs y *ECO2* pasados 172 μs aproximadamente, lográndose un comportamiento temporal muy similar al observado en los resultados de la Figura 3.15, pero con un *buffer rod* de menor longitud y peso. Además, se puede confirmar que el uso de un *buffer rod* de plástico permite que *ECO2* tenga mayor amplitud que *ECO1* (apartado 3.4.3), favoreciendo el desempeño de la aplicación diseñada.

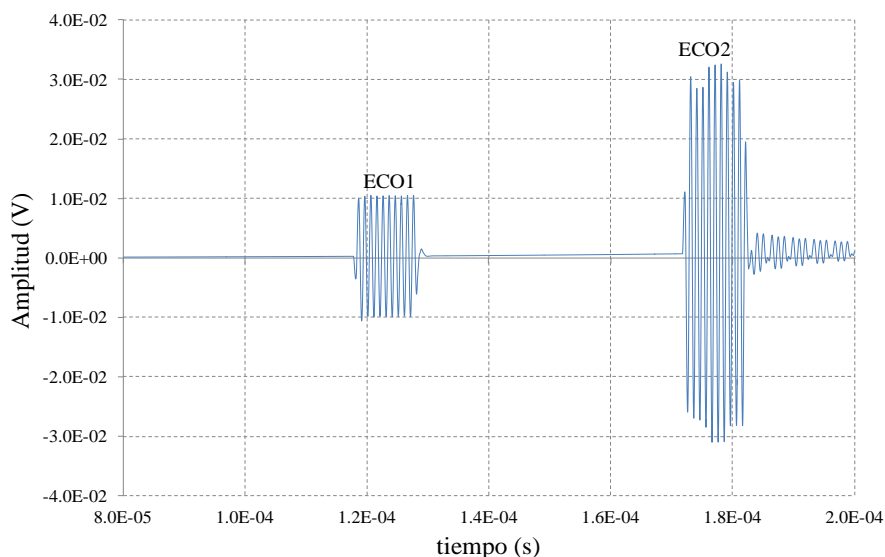


Figura 3.17 *ECO1* y *ECO2* obtenidos mediante simulación cuando el material del *buffer rod* es *PEAD* (longitud 142,5 mm) y la distancia *BR-reflector* es 50 mm.

Finalmente, en la Figura 3.18 se observan las formas de onda para *ECO1* y *ECO2* obtenidas al simular nuevamente la segunda configuración, pero usando la longitud calculada con el redimensionamiento del *buffer rod* de *PEAD* ($L_{BRPEAD} = 47,5$ mm para $n = 2$ en Ec. (3.19)).

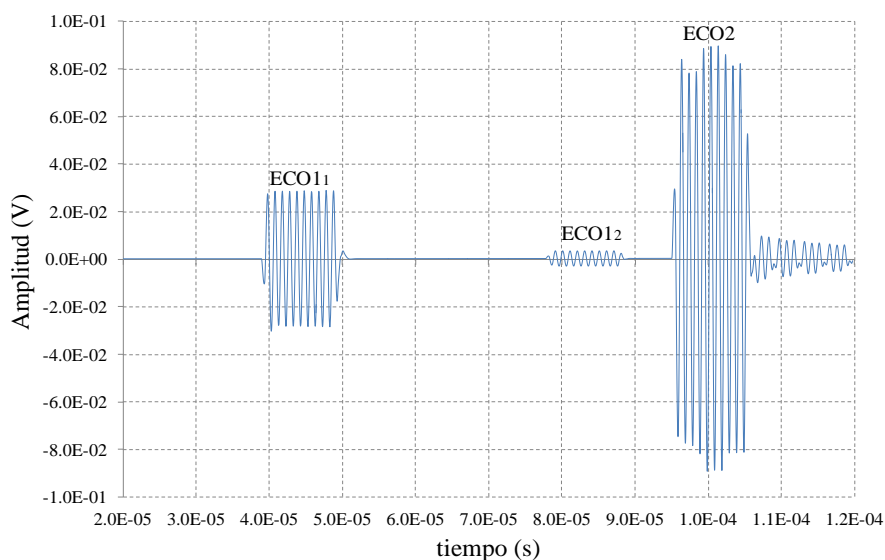


Figura 3.18 *ECO1₁*, *ECO1₂* y *ECO2* obtenidos mediante simulación cuando el material del *buffer rod* es *PEAD* (longitud 47,5 mm) y la distancia *BR-reflector* es 50 mm.

En esta ocasión, el primer *ECO1* ($ECO1_1$) llega pasados 39 μs y *ECO2* 94 μs aproximadamente, manteniéndose entre ellos una franja de tiempo suficiente para posicionar adecuadamente el segundo *ECO1* ($ECO1_2$) sin que interfiera en la medida del *TOF* en el medio líquido. Además, el comportamiento de amplitudes de los ecos es el más adecuado (*ECO2* con la mayor amplitud y $ECO1_2$ con una amplitud casi nula) lo que, sumado a la importante reducción en longitud y peso del *buffer rod*, confirman a esta última opción como la mejor configuración a la hora de llevar a cabo el montaje final del sistema de medida.

4. TÉCNICAS DE PROCESADO PARA OBTENER VELOCIDAD Y VARIACIONES DE VELOCIDAD DE SEÑALES ULTRASÓNICAS

4.1 Determinación de la velocidad

La obtención de forma efectiva y precisa de las variaciones de velocidad Δc y/o velocidad absoluta c , de las diferentes ondas de ultrasonido que se reciben y almacenan en cada prueba realizada, se convierte en una de las tareas técnicas más importantes a tener en cuenta en la puesta en marcha, desarrollo y resultados del presente trabajo.

Como ya se ha mencionado, en términos generales, la velocidad c de una onda ultrasónica que atraviesa cualquier medio sin ser completamente atenuada, se puede calcular mediante la división de la distancia que ha recorrido d_r entre el tiempo que necesitó para realizar dicho recorrido, Ec. (4.1). Este tiempo es conocido como tiempo de vuelo TOF (time-of-flight). Cuando la distancia d_r se mantiene constante, como será nuestro caso, el TOF se caracteriza por tratarse del parámetro de interés a medir.

$$c = \frac{d_r}{TOF}. \quad (4.1)$$

Por consiguiente, el presente capítulo se centra en la descripción y comparación de un conjunto de métodos aptos para obtener variaciones de velocidad Δc y/o velocidad c , mediante la medida de las variaciones del tiempo de vuelo ΔTOF entre ondas consecutivas. De esta manera, escogiendo la técnica de procesado más conveniente y con ayuda de una única medida de velocidad inicial de referencia c_{ref} , los valores posteriores de velocidad c y de variaciones de velocidad Δc , de las señales a procesar, se pueden determinar mediante las siguientes expresiones:

$$c = \frac{d_r}{TOF} = \frac{d_r}{TOF_{ref} + \Delta TOF} = \frac{c_{ref} \cdot d_r}{d_r + c_{ref} \cdot \Delta TOF} \quad y \quad (4.2)$$

$$\Delta c = c - c_{ref} = \frac{d_r}{TOF_{ref} + \Delta TOF} - \frac{d_r}{TOF_{ref}} = -\frac{c_{ref}^2 \cdot \Delta TOF}{d_r + c_{ref} \cdot \Delta TOF} . \quad (4.3)$$

Donde, TOF_{ref} corresponde al tiempo de vuelo de la señal de referencia.

4.1.1 Incertidumbre en la determinación del tiempo de vuelo

Para un primer pulso ultrasónico que realice el recorrido a través del medio bajo test, el valor real del tiempo de vuelo TOF_1 que emplea, se puede conocer aplicando una adecuada corrección τ' a la distancia temporal que se visualiza con el osciloscopio TOF_{1a} (tiempo de vuelo aparente). Esta corrección es equivalente al tiempo aportado por el sistema de medida y su valor se obtiene sumando los diferentes tiempos parciales que emplea la señal para circular a través de segmentos como cables, aparatos, instrumental, transductores y demás. De esta manera, el tiempo de vuelo real TOF_1 quedaría determinado como:

$$TOF_1 = TOF_{1a} - \tau' . \quad (4.4)$$

Obtener τ' sería posible mediante una precisa calibración de todo el sistema de medida; aunque, esto no es del todo fácil y resulta más conveniente pensar en términos de variaciones del tiempo de vuelo (tanto aparente ΔTOF_a , como real ΔTOF). En otras palabras y con ayuda de la Figura 4.1, contando con el tiempo de vuelo aparente de un segundo pulso ultrasónico consecutivo TOF_{2a} , cuyo valor real sería $TOF_2 = TOF_{2a} - \tau'$, es posible observar que la variación del tiempo de vuelo real ΔTOF es igual a la variación del tiempo de vuelo aparente ΔTOF_a :

$$\Delta TOF = TOF_2 - TOF_1 = (TOF_{2a} - \tau') - (TOF_{1a} - \tau') = TOF_{2a} - TOF_{1a} = \Delta TOF_a . \quad (4.5)$$

Es decir, las variaciones del tiempo de vuelo calculadas serán debidas, exclusivamente, a los cambios físico-químicos del medio bajo test. Resultado que ratifica la necesidad de contar con un método adecuado para el procesado de señales que permita obtener, de forma muy precisa, dichas variaciones del tiempo de vuelo.

4.2 Relación de métodos para obtener variaciones del tiempo de vuelo

4.2.1 Método del umbral

Desarrollado en el dominio del tiempo, el *método del umbral* es quizá la técnica más sencilla y de fácil aplicación que puede utilizarse para determinar el tiempo de inicio de diversas señales como los ecos ultrasónicos empleados en este trabajo. Básicamente, el método consiste en detectar y registrar el instante en que, por primera vez, la onda sobrepasa un cierto valor de

amplitud «nivel de umbral» previamente establecido (Parrilla *et al.*, 1991). Asimismo, la exactitud en la medida obtenida dependerá principalmente del valor mínimo que pueda ser asignado al umbral, de la relación señal-ruido (SNR) y de la frecuencia de muestreo utilizada.

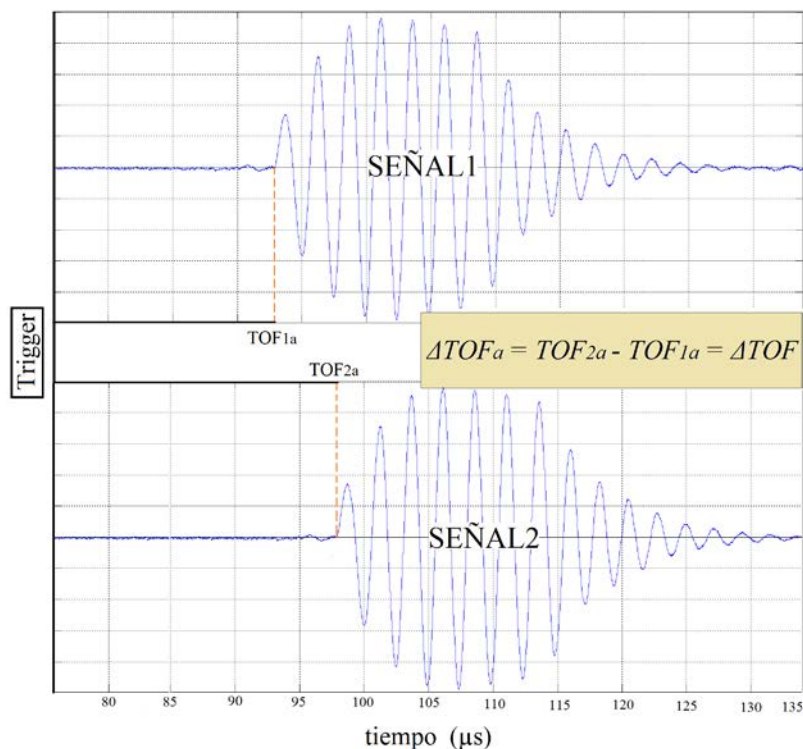


Figura 4.1 Relación entre el tiempo de vuelo aparente TOF_a visualizado por el osciloscopio y la variación del tiempo de vuelo entre señales consecutivas ΔTOF .

Por consiguiente, suponiendo que la señal de la Figura 4.2 corresponde al registro de una onda ultrasónica que ha finalizado su recorrido a través de un determinado medio bajo análisis, el tiempo de inicio t_0 obtenido con este método podría considerarse como equivalente del tiempo empleado por la onda para hacer dicho recorrido. Es decir, estableciendo un nivel de umbral muy bajo, se dispondría del método para la medida directa y aproximada del TOF en esta clase de señales. Además, como ya se ha explicado en el apartado 4.1, conociendo el valor de la distancia recorrida y midiendo el respectivo TOF , con la Ec. (4.1) se puede hacer el cálculo inmediato de la velocidad de propagación en el medio de las ondas ultrasónicas.

Con señales de comportamiento constante y bajo ruido, esta técnica sería suficiente e ideal para la tarea de obtener el TOF y la velocidad de propagación. En la práctica, diversos factores pueden dar lugar a medidas del TOF que, dependiendo del caso, pueden llegar a ser inferiores o superiores al valor real.

Así, las limitaciones en ancho de banda del transductor, que al influir directamente en el tiempo de crecimiento del eco, pueden ocasionar que el verdadero origen de la señal esté por debajo del nivel de umbral establecido. Un nivel de SNR demasiado bajo daría la posibilidad a que picos de ruido superen el umbral antes que la onda. También, la atenuación que afecta la amplitud de las señales, y la frecuencia de muestreo que limita la resolución de las medidas pueden influir como fuentes de error sobre los resultados obtenidos, limitando la exactitud en el cálculo y por consiguiente, el buen desempeño del método.

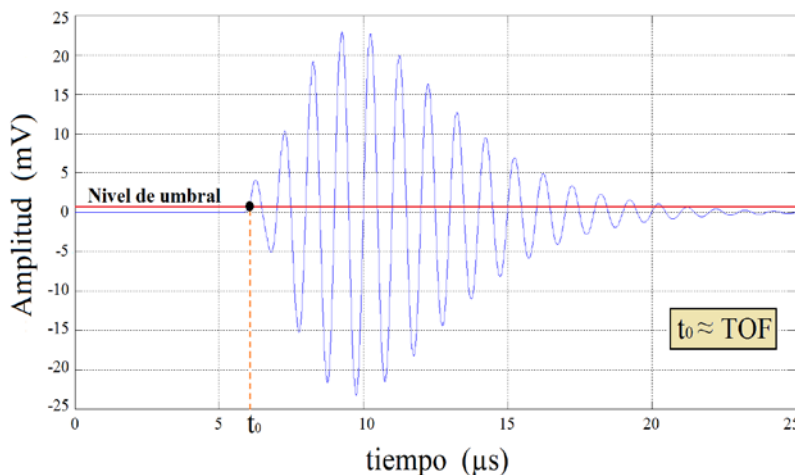


Figura 4.2 Método del *umbral* para obtener el TOF de una onda de ultrasonidos.

Si se establece un nivel de umbral mucho más elevado que el de la Figura 4.2, ya no sería posible determinar con precisión el tiempo de origen de cada señal y por lo tanto, tampoco el respectivo *TOF*, pero se podría contar con una sencilla técnica para calcular variaciones de éste entre señales consecutivas. Además, supondría la solución para la mayoría de los inconvenientes descritos en el párrafo anterior.

De esta manera, supóngase dos ondas registradas por un transductor de forma consecutiva después de su recorrido por el medio bajo test, *ECO1* y *ECO1'*, como las de la Figura 4.3, y una amplitud umbral que sobrepase algunos de los semiciclos iniciales. En estas condiciones, al medir los tiempos en que cada señal supera por primera vez este nuevo umbral, t_1 y t_1' , y realizar la diferencia entre ellos, se estará calculando una variación de tiempo que es equivalente a la variación del tiempo de vuelo ΔTOF entre estas dos señales. Este cálculo podrá realizarse tantas veces como ondas consecutivas se tengan y sólo haría falta contar con una primera medida de referencia en el momento de querer convertir las variaciones del tiempo de vuelo en valores absolutos.

Adicionalmente, trabajando de esta manera se consigue evitar las falsas detecciones por picos altos de ruido y se evade el tramo inestable en el cual el eco apenas comienza a crecer,

logrando trabajar en zonas más internas y estables de cada señal con lo cual se puede mejorar la fiabilidad de la información recopilada.

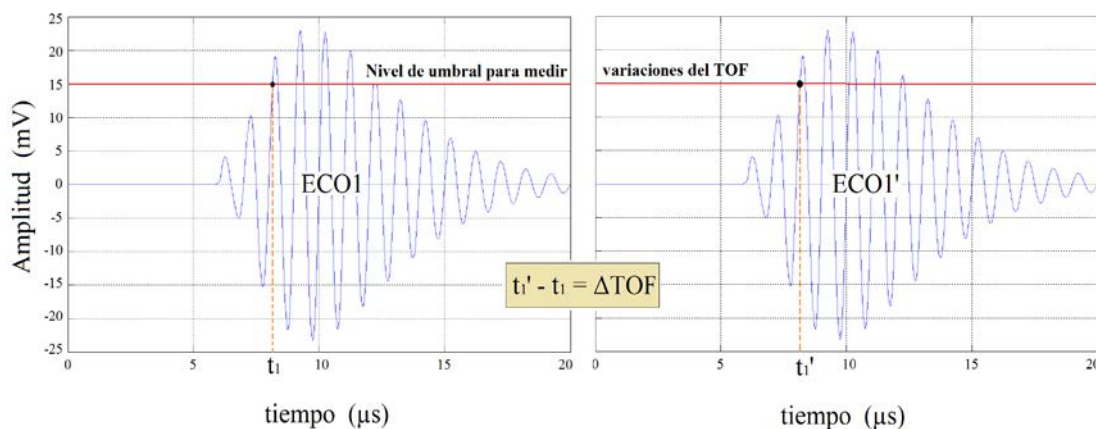


Figura 4.3 Método del *umbral* para obtener variaciones del *TOF* entre ondas de ultrasonido similares y consecutivas.

De otro lado, hay que tener en cuenta que el método requiere un comportamiento prácticamente constante en la forma y amplitud de las señales consecutivas para poder asegurar que el umbral, en cada una de las ondas, será superado siempre en el mismo semiciclo. Esto es especialmente importante ante fuertes atenuaciones que puedan hacer variar la amplitud de la onda, generando, en algunas de las señales, detecciones en otros semiciclos y por consiguiente medidas erróneas. De esta manera, al contar con señales de forma similar, el nivel de umbral puede establecerse como una parte proporcional de la máxima amplitud que acompaña a cada una de las ondas. Finalmente, la resolución de las medidas seguirá siendo dependiente, principalmente, de la frecuencia de muestreo utilizada.

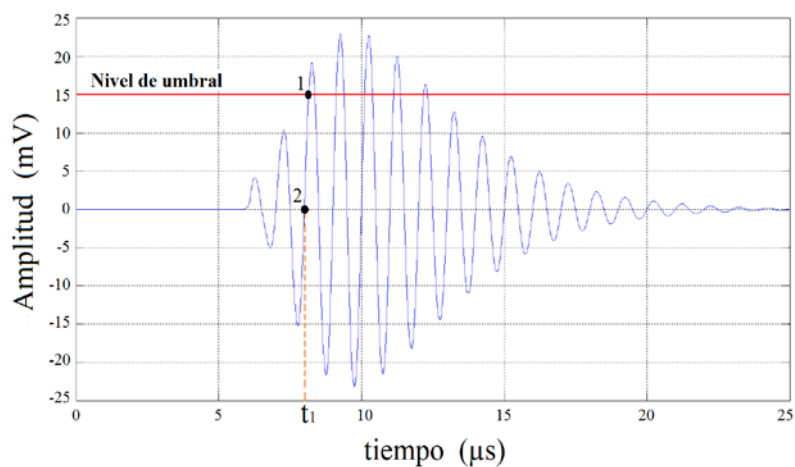
4.2.2 Método del cruce por cero

Como se ha hecho notar desde el inicio de este capítulo y se confirma en el apartado 4.2.1, el objetivo principal de las técnicas para procesar las señales ultrasónicas con las que se trabaja en esta Tesis, no es el de obtener directamente el valor absoluto del *TOF* de cada eco, sino el de ser capaces de medir pequeñas variaciones de éste entre ecos consecutivos. Siguiendo dicho criterio, la técnica del *cruce por cero* se apoya, inicialmente, en el funcionamiento del *método del umbral*.

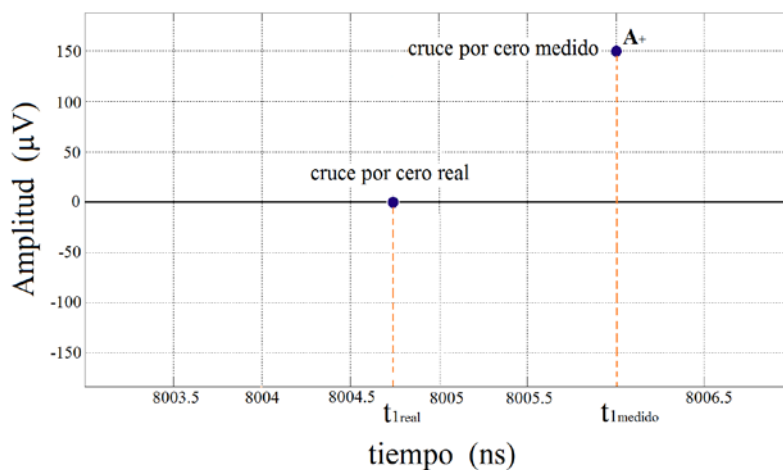
Como se puede observar en la Figura 4.4, con el objetivo de trabajar siempre en alguno de los semiciclos internos de la señal, se establece nuevamente un nivel de umbral de valor alto y proporcional al de la máxima amplitud que acompaña a la onda, pero en lugar de registrar el momento en el cual se supera dicho umbral (punto marcado como 1 en la Figura 4.3.a), éste es usado como punto de partida para retroceder por el semiciclo hasta detectar el último valor de

amplitud positivo A_+ con su respectivo tiempo $t_{1medido}$ (Figura 4.4.b). Finalmente, se asume este tiempo como el instante del cruce por cero en ese semiciclo. Una vez se tengan los correspondientes datos de cada eco, se podrá realizar la diferencia entre medidas de señales consecutivas para obtener las correspondientes variaciones del tiempo de vuelo ΔTOF .

Nuevamente, al tratarse de una técnica desarrollada en el dominio del tiempo, sigue siendo latente la dependencia de la resolución y exactitud de las medidas con la frecuencia de muestreo aunque, como se verá en el siguiente apartado, éste es un inconveniente que puede mejorarse mediante un tratamiento extra que sólo se realizaría en un pequeño intervalo de la señal y que daría más ventajas al método del *cruce por cero* con respecto al del *nivel de umbral*.



a)



b)

Figura 4.4 Método del *cruce por cero* para obtener variaciones del TOF entre onda de ultrasonidos similares y consecutivas a) Vista completa de la onda a procesar; b) Vista ampliada del tramo marcado como 2 en (a).

4.2.2.1 Cruce por cero con interpolación

Una forma sencilla de mejorar la resolución de las medidas obtenidas con el método del *cruce por cero*, consiste en aplicar técnicas de interpolación en un intervalo delimitado por el mismo punto usado en el apartado anterior A_+ y el siguiente punto de amplitud negativa A_- ubicado justo después del cruce por cero, Figura 4.5. Una vez se obtengan los tiempos t_{A+} y t_{A-} que acompañan a dichas amplitudes, se lleva a cabo una interpolación lineal entre estas dos coordenadas. De esta manera, se contará con una recta constituida por tantos puntos como se haya decidido realizar la interpolación, aumentando la resolución únicamente en el cruce por cero y permitiendo medidas del tiempo $t_{Imedido}$ más cercanas al valor real t_{Ireal} .

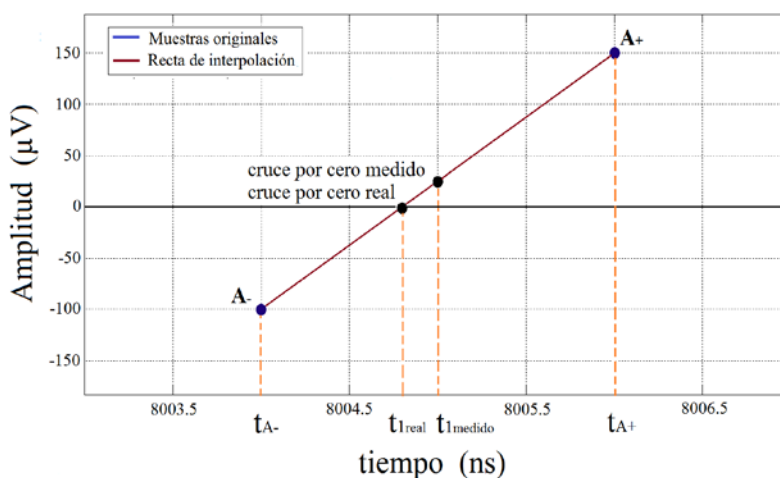


Figura 4.5 Vista ampliada del tramo marcado como 2 en la Figura 4.4.a para detallar el método del *cruce por cero con interpolación* con el cual obtener variaciones del TOF entre ondas de ultrasonidos similares y consecutivas mediante interpolación lineal.

4.2.3 Método del máximo

Una vez más, como se puede observar en la Figura 4.6, la aplicación para el método del *máximo* parte de fijar un nivel de umbral alto que permita trabajar en zonas más internas y estables de las señales adquiridas. De esta manera, a partir del momento en que el eco sobrepase la amplitud de umbral (punto marcado como 1), se procede a determinar el primer máximo posterior (punto marcado como 2) y su respectivo tiempo t_I . Con estos datos, se podrán realizar las correspondientes diferencias que conllevan al cálculo de las variaciones del tiempo de vuelo entre señales consecutivas.

Al igual que en el método del *cruce por cero*, también cabe la posibilidad de aplicar técnicas de interpolación en un pequeño tramo de la señal con el fin de mejorar la resolución de las medidas obtenidas.

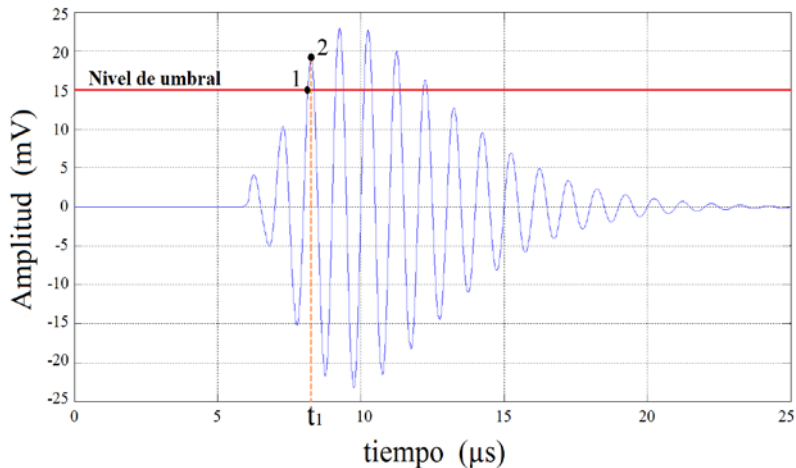


Figura 4.6 Método del *máximo* para obtener variaciones del *TOF* entre ondas de ultrasonidos similares y consecutivas.

4.2.3.1 *Máximo con interpolación*

En la Figura 4.7, se puede observar la captura de cuatro muestras (puntos marcados como 1, 2, 4 y 5) en la vecindad del máximo obtenido con el procedimiento descrito en el apartado 4.2.3 (punto marcado como 3 con tiempo $t_{I(1)}$). Igualmente, se añade la curva calculada al realizar una interpolación parabólica de 51 puntos. Con esta modificación, se logra determinar con mayor exactitud la posición del máximo de la onda a analizar y por consiguiente de su correspondiente medida de tiempo $t_{I(2)}$.

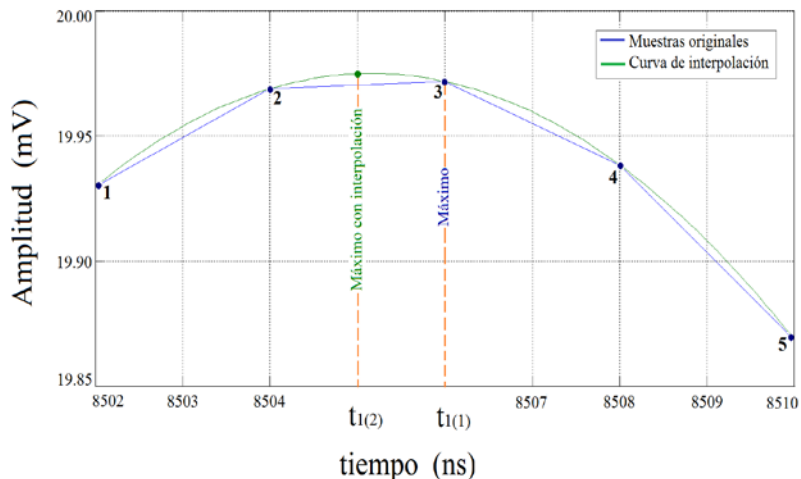


Figura 4.7 Vista ampliada del tramo marcado como 2 en la Figura 4.5 para detallar el método del *máximo con interpolación* con el cual obtener variaciones del *TOF* entre ondas de ultrasonidos similares y consecutivas mediante interpolación parabólica.

En último lugar, cabe esperar que poner en práctica los métodos de *cruce por cero*, *máximo* y sus respectivas modificaciones con interpolación, conlleve un aumento de los tiempos de ejecución con respecto al método inicial del *umbral*. No obstante, como se verá más adelante, este aumento de tiempo de ejecución se verá compensado con la mejora en las respuestas obtenidas. Además, seguirá siendo válido el hecho de que aún así, estos métodos sigan siendo técnicas de sencilla aplicación, algo importante a la hora de desarrollar sistemas de medida prácticos y portátiles.

4.2.4 Método de la correlación cruzada

Finalmente, un método que presenta muy buenas referencias para determinar variaciones entre señales consecutivas, trabajando en el dominio del tiempo, es el que emplea técnicas basadas en correlación o correlación cruzada (Marioli, 1991; Barshan, 2000; Queirós *et al.*, 2010). A esta práctica se le atribuye un excelente desempeño ya que utiliza toda la información contenida en la onda y por lo tanto está muy bien referenciada como estimador de variaciones del tiempo de vuelo ΔTOF . Como ha sido común hasta el momento, la exactitud en las respuestas de este método depende principalmente de la frecuencia de muestreo y del comportamiento constante en la forma de las señales. Por otro lado, es de esperar un importante aumento en el coste computacional a la hora de realizar los cálculos de las correlaciones, sobre todo a medida que la cantidad de muestras obtenidas vaya creciendo.

4.2.5 Método de la diferencia de fases

Pasando al dominio de la frecuencia, encontramos el método de la *diferencia de fases*. Esta técnica permite calcular expresamente variaciones del tiempo de vuelo ΔTOF mediante el uso de las variaciones de fase entre pares de señales desplazadas (Ahmed & Natarajan, 1983). El método se basa en el teorema de traslación de la transformada de Fourier. Específicamente, teniendo dos señales $x_1(t)$ y $x_2(t)$ con un factor de escala k y desplazadas una diferencia de tiempo $\Delta\tau$, de forma que:

$$x_2(t) = k \cdot x_1 \cdot (t - \Delta\tau) . \quad (4.6)$$

La relación entre sus respectivas transformadas de Fourier $X_1(f)$ y $X_2(f)$ viene determinada por:

$$X_2(f) = k \cdot e^{-2\pi \cdot f \cdot \Delta\tau} \cdot X_1(f) . \quad (4.7)$$

Por lo que, el espectro de fases $\varphi_2(f)$ de $X_2(f)$ cumple:

$$\varphi_2(f) = \varphi_1(f) - (2 \cdot \pi \cdot f \cdot \Delta\tau) . \quad (4.8)$$

Finalmente, si se considera $\varphi_1(f)$ como la fase de referencia, la variación del tiempo de vuelo ΔTOF entre estas dos señales se puede calcular despejando $\Delta\tau$ en (4.8):

$$\Delta\tau = -\frac{\varphi_2(f) - \varphi_1(f)}{2 \cdot \pi \cdot f} = \Delta TOF . \quad (4.9)$$

Es decir, la variación del tiempo de vuelo ΔTOF entre dos señales se puede calcular si se obtiene el valor de fase de cada una de ellas a la frecuencia de trabajo del transductor empleado. En el tratamiento digital de señales, para obtener estos valores de fase, normalmente se utiliza como herramienta computacional la FFT (fast Fourier transform) en lugar de la DFT (discrete Fourier transform) ya que es un algoritmo que reduce considerablemente el número de operaciones a realizar, proporcionando muy buena respuesta en menor cantidad de tiempo.

Para el correcto desarrollo de la FFT, es necesario que la cantidad de muestras de la señal a procesar sea un número igual a una potencia de dos. Normalmente, las herramientas informáticas disponibles para llevar a cabo la FFT permiten completar con ceros las señales que no tienen suficientes muestras para cumplir con el requisito y sería lógico pensar que lo más adecuado y fácil es agregar los ceros necesarios para conseguir la potencia de dos más próxima a la cantidad real de muestras.

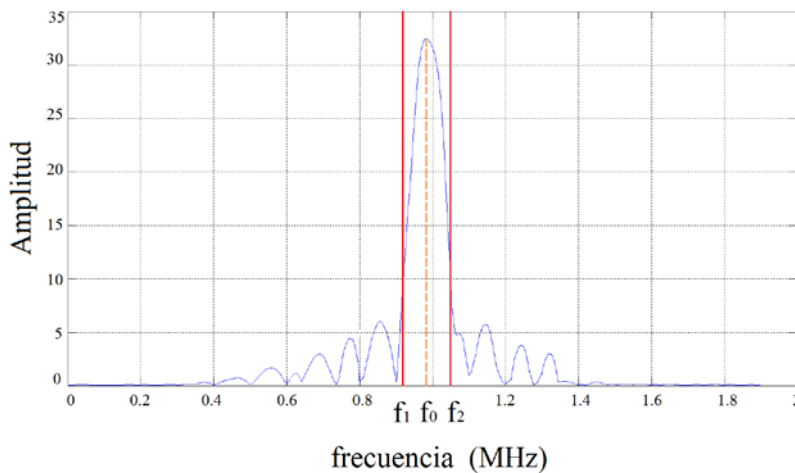
Con el objetivo de comparar en eficiencia y exactitud los métodos seleccionados para medir variaciones del tiempo de vuelo, en esta ocasión es interesante determinar si calcular la FFT con el mínimo número de muestras posible es suficiente para conseguir respuestas satisfactorias y si no es así, establecer cómo afecta al método el aumento sistemático de este parámetro.

4.2.6 Método de la diferencia de pendientes

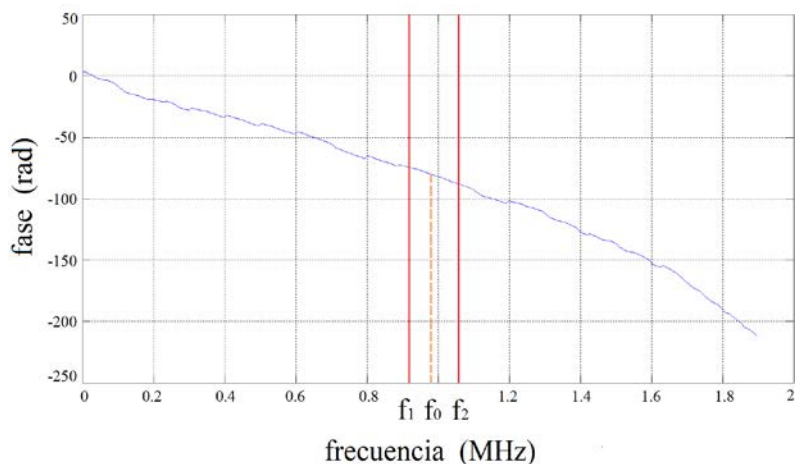
Esta técnica, que también hace uso del análisis en el dominio de la frecuencia para determinar el retraso (o adelanto) entre señales consecutivas es por consiguiente, de interés para el cálculo de variaciones del tiempo de vuelo ΔTOF . La técnica consiste en realizar la resta entre porciones específicas, en torno a la frecuencia central, de las curvas de fase de las señales a procesar (recomendablemente entre una onda de referencia sin ruido y la señal a analizar). De esta manera, se obtiene como resultado una recta, en el plano frecuencia-fase, cuya pendiente corresponderá al retardo entre ambas señales (Ibañez *et al.*, 2000).

En cuanto a los valores de frecuencia convenientes para obtener las respectivas rectas de fase, éstos se pueden ajustar con ayuda de los espectros de potencia, Figura 4.8. Partiendo de la frecuencia central f_0 , se buscarán las frecuencias, superior e inferior f_1 y f_2 , a las cuales la

amplitud del espectro cae 12 dB, Figura 4.8.a. Finalmente, estas frecuencias se utilizarán como el intervalo de corte en la curva de fase, Figura 4.8.b.



a)



b)

Figura 4.8 Método de la *diferencia de pendientes* para obtener variaciones del *TOF* entre señales ultrasónicas a) Espectro de potencia de la señal a procesar; b) Espectro de fase de la señal a procesar.

4.2.7 Comparación del desempeño de los métodos mediante simulaciones

Para llevar a cabo una comparativa teórica que ponga a prueba cada uno de los ocho métodos elegidos y descritos anteriormente: *umbral*, *cruce por cero*, *cruce por cero con interpolación*, *máximo*, *máximo con interpolación*, *correlación cruzada*, *diferencia de fases* y *diferencia de pendientes*, se recurre a un desarrollo virtual con ayuda del software de procesamiento matemático Matlab® (Math Works Inc., Natick, MA, U.S.A).

Con ayuda de la ecuación (4.10), se realiza el modelado de las respectivas ondas ultrasónicas:

$$s(n) = A \cdot (n \cdot T_s - \theta)^2 \cdot e^{-\beta \cdot (n \cdot T_s - \theta)} \sin(2 \cdot \pi \cdot f \cdot (n \cdot T_s - \theta)). \quad (4.10)$$

Donde, A representa la amplitud de la señal, T_s el período de muestreo, f la frecuencia de trabajo, β la constante para controlar la velocidad de amortiguamiento y θ el retardo introducido. Los valores dados a estas constantes han sido: $A = 1,3E10$, $\beta = 5,5E9$, $f = 1$ MHz, $T_s = 2$ ns y se ha usado un total de 15000 muestras por señal buscando el mayor parecido con las formas de onda de los ecos obtenidos experimentalmente, Figura 4.9.

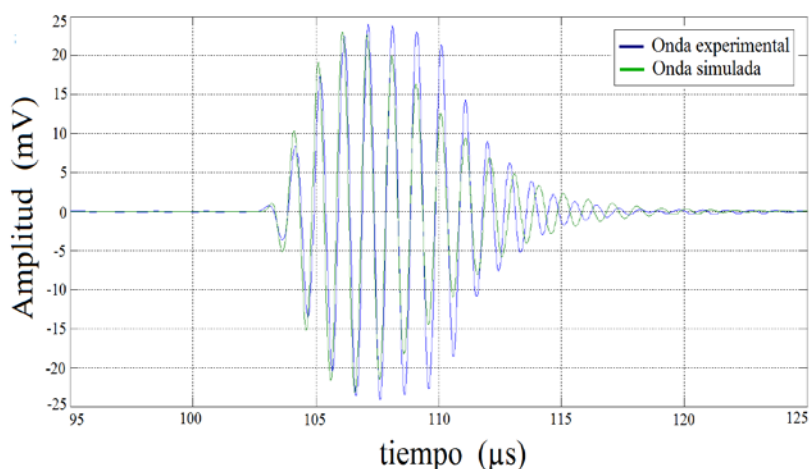


Figura 4.9 Forma de onda de un eco ultrasónico experimental y un eco simulado.

Con el fin de abarcar diferencias inferiores, cercanas y superiores al período de muestreo usado (2 ns), se generan 10 conjuntos de señales, de 50 ondas cada uno, a los cuales se le asigna un retardo diferente que se aplica de forma acumulada: 0,8 ns, 1,2 ns, 1,5 ns, 2 ns, 3,8 ns, 7,2 ns, 11,6 ns, 15,3 ns, 20 ns y 27,1 ns. Además, agregando ruido blanco Gaussiano, se simulan niveles de ruido similares a los que se encuentran usualmente en medidas experimentales con alimentos. Así por ejemplo, suelen registrarse valores de SNR entre 15 dB (alimentos dispersivos y altamente atenuantes como masas de pan) y 35 dB (alimentos líquidos con poca atenuación).

Por otro lado, para obtener una visión más amplia del comportamiento de los métodos ante los posibles contextos que se pueden encontrar en la práctica, se ejecuta cada uno de ellos en 4 situaciones diferentes:

- a) Señales que se procesan con su nivel de ruido original y entre ellas sólo varía el retardo.

b) Señales que se procesan con su nivel de ruido original y entre ellas varía el retardo y la amplitud (reducción de 20 dB entre la primera y la última señal distribuido equitativamente entre todo el conjunto).

c) Señales a las que se le aplica una etapa de filtrado digital antes de ser procesadas y entre ellas sólo varía el retardo.

d) Señales a las que se le aplica etapa de filtrado digital antes de ser procesadas y entre ellas varía el retardo y la amplitud (reducción de 20 dB entre la primera y la última señal distribuido equitativamente entre todo el conjunto).

Posteriormente, mediante el cálculo de la Raíz del Error Cuadrático Medio RMSE (Root Mean Square Error) y agregando contadores de tiempo de CPU a los algoritmos encargados de llevar a cabo cada método, se obtienen los dos parámetros usados como comparadores.

En cuanto a aspectos particulares de cada método que se tienen en cuenta para agregar a dichos algoritmos cabe mencionar:

- Para el método del *umbral*, el nivel de umbral usado corresponde al 60% de la máxima amplitud de la onda. El tiempo medido será el correspondiente a aquella amplitud que supere por primera vez el nivel umbral y las variaciones del tiempo de vuelo ΔTOF se miden entre señales consecutivas.

- Con los métodos *de cruce por cero y máximo*, el criterio aplicado es similar. Para el primero, buscar el tiempo correspondiente al valor de amplitud positivo más cercano a cero en el semiciclo de señal donde se supera por primera vez el nivel de umbral (60% de la máxima amplitud). Para el segundo, buscar el tiempo que acompaña al máximo que esté inmediatamente después de superarse el mismo valor umbral. Las variaciones del tiempo de vuelo ΔTOF nuevamente se miden entre señales consecutivas.

- En cuanto al método del *máximo con interpolación*, se ubica el máximo con el mismo criterio que en la forma original (*máximo*) y junto a éste se usan los valores de amplitud anterior y el posterior con sus respectivos tiempos. Con estas tres muestras, se aplica la interpolación parabólica. Además, se realizan dos pruebas para determinar el grado de influencia de la cantidad de nuevos puntos obtenidos con la interpolación. En concreto, se trabaja con 11 y 51 puntos para reducir la resolución inicial de 2 ns a 0,4 ns y 0,08 ns respectivamente.

- Por el lado del *cruce por cero con interpolación*, también se parte de lo hecho con el método original (*cruce por cero*). Tomando, junto al tiempo del valor de amplitud positivo más cercano a cero, el tiempo del valor de amplitud negativo que le precede y con estos dos datos se

realiza la interpolación lineal. Igualmente, se comparan los resultados obtenidos al interpolar con 11 y 51 nuevos puntos en cuyo caso se obtienen resoluciones de 0.2 ns y 0.04 ns respectivamente. Como hasta el momento, en estos dos últimos casos también se mide las variaciones del tiempo de vuelo ΔTOF entre señales consecutivas.

- Respecto al método de la *correlación cruzada*, pruebas preliminares han sido útiles para determinar que el método se desempeña mejor si se aplica entre la primera muestra obtenida (usada como referencia) y cada una de las posteriores señales. Si se aplica entre señales consecutivas, el método se ve afectado negativamente cuando las variaciones no están en el orden del período de muestreo, haciendo que el error cometido sea más grande y se vaya acumulando.

- En el método de la *diferencia de fases*, es importante determinar con qué número de muestras se va a desarrollar la FFT de cada señal. Como primera medida, ya que se trabaja con ventanas que contienen 15000 muestras de la onda, se empieza utilizando el mínimo número que se ajusta, 16384 puntos (2^{14}). Teniendo en cuenta que la resolución de este método se puede mejorar aumentando el número de puntos, se realizan pruebas con 32768 puntos (2^{15}) y 65536 puntos (2^{16}) para observar cuáles serían las diferencias. En este caso, las variaciones del tiempo de vuelo ΔTOF se miden entre señales consecutivas.

- Finalmente, para el método de la *diferencia de pendientes* se intenta hacer un tratamiento similar al de *diferencias de fases*, llevando a cabo pruebas con dos cantidades de puntos diferentes para la FFT, 2^{14} y 2^{15} . En esta ocasión, 2^{16} es descartado ya que pruebas preliminares mostraban un excesivo incremento en el tiempo de ejecución y unos resultados incluso inferiores a los obtenidos con 2^{15} . Siguiendo la recomendación de literatura (Ibáñez *et al.*, 2000), se crea una señal ideal (sin ruido) para usarla como referencia y en consecuencia las variaciones del tiempo de vuelo ΔTOF se calculan entre esta referencia y cada una de las demás señales.

4.2.7.1 Resultados obtenidos y discusión

Las Tablas 4.1 y 4.2 recopilan los valores de RMSE calculados con los resultados producidos por cada uno de los métodos, aplicados en los 4 diferentes casos de interés, y los vectores de referencia de tiempos. Estos últimos, formados por sumas acumuladas de cada uno de los valores de retardo usados. En un primer análisis, se mantiene la SNR en 15 dB y seguidamente, Tablas 4.3 y 4.4, se lleva a cabo el mismo procedimiento cambiando la SNR a 35 dB.

RMSE (ns)								
RETARDO APLICADO (ns)	UMBRAL	MÁXIMO	MÁXIMO INTERP	CRUCE POR CERO	CRUCE POR CERO INTERP	CORRELACIÓN CRUZADA	DIFERENCIA DE PENDIENTES	DIFERENCIA DE FASES
0,8	11,790_2,071	11,781_2,109	11,973_2,072	9,286_1,308	8,851_1,144	2,086_0,645	6,465_6,486	0,670_0,603
			11,885_2,112		8,829_1,175		7,450_7,510	0,617_0,556
1,2	11,760_2,176	11,718_2,241	11,931_2,121	10,521_1,380	10,045_1,115	2,298_0,632	6,410_6,413	0,740_0,667
			11,854_2,165		10,015_1,161		7,367_7,427	0,616_0,554
1,5	8,752_2,183	8,812_2,219	8,950_2,127	8,864_1,430	8,349_1,110	2,228_0,667	6,378_6,370	0,795_0,719
			8,897_2,158		8,320_1,156		7,298_7,360	0,615_0,552
2	8,922_2,154	8,931_2,059	9,143_2,032	9,695_1,327	9,310_1,126	2,098_0,000	6,348_6,326	0,890_0,808
			9,062_2,092		9,276_1,166		7,169_7,242	0,612_0,548
3,8	8,699_2,060	8,634_1,961	8,791_1,970	8,603_1,455	8,318_1,253	2,203_0,610	6,460_6,452	1,246_1,158
			8,717_2,020		8,290_1,295		6,636_6,770	0,605_0,537
7,2	10,137_2,109	10,034_2,067	10,137_1,978	9,749_1,486	9,164_1,314	1,784_0,607	6,924_7,123	1,911_1,833
			10,058_2,004		9,129_1,363		6,249_6,379	0,590_0,536
11,6	12,123_1,980	12,129_2,032	12,323_1,965	9,718_1,507	9,289_1,319	2,098_0,620	6,591_6,834	2,598_2,538
			12,226_2,029		9,280_1,352		7,471_7,543	0,530_0,489
15,3	9,545_1,875	9,535_1,981	9,790_1,926	9,266_1,498	8,854_1,324	1,854_0,702	6,640_6,789	3,393_3,336
			9,676_1,988		8,816_1,361		7,481_7,637	0,601_0,537
20	10,575_1,625	10,752_2,263	10,888_2,022	9,051_1,467	8,695_1,264	1,549_0,000	6,602_6,967	4,401_4,336
			10,812_2,106		8,661_1,287		6,980_7,081	0,511_0,475
27,1	10,780_1,981	10,860_2,335	10,910_2,070	10,373_1,517	9,990_1,209	1,938_0,685	7,250_7,320	5,876_5,783
			10,846_2,123		9,963_1,238		6,554_6,646	0,505_0,496

Tabla 4.1 RMSE para señales con SNR de 15 dB; variando sólo el retardo, primer valor sin etapa de filtrado y segundo valor con etapa de filtrado.

Máximo interp y *Cruce por cero interp*: primera línea = interpolación con 11 puntos; segunda línea = interpolación con 51 puntos.

Diferencia de pendientes: primera línea = FFT con 2^{14} puntos; segunda línea = FFT con 2^{15} puntos.

Diferencia de fases: primera línea = FFT con 2^{14} y 2^{15} puntos; segunda línea = FFT con 2^{16} puntos.

RMSE (ns)								
RETARDO APLICADO (ns)	UMBRAL	MÁXIMO	MÁXIMO INTERP	CRUCE POR CERO	CRUCE POR CERO INTERP	CORRELACIÓN CRUZADA	DIFERENCIA DE PENDIENTES	DIFERENCIA DE FASES
0,8	10,456_1,910	11,563_2,094	11,033_2,375	10,119_1,673	9,777_1,376	1,980_0,704	8,865_8,787	0,650_0,672
			11,082_2,467		9,756_1,405		6,712_6,774	0,448_0,496
1,2	10,531_2,063	11,486_2,224	11,032_2,354	10,497_1,968	10,133_1,392	2,090_0,704	8,799_8,703	0,718_0,738
			11,084_2,421		10,103_1,416		6,709_6,755	0,445_0,494
1,5	8,654_1,940	9,607_2,060	9,205_2,280	11,592_1,710	11,180_1,393	1,834_0,803	8,738_8,634	0,772_0,789
			9,236_2,368		11,152_1,408		6,702_6,735	0,443_0,492
2	9,621_1,876	10,80_2,079	10,322_2,190	10,342_1,766	9,896_1,357	2,245_0,000	8,616_8,508	0,865_0,879
			10,345_2,296		9,874_1,385		6,681_6,688	0,440_0,488
3,8	11,467_2,129	12,538_1,890	12,025_2,176	8,624_1,631	8,326_1,294	1,907_0,707	8,057_8,055	1,227_1,230
			12,093_2,287		8,273_1,314		6,525_6,429	0,436_0,471
7,2	9,760_1,931	10,905_2,514	10,460_2,686	11,732_1,595	11,299_1,155	2,366_0,657	7,555_7,793	1,933_1,919
			10,489_2,796		11,264_1,172		6,103_5,957	0,443_0,452
11,6	11,191_1,996	12,277_1,859	11,815_2,025	10,359_1,600	10,017_1,082	2,169_0,716	8,098_8,002	2,703_2,672
			11,843_2,152		9,998_1,106		5,725_5,755	0,422_0,450
15,3	12,063_2,364	13,056_2,464	12,630_2,653	9,197_1,517	8,887_1,165	2,043_0,730	8,021_8,367	3,544_3,510
			12,637_2,777		8,862_1,179		5,930_5,888	0,510_0,524
20	11,285_1,939	12,339_2,298	11,841_2,260	10,70_1,625	10,358_1,290	1,833_0,000	7,559_7,642	4,536_4,521
			11,881_2,360		10,334_1,317		6,766_6,695	0,427_0,453
27,1	11,185_2,212	12,387_2,446	11,860_2,245	11,102_1,736	10,709_1,391	1,991_0,713	8,243_8,417	5,897_5,924
			11,915_2,361		10,677_1,407		6,319_6,196	0,387_0,393

Tabla 4.2 RMSE para señales con SNR de 15 dB; variando el retardo y la amplitud, primer valor sin etapa de filtrado y segundo valor con etapa de filtrado.

Máximo interp y *Cruce por cero interp*: primera línea = interpolación con 11 puntos; segunda línea = interpolación con 51 puntos.

Diferencia de pendientes: primera línea = FFT con 2^{14} puntos; segunda línea = FFT con 2^{15} puntos.

Diferencia de fases: primera línea = FFT con 2^{14} y 2^{15} puntos; segunda línea = FFT con 2^{16} puntos.

RMSE (ns)								
RETARDO APLICADO (ns)	UMBRAL	MÁXIMO	MÁXIMO INTERP	CRUCE POR CERO	CRUCE POR CERO INTERP	CORRELACIÓN CRUZADA	DIFERENCIA DE PENDIENTES	DIFERENCIA DE FASES
0,8	4,310_0,903	7,486_0,876	7,474_0,188	1,798_0,955	0,992_0,150	0,566_0,566	0,644_0,647	0,202_0,193
			7,442_0,215		1,012_0,122		0,745_0,750	0,054_0,049
1,2	4,575_0,955	8,120_0,980	8,128_0,219	1,518_0,930	0,937_0,155	0,566_0,566	0,639_0,639	0,282_0,272
			8,113_0,230		0,938_0,121		0,737_0,742	0,050_0,046
1,5	4,167_0,982	9,289_0,962	9,051_0,227	1,626_0,941	0,874_0,156	0,604_0,604	0,636_0,635	0,342_0,333
			9,025_0,225		0,893_0,122		0,730_0,735	0,048_0,044
2	4,418_0,490	8,173_0,40	7,966_0,196	1,649_0,000	0,929_0,155	0,000_0,000	0,632_0,630	0,443_0,434
			7,956_0,222		0,943_0,123		0,717_0,724	0,045_0,042
3,8	4,501_0,982	7,737_0,949	7,687_0,206	1,794_0,940	0,996_0,167	0,583_0,583	0,645_0,643	0,813_0,804
			7,683_0,213		1,018_0,134		0,664_0,676	0,039_0,039
7,2	4,112_0,996	7,065_0,930	6,932_0,170	1,345_0,955	0,801_0,188	0,566_0,566	0,690_0,711	1,474_1,467
			6,907_0,212		0,802_0,153		0,625_0,637	0,069_0,073
11,6	4,536_0,972	7,133_0,955	7,097_0,179	1,357_0,955	0,793_0,217	0,566_0,566	0,660_0,682	2,174_2,172
			7,076_0,207		0,808_0,178		0,747_0,753	0,277_0,281
15,3	4,103_0,906	7,976_0,928	7,911_0,201	1,720_0,906	0,942_0,204	0,570_0,570	0,662_0,676	3,019_3,016
			7,893_0,210		0,959_0,182		0,748_0,764	0,295_0,299
20	4,089_0,283	5,913_0,566	5,860_0,240	1,744_0,000	0,974_0,172	0,000_0,000	0,660_0,700	4,058_4,053
			5,852_0,244		0,988_0,135		0,697_0,706	0,2736_0,282
27,1	4,449_1,014	7,411_0,910	6,937_0,227	1,396_0,936	0,787_0,163	0,570_0,570	0,725_0,728	5,487_5,475
			6,888_0,240		0,795_0,131		0,656_0,667	0,379_0,383

Tabla 4.3 RMSE para señales con SNR de 35 dB; variando sólo el retardo, primer valor sin etapa de filtrado y segundo valor con etapa de filtrado.

Máximo interp y *Cruce por cero interp*: primera línea = interpolación con 11 puntos; segunda línea = interpolación con 51 puntos.

Diferencia de pendientes: primera línea = FFT con 2^{14} puntos; segunda línea = FFT con 2^{15} puntos.

Diferencia de fases: primera línea = FFT con 2^{14} y 2^{15} puntos; segunda línea = FFT con 2^{16} puntos.

RMSE (ns)								
RETARDO APLICADO (ns)	UMBRAL	MÁXIMO	MÁXIMO INTERP	CRUCE POR CERO	CRUCE POR CERO INTERP	CORRELACIÓN CRUZADA	DIFERENCIA DE PENDIENTES	DIFERENCIA DE FASES
0,8	2,350_0,955	7,703_0,903	7,572_0,204	1,308_0,980	0,897_0,165	0,566_0,566	0,887_0,881	0,202_0,203
			7,551_0,226		0,860_0,141		0,672_0,678	0,039_0,045
1,2	2,366_0,903	8,880_0,930	8,738_0,212	1,368_0,955	0,983_0,167	0,566_0,566	0,879_0,871	0,282_0,282
			8,740_0,222		0,930_0,141		0,671_0,676	0,038_0,043
1,5	2,334_0,941	8,850_0,919	8,768_0,227	1,416_0,941	0,953_0,148	0,604_0,604	0,873_0,864	0,342_0,342
			8,734_0,213		0,912_0,138		0,670_0,674	0,037_0,043
2	2,154_0,400	7,663_0,632	7,554_0,212	1,575_0,000	1,050_0,162	0,000_0,000	0,860_0,850	0,443_0,443
			7,516_0,207		1,010_0,137		0,682_0,670	0,036_0,042
3,8	2,316_0,974	8,556_0,974	8,475_0,181	1,703_0,940	1,219_0,139	0,583_0,583	0,807_0,807	0,813_0,811
			8,447_0,203		1,164_0,129		0,652_0,642	0,039_0,043
7,2	2,485_0,947	7,230_0,921	7,109_0,219	1,649_0,930	1,073_0,117	0,566_0,566	0,758_0,782	1,477_1,475
			7,065_0,254		1,032_0,108		0,611_0,597	0,072_0,074
11,6	2,082_0,955	9,065_0,876	8,898_0,196	1,620_0,980	1,141_0,117	0,566_0,566	0,811_0,803	2,186_2,187
			8,820_0,196		1,122_0,100		0,571_0,577	0,279_0,284
15,3	2,188_0,949	7,945_0,970	7,890_0,230	1,254_0,915	0,803_0,145	0,570_0,570	0,807_0,841	3,035_3,033
			7,843_0,254		0,770_0,141		0,593_0,591	0,294_0,297
20	2,383_0,566	7,172_0,632	7,122_0,247	1,386_0,000	1,050_0,152	0,000_0,000	0,758_0,765	4,072_4,070
			7,094_0,242		1,030_0,131		0,679_0,673	0,284_0,288
27,1	1,971_0,982	9,034_1,057	8,590_0,244	1,367_0,986	0,950_0,145	0,570_0,570	0,823_0,838	5,498_5,498
			8,521_0,248		0,898_0,139		0,632_0,622	0,398_0,399

Tabla 4.4 RMSE para señales con SNR de 35 dB; variando el retardo y la amplitud, primer valor sin etapa de filtrado y segundo valor con etapa de filtrado.

Máximo interp y *Cruce por cero interp*: primera línea = interpolación con 11 puntos; segunda línea = interpolación con 51 puntos.

Diferencia de pendientes: primera línea = FFT con 2^{14} puntos; segunda línea = FFT con 2^{15} puntos.

Diferencia de fases: primera línea = FFT con 2^{14} y 2^{15} puntos; segunda línea = FFT con 2^{16} puntos.

Dentro de los aspectos interesantes que se pueden observar con los resultados proporcionados y contenidos en estas Tablas, encontramos:

- Las técnicas del *umbral*, *máximo* y *máximo con interpolación* son métodos que precisan señales de entrada con una SNR relativamente alta e incluso, es aconsejable implementar la etapa previa de filtrado digital que permita mejorar este nivel de SNR. El aplicar cada método entre señales consecutivas permite evitar que las variaciones de amplitud sean de

gran influencia y en cuanto a la interpolación, se determina que una mayor cantidad de puntos no mejora los resultados de forma considerable.

- Con la técnica de *cruce por cero* se consiguen mejores resultados para señales con una SNR de bajo valor y etapa de filtrado. Además, los resultados son aceptables cuando el retardo entre señales es mayor que la resolución con que se cuenta, en este caso 2 ns. Nuevamente, al aplicar el método entre señales consecutivas se observa poca influencia de las variaciones en amplitud. En su versión modificada, *cruce por cero con interpolación*, se observa una notable mejora a partir de la prueba con bajo valor de SNR y etapa de filtrado por lo que en este caso, podemos contar con un método de sencilla aplicación y buenas respuestas. Nuevamente, se establece que una gran cantidad de puntos en la interpolación no es relevante.

- El método de la *correlación cruzada* deja ver que no es recomendable para usar en señales con una SNR baja sin etapa de filtrado. Una vez se usa el filtro o se aplique a señales de SNR alta, su desempeño mejora notablemente, llegando a ser uno de los métodos más exactos con respuestas perfectas cuando el retardo entre señales es igual al período de muestreo o un múltiplo entero de éste.

- En la *diferencia de pendientes*, se observa que el método proporciona muy buena resolución (RMSE bajo) sólo si las señales que se procesan tienen una SNR alta o muy alta en cuyo caso, se puede obviar el empleo de filtro. Además, se comprueba que es suficiente trabajar la FFT con el mínimo número de puntos posible, 2^{14} .

- La *diferencia de fases* es el método que de forma general se ve más apto para utilizar directamente sobre las señales recopiladas. Es decir, no es necesario usar etapa de filtro, incluso para señales con bajo valor de SNR. Igualmente, no se ve afectado de forma importante por las variaciones de amplitud y al desarrollar la FFT con 2^{14} puntos (mínimo posible), se confirma que el error es proporcional a los retardos entre señales. Así, a mayor retardo, mayor es la RMSE, llegando inclusive, para valores de retardo bastante más grandes que el período de muestreo, a tener un error superior que el que proporcionan la mayoría de los otros métodos. Este último efecto se llega a mejorar aumentando el número de puntos de la FFT. En esta oportunidad, se ha podido comprobar que trabajando con 2^{15} puntos las respuestas siguen siendo exactamente iguales a las de 2^{14} , pero para 2^{16} puntos se empieza a contar con el método que proporciona mejor resolución. En este último caso, los valores de la RMSE son muy inferiores comparados con los de los otros métodos y sólo se ven superados por las respuestas de la *correlación cruzada* cuando los retardos son del valor del período de muestreo o múltiplos enteros de este. El precio a pagar, como se comprobará más adelante, viene relacionado con el coste computacional que es altamente dependiente del número de puntos usado en la FFT. Por

otra parte, sobrepasar 2^{16} puntos no representa una mejora significativa en las respuestas obtenidas.

Finalmente, teniendo en cuenta que el método del *umbral* es el más rápido en cuanto a tiempo de CPU se refiere, éste se utilizó como referencia para comparar el tiempo de cómputo de los otros métodos, Tabla 4.5, una vez se define la configuración de funcionamiento más apta para algunos de ellos: interpolaciones con 11 puntos, número de puntos de la FFT para *diferencia de pendientes* 2^{14} y para *diferencia de fases* 2^{16} .

TIEMPO DE CPU	
UMBRAL	1,00
MÁXIMO	1,02
CRUCE POR CERO	1,02
CRUCE POR CERO CON INTERPOLACIÓN	1,10
MÁXIMO CON INTERPOLACIÓN	1,15
CORRELACIÓN CRUZADA	4,10
DIFERENCIA DE PENDIENTES	198,05
DIFERENCIA DE FASES	4645,08

Tabla 4.5 Relación de tiempos de ejecución usando como referencia el método del *umbral*.

Como se observa, contar con un método de muy alta resolución y excelentes resultados como el de la *diferencia de fases* con FFT de 2^{16} puntos, conlleva un alto coste computacional, mientras que las opciones más sencillas de *máximo con interpolación* y *cruce por cero con interpolación*, se presentan como técnicas cuya relación eficiencia-resultados puede ser suficiente en muchas aplicaciones.

4.2.8 Comparación del desempeño de los métodos mediante prueba experimental

La comparación experimental de los resultados obtenidos con cada método se lleva a cabo procesando la información recopilada cuando se monitoriza, durante 11 días consecutivos, un medio líquido (vino tinto) utilizando el sensor de medida ultrasónico diseñado y descrito en el Capítulo 3. En este caso, el tiempo de propagación de las diferentes ondas ultrasónicas registradas se verá alterado, principalmente, por las variaciones de temperatura y los cambios físico-químicos que ocurren en el medio a analizar.

El sistema de monitorización se ha configurado para que cada tres horas realice tres medidas consecutivas que serán promediadas posteriormente. De otro lado, se ha podido

comprobar que las señales adquiridas presentan una SNR promedio de 34 dB que, tras aplicar una etapa de filtrado durante el procesado, se incrementa a 48 dB.

En la Figura 4.10 se puede observar la representación gráfica de la variación acumulada del tiempo de vuelo registrado por cada uno de los métodos utilizados.

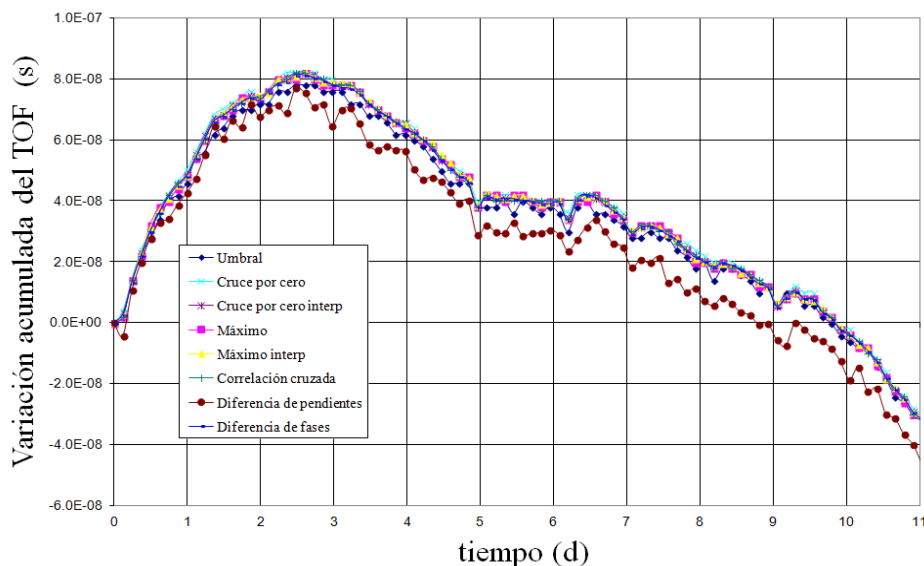


Figura 4.10 Variación acumulada del *TOF* experimental.

Puesto que se trata de una prueba experimental en la que se desconoce lo que se está midiendo, de acuerdo con las conclusiones obtenidas en el apartado anterior, la curva obtenida con el método de *diferencia de fases* (con 2^{16} puntos para la FFT) se utiliza como referencia para calcular el valor RMSE de los otros métodos, Tabla 4.6.

RAÍZ DEL ERROR CUADRÁTICO MEDIO (ns)	
UMBRAL	2,47
MÁXIMO	0,94
MÁXIMO CON INTERPOLACIÓN	0,85
CRUCE POR CERO	1,36
CRUCE POR CERO CON INTERPOLACIÓN	0,63
CORRELACIÓN CRUZADA	0,62
DIFERENCIA DE PENDIENTES	9,92

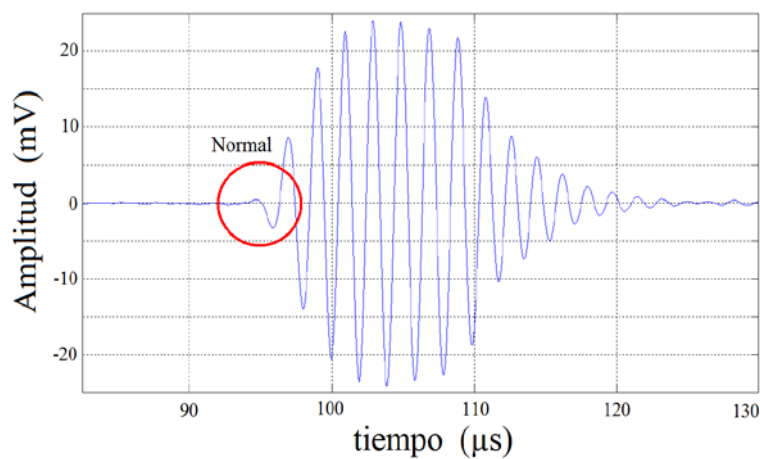
Tabla 4.6 Raíz del error cuadrático medio de resultados experimentales usando el método de la *diferencias de fases* como referencia.

Como era de esperar, después de los resultados observados en las simulaciones, el método de la *correlación cruzada* se presenta como el de menor error y por tanto, el de segundo mejor desempeño. Aunque también sobresale la propuesta del método de *cruce por cero con interpolación* con un valor de error muy parecido. Por el contrario, los peores resultados fueron obtenidos con el método de la *diferencia de pendientes*, hasta el punto de ser el método que presenta la mayor diferencia entre simulación y prueba experimental. Esto puede deberse, en parte, a la dificultad de contar con una señal de referencia ideal (sin ruido), siendo necesario, en este caso, usar la primera de las señales recibidas.

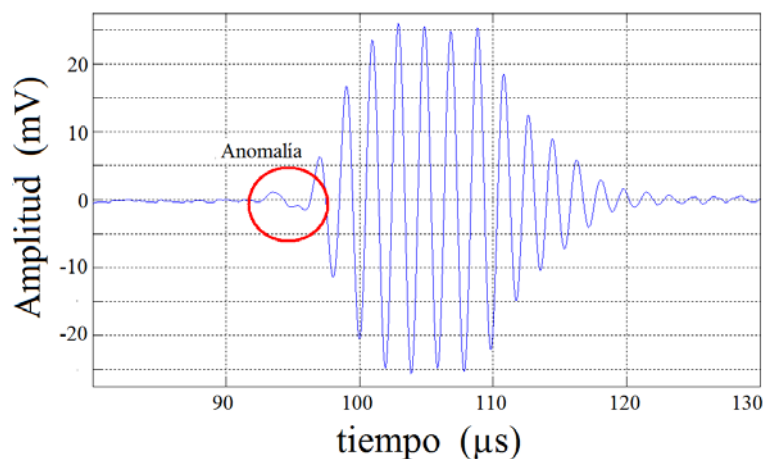
Como resultado general, seis de los métodos seleccionados están en capacidad de producir un error menor que el período de muestreo. Por lo tanto, la selección de uno de ellos dependerá de los recursos disponibles para cada caso en cuestión.

Por otro lado, una situación que se ha presentado en la toma de medidas experimentales y que influye notoriamente en los resultados de los métodos en el dominio del tiempo, se encontró cuando esporádicamente uno los ecos recibidos presentaba una anomalía en el momento de su recepción.

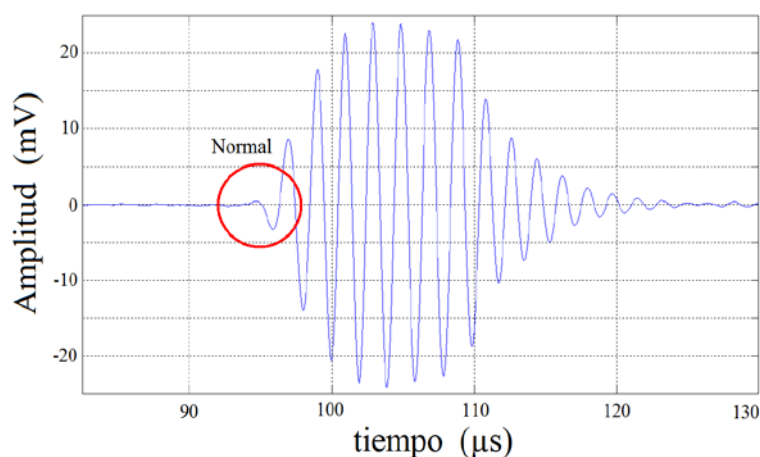
En la Figura 4.11 se observan tres señales consecutivas a), b) y c), en las cuales la intermedia (Figura 4.11.b) se ve alterada al inicio por lo que podría ser un fallo en el momento de la recepción o una reacción imprevista y momentánea del medio. Esto provoca un desplazamiento de toda la señal que, a partir de la siguiente, es nuevamente corregido, dejando que el sistema siga operando de forma normal (Figura 4.11.c).



a)



b)



c)

Figura 4.11 a), b) y c) Tres ecos consecutivos donde el del medio presenta una anomalía en su inicio.

Con el fin de determinar la forma en que influyen anomalías como ésta al desempeño de los métodos que calculan variaciones del *TOF*, se realiza la selección y posterior análisis de nueve señales ultrasónicas donde la que ocupa la quinta posición es la que presenta dicho defecto. En la Figura 4.12 se representa la respuesta de las variaciones acumuladas del *TOF* obtenida con los ocho métodos aplicados a este pequeño conjunto de datos.

Como se puede notar, los métodos que operan en el dominio del tiempo se ven más afectados al producirse un desplazamiento indebido de la onda y es el método de la *diferencia de fases* el que, por su robustez, presenta la respuesta menos alterada.

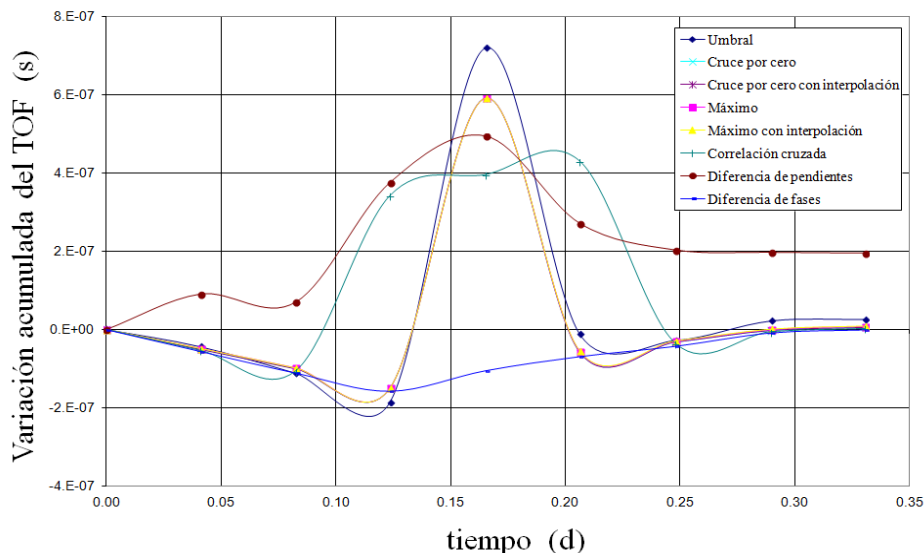


Figura 4.12 Respuesta de los 8 métodos ante una anomalía esporádica presentada en la señal central dentro de un conjunto de 9 ecos recopilados.

Como conclusión, teniendo en cuenta los diferentes resultados anteriormente presentados, se toma la decisión de seleccionar el método de la *diferencia de fases* como la técnica a aplicar para el cálculo de las variaciones del tiempo de vuelo ΔTOF , y el posterior cálculo de las variaciones de velocidad Δc , entre las ondas ultrasónicas adquiridas por el sistema de medida presentado en esta Tesis. De forma similar, el método del *cruce por cero con interpolación* será el empleado para calcular los tiempos de vuelo TOF_{ref} en las medidas usadas para obtener las respectivas velocidades de referencia c_{ref} .

5. MATERIALES Y MÉTODOS

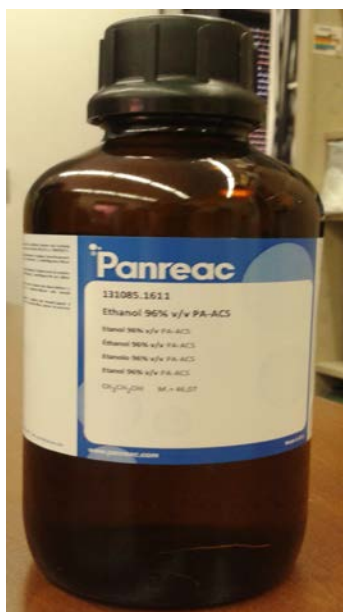
5.1 Introducción

En este capítulo se agrupan los recursos (técnica, materiales e instrumentos) empleados para llevar a cabo el desarrollo del presente trabajo. La elaboración de soluciones acuosas y soluciones hidroalcohólicas para medir velocidad, mientras se simula la evolución de los principales compuestos que intervienen durante la FML, se explica en el apartado 5.2. La descripción completa del sistema de medida diseñado para operar en ambiente de laboratorio, las modificaciones necesarias para trabajar en campo y la estrategia para medir, de forma continua, temperatura en el interior de los tanques de fermentación son definidos en el apartado 5.3. La descripción del procesado de las señales recopiladas así como la estimación del error en las medidas, se consideran en el apartado 5.4. Para poner a prueba todo el sistema de medida, contrastar los conocimientos y resultados obtenidos en las pruebas de laboratorio y correlacionar las medidas ultrasónicas con medidas de parámetros enológicos convencionales, se lleva a cabo una serie de monitorizaciones con vinos reales en proceso de FML ubicados en plantas piloto de grupos colaboradores o bien en bodegas de vinicultores. Todos los montajes realizados y vinos monitorizados se describen en el apartado 5.5.

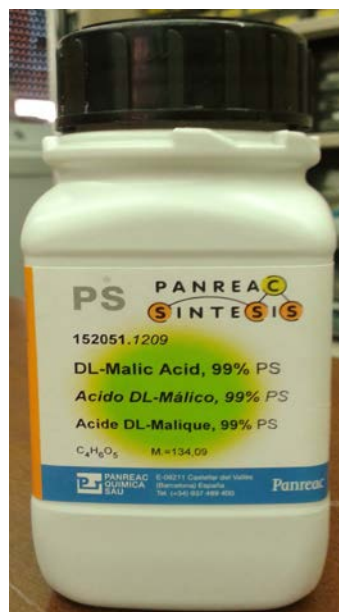
5.2 Preparación de muestras para pruebas en laboratorio

5.2.1 Reactivos

Los reactivos utilizados para preparar las diferentes mezclas necesarias durante las pruebas llevadas a cabo en laboratorio comprenden: agua destilada, Etanol 96% v/v PA-ACS (Panreac Química S.L.U., Barcelona, Cataluña, España) Figura 5.1.a, Ácido DL-Málico pureza >99% (Panreac Química S.L.U., Barcelona, Cataluña, España) Figura 5.1.b, Ácido L(+)-Láctico pureza >95% (Panreac Química S.L.U., Barcelona, Cataluña, España) Figura 5.2.a y Acido L(+)-Tartárico (Panreac Química S.L.U., Barcelona, Cataluña, España) Figura 5.2.b.



a)



b)

Figura 5.1 a) Etanol y b) Ácido málico utilizados para preparar las mezclas en laboratorio.



a)



b)

Figura 5.2 a) Ácido láctico y b) Ácido tartárico utilizados para preparar las mezclas en laboratorio.

5.2.2 Mezclas

Las diferentes mezclas realizadas se pueden dividir en dos conjuntos, el primero de ellos se lleva a cabo utilizando agua destilada como solvente (soluciones acuosas) y el segundo, utilizando una solución agua-etanol (soluciones hidroalcohólicas).

Las soluciones acuosas se realizan mezclando cantidades discretas de ácido málico o ácido láctico en agua destilada contenida en un vaso de precipitado de 600 ml, Figura 5.3, y de tal forma que la concentración de ácidos vaya aumentando en saltos de 0,25 g/ml. Para seleccionar y agregar las cantidades exactas de reactivos, se cuenta con la ayuda de una balanza digital COBOS CB-Compleat (precisión 0,001 g), Figura 5.4.a, y una pipeta de microlitros P200 Gilson's PIPETMAN P (Gilson, Villiers-le-Bel, Francia), Figura 5.4.b.

Respecto a las soluciones hidroalcohólicas, la metodología es similar, pero usando como solvente soluciones agua-etanol al 12% preparadas con ayuda de una pipeta de 10 ml (Duran, Alemania) y varios matraces aforados de 100 y 1000 ml.

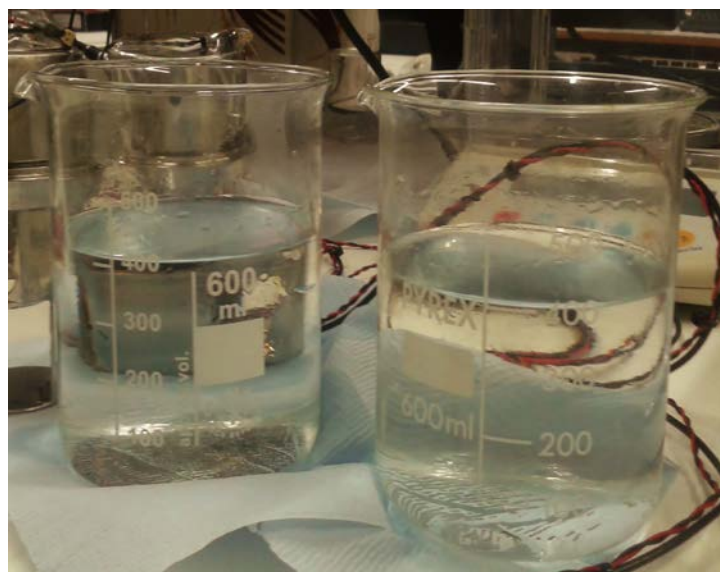


Figura 5.3 Vasos de precipitado para preparar soluciones acuosas y soluciones hidroalcohólicas.



a)



b)

Figura 5.4 a) Balanza digital COBOS y b) Pipeta de microlitros GILSON utilizados para obtener las cantidades necesarias de reactivos a mezclar en laboratorio.

5.2.3 Muestras de vino tinto

En las pruebas de laboratorio donde se utilizan muestras de vino tinto, se cuenta con la ayuda y suministro por parte de INCAVI (Institut Català de la Vinya i el Vi). De esta manera, para observar los efectos de la temperatura y la turbidez en la velocidad de propagación de los ultrasonidos, se utiliza un lote de vino genérico de la variedad Merlot cuyas propiedades se resumen en la Tabla 5.1.

Parámetro	
Grado alcohólico volumétrico (% vol.)	1,54
pH	3,29
Azúcar residual (g/l)	2,40
Acidez total (g/l de ácido tartárico)	8,80
Acidez volátil (g/l de ácido acético)	5,18

Tabla 5.1 Características de interés enológico del lote de vino tinto Merlot utilizado para pruebas en laboratorio.

De igual forma, en el caso de las medidas de turbidez se agrega, a varias muestras de este lote, heces de vino (levadura muerta, levadura residual y otras partículas que se precipitan en el

fondo del depósito) del propio vino hasta ir alcanzando diversos valores en el rango de 0,6 a 520 NTU (unidades nefelométricas), dichos valores son confirmados con ayuda de un turbidímetro Ratio/XR (HACH Company).

5.3 Sistema ultrasónico de medida

Durante las pruebas realizadas en el desarrollo de la presente Tesis, las variaciones de velocidad Δc y la posterior velocidad de los ultrasonidos c se ha medido usando la técnica de *pulso-eco* combinada con el uso de un *buffer rod*. Este método de medida ya fue descrito en detalle en el apartado 3.3 del Capítulo 3. En cuanto al procesado necesario para llegar a los valores de velocidad, a las señales adquiridas se les aplica el método de la *diferencia de fases* basado en la FFT y descrito en el apartado 4.2.5 del Capítulo 4. De esta forma, a partir del espectro de fase, se obtienen inicialmente variaciones del *TOF* entre señales consecutivas que pueden convertirse en valores absolutos utilizando una única medida de referencia.

5.3.1 Set-up para la adquisición de datos

La configuración del set-up de medida se realiza pensando en los dos tipos de pruebas a realizar. Por un lado, se encuentran las pruebas que se llevaran a cabo en un ambiente de laboratorio (Figura 5.5) y por otro, las pruebas realizadas en ambiente semi-industrial y/o industrial en plantas piloto y en bodegas vinícolas (Figura 5.6).

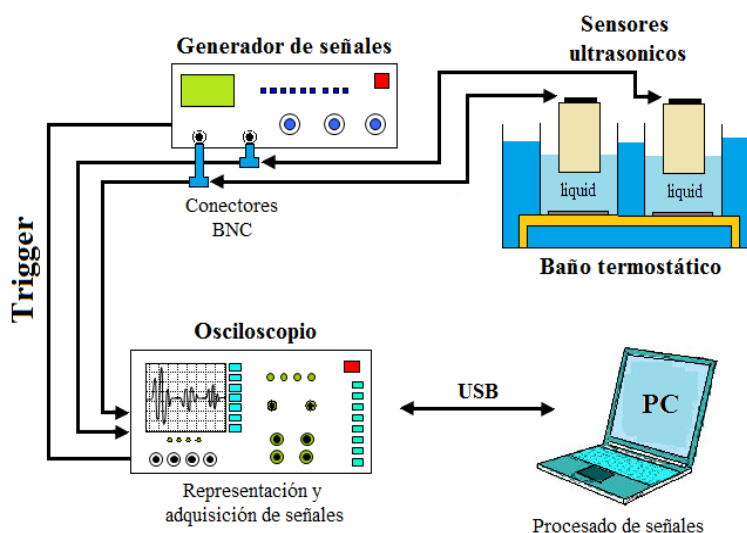


Figura 5.5 Esquema del sistema de medida ultrasónico para obtener variaciones de velocidad y/o velocidad de propagación en pruebas de laboratorio.

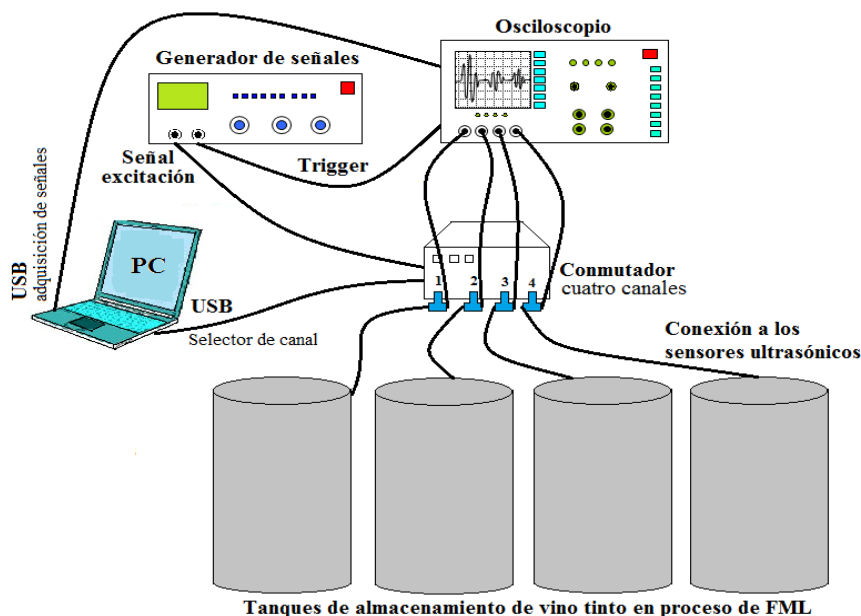


Figura 5.6 Esquema del sistema ultrasónico para obtener variaciones de velocidad y/o velocidad de propagación en pruebas de campo.

La estructura básica del sistema en los dos casos mencionados anteriormente es la misma donde, como se describirá más adelante, se presentan algunos cambios para conseguir el acoplamiento mecánico del sensor y para controlar la cantidad de sensores (canales) conectados simultáneamente. Como se puede observar en las dos figuras anteriores, el sistema de medida comprende los siguientes dispositivos:

- Ordenador personal.
- Osciloscopio digital Tektronix DPO 2024.
- Generador de funciones Agilent 33250A.
- Conmutador de cuatro canales.
- Sensor o sensores ultrasónicos.
- Baño termostático OMEGA HCTB-3030.

Con ayuda de una aplicación desarrollada en lenguaje de programación Visual Basic se lleva a cabo, entre otras cosas, la configuración y control de los elementos electrónicos, la definición de la cantidad de medidas consecutivas a realizar en cada toma de datos, la programación del intervalo de tiempo que separará dichas tomas de datos y, posteriormente, la adquisición y almacenamiento de los datos generados (señales ultrasónicas). Los algoritmos necesarios para el procesado de todas las señales adquiridas durante cada una de las diferentes pruebas realizadas y la presentación de los resultados obtenidos, se implementan con ayuda del software matemático MATLAB® (Math Works Inc., Natick, MA).

Durante la mayoría de pruebas realizadas en este trabajo, el generador de funciones (controlado vía USB) se configura para que emita un tren de ondas del orden de 10 ciclos, con amplitud de $20 V_{pp}$ y centrado en la frecuencia de resonancia del transductor ultrasónico utilizado (1 MHz). El osciloscopio digital (controlado vía USB), se configura para que trabaje con frecuencia de muestreo 500 MS/s, adquiera señales de 100000 puntos y use promediado de 128. En cuanto al conmutador de cuatro canales (controlado vía USB), Figura 5.7, con su uso se ofrece la oportunidad de realizar medidas en hasta cuatro muestras diferentes o cuatro tanques de fermentación, pudiéndose programar, como ya se ha mencionado, la cantidad de canales activos, el número de medidas consecutivas a realizar por cada activación de canal y el tiempo de espera antes de llevar a cabo una nueva serie de medidas.

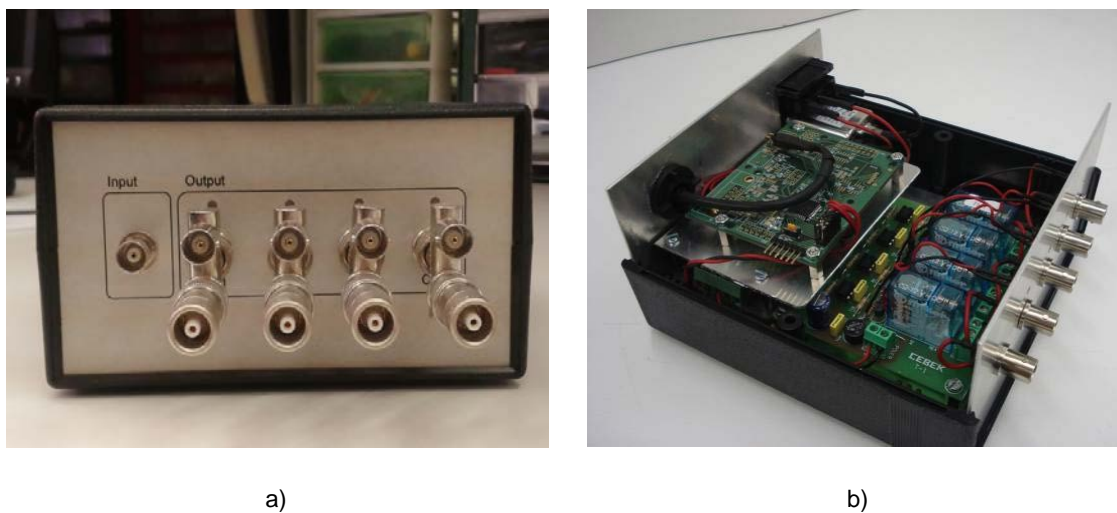


Figura 5.7 Sistema de conmutación de 4 canales controlable vía USB mediante aplicación software en PC a) Vista frontal b) Vista interna.

Cada vez que se cumple el intervalo de tiempo establecido, el sistema excita el transductor del canal seleccionado y hace una o más medidas ultrasónicas dependiendo de lo que se haya programado. La aplicación registra los datos de cada medida y los parámetros de configuración del osciloscopio en documentos de texto (*medida1, medida2, medida3.....medidan, config*) y los almacena en una carpeta nombrada con el siguiente formato: *año-mes-día-hora-minutos_prueba#*. Además, cada nuevo archivo creado se va guardando dentro de una carpeta principal llamada según el canal al que corresponda (*canal1, canal2, canal3 o canal4*), Figura 5.8. Este proceso se repite para cada uno de los canales con los que se trabaje y permite, de esta forma, llevar a cabo el correspondiente procesado de las señales inmediatamente después de finalizada una serie de medidas e igualmente, almacenar todas las señales adquiridas durante el tiempo que sea considerado necesario.

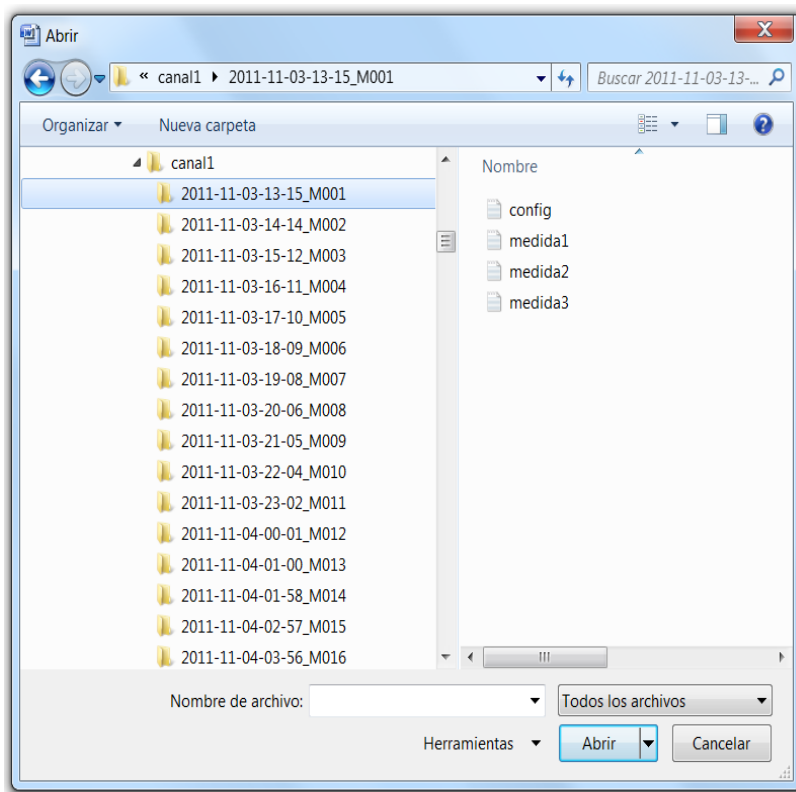


Figura 5.8 Almacenamiento de la información recopilada por el sistema de medida ultrasónico para cada canal activo.

5.3.2 Sensor ultrasónico

Según el desarrollo llevado a cabo en el Capítulo 3, el diseño del sensor ultrasónico estará compuesto de tres partes principales: transductor ultrasónico, *buffer rod* y reflector, Figura 5.9.

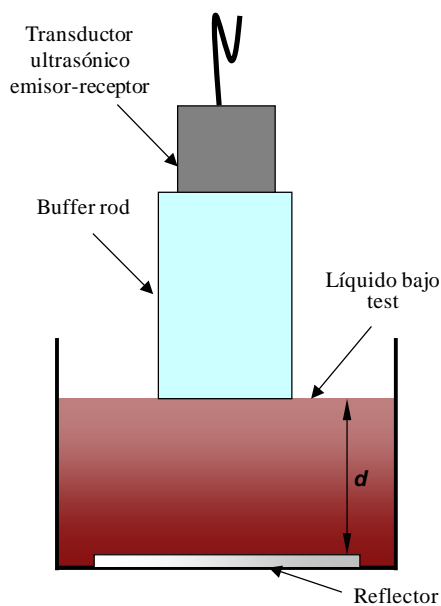


Figura 5.9 Esquema general del sensor ultrasónico diseñado para medir velocidad de propagación.

5.3.2.1 Transductor ultrasónico

El transductor de ultrasonidos es el elemento principal que forma parte del sensor ultrasónico diseñado. Dentro de una amplia lista de transductores ultrasónicos disponibles comercialmente, se contará con cinco transductores de contacto pertenecientes a dos fabricantes diferentes. Se eligen transductores de contacto de un solo elemento, con frecuencia de resonancia de 1 MHz y modo longitudinal, especialmente diseñados para la caracterización de materiales y la medida de velocidad del sonido y fabricados específicamente para resistir en ambientes de trabajo difíciles y para el contacto directo con la pieza bajo test o, en nuestro caso, con el *buffer rod*, Figura 5.10. Los transductores actuarán de emisores-receptores de las ondas ultrasónicas.

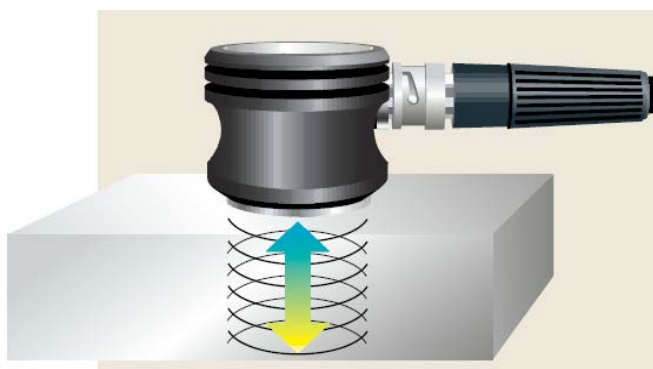


Figura 5.10 Funcionamiento general de un transductor ultrasónico de contacto (emisor-receptor) generador de ondas longitudinales (Imagen tomada de www.olympusNDT.com).

De esta manera, en el primer prototipo que se montó del sensor ultrasónico se utilizó un transductor PANAMETRICS ACCUSCAN A102S-RM y para los cuatro sensores ultrasónicos posteriores se utilizaron transductores GENERAL ELECTRIC B1F, Figura 5.11, siendo ambos tipos de transductores de características similares.



Figura 5.11 Transductor ultrasónico PANAMETRIC ACCUSCAN A102S-RM (izquierda) y transductor ultrasónico de la familia GENERAL ELECTRIC B1F (derecha) (Imagen tomada de www.olympusNDT.com).

Finalmente, en la Tabla 5.2 se resumen las principales características físicas de estas dos clases de transductores ultrasónicos.

Transductor ultrasónico	Diámetro del sensor (mm)	f (MHz)	Diámetro total (mm)	Altura total (mm)	Tipo de conector
PANAMETRIC ACCUSCAN A 102S-RM	25	1	31,75	16	Microdot
GENERAL ELECTRIC B1F	20	1	31	16	Microdot

Tabla 5.2 Características físicas de los transductores ultrasónicos utilizados.

5.3.2.2 Buffer rod y reflector

El mecanizado de los *buffer rod*, utilizados en el montaje de cinco sensores, se lleva a cabo empleando cilindros del material plástico Polietileno de alta densidad (*PEAD*), uno de los materiales permitidos para el contacto directo con alimentos. La Tabla 5.3 resume los parámetros acústicos y físicos que, para nuestro caso, más nos interesan de dicho material.

Velocidad acústica c (m/s)	Impedancia acústica Z (MRayl)	Densidad ρ (kg/m ³)	Diámetro (mm)
2430	2,33	960	40,95

Tabla 5.3 Características acústicas y físicas del material plástico Polietileno de alta densidad (*PEAD*).

El diámetro utilizado responde perfectamente a dos condiciones que demanda el sistema de medida. Por un lado, es mayor, en más de 1,5 veces, que el diámetro de los sensores de los transductores ultrasónicos (20 y 25,4 mm), una característica, ya mencionada en el Capítulo 3, que se recomienda para reducir la interferencia acústica producida en los bordes del cilindro (Adamowski *et al.*, 1998; Hoppe *et al.*, 2003; Garcia-Alvarez *et al.*, 2006; Garcia-Alvarez *et al.*, 2007). De otro lado, ya que el sistema está enfocado para ser utilizado en un entorno industrial, este diámetro es apto para que el *buffer rod* pueda ser introducido por el agujero roscado DN50 (diámetro interior de 53 mm) que, generalmente, tienen los tanques de fermentación de acero inoxidable para el vaciado.

En cuanto a la longitud del *buffer rod*, se ha obtenido que un valor óptimo está en los 49,6 mm. Para ello se ha utilizado el redimensionamiento descrito en el Capítulo 3 (secciones 3.4.1 y 3.4.2) y específicamente, la Ec. (3.19) para $\beta = 0,5$ y $n = 2$ (recepción de dos *ECO1* antes del primer *ECO2*, Figura 5.12), con una distancia entre *buffer rod* y *reflector* de 47 mm (distancia adecuada para que haya suficiente muestra líquida entre los dos componentes) y considerando una velocidad promedio de propagación en el líquido de 1500 m/s.

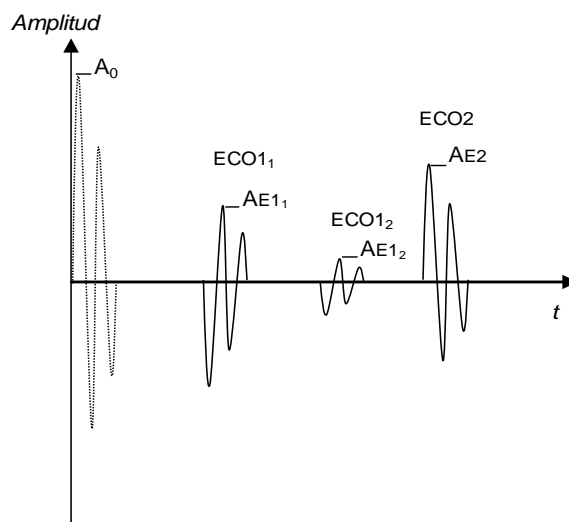


Figura 5.12 Representación del orden en que serán detectados los ecos de interés ($ECO1_1$ y $ECO2$) según la longitud del *buffer rod* y la distancia *BR-reflector* definidas.

Respecto al *reflector*, ya que debe estar siempre en contacto directo con el vino, se define que el material más adecuado a utilizar es el mismo del que están hechos los tanques de fermentación, es decir, acero inoxidable. De esta manera, aparte de conseguirse unas condiciones de reflexión óptimas (Capítulo 3, sección 3.4.3), se podrá considerar al reflector como una prolongación más del propio tanque.

5.3.2.3 Sensores ultrasónicos

El primer sensor que se construye es un prototipo pensado para realizar pruebas en laboratorio. En su montaje se utiliza el transductor PANAMETRICS ACCUSCAN A102S-RM. Su acabado final se puede observar en la Figura 5.13. En ella se aprecia el sensor ultrasónico montado en una estructura compuesta por tres varillas roscadas y tres anillos de PVC color grisáceo, la cual permite una correcta separación entre *buffer rod* y *reflector*. Entre los dos anillos superiores se ha colocado una junta tórica que evita, una vez sumergido el sensor, el líquido fluya por entre las paredes del *buffer rod* y el anillo de PVC hacia el transductor. También se mecanizó un pequeño disco del mismo material plástico que el *buffer rod* que permite anclar el transductor de ultrasonidos al *buffer rod*. El acoplo entre el transductor y el *buffer rod* se ha mejorado utilizando un gel de acoplamiento específico de PANAMETRICS.

En cuanto a los otros cuatro sensores, siguiendo con el objetivo de contar con un sistema de medida de utilidad industrial, se construyen dispositivos similares usando los transductores ultrasónicos GENERAL ELECTRIC B1F, todos ellos aptos para ser acoplados en los depósitos de acero inoxidable normalmente utilizados para almacenar el vino en proceso de FML, Figuras 5.14 y 5.15.

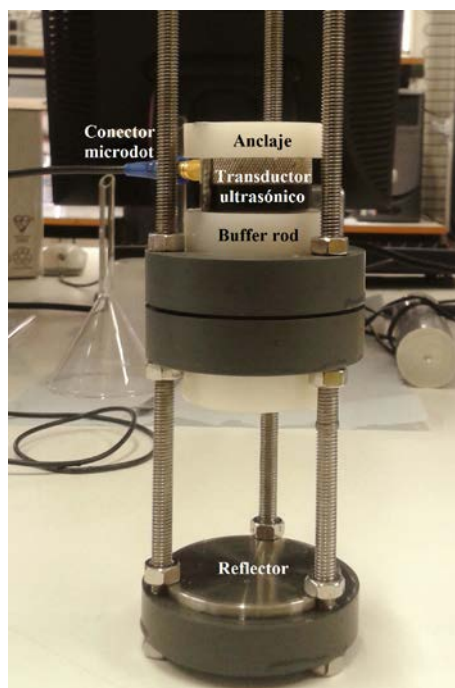
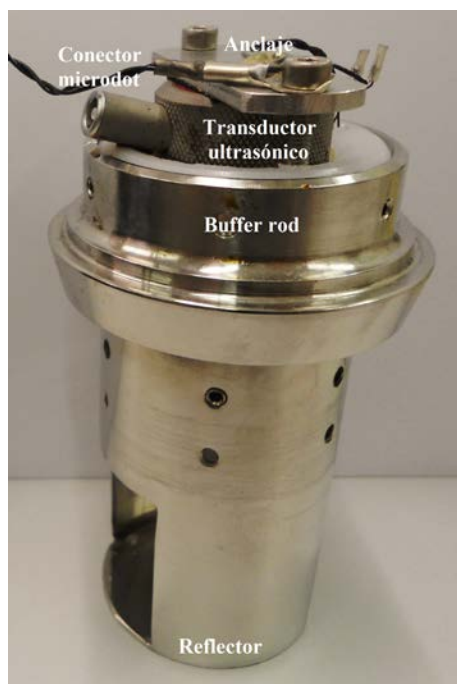
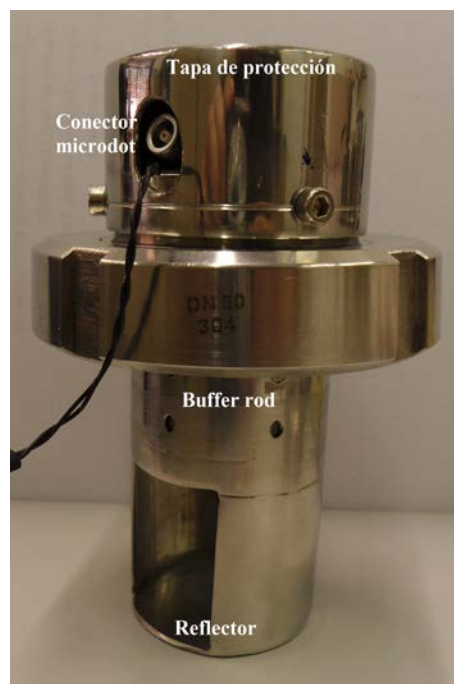


Figura 5.13 Sensor ultrasónico diseñado y construido para pruebas en laboratorio.



a)



b)

Figura 5.14 Sensor ultrasónico diseñado y construido para ser acoplado en tanques de almacenamiento de vino tinto a) Vista interna b) Acabado final.

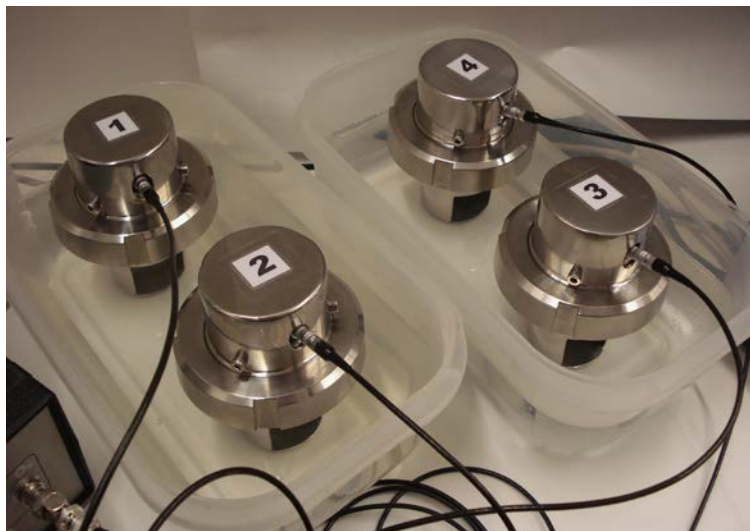


Figura 5.15 Conjunto de 4 sensores ultrasónicos diseñados y contruidos para ser acoplado en tanques de almacenamiento de vino tinto.

Observando las dos últimas figuras anteriores, se puede detallar que los elementos de cada sensor están contenidos y protegidos dentro de una estructura de acero inoxidable apta para ser acoplada al agujero roscado DN50 de cada tanque de fermentación (Figura 5.16). De esta manera, el contacto con el vino sólo lo tendrán el *reflector* y un extremo del *buffer rod*, ambos contruidos con materiales cuyo contacto con alimentos está permitido. Por último comentar que, en esta ocasión, el anclaje del transductor ultrasónico al *buffer rod* se realiza mediante una placa de aluminio de 1,5 mm de espesor (Figura 5.14.a).



Figura 5.16 Sensores ultrasónicos acoplados a tanques de fermentación de acero inoxidable y 100 l de capacidad.

Finalmente, en la Tabla 5.4 se resumen las longitudes de los *buffer rod* y las distancias *BR-reflector* una vez se han unido todas las piezas de los 5 sensores diseñados, las medidas se realizan con ayuda de un calibre digital.

Sensor	Transductor Ultrasónico	Longitud BR (mm)	Distancia BR-Reflector (mm)
1	General Electric B1F	50	46,83
2	General Electric B1F	50	46,55
3	General Electric B1F	50	46,6
4	General Electric B1F	50	46,62
5	Panametrics ACCUSCAN A102S-RM	53,65	50,3

Tabla 5.4 Longitud del *buffer rod* y distancia *BR-reflector* para los 5 sensores ultrasónicos diseñados.

5.3.3 Monitorización de la temperatura

Como ya se ha mencionado anteriormente y se hará evidente en los primeros resultados en campo presentados en el siguiente capítulo, la temperatura será el parámetro físico más influyente en las respuestas de propagación de los ultrasonidos a través del vino tinto. La única forma segura de evitar dicha influencia es manteniendo su valor constante, por lo menos mientras duran las medidas que se quieran realizar y en los casos donde no sea posible, estar en disposición de poder compensar adecuadamente los efectos que las variaciones de temperatura produzcan sobre el medio con el que se esté trabajando.

Un ejemplo que ilustra la importancia de controlar las variaciones de temperatura lo presentan Bilanuk *et al.* (1993), donde los autores han aproximado el cálculo de la velocidad del sonido en el agua pura en función de la temperatura a través de un polinomio de quinto orden. De esta manera, si se utiliza la temperatura a la cual suele llevarse a cabo la FML (22 °C) y se considera que ésta puede variar en $\pm 0,1$ °C, dichas condiciones producirían cambios en la velocidad en el agua pura de, aproximadamente, $\pm 0,55$ m/s.

Así, para las diferentes pruebas llevadas a cabo en laboratorio, el control de temperatura se realiza mediante el uso de un baño de circulación de temperatura constante OMEGA HCTB-3030 con control PID (proportional-integral-derivative) y sensor de temperatura PRT capaz de mantener el valor de temperatura elegido con una estabilidad de hasta $\pm 0,005$ °C, Figura 5.17.

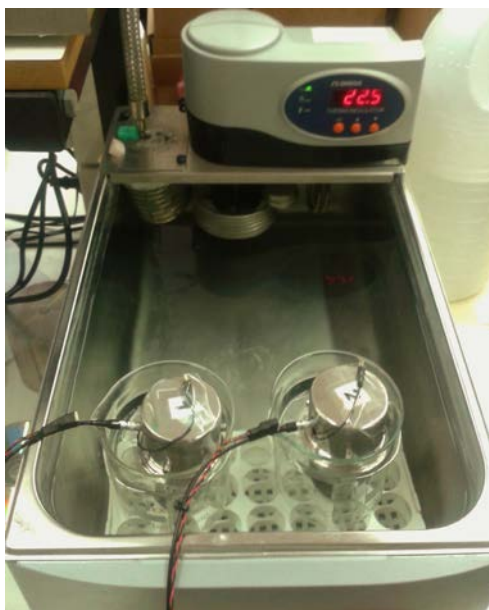


Figura 5.17 Baño de circulación de temperatura constante OMEGA HCTB-3030 usado para controlar la temperatura de las muestras durante las pruebas en laboratorio.

El baño se llena con agua destilada para un correcto desempeño y mantenimiento, las muestras son introducidas usando vasos de precipitado y se mantienen el tiempo necesario hasta que adopten la temperatura de estabilización. Para corroborar que, en el momento de realizar cualquier toma de datos, la temperatura de la muestra se mantenía en el valor de estabilización seleccionado, se utiliza adicionalmente un termómetro digital FLUKE 1551A Ex que, con una sonda RTD, permite medir la temperatura en el interior de cada vaso de precipitado (muestras) con una precisión y repetibilidad de $\pm 0,05^{\circ}\text{C}$, Figura 5.18.

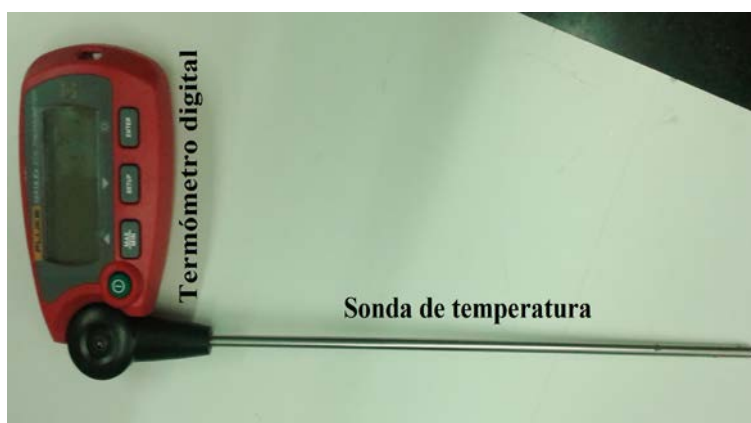


Figura 5.18 Termómetro digital FLUKE 1551A Ex.

En cuanto a las pruebas de campo (plantas piloto y bodegas), en este caso es más complicado mantener constante la temperatura del vino en proceso de FML, siendo necesario tener en cuenta la opción de realizar un adecuado seguimiento de las variaciones de temperatura

del vino para aplicar la adecuada compensación a los resultados de velocidad. Por lo tanto y después de unas primeras pruebas, se modifican los cuatro sensores ultrasónicos, pensados para monitorizar la FML en bodegas, adaptándoles un sensor de temperatura termistor tipo NTC (Negative Temperature Coefficient) con el propósito de hacer posible, de forma sencilla, la monitorización continua de la temperatura interna a la cual se está desarrollando la FML en cada tanque, Figura 5.19.

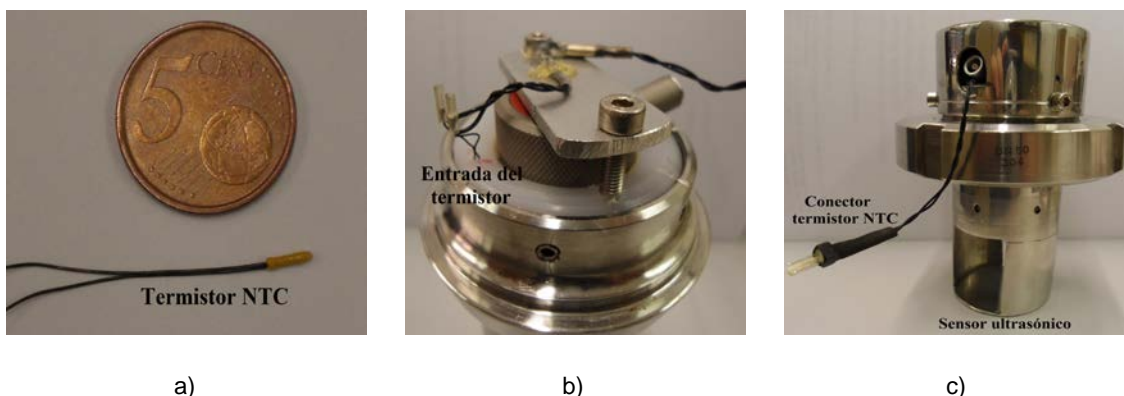


Figura 5.19 Detalle del acoplamiento del sensor de temperatura termistor NTC al sensor ultrasónico a) Tamaño del termistor, b) Montaje junto al transductor y *buffer rod* y c) Sensor ultrasónico con sensor de temperatura listo para ser montado en tanque de acero inoxidable.

Como se puede observar en la Figura 5.19.b y se detalla en la Figura 5.20, la adaptación del termistor se lleva a cabo realizando un pequeño agujero (2 mm Ø) en uno de los lados del *buffer rod*, de tal manera que lo atraviere sin llegar a traspasar la cara que estará en contacto con el vino (1 mm antes). Esta modificación física se realiza junto con la respectiva modificación del software de control y captura de datos para que, simultáneamente, se puedan adquirir las medidas ultrasónicas y la medida de temperatura de forma automática e ininterrumpida.

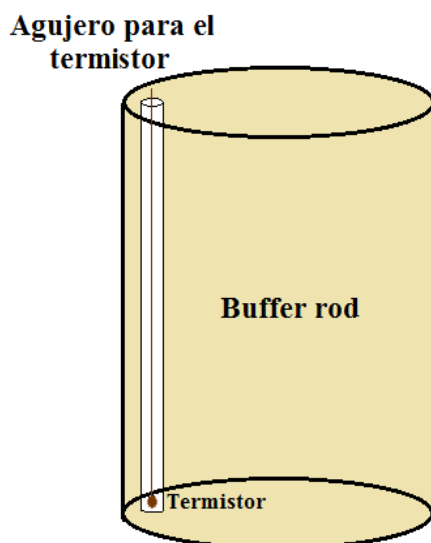


Figura 5.20 Representación del agujero hecho a cada *buffer rod* para acoplar el termistor NTC.

5.4 Procesamiento de las señales ultrasónicas

Una vez se pone en funcionamiento el set-up de medida descrito en el apartado anterior, con el diseño del sensor y la técnica ultrasónica adoptada (*pulso-eco*), se empezaran a adquirir señales como las de la Figura 5.21.

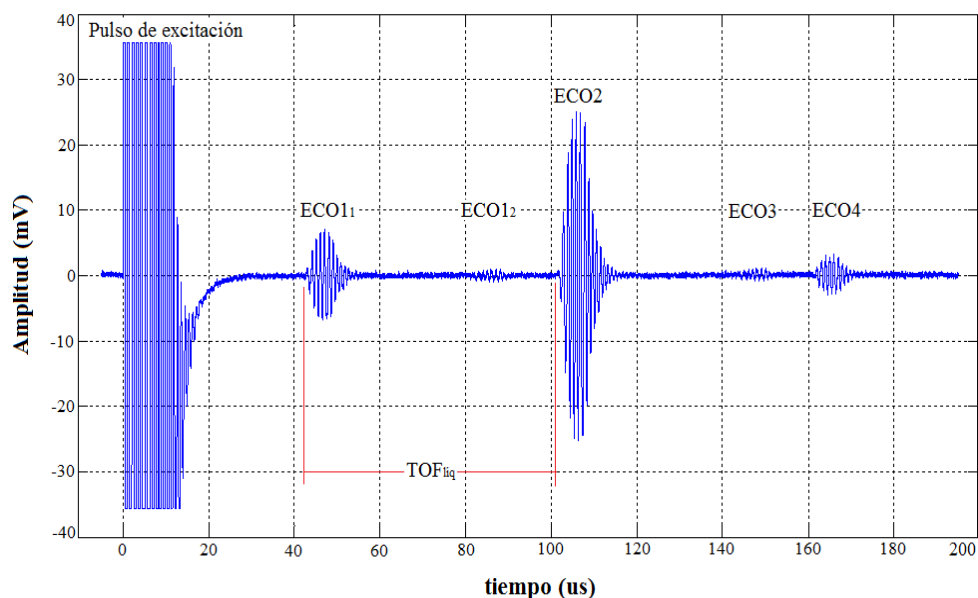


Figura 5.21 Forma de onda registrada por el osciloscopio digital y almacenada cada vez que el sistema ultrasónico lleva a cabo una medida en el canal seleccionado.

Como se puede observar, cada señal original está compuesta por el registro del pulso con el que se excita al transductor ultrasónico y por cinco ecos que, posteriormente, el mismo transductor recibe. Los ecos $ECO1_1$ y $ECO2$ que, al estar separados por el tiempo de vuelo en el medio líquido TOF_{liq} , son las señales de mayor interés, es decir, son los ecos que delimitan el tiempo que tarda $ECO2$ en recorrer el trayecto por el medio líquido a analizar, dato necesario para el posterior cálculo de la variación de velocidad Δc_{liq} y/o velocidad de propagación ultrasónica c_{liq} en dicho medio (Capítulo 3, apartado 3.3). El $ECO1_2$ que se ubica intencionalmente en medio de los dos anteriores para reducir, a conveniencia, la longitud del *buffer rod* (Capítulo 3, apartado 3.4.1 y 3.4.2). Por último, los ecos $ECO3$ y $ECO4$ que son consecuencias de nuevas reflexiones y transmisiones de $ECO2$ y que no serán tenidos en cuenta para obtener resultados en este trabajo.

Utilizando estas señales originales, se lleva a cabo la etapa de procesamiento con ayuda de un algoritmo desarrollado en MATLAB® (Math Works Inc., Natick, MA) y cuya primera fase se puede describir con los siguientes pasos:

a) Cuando se realiza más de una medida por canal seleccionado (*medida1, medida2, medida3.....medidan*), se lleva a cabo la suma y promedio de estas señales con el fin de obtener una única forma de onda a procesar.

b) Se definen dos posiciones horizontales límite, es decir, un intervalo de tiempo que delimite desde y hasta donde interesa analizar la señal. Estas posiciones están directamente relacionadas con el tiempo que tardan los ecos $ECO1_1$ y $ECO2$ en hacer sus respectivos recorridos hasta ser detectados por el transductor. Normalmente, para muchas de las pruebas realizadas, estos valores se fijan en $38 \mu s$ y $124 \mu s$, aunque según el medio líquido analizado, el límite superior puede llegar a variar ($\pm 6 \mu s$).

c) A la porción de señal que se obtiene en el paso anterior se le resta su valor medio, evitando la presencia de la componente de nivel continuo en el análisis FFT.

d) Se separan $ECO1_1$ y $ECO2$ para ser procesados y, con los resultados de procesar los correspondientes $ECO1_1$ y $ECO2$ de la onda anterior, hallar la variación del tiempo de vuelo que cada uno experimenta, ΔTOF_{E1} y ΔTOF_{E2} respectivamente. Para dicha separación, se establece una ventana rectangular W cuya longitud horizontal ΔW se define con ayuda del número de puntos que componen cada eco (*puntos_eco*) y del período de muestreo utilizado T_s mediante:

$$\Delta W = (\text{puntos_eco}) \cdot T_s. \quad (5.1)$$

Trabajando con $T_s = 2 \text{ ns}$ y estableciendo el número de puntos para cada eco en 13000, la longitud de la ventana, usada para la mayoría de las señales procesadas en este trabajo, queda definida en $26 \mu s$. De esta manera, el intervalo de tiempo que abarca $ECO1_1$ estará comprendido entre $38 \mu s$ y $64 \mu s$, y el de $ECO2$ entre $98 \mu s$ y $124 \mu s$.

e) Como se mencionó en el Capítulo 4 (apartado 4.2.5), es necesario establecer la cantidad de ceros que se añaden a cada eco para optimizar el procesado FFT y de esta manera, completar un vector de 2^n elementos. Para este caso y como se demostró en el mismo capítulo, se establece trabajar con $n = 16$ (65536 puntos).

5.4.1 Cálculo de la velocidad de propagación ultrasónica

La segunda parte del algoritmo de procesado, puede definirse como la etapa en la que se aplica el método de la *diferencia de fases* a $ECO1_1$ y $ECO2$ para, a través del espectro de fase de cada uno, obtener el valor de fase a la frecuencia de resonancia del transductor utilizado. Posteriormente, con ayuda de la Ec. (4.9) del Capítulo 4 y de los mismos datos obtenidos de la señal inmediatamente anterior, se calculan las correspondientes variaciones del tiempo de vuelo de cada eco, ΔTOF_{E1} y ΔTOF_{E2} respectivamente.

Como la distancia d del *buffer rod* al *reflector* es previamente conocida y se mantiene fija, sólo será necesario contar con una referencia inicial del tiempo de vuelo de cada eco TOF_{E1Ref} y TOF_{E2Ref} para calcular la velocidad de propagación de los ultrasonidos en el medio líquido $c_{líq}$ en función de dichas variaciones del tiempo de vuelo medidas:

$$\begin{aligned}
 c_{líq} &= \frac{D}{TOF_{líq}} = \frac{D}{TOF_{E2} - TOF_{E1}} \\
 &= \frac{D}{(TOF_{E2Ref} + \Delta TOF_{E2}) - (TOF_{E1Ref} + \Delta TOF_{E1})} \\
 &= \frac{D}{(TOF_{E2Ref} - TOF_{E1Ref}) + (\Delta TOF_{E2} - \Delta TOF_{E1})} \\
 &= \frac{D}{TOF_{líqRef} + \Delta TOF_{líq}} = \frac{D \cdot c_{líqRef}}{D + c_{líqRef} \cdot \Delta TOF_{líq}}. \tag{5.2}
 \end{aligned}$$

Donde, $D = 2d$; $TOF_{líqRef} = TOF_{E2Ref} - TOF_{E1Ref}$, es decir, el tiempo de vuelo de referencia en el líquido; $\Delta TOF_{líq} = \Delta TOF_{E2} - \Delta TOF_{E1}$, es decir, las variaciones del tiempo de vuelo en el líquido y $c_{líqRef} = D/TOF_{líqRef}$. Igualmente, la variación de la velocidad de propagación ultrasónica en el medio líquido $\Delta c_{líq}$ se puede expresar en función de estos mismos parámetros:

$$\Delta c_{líq} = c_{líq} - c_{líqRef} = \frac{D}{TOF_{líqRef} + \Delta TOF_{líq}} - \frac{D}{TOF_{líqRef}} = \frac{(c_{líqRef})^2 \Delta TOF_{líq}}{D + c_{líqRef} \Delta TOF_{líq}}. \tag{5.3}$$

5.4.2 Error estimado en la medida de la velocidad de propagación ultrasónica

La velocidad de propagación de los ultrasonidos en el medio líquido se calcula como: $c_{líq} = c_{líqRef} + \Delta c_{líq}$ y considerando el error absoluto en la medida de la velocidad de referencia $c_{líqRef} \pm \varepsilon_a(c_{líqRef})$ y en la medida de las variaciones de velocidad $\Delta c_{líq} \pm \varepsilon_a(\Delta c_{líq})$. Por propagación de errores en sumas y diferencias y suponiendo el caso más desfavorable, sin considerar los errores independientes y aleatorios, se puede estimar que el error en el cálculo de la velocidad de propagación en el medio líquido $\varepsilon_a(c_{líq})$ es equivalente a la suma de los errores absolutos en las otras dos magnitudes:

$$\varepsilon_a(c_{líq}) \approx \varepsilon_a(c_{líqRef}) + \varepsilon_a(\Delta c_{líq}). \tag{5.4}$$

Igualmente, observando que la Ec.(5.3) expresa el cálculo de las variaciones de velocidad en función de tres variables, $\Delta c_{líq} = f(c_{líqRef}, \Delta TOF_{líq}, D)$, y aplicando el mismo criterio anterior, el error en la variación de velocidad de los ultrasonidos en el medio líquido $\varepsilon(\Delta c_{líq})$ se puede calcular mediante un desarrollo en serie para el caso de varias variables teniendo en cuenta el error en cada una de ellas:

$$\varepsilon(\Delta c_{líq}) \approx \left| \frac{\partial \Delta c_{líq}}{\partial c_{líqRef}} \right| \cdot \varepsilon(c_{líqRef}) + \left| \frac{\partial \Delta c_{líq}}{\partial \Delta TOF_{líq}} \right| \cdot \varepsilon(\Delta TOF_{líq}) + \left| \frac{\partial \Delta c_{líq}}{\partial D} \right| \cdot \varepsilon(D). \quad (5.5)$$

Desarrollando esta expresión con ayuda de la Ec. (5.3):

$$\begin{aligned} \varepsilon(\Delta c_{líq}) \approx & \frac{c_{líqRef} \Delta TOF_{líq} (2D + c_{líqRef} \Delta TOF_{líq})}{(D + c_{líqRef} \Delta TOF_{líq})^2} \cdot \varepsilon(c_{líqRef}) + \frac{c_{líqRef}^2 D}{(D + c_{líqRef} \Delta TOF_{líq})^2} \cdot \varepsilon(\Delta TOF_{líq}) \\ & + \frac{c_{líqRef}^2 \Delta TOF_{líq}}{(D + c_{líqRef} \Delta TOF_{líq})^2} \cdot \varepsilon(D). \end{aligned} \quad (5.6)$$

Suponiendo, $\varepsilon(c_{líqRef}) = \pm 0,01$ m/s, $\varepsilon(\Delta TOF_{líq}) = \pm 2$ ns y $\varepsilon(D) = \pm 0,01$ mm, la estimación del error, para el caso más desfavorable, de la variación de velocidad de los ultrasonidos en el medio líquido sería, aproximadamente, de $\pm 0,1$ m/s ($\varepsilon(\Delta c_{líq}) \approx \sim 0,00 + \sim 0,1 + \sim 0,00$).

Como ejemplo, se puede observar en la Figura 5.22 que las variaciones de la velocidad de propagación ultrasónica, registradas al medir en agua destilada a 22,5 °C durante 104 minutos, muestran una estabilidad en las medidas incluso mucho menor que el error estimado, aproximadamente $\pm 0,035$ m/s, y una precisión de alrededor de $\pm 0,015$ m/s.

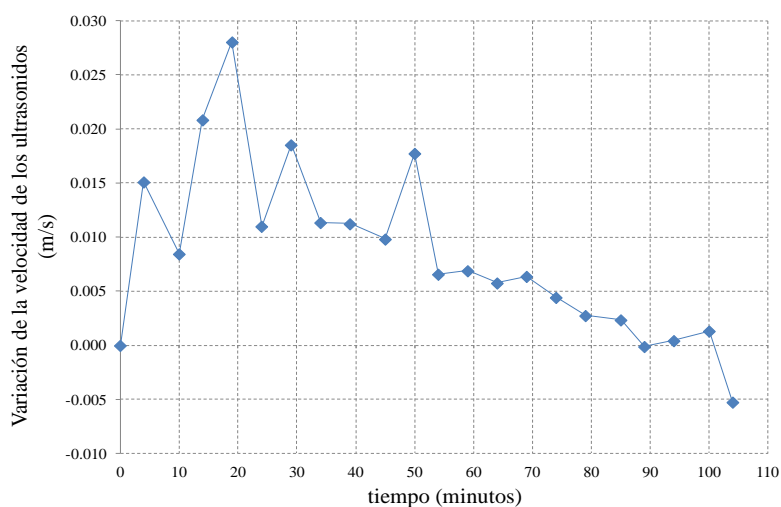


Figura 5.22 Variaciones de la velocidad de los ultrasonidos registradas por el sistema de medida en agua destilada a 22,5 °C durante 104 minutos.

5.5 Pruebas en plantas piloto y bodegas

Con el objetivo de llevar a la práctica los resultados obtenidos en laboratorio y de poner a prueba, en campo, el desempeño del sistema de medida diseñado, se contó con la colaboración de dos centros de investigación (INCAVI en Cataluña y el Grupo ENOBIOTEC en la Universidad de Valladolid) y de dos bodegas (Vega de Ribes y Torre del Veguer en Cataluña) donde fue posible llevar a cabo monitorizaciones ultrasónicas y enológicas a vinos almacenados en tanques de acero inoxidable de diferente capacidad y en fase de FML.

5.5.1 INCAVI

En la bodega experimental de INCAVI en Vilafranca del Penedès (Cataluña), se llevó a cabo el montaje de todo el sistema de medida para realizar, simultáneamente, el seguimiento enológico y ultrasónico de la FML desarrollada en muestras de vino almacenadas en tres tanques de 100 litros de capacidad c/u, Figura 5.23. El experimento se repitió dos veces.

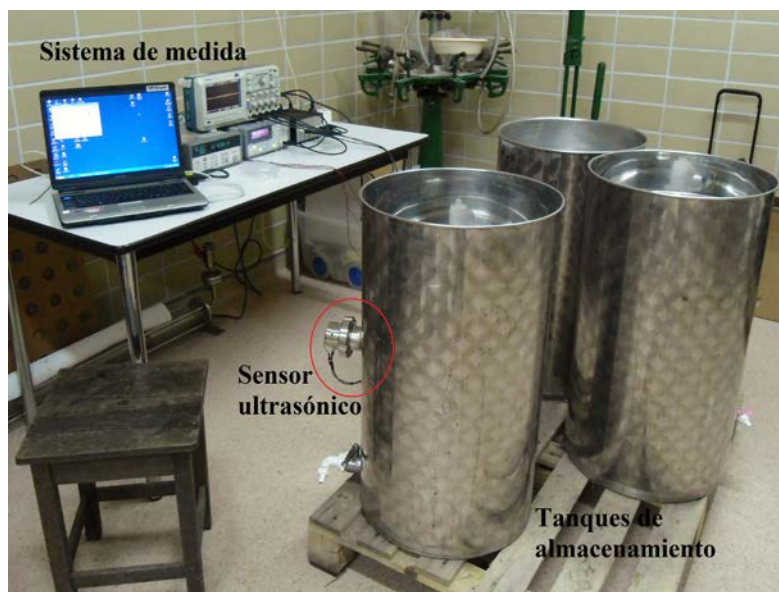


Figura 5.23 Montaje realizado para monitorizar FML's en la bodega experimental de INCAVI.

En ambas pruebas, temporalmente separadas, se utilizaron muestras de vinos elaborados con uvas de las variedades Merlot y Tempranillo (vendimias de 2010 y 2011) inoculados con cepas de BAL *Oenococcus oeni* (Lalvin VP41®, Lallemand, 1 g/Hl). Dichas cepas son altamente tolerantes ante elevados niveles de alcohol, bajo pH y presencia de SO₂ e igualmente, son de baja producción de acidez volátil, no producen aminas biógenas y contribuyen positivamente a la complejidad sensorial y la calidad del vino.

Los análisis químicos para la obtención de los parámetros enológicos convencionales (acidez volátil, turbidez, pH y población de bacterias), fueron realizados por el personal de INCAVI siguiendo métodos de análisis oficiales (OIV, 2012). En particular, las concentraciones de los ácidos málico y láctico fueron enzimáticamente medidas en un equipo LISA 200 (Hycel diagnostics, TDI Tecnología Difusión Ibérica, S.L., España).

5.5.2 Universidad de Valladolid

En esta ocasión, el experimento se realizó en la planta piloto del grupo de investigación ENOBIOTEC (Áreas de Tecnología de Alimentos y Microbiología de la Escuela Técnica Superior de Ingenierías Agrarias) de la Universidad de Valladolid (Campus de Palencia), donde se llevó a cabo la monitorización de la FML en muestras de vino tinto almacenadas en dos tanques de acero inoxidable con capacidad de 100 litros c/u, Figura 5.24.

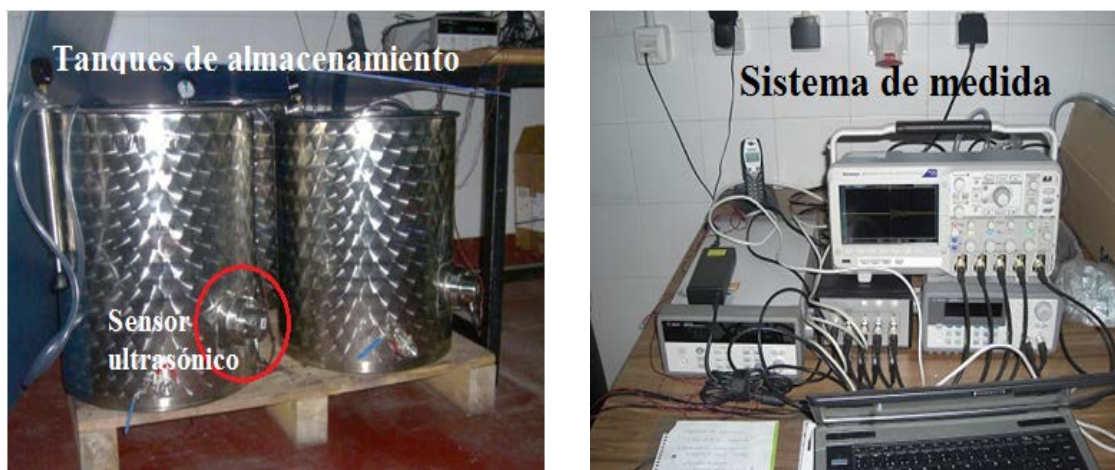


Figura 5.24 Montaje realizado para monitorizar FML's en la planta piloto de la Universidad de Valladolid (Campus de Palencia).

El vino para estas pruebas fue elaborado con uvas de la variedad Tempranillo (vendimia de 2011) e inoculado con cepas de BAL *Oenococcus oeni* (Lalvin VP41®, Lallemand, 1 g/Hl). Las medidas de parámetros enológicos convencionales (pH, acidez total, turbidez, grado alcohólico y acidez volátil) fueron llevadas a cabo por personal del grupo ENOBIOTEC siguiendo métodos de análisis oficiales (OIV, 2012) y, en especial, las medidas de las concentraciones de los ácidos málico y láctico fueron realizadas usando un kit de test enzimático (Novakit, Barcelona, España).

5.5.3 Bodega Vega de Ribes

En la tarea de ampliar el margen de pruebas en campo, se llevó a cabo el montaje del sistema de medida para realizar el seguimiento de la FML del vino Cabernet Sauvignon (vendimia de 2012) elaborado en la bodega Vega de Ribes (Sant Pere de Ribes, Cataluña), con un grado alcohólico del 12% vol., almacenado en un tanque de 3000 litros de capacidad e inoculado con cepas de BAL *Oenococcus oeni* (Laffort B28®, 1 g/Hl), Figura 5.25.



Figura 5.25 Montaje realizado para monitorizar la FML del vino elaborado en la bodega Vega de Ribes.

5.5.4 Bodega Torre del Veguer

Finalmente, se realizó un último desplazamiento a la bodega Torre del Veguer (Sant Pere de Ribes, Cataluña) para instalar el equipo de medida en un depósito de 5000 litros de capacidad lleno con vino Petite Sirah 12,46% vol. (vendimia de 2012) en el cual no se inocularon BAL comerciales a la espera que la FML se produjera de forma espontánea ni, por su elevado coste, se realizó un seguimiento enológico convencional (toma de muestras cada dos o tres días) como en los otros casos, Figura 5.26.



Figura 5.26 Montaje realizado para monitorizar la FML del vino elaborado en la bodega Torre del Veguer.

6. CARACTERIZACIÓN Y MONITORIZACIÓN ULTRASÓNICA DE LA FML EN EL VINO TINTO

6.1 Introducción

En este capítulo se presentan los resultados obtenidos en el estudio de la monitorización de la FML en el vino tinto a través del uso de ondas de ultrasonidos, analizando y poniendo a prueba la aplicabilidad del sistema de medida experimental diseñado en los Capítulos 3 y 5, y del método para el procesado de la información ultrasónica, para obtener variaciones de velocidad y/o velocidad de propagación, detallado y seleccionado en el Capítulo 4.

Como se comentó en el Capítulo 1, el análisis del fenómeno biológico conocido como FML mediante técnicas basadas en ultrasonidos, es un tema del cual no se encuentran precedentes directos en la literatura científica. Por lo tanto, los resultados y análisis del presente capítulo se apoyan en medidas preliminares llevadas a cabo por el Grupo Sistemas Sensores de la UPC; utilizan como referencia algunos trabajos, muchos de ellos recientes, enfocados en el estudio y monitorización con ultrasonidos de reacciones químicas y procesos biológicos que pueden llegar a relacionarse con los que suelen acontecer durante la actividad maloláctica de las BAL; y se apoyan en la comparación correlativa con los resultados obtenidos al monitorizar, midiendo de forma convencional, los principales parámetros de interés enológico utilizados por los elaboradores de vino.

A efectos prácticos, se puede decir que el desarrollo presentado en este capítulo se consigue dividiendo el trabajo realizado en dos partes. La primera, desarrollada completamente en laboratorio, básicamente consiste en relacionar la influencia sobre la velocidad que ejercen la presencia y evolución de los principales componentes y parámetros físicos que se manifiestan durante la FML —concentración de ácido málico, concentración de ácido láctico, presencia de etanol (grado alcohólico volumétrico), turbidez, CO₂ y temperatura, entre otros— bien sea actuando de forma individual o en mezclas específicas. Este primer análisis será utilizado como referente y ajuste de lo que podremos encontrar en el momento de llevar a cabo la monitorización real de una FML. Igualmente, en este aspecto, la comparación con resultados de pruebas análogas, aunque no enfocadas en la FML, llevadas a cabo por otros autores, servirá

para validar y reforzar la propuesta del sistema de medida diseñado. Continuando en la línea experimental, la segunda parte consiste en poner a prueba todo el sistema de medida, junto con los conocimientos adquiridos, a través de la monitorización de la FML durante la elaboración de algunos vinos tintos en bodega. Para ello se cuenta con la ayuda de dos importantes centros de investigación enológica (INCAVI y Universidad de Valladolid) que, aparte de permitir la instalación de todo lo necesario en sus bodegas experimentales, reforzaran la colaboración proporcionando las medidas de parámetros de interés enológicos convencionales —medidas de concentración de ácidos, pH, turbidez, población de bacterias y grado alcohólico volumétrico, entre otros— necesarios para el análisis correlativo con las medidas ultrasónicas.

Finalmente, todos los resultados y análisis presentados serán la guía para allanar el camino de la puesta en marcha del sistema de monitorización y medida ultrasónico propuesto, dejando en evidencia ventajas y desventajas del uso de esta técnica e igualmente, ayudando a definir la metodología más apropiada a aplicar para conseguir un sistema de control on-line para la FML del vino tinto.

6.2 Consecuencias de los efectos de la FML en la propagación de ondas de ultrasonido

Durante el desarrollo de la FML, la actividad principal de las BAL es llevar a cabo la descarboxilación del ácido málico, presente en el vino de forma natural, con la consecuente producción de ácido láctico y CO₂. Por consiguiente, es conveniente tener presente que la actividad de dichos microorganismos converge en diversos y complejos fenómenos que de una u otra manera contribuyen a la modificación de las propiedades fisicoquímicas del medio donde actúan. De esta manera, se considera necesario y apropiado analizar de forma separada, a través de mezclas líquidas binarias, ternarias y/o cuaternarias, los principales subprocesos y parámetros que caracterizan a la FML y que podrían ser influyentes en la modificación de las propiedades acústicas del vino. Así, se facilitará la tarea de relacionar los cambios registrados en velocidad de propagación durante la monitorización ultrasónica de una FML real con la evolución individual de dichos subprocesos.

6.2.1 Influencia de la temperatura en la velocidad de propagación de los ultrasonidos

La fuerte influencia de la temperatura sobre las propiedades acústicas de los materiales líquidos en general y por consiguiente, para nuestro caso, de los alimentos líquidos y bebidas, es un tema de amplio interés para quienes estudian y trabajan con técnicas ultrasónicas. Además, comportamientos como el de la velocidad de propagación, dentro de un determinado rango de temperaturas de trabajo, suele estar ligado a la clase de sustancia analizada, llegando a

convertirse, generalmente, en una propiedad característica del propio material bajo test. Por consiguiente, el vino tinto, como la mayoría de bebidas basadas en mezclas de agua-alcohol, no es ajeno a experimentar significativos cambios en sus propiedades acústicas ante variaciones de temperatura. Una cuestión que, como se verá más adelante, juega un papel especial durante el desarrollo del presente trabajo.

De forma ilustrativa, se llevan a cabo dos pruebas en las cuales se puede observar cómo las variaciones de temperatura influyen en la medida de la velocidad de propagación de los ultrasonidos en medios líquidos de propiedades similares al vino.

La primera experiencia se lleva a cabo con la monitorización de la evolución de la velocidad ultrasónica ante variaciones de temperatura, en el rango de 19-30 °C, en una muestra de agua destilada. De esta forma, además de corroborar lo ya dicho acerca de la influencia de la temperatura sobre las propiedades acústicas de los materiales líquidos, también se aprovecha para poner a prueba el funcionamiento de todo sistema de medida diseñado, abarcando todos los aspectos que van desde la correcta ubicación del sensor hasta el respectivo procesado de la información.

En la Figura 6.1 se presentan los resultados obtenidos en esta prueba inicial. Como se puede observar, la velocidad aumenta aproximadamente 2,7 m/s por cada incremento de 1°C en la temperatura. Una tasa de variación que, como se verá más adelante, es un valor suficientemente alto como para enmascarar muchas de las variaciones de velocidad que producen los elementos y componentes involucrados en la FML. Un hecho que reafirma nuevamente, la especial atención que se debe tener con el parámetro temperatura en todas las medidas que se lleven a cabo.

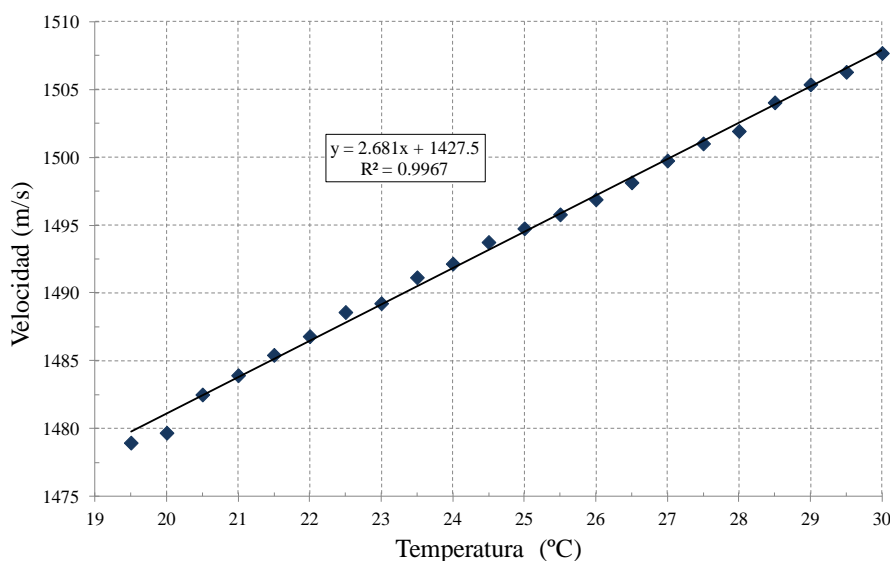


Figura 6.1 Velocidad de propagación de los ultrasonidos en agua destilada en función de la temperatura dentro del rango 19-30 °C.

Por otro lado, en Elvira *et al.* (2007) realizan una prueba similar usando agua destilada y variando la temperatura en el rango de 22-40 °C. Dado que sus resultados están muy en concordancia con los de la Figura 6.1, este hecho ayuda a reforzar el correcto desempeño del sistema de medida diseñado y utilizado en este trabajo.

En segundo lugar, en unas medidas previas realizadas por el grupo de trabajo al que pertenece el autor de esta Tesis, la sensibilidad de la velocidad de propagación ultrasónica ante variaciones de temperatura, en el rango de 20-31 °C, ha sido medida en una muestra de vino tinto genérico de la variedad Merlot. Como se puede observar en la Figura 6.2, en esta oportunidad la velocidad también presenta un comportamiento creciente, con un incremento relativo de 1,079 m/s por °C dentro del rango de temperaturas utilizado. De igual forma, también se puede detallar que los valores de velocidad en esta segunda prueba son mayores que los medidos en el agua destilada e incluso en el agua pura (Grosso & Mader, 1972) o, relacionándolos con una bebida más a fin, que en la cerveza (Becker *et al.*, 2001), pero de igual proporción a los registrados en otras pruebas con mezclas de agua-etanol (Vatandas *et al.*, 2007).

Por lo tanto, teniendo en cuenta las dos pruebas realizadas, se puede destacar que el efecto de otros elementos presentes en la muestra líquida (en nuestro caso elementos característicos del vino tinto) contribuyen con el incremento global del valor de velocidad al tiempo que inducen una reducción en su tasa de crecimiento (pendiente) ante incrementos del parámetro temperatura. Todo esto, como se demostrará más adelante, está especialmente relacionado con la cantidad (concentración) de etanol presente en el medio líquido a analizar.

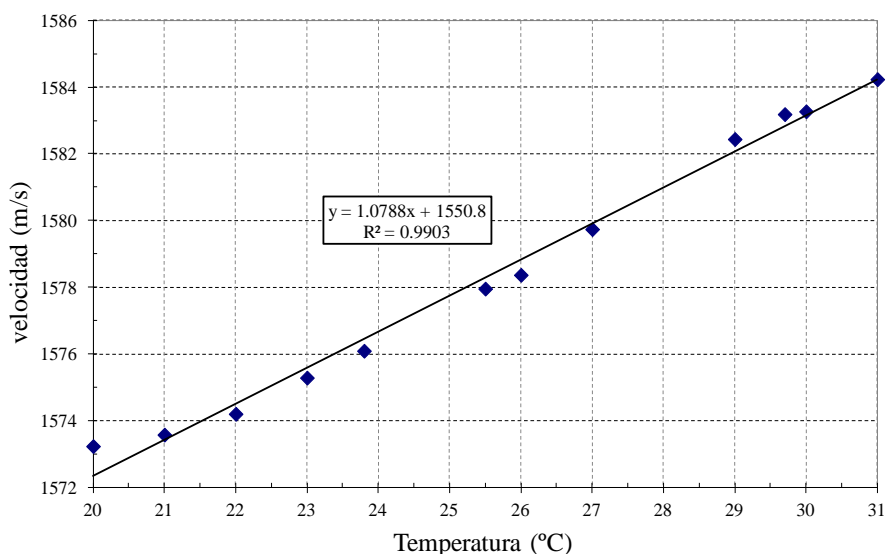


Figura 6.2 Velocidad de propagación de los ultrasonidos en una muestra de vino tinto Merlot en función de la temperatura dentro del rango 20-31 °C.

6.2.2 Comportamiento de los ultrasonidos ante variaciones en la concentración de los ácidos málico y láctico

Dado el papel principal que desempeñan las concentraciones de los ácidos málico y láctico durante la FML y que su medida en el vino es considerado el dato relevante que permite determinar cómo se está desarrollando el proceso y cuándo se puede considerar finalizado, es necesario dedicar especial atención a la forma en que dichos valores de concentración pueden llevar a influir en la propagación de las ondas de ultrasonido. Para facilitar este primer análisis, se empieza con las medidas sobre mezclas binarias de cualquiera de los ácidos con agua y finalmente, se trabaja con la mezcla ternaria de agua más los dos ácidos.

6.2.2.1 Mezcla binaria de agua y ácido málico

En la Figura 6.3 se representa la evolución de la velocidad de los ultrasonidos medida en una muestra de agua destilada a la que se le va agregando determinadas cantidades de ácido málico. La temperatura de trabajo es fijada en 22 °C, un valor que, como se mencionó en el Capítulo 2 (apartado 2.4.6), representa el límite superior del rango de temperaturas que optimizan el crecimiento y la actividad maloláctica de las BAL (18 a 22 °C).

Como se puede observar, la velocidad presenta un comportamiento lineal creciente con una tasa de aumento de, aproximadamente, 0,29 m/s por g/l de ácido málico contenido en la mezcla. El rango de concentraciones utilizadas se establece entre 0 y 8 g/l ya que en un vino tinto, las concentraciones iniciales de ácido málico pueden variar entre 1 g/l para vinos poco ácidos y 6-7 g/l cuando se trata de vinos muy ácidos (Lonvaud-Funel, 2004).

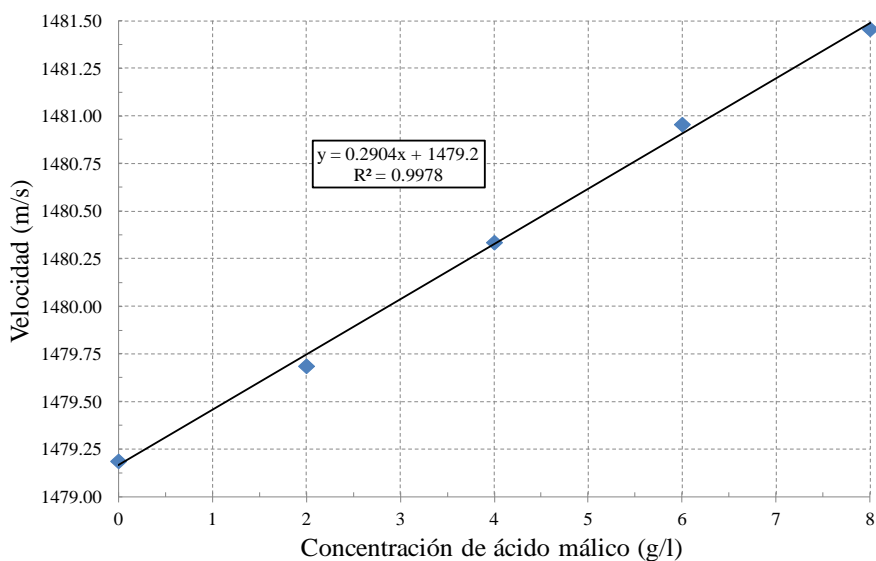


Figura 6.3 Comportamiento de la velocidad ultrasónica medida a 22 °C en la mezcla binaria agua-ácido málico con diferentes valores de concentración.

6.2.2.2 Mezcla binaria de agua y ácido láctico

De igual manera que en el apartado anterior, la Figura 6.4 muestra la evolución de la velocidad de las ondas de ultrasonido cuando se propagan a través del agua destilada a medida que se van agregando, sistemáticamente, determinadas cantidades de ácido láctico.

Es fácilmente apreciable que, junto con el ácido málico, el efecto del ácido láctico sobre la velocidad de propagación de los ultrasonidos en el agua destilada es muy parecido. Es decir, teniendo en cuenta que en esta ocasión la velocidad se manifiesta con una tasa de aumento de 0,29 m/s por cada g/l de ácido mezclado y comparando con los resultados del apartado 6.2.2.1, la tasa de crecimiento que presentaría la velocidad de propagación sería prácticamente la misma, dentro del rango de temperaturas de trabajo, en el momento de agregar cualquiera de los dos ácidos al agua destilada.

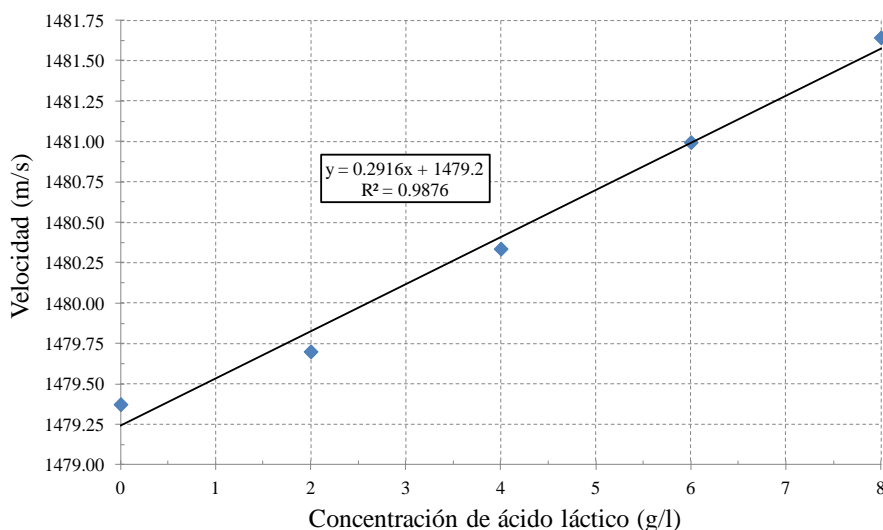


Figura 6.4 Comportamiento de la velocidad ultrasónica medida a 22 °C en la mezcla binaria agua-ácido láctico con diferentes valores de concentración.

6.2.2.3 Mezclas ternarias de agua, ácido láctico y ácido málico

Si el comportamiento de la velocidad ultrasónica, durante la FML, pudiese ser completamente representado con la superposición de los resultados obtenidos en los dos apartados anteriores, como consideración de que sólo importa la evolución de los ácidos málico y láctico, globalmente podríamos esperar una tendencia decreciente en las medidas de dicha velocidad. Es decir, teniendo en cuenta que, estequiométricamente, durante la FML 1 mol de ácido málico produce 1 mol de ácido láctico y 1 mol de CO₂ o, en términos de concentraciones, que por cada g/l de ácido málico metabolizado, las BAL producen aproximadamente 0,67 g/l de ácido láctico y 0,33 g/l de CO₂ (Hidalgo, 2011), se podría suponer que, dentro de las concentraciones habituales de ácido málico presentes en el vino tinto, el aporte decreciente

sobre la velocidad debido a la reducción de ácido málico siempre será mayor que el aporte creciente derivado de la producción de ácido láctico.

Con ayuda de la Figura 6.5 se puede corroborar lo dicho anteriormente. En este caso, se presentan las curvas correspondientes a la medida de velocidad en mezclas de agua y ácido láctico (en concentraciones fijas) a las que se le va agregando poco a poco cantidades definidas de ácido málico (2 g/l en cada intento).

Como era de esperarse, la velocidad aumenta tanto con el incremento de ácido málico como con el incremento de ácido láctico. También se puede notar que, a medida que entran en juego las dos clases de ácidos, las curvas de ajuste presentan un comportamiento de tipo cuadrático.

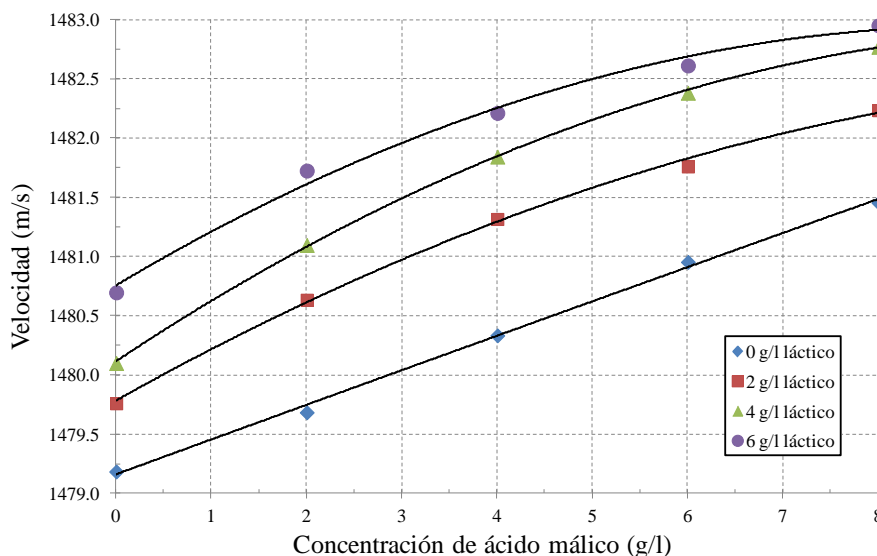


Figura 6.5 Evolución de la velocidad ultrasónica medida a 22 °C en mezclas ternarias agua-ácido láctico-ácido málico manteniendo fija la concentración de láctico mientras varía la concentración de málico.

Ahora, supongamos una FML que inicia con 8 g/l de ácido málico y finaliza cuando la concentración de dicho ácido llegue a cero. Según lo dicho al inicio del apartado, esto conllevará a la producción aproximada de 5,4 g/l de ácido láctico ($8 \times 0,67$). Por lo tanto, descartando el CO_2 producido y usando los resultados de las Figuras 6.3 y 6.4, la desaparición total del ácido málico acarreará una reducción en la velocidad de 2,32 m/s ($8 \text{ g/l} \times 0,29 \text{ m/s por g/l}$) mientras que la producción de ácido láctico supondrá un incremento de 1,57 m/s ($5,4 \text{ g/l} \times 0,29 \text{ m/s por g/l}$). De esta manera, la diferencia que separará a la velocidad final de la velocidad inicial será, aproximadamente, de -0,75 m/s.

Éste último resultado se ajusta bastante bien a los -0,76 m/s que se obtienen de restar, con ayuda de la Figura 6.5, la velocidad de la curva 6 g/l láctico (teniendo en cuenta que es un

poco menos) cuando la concentración de málico es 0 g/l con la velocidad de la curva 0 g/l láctico cuando la concentración de málico es 8 g/l (1480,70 m/s - 1481,46 m/s). En otras palabras, restar velocidad final menos velocidad inicial del proceso simulado.

6.2.3 Comportamiento de los ultrasonidos ante variaciones en la concentración de los ácidos málico y láctico en presencia de etanol

Durante el desarrollo de la FML, heredado como producto principal de la FA, el etanol siempre estará presente en una cantidad bastante estable. Normalmente, las concentraciones de etanol (grado alcohólico volumétrico o grado alcohólico) para vinos no enriquecidos, pueden encontrarse entre un 7 y un 14 % vol. dependiendo en gran parte del tipo de uva y de las condiciones generales de elaboración. Además, debido a su gran complejidad, el estudio de las propiedades acústicas de la mezcla agua-etanol ha sido, durante muchos años, y sigue siendo un tema de amplio interés (Giacomini, 1947; Winder *et al.*, 1970; Arrigo & Paparelli, 1987; Martin & Spinks, 2001; Povey *et al.*, 2003; Resa *et al.*, 2004).

Consecuentemente, continuando con el desarrollo del sistema de medida propuesto en este trabajo, se considera importante observar, estudiar y caracterizar la forma cómo la presencia del etanol interviene en la evolución de la velocidad de propagación definida por las variaciones de los ácidos principales (málico y láctico) durante el proceso maloláctico e igualmente, el comportamiento de la relación etanol-temperatura.

6.2.3.1 Mezclas binarias de agua y etanol ante variaciones de temperatura

Siguiendo el concepto de que la temperatura es uno de los parámetros externos que más puede influir en los resultados ultrasónicos obtenidos en este estudio y teniendo presente que las propiedades acústicas del etanol no son ajenas a cambiar ante variaciones térmicas, como se puede observar en la Figura 6.6; donde, usando una muestra de alcohol etílico (96% de pureza) y variando la temperatura en el rango de 19 a 31 °C, se registra una tasa de reducción de la velocidad de propagación de aproximadamente -3,051 m/s por °C. En este apartado se propone una alternativa empírica que puede llegar a ser útil en el momento en que sea necesario aplicar ajustes relacionados con las variaciones de temperatura sobre los resultados ultrasónicos medidos en el vino tinto, o mezcla similar, con concentraciones de etanol comprendidas en la proximidad de los valores que se suelen encontrar comercialmente (7 a 15 % vol.).

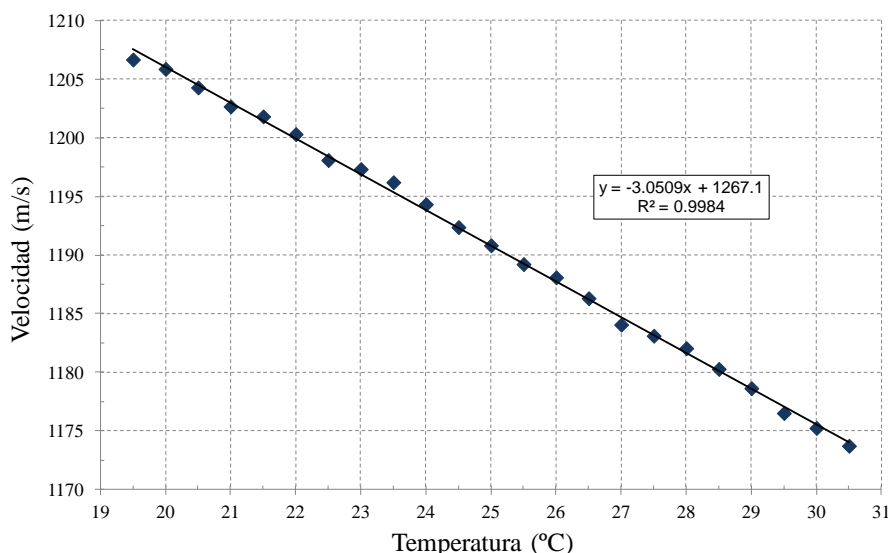


Figura 6.6 Evolución de la velocidad de propagación ultrasónica en el alcohol etílico (96% de pureza) ante variaciones de temperatura dentro del rango 19-31 °C.

En la Figura 6.7 se pueden observar las medidas de velocidad en diferentes mezclas agua-etanol, con concentraciones fijas de etanol comprendidas entre 0 y 15 % vol., cuando se producen variaciones de temperatura que abarcan valores entre 20 y 32 °C. Como se puede notar, las diferentes curvas de velocidad, hechas para cada grado alcohólico, presentan un comportamiento lineal creciente ante el incremento de temperatura. De igual forma, a medida que aumenta la concentración de etanol, los valores de velocidad son mayores para una misma temperatura aunque el valor de las pendientes de las rectas de ajuste va disminuyendo progresivamente. De esta manera, sería lógico pensar que llegará el momento en que la curva que representa la velocidad de un determinado grado alcohólico, mucho más alto del permitido en vinos tintos comerciales, presente un comportamiento decreciente ante aumentos de temperatura. Precisamente, Elvira *et al.* (2007) midieron la velocidad de propagación del sonido en una mezcla agua-etanol (28,5% vol.) cuyos resultados seguían perfectamente una tendencia lineal con pendiente negativa a medida que aumentaba la temperatura para el rango limitado entre 20 y 40 °C.

Por otro lado, Resa *et al.* (2004) presentan una curva de velocidad experimental medida en una mezcla agua-etanol a 30 °C cuando varía la concentración de etanol. En ella se puede observar que, para concentraciones entre 0 y 30 % aproximadamente, la velocidad evoluciona de forma creciente hasta llegar a un máximo valor. A partir del 30%, los valores de velocidad empiezan a decrecer ante el aumento del valor de la concentración. Además, es apreciable que la tasa de crecimiento en el intervalo de aumento es diferente a la tasa de decrecimiento en el intervalo en el que la curva disminuye.

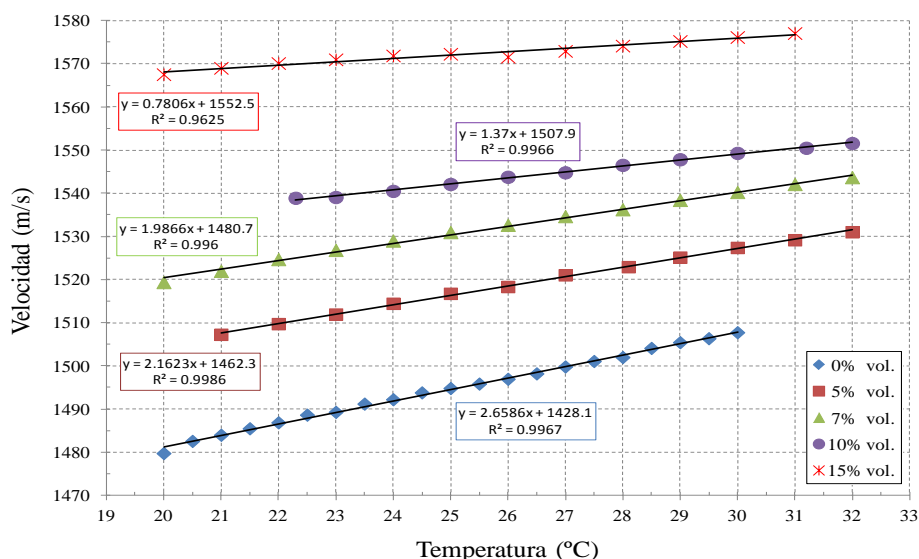


Figura 6.7 Comportamiento de la velocidad ultrasónica ante variaciones de temperatura para mezclas agua-etanol con diferente grado alcohólico volumétrico (% vol.).

Asumiendo una cierta proporcionalidad, según la concentración de etanol, en la distribución de las distintas rectas de la Figura 6.7 y dado el margen de valores de grado alcohólico volumétrico en el que nos vamos a mover, podremos suponer la existencia de una constante de proporcionalidad, calculada a partir de las pendientes de cada recta de tendencia graficada.

Es decir, realizando una recta con los valores de pendientes como la de la Figura 6.8, es posible obtener una ecuación (Ec. (6.1)) con la cual calcular empíricamente la tasa de variación de la velocidad respecto a la temperatura Δc_T (m/s por °C) ante cualquier valor de grado alcohólico volumétrico (g.a) que no supere el 15 % vol. aproximadamente, cubriendo el rango de grado alcohólico definido por la OIV para los vinos tintos comerciales (OIV –Organización Internacional de la Viña y el Vino). La utilidad de esta propuesta será puesta a prueba más adelante cuando se monitoricen FML's reales en ambiente semi-industrial donde la temperatura no se puede controlar de la misma forma que en el laboratorio.

$$\Delta c_T = -0,130 \cdot (g.a) + 2,761 \quad (6.1)$$

6.2.3.2 Influencia de la evaporación del etanol en la mezcla binaria agua-etanol

En este apartado se hace mención a un hecho, a tener en cuenta, que se presentaba en el momento de realizar pruebas en laboratorio con las mezclas que involucraran concentraciones fijas de etanol como uno de sus componentes.

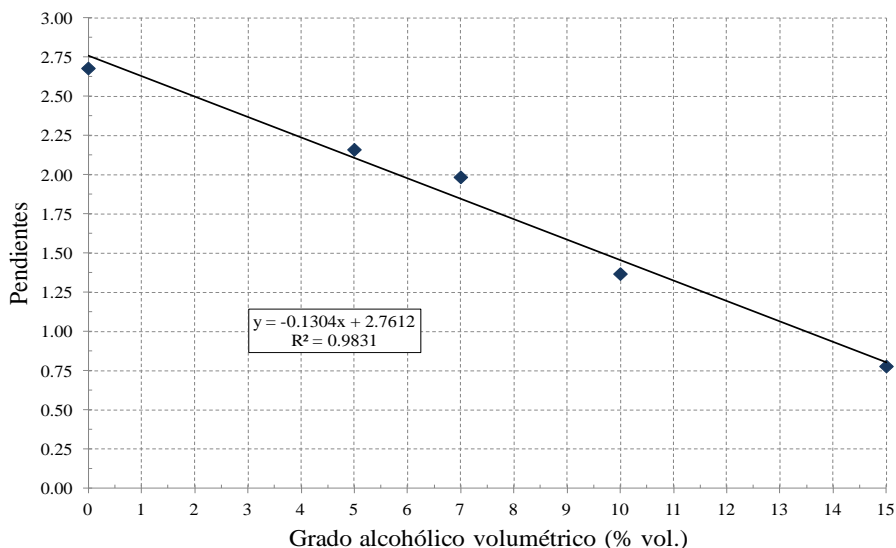


Figura 6.8 Tasas de variación de la velocidad respecto a la temperatura (m/s por °C) en función del grado alcohólico volumétrico dentro del rango comprendido entre 0 y 15 % vol.

Específicamente, una vez realizadas diferentes medidas en mezclas de agua, etanol y cualquiera de los ácidos utilizados, se empezó a notar un comportamiento erróneo o inesperado en las respuestas de velocidad obtenidas. Indagando en el tema, se pudo llegar a la conclusión que la fuente principal del problema provenía de la evaporación del etanol presente en cada una de las mezclas realizadas, algo principalmente incitado por el uso necesario de vasos de precipitado suficientemente amplios como para almacenar toda la mezcla junto con la estructura del sensor diseñado. Además, era descartada la opción de llevar a cabo un sellado total del vaso, entre otras cosas, por la necesidad de contar con suficiente espacio abierto para ir agregando nuevas cantidades de componentes a medida que iban avanzando las pruebas. Asimismo, hay que sumar el hecho de tener que contar con amplios intervalos de tiempo entre medidas (en ocasiones sobrepasando los 20 minutos), para permitir la correcta disolución de nuevas cantidades añadidas y el correcto ajuste a la temperatura de trabajo (termostatado de toda la mezcla).

Como ejemplo, la Figura 6.9 resume todo lo comentado en el párrafo anterior. En esta ocasión, se mide la velocidad en una mezcla de agua-etanol (12% vol.) a 22,5 °C, realizando varias medidas durante 41 minutos.

Como se puede observar, durante el tiempo empleado para esta prueba, la velocidad reporta una reducción, no lineal, de aproximadamente 0,75 m/s sólo por evaporación de etanol (coincidiendo nuevamente con el comportamiento de la curva en Resa *et al.* (2004) ya mencionada).

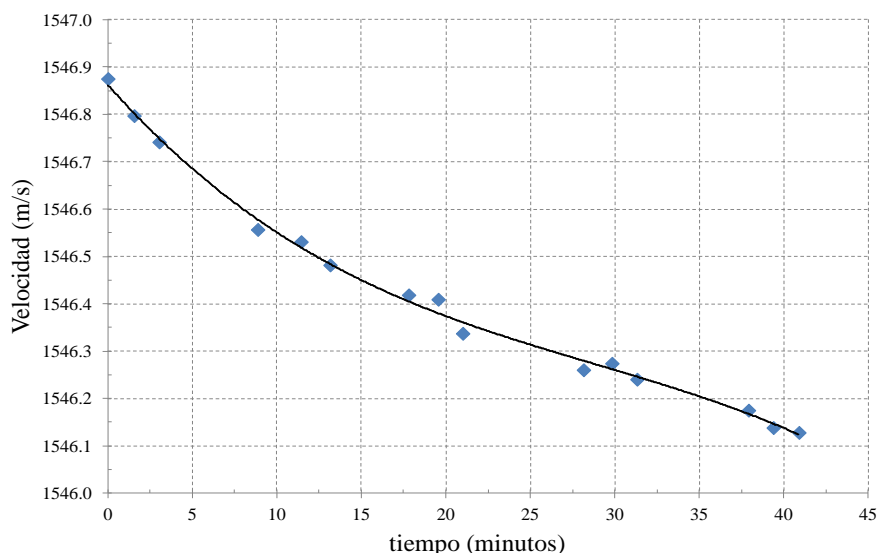


Figura 6.9 Velocidad de los ultrasonidos a 22,5 °C en una mezcla binaria agua-etanol al 12% vol. durante el transcurso del tiempo.

Teniendo en cuenta que en nuestro caso una sola tanda de medidas, como puede ser el seguimiento de la velocidad ante diferentes concentraciones de ácido málico o ácido láctico usando como base la misma mezcla agua-etanol, puede llegar a durar más de 2 horas, estaríamos añadiendo un error dependiente de las condiciones de cada prueba y por tanto muy difícil de modelar y de compensar, pero que muy probablemente puede llegar a enmascarar los resultados registrados.

Por lo tanto, para muchas de las pruebas en laboratorio desarrolladas en este trabajo y que involucren una determinada concentración de etanol, se aplicará un procedimiento de medida de referencia. Para ello, se utilizarán dos vasos de precipitado, en uno se harán todas las mezclas necesarias (*prueba*) y en el otro se pondrá sólo la mezcla base agua-etanol (*referencia*), llevándose a cabo simultáneamente la misma cantidad de medidas que la prueba requiera (con dos sensores de las mismas características en iguales condiciones de temperatura). De esta forma, se usarán las variaciones registradas en la *referencia* como información para compensar los resultados de la *prueba*, Figura 6.10.

6.2.3.3 Mezcla ternaria de agua, etanol y ácido málico

Buscando llegar a una acertada aproximación que permita ofrecer un mejor entendimiento en cuanto a la propagación de ondas de ultrasonido durante la FML, en este apartado se analiza la sensibilidad de la velocidad sobre una solución hidroalcohólica (agua-etanol al 12% vol.) a la cual se le va agregando determinadas concentraciones de ácido málico dentro del rango comprendido entre 0 y 8 g/l, todo esto manteniendo la temperatura constante en 22 °C y aplicando el procedimiento de medida de *referencia* del apartado anterior para ajustar y compensar el resultado final.



Figura 6.10 Montaje *Prueba-Referencia* para aplicar compensaciones a las medidas de velocidad en mezclas que involucren alguna concentración fija de etanol.

Como se puede observar en la Figura 6.11, la evolución de la velocidad presenta un comportamiento decreciente ante el incremento en la concentración de ácido málico. Esta tendencia es completamente contraria a la del apartado 6.2.2.1 indicando que, ante la presencia del etanol, el efecto original que produce el ácido málico mezclado con agua sobre la velocidad de propagación se invierte. Por lo tanto, es de esperar que durante el desarrollo de la FML, la reducción del ácido málico implique un incremento en velocidad de aproximadamente 0,2 m/s por cada g/l de ácido catabolizado por las BAL.

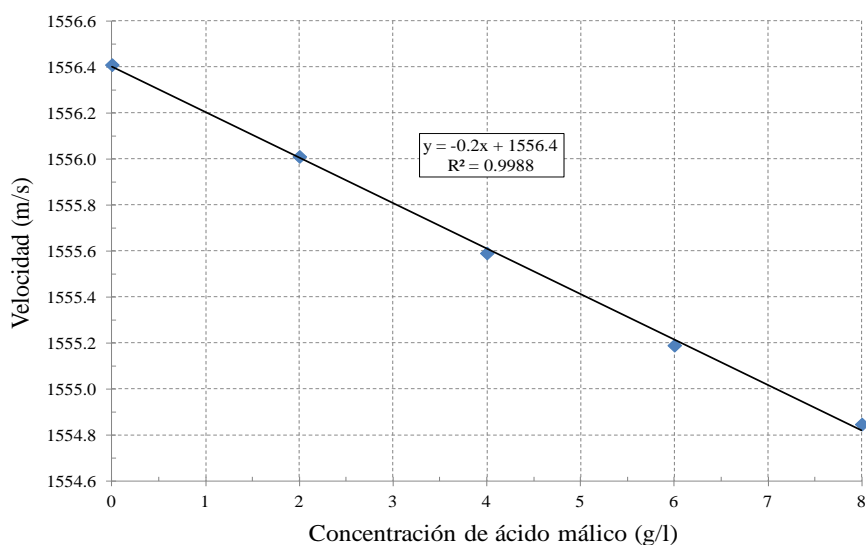


Figura 6.11 Evolución de la velocidad ultrasónica a 22 °C en una solución hidroalcohólica al 12% vol. añadiendo diferentes concentraciones de ácido málico.

6.2.3.4 Mezcla ternaria de agua, etanol y ácido láctico

De igual manera que en el apartado anterior, en esta prueba se realiza el seguimiento de la velocidad ultrasónica en una solución hidroalcohólica (agua-etanol al 12% vol.), pero en este caso el tercer componente a agregar es el ácido láctico usando las mismas concentraciones dentro del rango de 0 a 8 g/l y teniendo en cuenta las mismas consideraciones de temperatura, ajuste y compensación utilizando medida de *referencia*.

En la Figura 6.12 se puede apreciar que el comportamiento de la velocidad es inverso al de la Figura 6.11, es decir, la velocidad ultrasónica aumenta ante incrementos de concentración de ácido láctico, manteniendo el mismo comportamiento que en la prueba del apartado 6.2.2.2, e incluso pudiéndose observar que, en esta ocasión, la presencia del etanol incrementa levemente la tasa de crecimiento de la velocidad. Por consiguiente, es de esperar que, durante la FML, la producción de ácido láctico por parte de las BAL resulte en un aumento en velocidad de aproximadamente 0,3 m/s por cada nuevo g/l de ácido presente en el vino.

En un primer análisis general, se puede asumir que el vino es una mezcla compuesta entre el 95 y 99% de agua y etanol, y que en el momento de llevarse a cabo la FML, el ácido málico y ácido láctico son los únicos componentes que varían. Bajo estas condiciones, teniendo en cuenta a Resa *et al.*, 2007, es posible considerar que el efecto global sobre los parámetros de propagación de las ondas de ultrasonidos se pueda obtener mediante la superposición de los efectos individuales de cada ácido. En consecuencia, durante la monitorización de una FML completa, deberíamos esperar un comportamiento creciente de la velocidad ultrasónica registrada, la cual tendría que estabilizarse en el momento en que las concentraciones de los ácidos llegasen a su valor definitivo una vez transformado todo el ácido málico (fin de la FML).

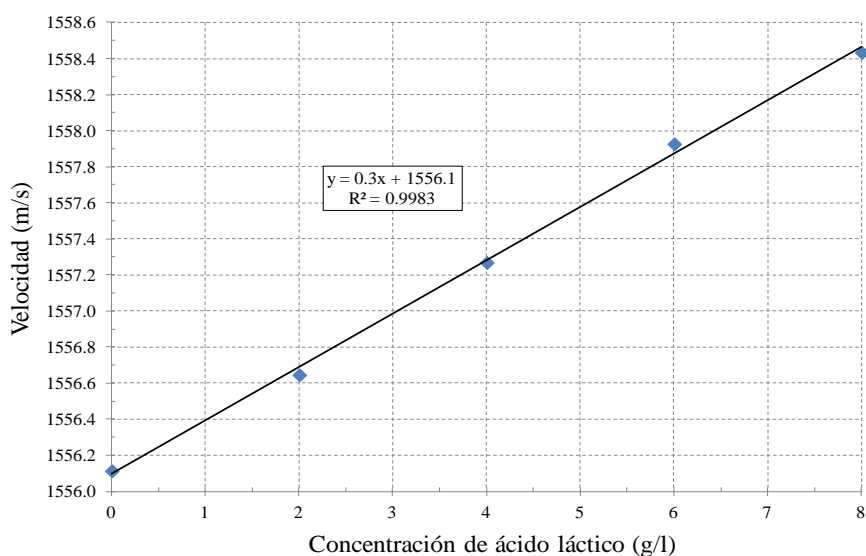


Figura 6.12 Evolución de la velocidad ultrasónica a 22 °C en una solución hidroalcohólica al 12% vol. añadiendo diferentes concentraciones de ácido láctico.

6.2.3.5 Mezclas cuaternarias de agua, etanol, ácido málico y ácido láctico

Haciendo un análisis similar al del apartado 6.2.2.3, en esta ocasión se busca confirmar que el comportamiento de la velocidad ultrasónica, durante una FML simulada, puede ser representado con la superposición de los resultados obtenidos en los apartados 6.2.3.3 y 6.2.3.4 teniendo en cuenta la presencia de un componente fundamental como lo es el etanol. Usando las Figuras 6.11 y 6.12 y como ya se mencionó en el apartado 6.2.3.4, ante la reducción del ácido málico y el incremento del ácido láctico, globalmente deberíamos esperar una tendencia creciente de la velocidad ultrasónica mientras transcurre la FML.

En la Figura 6.13 se presentan las curvas correspondientes a la medida de velocidad en mezclas de agua, etanol y ácido málico (en concentraciones fijas), a las que se le va agregando en cada medida 2 g/l de ácido láctico hasta llegar a una concentración final de 10 g/l, es decir, se monitoriza la influencia del etanol en el comportamiento de la velocidad cuando un ácido aumenta en presencia del otro.

Como se puede observar, la velocidad disminuye con el incremento de ácido málico mientras que aumenta con el incremento de ácido láctico, coincidiendo con los resultados por separado de los dos apartados anteriores cuando una de las dos concentraciones era cero. También se puede notar que, en esta ocasión y a medida que entran en juego los dos tipos de ácidos, las curvas de ajuste presentan un comportamiento de tipo lineal con valores de R^2 , en todas las rectas, por encima de 0,995.

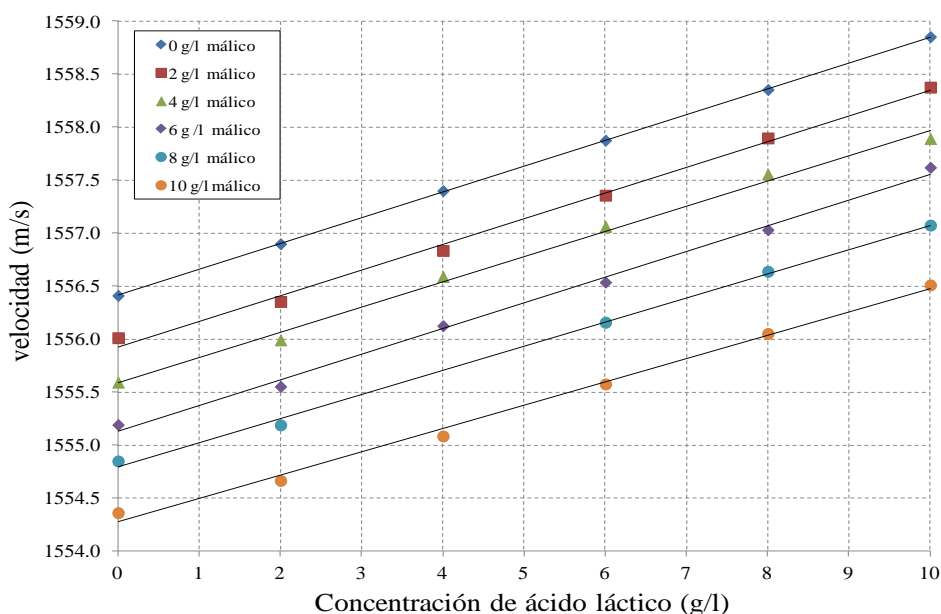


Figura 6.13 Evolución de la velocidad ultrasónica medida a 22 °C en mezclas de agua-etanol-ácido láctico-ácido málico para distintas concentraciones de ácido málico y manteniendo fija la concentración de etanol (12% vol.) mientras varía la concentración de láctico

Realizando la misma suposición del apartado 6.2.2.3, si una FML inicia con 8 g/l de ácido málico y finaliza con 0 g/l del mismo, según el balance teórico de la FML, esto conllevará a la producción aproximada de 5,4 g/l de ácido láctico. Por lo tanto, descartando nuevamente el CO₂ producido, la desaparición total del ácido málico acarreará un incremento en la velocidad de 1,60 m/s ($8 \text{ g/l} * 0,20 \text{ m/s por g/l}$) al tiempo que la producción de ácido láctico aportará un incremento de 1,62 m/s ($5,4 \text{ g/l} * 0,30 \text{ m/s por g/l}$). De esta manera, el incremento esperado entre la velocidad al inicio de la FML y la velocidad al final será, aproximadamente, de 3,22 m/s ($1,60 \text{ m/s} + 1,62 \text{ m/s}$).

Una vez más, el incremento esperado durante el desarrollo de la FML es bastante cercano a los 3,05 m/s que se obtienen de restar, con ayuda de la Figura 6,13, la velocidad de la curva *8 g/l málico* cuando la concentración de láctico es 0 g/l (velocidad inicial) con la velocidad, extrapolada, de la curva *0 g/l málico* cuando la concentración de láctico es 5,4 g/l (velocidad final). Es decir, 1557,80 m/s - 1554,75 m/s.

Como se ha dicho, ésta es una primera aproximación para describir la evolución de la propagación de ondas de ultrasonidos durante la FML del vino tinto. Como se verá más adelante, esta fermentación es un proceso complejo que involucra más parámetros, algunos de mayor influencia que otros, que de alguna manera también pueden ser parte importante en la modificación de las características acústicas del vino.

Comparando los resultados de los apartados 6.2.2.1, 6.2.2.2, 6.2.3.3, 6.2.3.4 y este último, sobresale el comportamiento inverso que presenta la evolución de la velocidad ultrasónica al añadir ácido málico en una solución acuosa y al hacerlo en una solución hidroalcohólica, circunstancia que no ocurre al realizar el experimento con ácido láctico.

Para encontrar una explicación a este resultado, se hace indispensable realizar un análisis abordando algunas de las interacciones químicas que se pueden dar entre los componentes que intervienen (agua, etanol y ácido correspondiente). De esta manera, si el soluto es ácido málico puro (sólido cristalino a temperatura ambiente) y el solvente la solución hidroalcohólica, se estará dando oportunidad a la presencia de una reacción de esterificación ácido-etanol, es decir, al tratarse de un ácido dicarboxílico, cada una de las moléculas de málico tiene la oportunidad de reaccionar con dos moléculas de etanol para producir una nueva molécula de malato de etilo (éster) y dos moléculas de agua. Como consecuencia y dependiendo de la espontaneidad y rapidez de la reacción, la concentración de etanol en la mezcla disminuirá mientras la concentración de agua aumentaría, dos factores que, como se ha visto por separado, contribuyen a la reducción de la velocidad ultrasónica. Por un lado, la velocidad en el agua pura es menor que la velocidad en una solución hidroalcohólica (apartado 6.2.1) y por otro, en la solución hidroalcohólica, si la concentración se mantiene por debajo del 30%, la velocidad

disminuye cuando el etanol disminuye (Resa *et al.*, 2004). Por consiguiente, la superposición de los dos efectos reforzaría la evolución negativa de la velocidad en la mezcla ternaria agua-etanol-ácido málico coincidiendo con los resultados experimentales obtenidos (apartado 6.2.3.3).

Ahora, si el soluto es ácido láctico puro (líquido viscoso en gran parte polimerizado a temperatura ambiente), para que en la solución hidroalcohólica se presente la misma reacción de esterificación ácido-etanol, primero es necesario que se desarrolle un proceso de monomerización ácido-agua (sólo el ácido láctico monómero es reactivo con el etanol). Puesto que dicha monomerización suele ser un proceso lento que puede durar varios días, se podría esperar que la reacción de esterificación se diera en menor medida que en el caso del ácido málico. Además, al tratarse de un ácido monocarboxílico, cada molécula de ácido láctico sólo podría reaccionar con una molécula de etanol, generándose menos agua y reduciéndose en menor cantidad el etanol y por consiguiente, siendo menos influyente en la evolución de la velocidad ultrasónica. Por ello, en mezclas agua-etanol-ácido láctico, el principal factor de variación de la velocidad podría deberse básicamente a la concentración de ácido polimerizado y, al igual que sucede con disoluciones acuosas puras, ésta va aumentando a medida que el ácido incrementa su concentración (apartados 6.2.2.2 y 6.2.3.4).

6.2.4 Comportamiento de los ultrasonidos ante variaciones de turbidez

La turbidez es un parámetro importante que presenta grandes variaciones durante el desarrollo de la FA, aunque no deja de estar presente, en menor proporción, durante la FML e incluso, suele ser una de las medidas de interés enológico que se realizan para llevar a cabo la monitorización del proceso maloláctico. Por consiguiente, se considera necesario tener presente su influencia sobre la velocidad de propagación de las ondas de ultrasonidos. La Figura 6.14 representa la evolución de la velocidad medida en varias muestras de vino tinto de la variedad Merlot, preparadas con diferentes niveles de turbidez que abarcan el rango que va de 0,6 a 520 NTU (unidades nefelométricas).

Como se puede observar, el comportamiento de la velocidad presenta una tendencia lineal decreciente con una tasa de reducción de -0,008 m/s por NTU, demostrando la relación entre velocidad y turbidez. Relación a tener en cuenta en procesos con grandes variaciones de turbidez, pero que podría ser considerada poco influyente en FML's donde se suelen registrar variaciones de unas pocas NTU.

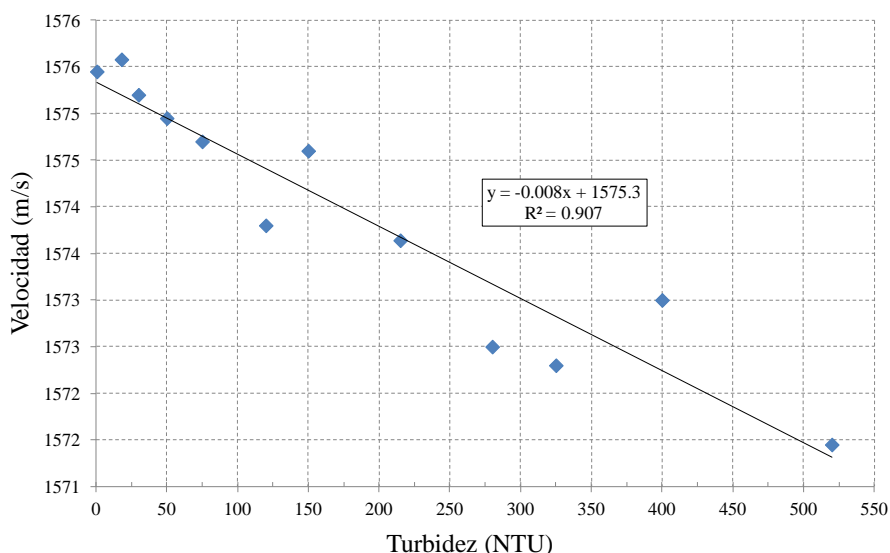


Figura 6.14 Evolución de la velocidad de propagación ultrasónica a 22 °C en función de la turbidez para muestras de vino de la variedad Merlot.

6.2.5 Comportamiento de los ultrasonidos ante CO₂ disuelto

Recordando del balance estequiométrico de la FML, durante la descarboxilación del ácido málico, aparte de la producción de ácido láctico, también tiene lugar la producción de CO₂. Inicialmente, dicho gas se presenta disuelto en el vino y cuando el límite de saturación es alcanzado, el exceso de CO₂ empieza a manifestarse en forma de burbujas. Según Lounvaud-Funel & Matsumoto (1979), a una temperatura de 20°C, se llega a saturación cuando en 1 litro de vino la concentración de CO₂ registra un valor de 0,73 l.

Becker *et al.* (2001), estudiaron el comportamiento de la velocidad ultrasónica ante CO₂ disuelto en agua destilada demostrando que la velocidad aumentaba con los incrementos, sin llegar a saturación, en la concentración del gas. De otro lado, Resa *et al.* (2009) hicieron lo correspondiente para el caso en que el CO₂, disuelto en el agua, hace presencia en forma de burbujas advirtiéndole que, de esta manera, el medio se hace más atenuante y reduce la velocidad de las ondas de ultrasonido que se propagan por él. Además, demuestran que trabajando a frecuencias por encima de la frecuencia de resonancia de las burbujas (0,6 MHz máximo), la medida con los ultrasonidos no debe verse alterada por la presencia de dichas burbujas.

En nuestro caso, para una FML como las que hemos monitorizado, la concentración de ácido málico inicial puede estar, en promedio, en 1,53 g/l. Por lo cual, si por cada mol de ácido málico se produce un mol de CO₂ y todo el ácido málico es transformado, de acuerdo a la ley de los gases ideales, esto conllevaría a la producción de 0,25 l de CO₂ por litro de vino. De esta manera, el CO₂ de nuestras FML's estará presente de forma disuelta contribuyendo al incremento de la velocidad ultrasónica. Por otro lado, como la frecuencia de trabajo se ha

establecido en 1 MHz, podremos evitar la influencia negativa en el caso de que se presente la formación de burbujas de CO₂.

6.3 Monitorización de la FML en plantas piloto y bodegas

6.3.1 Medidas en colaboración con el INCAVI

Como parte del proceso de puesta en marcha y ajuste del sistema de medida ultrasónico, se empieza por realizar una serie de medidas de prueba en colaboración con el personal del INCAVI (Institut Català de la Vinya i el Vi) en su bodega experimental de Vilafranca del Penedès. De esta manera, las primeras FML's monitorizadas son seguimientos hechos al vino tinto elaborado con dos variedades de uva, Tempranillo (*Te*) y Merlot (*Me*), con los cuales se organizan dos conjuntos de medidas utilizando tres tanques de acero inoxidable con capacidad para 100 litros c/u.

Para el primer conjunto de medidas (*conjunto1*), se distribuye el vino tinto en los tanques de la siguiente manera: *Tanque1-Te*, *Tanque2-Te* y *Tanque3-Me* y los resultados obtenidos han sido útiles, principalmente, para poner a prueba y observar el desempeño del sistema de medida fuera del laboratorio e igualmente, para proponer y adoptar modificaciones necesarias en la mejora de dicho desempeño. Posteriormente, las medidas del segundo conjunto (*conjunto2*) se hacen aplicando dichas modificaciones y distribuyendo el vino en: *TanqueA-Te*, *TanqueB-Me* y *TanqueC-Te*.

6.3.1.1 Conjunto1, velocidad de los ultrasonidos y monitorización de parámetros enológicos convencionales

En esta ocasión se lleva a cabo la monitorización ultrasónica, mediante la toma de tres medidas consecutivas cada hora, de la FML llevada a cabo por el vino tinto almacenado en cada uno de los tres tanques. Paralelamente, cada 2 o 3 días, se extraía una muestra de vino de cada tanque para medir parámetros enológicos como concentración de ácido málico, concentración de ácido láctico, acidez volátil, turbidez, población de bacterias y temperatura, de los cuales, en este caso, sólo se presentarán los resultados de los dos primeros por ser suficientes para el análisis que se quiere realizar.

En las Figuras 6.15, 6.16 y 6.17 se presentan la evolución de la velocidad ultrasónica para el vino de cada tanque junto con las correspondientes concentraciones de los ácidos málico y láctico (curvas usadas como referencia enológica).

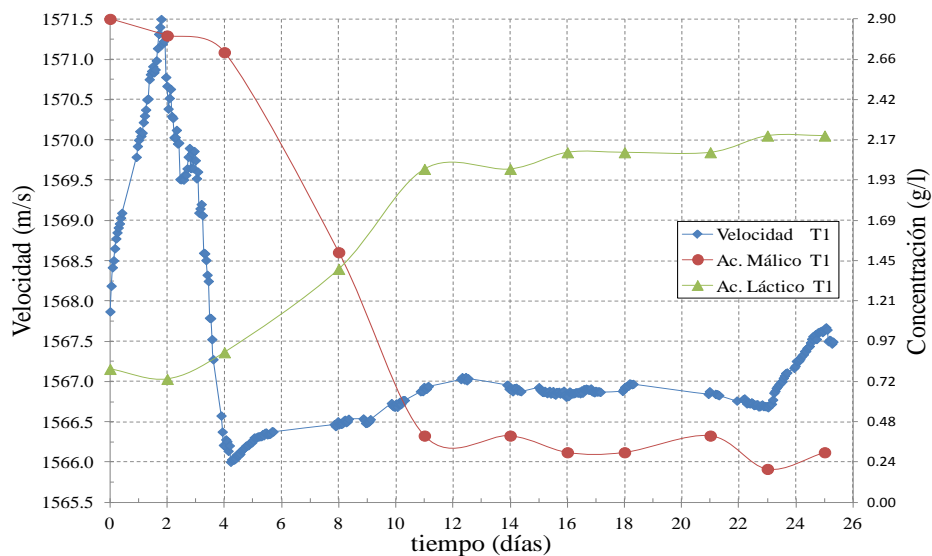


Figura 6.15 Evolución de la velocidad ultrasónica durante el desarrollo de la FML vs. Evolución de las concentraciones de los ácidos málico y láctico para el vino almacenado en *Tanque1-Te* (T1).

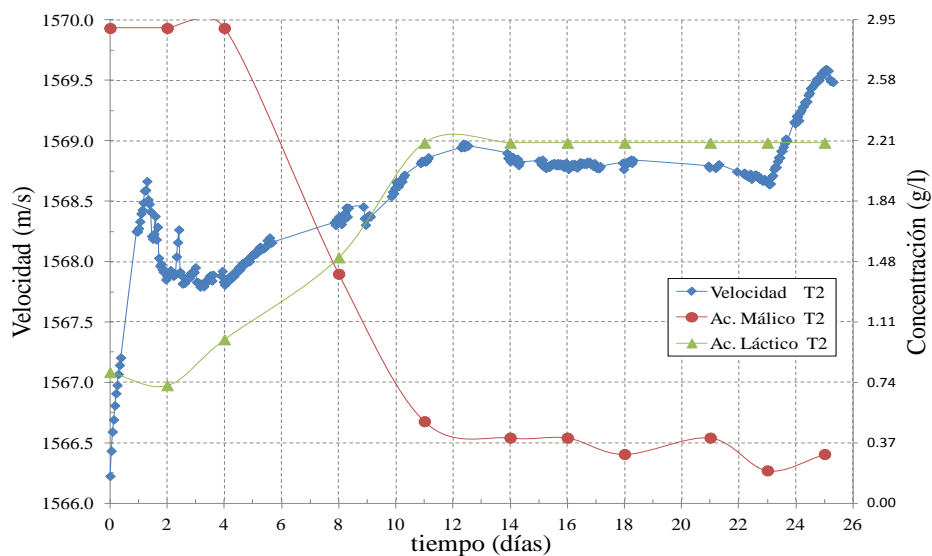


Figura 6.16 Evolución de la velocidad ultrasónica durante el desarrollo de la FML vs. Evolución de las concentraciones de los ácidos málico y láctico para el vino almacenado en *Tanque2-Te* (T2).

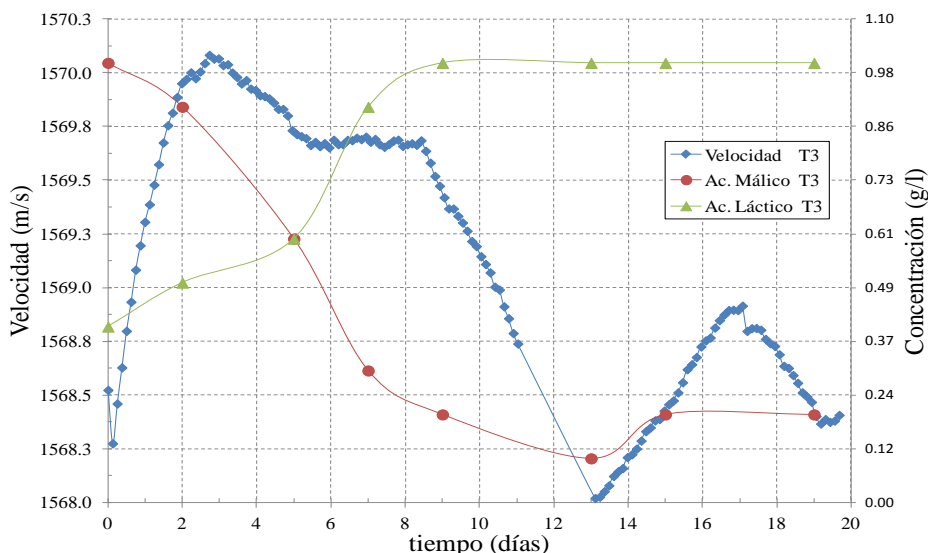


Figura 6.17 Evolución de la velocidad ultrasónica durante el desarrollo de la FML vs. Evolución de las concentraciones de los ácidos málico y láctico para el vino almacenado en *Tanque3-Me* (T3).

Observando el comportamiento de las curvas en las tres figuras anteriores, se destacan algunos aspectos importantes, los cuales se discuten a continuación.

En primer lugar, se puede apreciar la ausencia en algunos intervalos, incluso mayores a un día, de valores de velocidad. Éste hecho es debido a un fallo en el programa de control y adquisición de datos que, al estar trabajando continuamente durante mucho tiempo, llegaba a detener su funcionamiento cuando fallaba en el momento de estar realizando alguna medida, siendo necesario, generalmente, reiniciar de forma manual nuevamente la toma de datos. Este inconveniente ya fue subsanado en posteriores versiones del programa de adquisición, siendo una de las mejoras que se realizaron para que el propio programa fuera capaz de detectar si se produce fallo en el momento en que se está haciendo la medida y por consiguiente, repita inmediatamente y de forma automática dicha toma de datos.

En segundo lugar, se registran algunos comportamientos destacables para cada curva de velocidad. En la Figura 6.15, la velocidad empieza aumentando durante los dos primeros días para luego disminuir bruscamente durante dos días más, por el contrario, las concentraciones de los ácidos málico y láctico reportan poca variación durante estos cuatro días pudiéndose considerar que su influencia en los cambios de velocidad, para este intervalo, es prácticamente despreciable. Más adelante, a partir del cuarto día y hasta un poco más allá del duodécimo día, la velocidad va aumentando levemente hasta registrar una variación aproximada de 1 m/s (1567,028 - 1566,003). Igualmente, durante este intervalo de tiempo, el ácido málico presenta una reducción de 2,2 g/l y el ácido láctico un incremento de 1,2 g/l con lo cual, según los resultados de los apartados 6.2.3.3 y 6.2.3.4, su contribución total al aumento de velocidad

debería ser de 0,8 m/s ($2,2 \cdot 0,2 + 1,2 \cdot 0,3$), un valor bastante cercano a la variación real de velocidad que se ha medido.

Un caso similar se presenta en los resultados de velocidad de la Figura 6.26 mientras que los de la Figura 6.27 presentan un comportamiento un tanto diferente con un incremento elevado durante los tres primeros días, una leve reducción durante los siguientes tres días, una evolución casi constante durante aproximadamente dos días y pasado el octavo día, una reducción abrupta hasta llegar al undécimo día, momento en el cual, el sistema de medida se detiene volviendo a ponerse en marcha dos días después con un registro final en el comportamiento de velocidad que sigue estando fuera de lo esperado según la evolución de las concentraciones de los ácidos málico y láctico.

De esta manera, analizando los intervalos anómalos en los resultados de velocidad de estas tres pruebas, teniendo en cuenta todo lo mencionado respecto a la influencia de la temperatura en la propagación de ondas de ultrasonido y observando las variaciones de las temperaturas que se midieron en esta ocasión, Tabla 6.1, se llega a la consideración de que este parámetro puede estar detrás de la aparición de dichas anomalías, pero, ya que sólo se realizaba la medida de temperatura cuando se tomaban las respectivas muestras de vino para el análisis enológico, se considera necesario llevar un seguimiento más completo que permita confirmar dicha consideración y que sirva como información útil para aplicar las compensaciones necesarias que permitan descartar cualquier influencia térmica sobre los resultados obtenidos. Esta mejora se consigue incorporando un sensor de temperatura, como se describe en el capítulo 5, al sistema de medida ultrasónico y modificando el programa de control y toma de datos para que realice también una medida de temperatura cada vez que se hace una medida ultrasónica.

Día	Temp (°C) Tanque1-Te	Temp (°C) Tanque2-Te	Temp (°C) Tanque3-Me
0	19,5	19,4	19,2
2			20,3
4	21,5	21,6	20
8	21,8	21,5	20,1
11	22,1	22	19,9
14	21,7	21,6	19,2
16			19,8
18			19,5
21	22,2	22,1	
23	21,6	21,6	
25	22,3	22,2	

Tabla 6.1 Valores de temperatura medidos durante la toma de muestras para el análisis enológico del vino contenido en cada uno de los tanques de fermentación.

En tercer lugar, es destacable, sobre todo para las dos primeras figuras, que la evolución de la velocidad tiende a un comportamiento constante en el momento en que la concentración del ácido málico llega a la fase estacionaria (medida de un valor mínimo de ácido que reporta el final de la FML) dando claras señales que la velocidad deja de variar cuando la FML ha finalizado.

6.3.1.2 Conjunto2, velocidad de los ultrasonidos y monitorización de parámetros enológicos convencionales

Una vez se han aplicado las respectivas modificaciones al sistema de media y al software de control, se prepara todo lo necesario para realizar un nuevo conjunto de pruebas que, en esta oportunidad, corresponden a la monitorización, durante 18 días, de las FML's desarrolladas por nuevas muestras de vinos almacenados en los tres tanques y distribuidos de la siguiente manera: *TanqueA-Te*, *TanqueB-Me* y *TanqueC-Te*. Simultáneamente, las medidas convencionales se llevan a cabo midiendo cuatro parámetros enológicos: concentración de los ácidos málico y láctico, acidez volátil y crecimiento bacteriano.

Las Figuras 6.18, 6.19 y 6.20 contienen la evolución de la velocidad ultrasónica para el vino de cada tanque junto con las correspondientes concentraciones de los ácidos málico y láctico (curvas usadas como referencia). Como se puede observar, para este conjunto de FML's, se han realizado tres medidas ultrasónicas cada hora mientras que la toma de datos enológicos no se ha hecho a intervalos de tiempo constante.

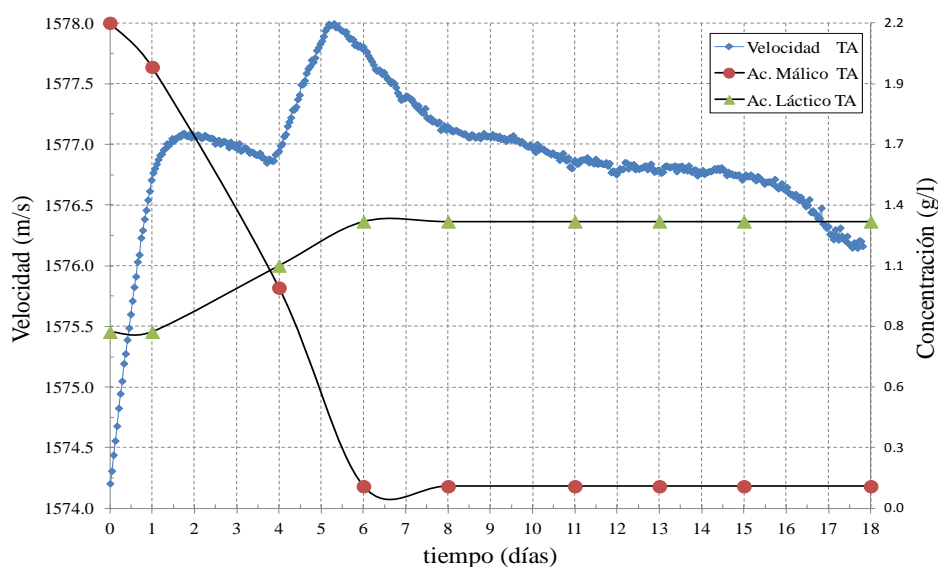


Figura 6.18 Evolución de la velocidad ultrasónica durante el desarrollo de la FML vs. Evolución de las concentraciones de los ácidos málico y láctico para el vino almacenado en *TanqueA-Te* (TA).

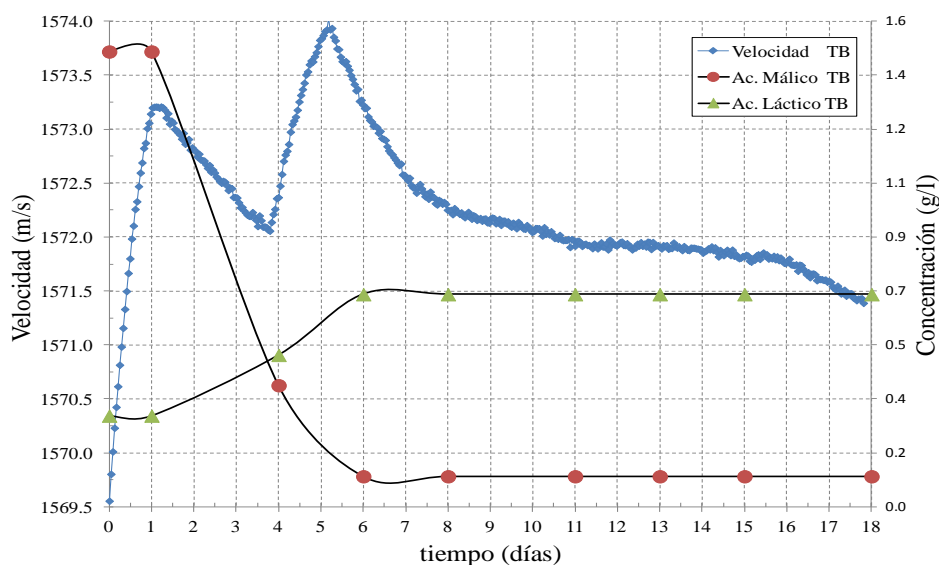


Figura 6.19 Evolución de la velocidad ultrasónica durante el desarrollo de la FML vs. Evolución de las concentraciones de los ácidos málico y láctico para el vino almacenado en *TanqueB-Me* (TB).

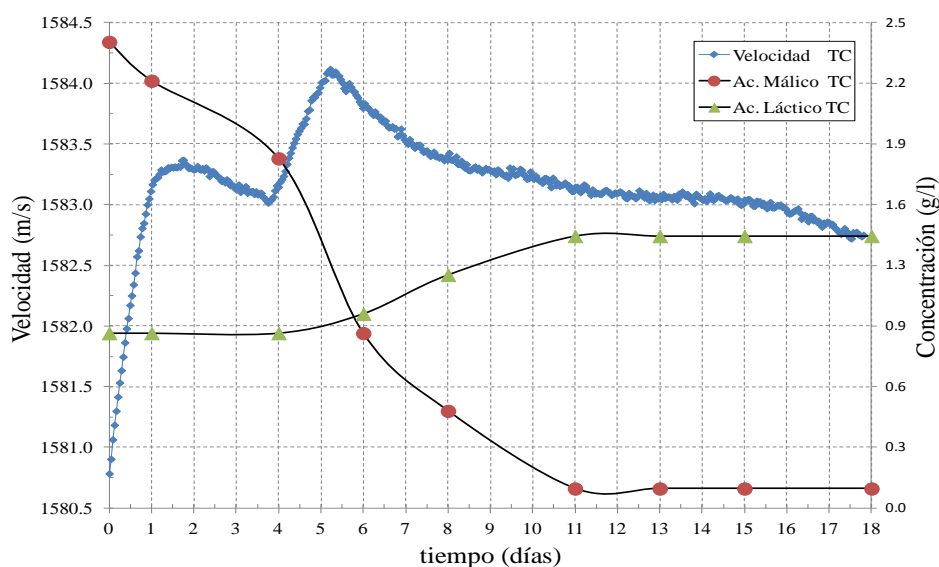


Figura 6.20 Evolución de la velocidad ultrasónica durante el desarrollo de la FML vs. Evolución de las concentraciones de los ácidos málico y láctico para el vino almacenado en *TanqueC-Te* (TC).

En cuanto a la evolución de la velocidad de los ultrasonidos, las tres pruebas presentan un comportamiento similar y unas curvas un poco particulares. Aquí se hará destacable el papel de la temperatura, medida cada hora también. Por el lado de las concentraciones de los ácidos málico y láctico, en los dos primeros tanques se considera que la fase estacionaria es alcanzada a partir del octavo día y en el tercero a partir del undécimo día.

La Figura 6.21 contiene la medida de la población de bacterias. Como puede apreciarse, las BAL empiezan a crecer tan pronto son inoculadas en el vino y, en esta oportunidad, en los 3 tanques hay una etapa de comportamiento constante que dura hasta el cuarto día, a partir de este momento crecen de forma progresiva hasta llegar al octavo día, aquí nuevamente dejan de reportar una actividad destacable coincidiendo con la fase estacionaria del ácido málico que se registra en *TanqueA* y *TanqueB*.

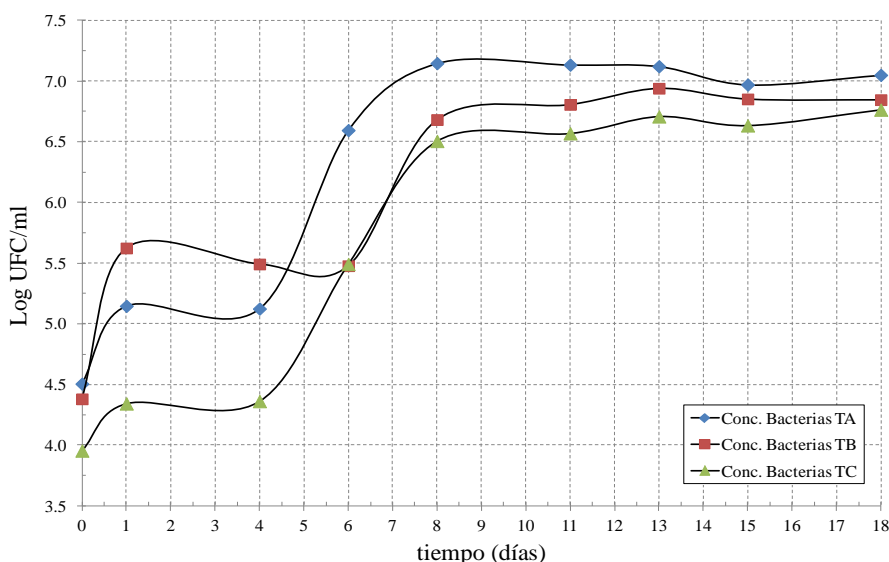


Figura 6.21 Evolución de la población de BAL durante el desarrollo de la FML para el vino almacenado en *TanqueA-Te* (TA), *TanqueB-Me* (TB) y *TanqueC-Te* (TC).

Por último, la acidez volátil representa un conjunto de ácidos (principalmente ácido acético) que se forman durante la elaboración del vino y pueden incrementar con la FML. Su monitorización es importante porque suele ser un indicador, cuando registra valores más elevados de lo adecuado, del riesgo que puede llegar a correr el vino de picarse y avinagrarse con el tiempo.

La Figura 6.22 muestra la evolución de la acidez volátil durante la FML en los tres tanques, el comportamiento general indica un aumento entre el valor inicial y el valor final en cada caso, señalando que durante la FML se ha generado más de estos ácidos, no obstante, los valores de concentración se mantienen por debajo de la referencia de 0,6 g/l, es decir, la acidez volátil se mantiene dentro del rango en el que se considera que contribuye positivamente a la complejidad del aroma en el vino (Lerm *et al.*, 2010).

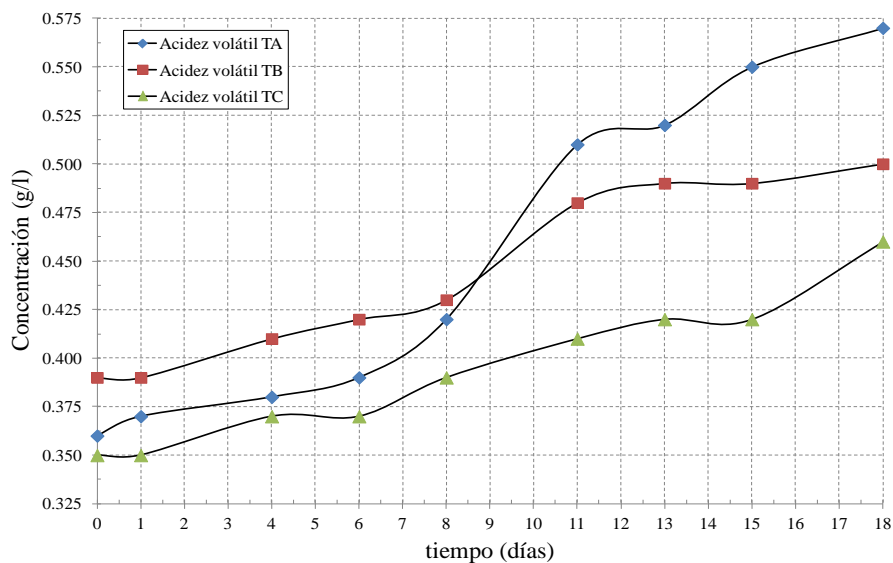


Figura 6.22 Evolución de la acidez volátil durante el desarrollo de la FML para el vino almacenado en *TanqueA-Te* (TA), *TanqueB-Me* (TB) y *TanqueC-Te* (TC).

6.3.1.2.1 Variaciones de temperatura durante la monitorización de la FML

Para este conjunto de medidas, la temperatura del vino presenta una evolución peculiar que afecta a las curvas de velocidad ultrasónica. En la Figura 6.23 se puede observar la evolución de la temperatura en el interior de cada tanque durante el desarrollo de toda la FML.

En esta ocasión, se presentó la necesidad de aumentar artificialmente la temperatura de la sala donde estaban ubicados los tanques con el vino ya que las condiciones de temperatura registraban un valor un poco más bajo del adecuado para iniciar la actividad de las BAL. Por tal motivo, se puso un radiador frente a los tanques y de esta manera, como se puede observar en cada curva, la temperatura empezó a aumentar muy rápidamente durante el primer día. Casualmente, estas primeras 24 horas de actividad abarcaban entre las 14:00 horas de un jueves y las 14:00 horas del día siguiente, viernes en el cual el personal del INCAVI inicia el fin de semana y el radiador es apagado. Esto último explica el siguiente tramo descendiente de la temperatura que va desde el viernes a las 14:00 hasta el siguiente lunes a las 09:00 horas, a pesar de que son casi 3 días, la temperatura no desciende tan precipitadamente como aconteció con el aumento del primer día, seguramente porque el calor generado por la FML ya hace efecto conservando y manteniendo más elevada la temperatura en el vino. Llegado el lunes, se decide encender de nuevo el radiador, suministrando otro aumento rápido de temperatura que va hasta el día siguiente a la misma hora (09:00), a partir del martes, se apaga el radiador y no se vuelve a encender durante lo que queda de FML.

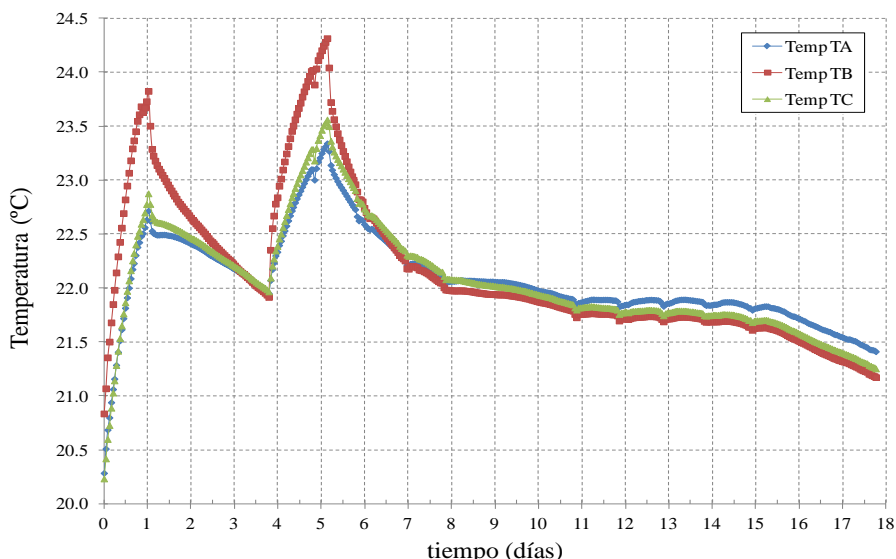


Figura 6.23 Evolución de temperatura durante el desarrollo de la FML para el vino almacenado en *TanqueA-Te* (TA), *TanqueB-Me* (TB) y *TanqueC-Te* (TC).

Igualmente, se puede observar que la temperatura de *TanqueB* sobresale más que las otras dos cuando el radiador permanece encendido. Esto se debe a que dicho tanque era el que estaba ubicado más cerca del radiador, quedando por delante de otros dos.

Visto de esta manera, podría pensarse que por el hecho de intervenir un factor externo que manipula, en algunos tramos, el comportamiento de la temperatura, se complica la opción de obtener resultados útiles a la hora de poner en marcha el análisis ultrasónico. Si bien es cierto que el desarrollo puede ser más difícil, en las siguientes secciones se comprobará que aún así, de los resultados obtenidos se puede extraer información aprovechable.

6.3.1.2.2 Análisis correlativo de los resultados obtenidos

La Tabla 6.2 contiene los valores del coeficiente de correlación de Pearson y del p-valor, calculados entre parámetros enológicos y ultrasónicos de forma indiferente. Por otro lado, al contar con más cantidad de medidas ultrasónicas que enológicas, se realiza una selección de aquellas velocidades que coinciden en tiempo con el momento en que se llevo a cabo la medida enológica en el vino de cada tanque.

Como observación general, se advierte que entre parámetros enológicos los valores de correlación son altos, especialmente entre los ácidos málico y láctico por un lado y entre la población de bacterias y todos los demás por el otro.

Tanque		Conc. Máfico	Conc. Láctico	Acidez volátil	Conc. Bacterias
<i>Tanque A-Te</i>	Velocidad	-0,622 (0,073)	0,596 (0,090)	0,107 (0,784)	0,533 (0,140)
	Vel_{comp}	-0,964 (0,000)	0,966 (0,000)	0,514 (0,157)	0,872 (0,002)
	Conc. Máfico				-0,943 (0,000)
	Conc. Láctico	-0,998 (0,000)			0,925 (0,000)
	Acidez volátil	-0,702 (0,035)	0,692 (0,039)		0,769 (0,015)
<i>Tanque B-Me</i>	Velocidad	-0,262 (0,496)	0,232 (0,548)	-0,074 (0,851)	0,262 (0,496)
	Vel_{comp}	-0,903 (0,001)	0,953 (0,000)	0,718 (0,029)	0,805 (0,009)
	Conc. Máfico				-0,755 (0,019)
	Conc. Láctico	-0,976 (0,000)			0,797 (0,010)
	Acidez volátil	-0,741 (0,022)	0,789 (0,011)		0,870 (0,002)
<i>Tanque C-Te</i>	Velocidad	-0,478 (0,193)	0,243 (0,529)	0,215 (0,578)	0,447 (0,228)
	Vel_{comp}	-0,926 (0,000)	0,897 (0,001)	0,880 (0,002)	0,917 (0,001)
	Conc. Máfico				-0,987 (0,000)
	Conc. Láctico	-0,942 (0,000)			0,949 (0,000)
	Acidez volátil	-0,873 (0,002)	0,914 (0,001)		0,871 (0,002)

Tabla 6.2 Coeficiente de correlación de Pearson y p-valor (segunda cantidad entre paréntesis) calculados entre las medidas llevadas a cabo durante la FML de cada tanque (convencionales y ultrasónicas de forma indiferente).

Ahora, en lo que respecta a la velocidad, se ha hecho un primer cálculo de correlaciones utilizando los valores originales medidos. Como se puede observar, los resultados no son los esperados y la relación estadística entre velocidad y parámetros convencionales es casi despreciable (especialmente para *TanqueB* y *TanqueC*).

Por tal motivo, se realiza un segundo cálculo del coeficiente de correlación de Pearson usando unos valores de velocidad compensados (Vel_{comp}). Es decir, partiendo de las muestras de velocidad tomadas de la curva original y con ayuda de la Ec. 6.1, se resta el efecto de las variaciones de temperatura o, en otras palabras, se aplica una compensación por variación de temperatura según el grado alcohólico de cada vino (*TanqueA-Te*, 12,96% vol.; *TanqueB-Me*,

12,46% vol. y *TanqueC-Te*, 13,85% vol.). La Figura 6.24 es un ejemplo de dicha compensación para las velocidades del vino almacenado en *TanqueA-Te*.

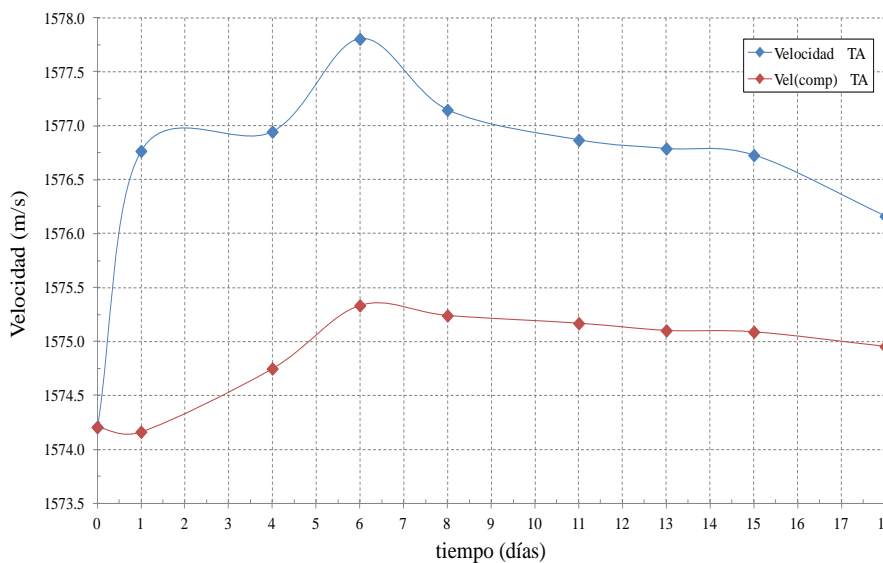


Figura 6.24 Evolución de la velocidad de los ultrasonidos en el vino de *TanqueA-Te* (TA) compensada en temperatura (Vel_{comp}).

De esta manera, las nuevas correlaciones entre velocidad compensada (Vel_{comp}) y parámetros enológicos mejoran considerablemente (Tabla 6.1). Es de destacar, en especial, la excelente correlación entre velocidad y concentraciones de los ácidos málico y láctico que, como se ha venido trabajando, son los usados como referencia para determinar el final de la FML y por consiguiente permiten demostrar que las medidas realizadas son útiles en el objetivo de monitorizar todo el proceso maloláctico y que las modificaciones llevadas a cabo son necesarias y prácticas.

6.3.2 Medidas en colaboración con la Universidad de Valladolid

Teniendo en cuenta las observaciones y sugerencias, para optimizar el desempeño del sistema de medida ultrasónico, derivadas del desarrollo experimental presentado en el apartado 6.3.1, se realiza un desplazamiento geográfico para llevar a cabo un tercer conjunto de pruebas experimentales. Como ya fue descrito en el capítulo anterior (Materiales y Métodos), las FML's monitorizadas con ayuda del grupo de investigación ENOBIOTEC de las áreas de Tecnología de Alimentos y Microbiología de la Escuela Técnica Superior de Ingenierías Agrarias de la Universidad de Valladolid (Campus de Palencia), son seguimientos hechos durante 14 días al vino elaborado con uva de la variedad Tempranillo, distribuido en dos tanques de acero inoxidable (*Tanque1* y *Tanque2*) con capacidad para 100 litros c/u y ubicados en su bodega experimental.

6.3.2.1 Medidas de parámetros enológicos convencionales

Siguiendo las pautas de lo que sería la monitorización convencional de una FML industrial, se realiza el seguimiento evolutivo de parámetros como la concentración de los ácidos málico y láctico, el pH, la acidez total, la turbidez y el crecimiento bacteriano, entre otros.

En la Tabla 6.3 se pueden encontrar las características químicas medidas en el vino antes de iniciar la FML y las características químicas medidas, en el contenido de cada tanque, al final del proceso maloláctico.

Parámetro	Antes de la FML	Después de la FML	
		Tanque1	Tanque2
pH	3,58	3,82	3,80
Acidez volátil (g/l ácido acético)	0,24	0,49	0,41
Acidez total (g/l ácido tartárico)	4,74	3,91	3,93
Grado alcohólico (%)	14,2	14,2	14,2
Turbidez (NTU)	59	23	23
Ácido málico (g/l)	1,53	0,03	0,01
Ácido láctico (g/l)	0,34	1,37	1,33

Tabla 6.3 Características analíticas del vino tinto Tempranillo antes y después de llevarse a cabo el proceso de FML.

A continuación, se presenta de forma gráfica el seguimiento evolutivo de los principales parámetros de interés enológico que se suelen utilizar para caracterizar el desarrollo completo de una FML.

6.3.2.1.1 Evolución de las concentraciones de ácido málico y ácido láctico

En primer lugar, se presenta la monitorización de las concentraciones de los ácidos málico y láctico durante las FML's en los tanques *Tanque1* y *Tanque2*, Figuras 6.25 y 6.26 respectivamente.

Como se puede observar, en ambos tanques, durante los primeros 2 días la variación que reporta el contenido de ácido málico es muy leve coincidiendo con la fase de crecimiento y adaptación de las BAL. Entre el segundo y el octavo día, se registra la máxima actividad catabólica de dichas bacterias, es decir, en este intervalo de tiempo se lleva a cabo la conversión de la mayor parte del ácido málico presente en el vino. Aproximadamente, se registran unas

tasas de reducción de 0,25 g/l/día para el vino de *Tanque1* y 0,24 g/l/día para el vino de *Tanque2*. Posteriormente, superado el octavo día, la evolución del ácido málico entra en una fase estacionaria anunciando el final de la FML. Tal y como se describió en el Capítulo 2, el final de la FML generalmente suele asociarse con el momento en que la concentración de ácido málico llega a un mínimo valor establecido y por consiguiente, es su curva evolutiva la que se ha venido y seguirá siendo usada como referencia para todas las otras medidas y pruebas que se realicen durante la monitorización de estas FML's.

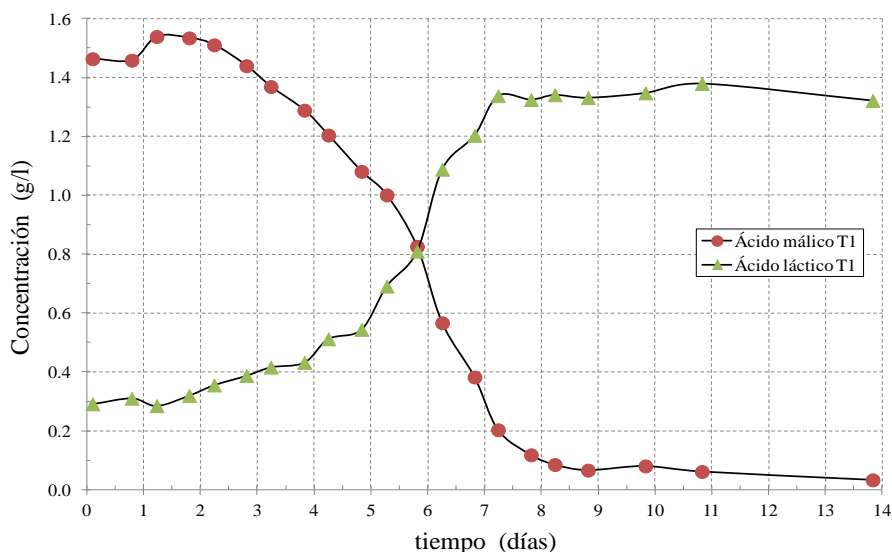


Figura 6.25 Evolución de la concentración de los ácidos málico y láctico durante el desarrollo de la FML en el vino almacenado en *Tanque1* (T1).

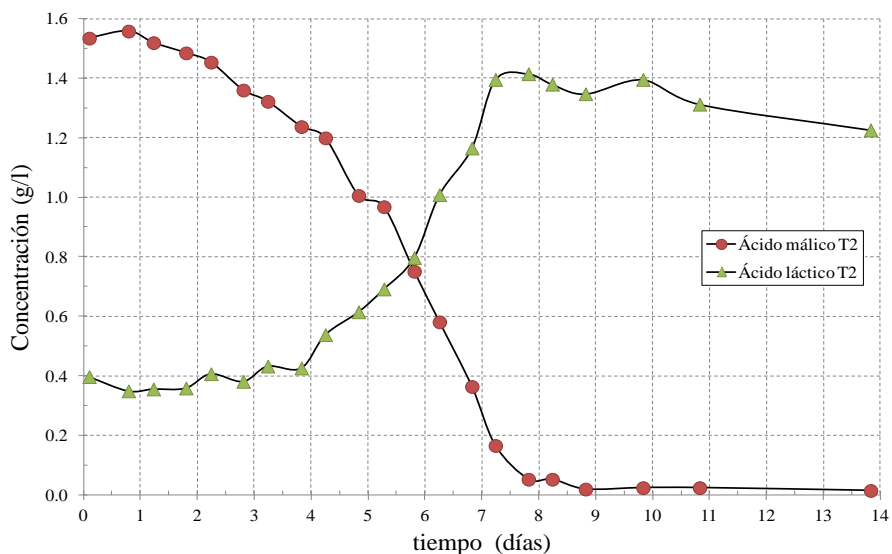


Figura 6.26 Evolución de la concentración de los ácidos málico y láctico durante el desarrollo de la FML en el vino almacenado en *Tanque2* (T2).

El ácido láctico, como es de esperar, registra una evolución que transcurre de forma paralela a lo que ocurre con el ácido málico, su variación es lenta al inicio y en el tramo comprendido entre el segundo y el octavo día se registra una tasa de aumento de aproximadamente 0,17 g/l/día en los dos tanques. Por otro lado, es destacable el hecho de que la llegada a la fase estacionaria parece ubicarse antes de la del ácido málico, un acontecimiento que tendría importancia si se tuviese que escoger entre la concentración de ácido málico y la concentración de ácido láctico como guía para determinar el final de la FML.

Finalmente, haciendo mención al balance teórico de la FML descrito en el apartado 6.2.2.3, el catabolismo de 1,53 g/l de ácido málico debería incurrir en la producción de 1,03 g/l de ácido láctico ($1,53 \cdot 0,67$). Un valor muy similar a las cantidades que se registran en ambos tanques: 1,03 g/l en *Tanque1* (1,37-0,34 g/l) y 0,99 g/l en *Tanque2* (1,33-0,34 g/l), Tabla 6.2.

6.3.2.1.2 Evolución del pH y la acidez total

Las Figuras 6.27 y 6.28, reportan el comportamiento de los parámetros que podrían considerarse los indicadores evolutivos de la acidez en el vino tinto durante la FML: el pH y la acidez total.

El pH, como se puede observar en ambas gráficas, durante los primeros 5 días registra una tendencia prácticamente constante. Pasado este momento, se van reportando leves incrementos ligados principalmente a la descarboxilación del ácido málico en ácido láctico que está aconteciendo. Al final de la FML, el pH registra un aumento de 0,24 en el vino almacenado en *Tanque1* y 0,22 en el de *Tanque2*, dichos valores se ajustan perfectamente al incremento comprendido entre 0,1 y 0,3 unidades que se suele esperar de una FML (Davis *et al.*, 1985).

En cuanto a la acidez total, como podría esperarse, reporta una significativa reducción en su concentración. En concreto, una vez finalizada la FML, se registran 0,83 g/l menos en la muestra de *Tanque1* y 0,81 g/l menos en la de *Tanque2* (g/l expresados en ácido tartárico).

Hidalgo (2011), menciona tres diferentes mecanismos como los causantes de las pérdidas en la acidez total, el primero tendría que ver con el hecho de que la FML es la causante de la transformación de un ácido fuerte (ácido málico dicarboxílico) en un ácido más débil (ácido láctico monocarboxílico), el segundo con la posible precipitación del ácido tartárico en forma de bitartrato de potasio o tartrato de calcio y el tercero con la reducción de la solubilidad del bitartrato de potasio. Igualmente, el mismo autor describe que, teóricamente, el consumo de 1 g/l de ácido málico induce un descenso de 0,6 g/l en la acidez total (expresada en ácido tartárico). Para nuestro caso, esta relación equivaldría a un valor teórico de 0,9 g/l de ácido tartárico, cantidad muy cercana a las calculadas al inicio del párrafo para cada tanque.

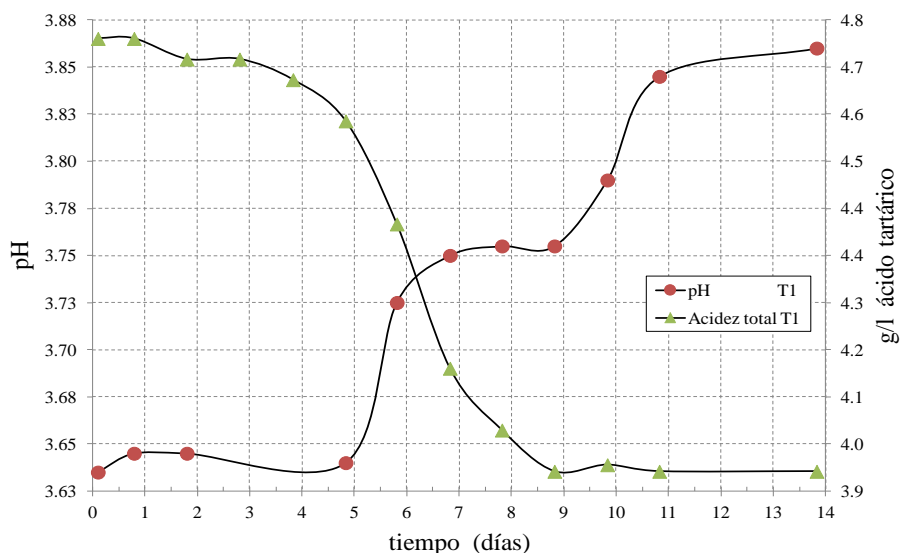


Figura 6.27 Evolución del pH y la acidez total durante el desarrollo de la FML en el vino almacenado en *Tanque1 (T1)*.

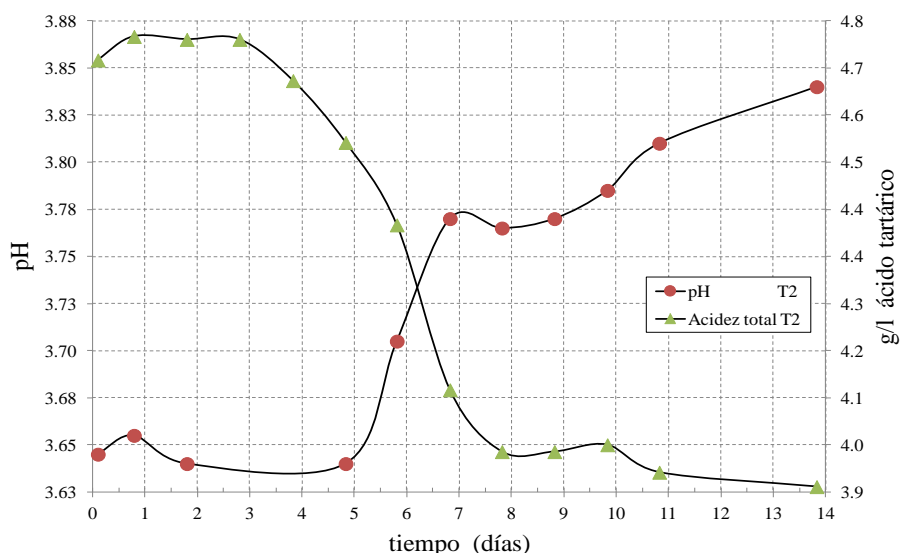


Figura 6.28 Evolución del pH y la acidez total durante el desarrollo de la FML en el vino almacenado en *Tanque2 (T2)*.

6.3.2.1.3 Evolución de la turbidez y el crecimiento de bacterias

Finalmente, completando los parámetros enológicos convencionales, en las Figuras 6.29 y 6.30 quedan registradas las medidas hechas a la población de bacterias y a la turbidez durante el desarrollo de la FML del vino tinto almacenado en cada tanque.

En cuanto a la población de bacterias, se puede apreciar fácilmente que, tan pronto son inoculadas en el vino, empiezan a crecer de forma muy rápida. Más adelante, pasados los primeros 3 días, llegan a los 6 log UFC/ml ideales para el desarrollo de la FML (Wibowo et al., 1985; Lonvaud-Funel, 1999; Lerm et al., 2010). Finalmente, transcurridos 5 días más (hasta el

día 8), alcanzan la fase estacionaria que, como se ha dicho, reporta el final de la FML. A partir de este momento, deja de detectarse degradación bacteriana de ácido málico, Figuras 6.25 y 6.26.

Contrario a lo que podría esperarse ante el crecimiento de la población bacteriana, la turbidez reporta una reducción de, aproximadamente, 36 NTU. Un hecho seguramente ligado al proceso de clarificación del vino y que según los resultados del apartado 6.2.4, se vería representado por aportes positivos a la evolución de la velocidad de propagación ultrasónica, que en nuestro caso, abarcaría los primeros 3 días.

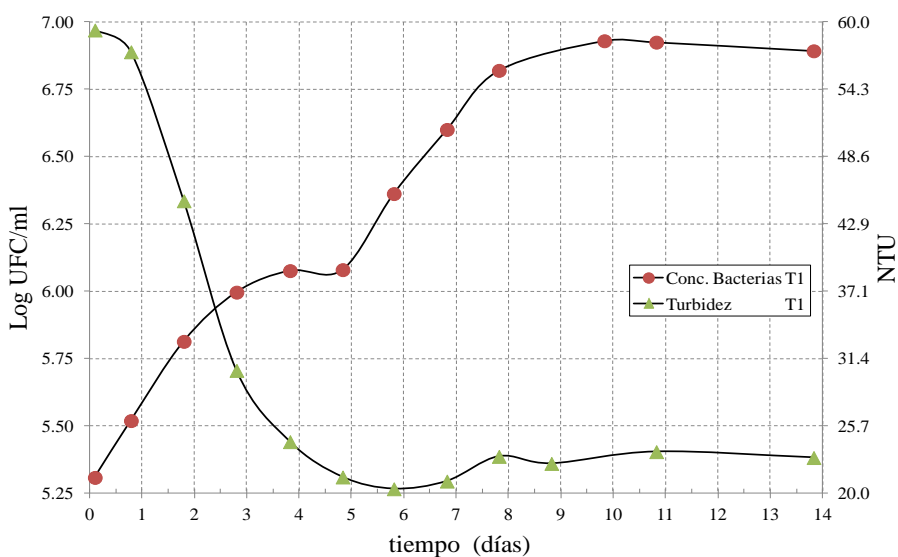


Figura 6.29 Evolución de la turbidez y el crecimiento de bacterias durante el desarrollo de la FML en el vino almacenado en *Tanque1* (T1).

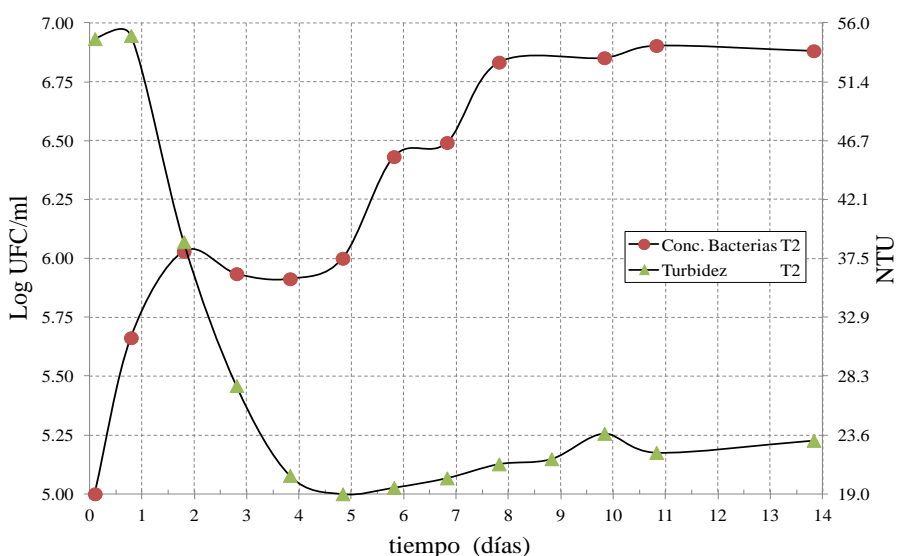


Figura 6.30 Evolución de la turbidez y el crecimiento de bacterias durante el desarrollo de la FML en el vino almacenado en *Tanque2* (T2).

6.3.2.2 Monitorización de la fermentación maloláctica mediante ondas de ultrasonido

Repasando el procedimiento llevado a cabo durante el desarrollo de la FML en los dos tanque empleados, debemos recordar que el sistema de medida ultrasónico diseñado se integraba a cada tanque para que efectuase dos medidas consecutivas cada 4 horas. Tarea que se efectúa en paralelo a la monitorización convencional descrita en el apartado 6.3.2.1.

En la Figura 6.31 se representan los resultados originales registrados, durante toda la FML, en cuanto a la evolución de la velocidad de las ondas de ultrasonido propagándose por el vino almacenado en cada tanque.

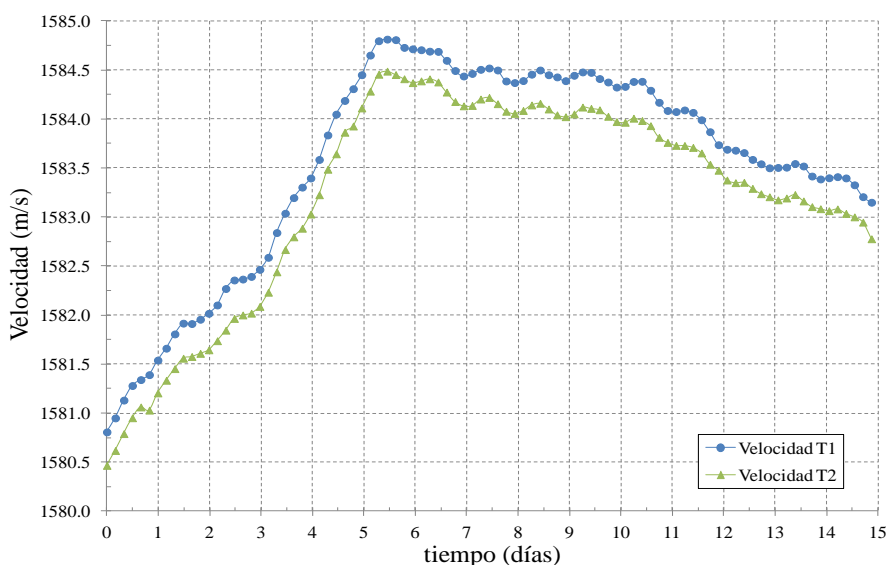


Figura 6.31 Evolución de la velocidad ultrasónica durante el desarrollo de la FML del vino almacenado en *Tanque1 (T1)* y *Tanque2 (T2)*.

A primera vista y en ambos casos, se observa que la velocidad adopta un comportamiento creciente desde el inicio, llegando a su valor máximo entre los días 5 y 6. En este momento, la variación respecto a las dos velocidades iniciales es de, aproximadamente, 4 m/s en cada caso. Posteriormente, durante más o menos un día y medio, la velocidad presenta un leve descenso que finaliza entre el día 7 y 8 cuando se registra el inicio de la que parece ser la fase estacionaria.

Por consiguiente, usando la evolución de los ácidos málico y láctico del vino almacenado en cada tanque como referencia (Figura 6.32), estas curvas de velocidad presentan un desfase de más o menos un día en cuanto a la posible detección del final de la FML. Igualmente, como ya se hizo mención, la velocidad deja de aumentar antes de que se agote el ácido málico disponible.

Por otro lado, destaca la presencia de una fase decreciente pasado el día 10, este comportamiento puede estar ligado al hecho de que la actividad en el vino continúa aunque se haya llegado al final de la FML. Es decir, una vez se ha consumido prácticamente todo el ácido málico, las BAL remanentes empezaran a hacer uso de otros elementos disponibles y útiles dentro del vino como el ácido tartárico, el ácido cítrico o los azúcares residuales (Lerm *et al.*, 2010) con la consecuente aparición de nuevos componentes de desecho y por consiguiente, con nuevas alteraciones en las características acústicas del medio que terminan afectando parámetros como la velocidad de propagación de las ondas de ultrasonido. Incluso, las BAL van efectuando el metabolismo de estos otros elementos en paralelo al del ácido málico aunque en menor cantidad. De todas formas, debido a que el objetivo de este trabajo es determinar la llegada a la fase estacionaria, como aviso del final de la FML, lo que ocurra más adelante no será tomado en cuenta.

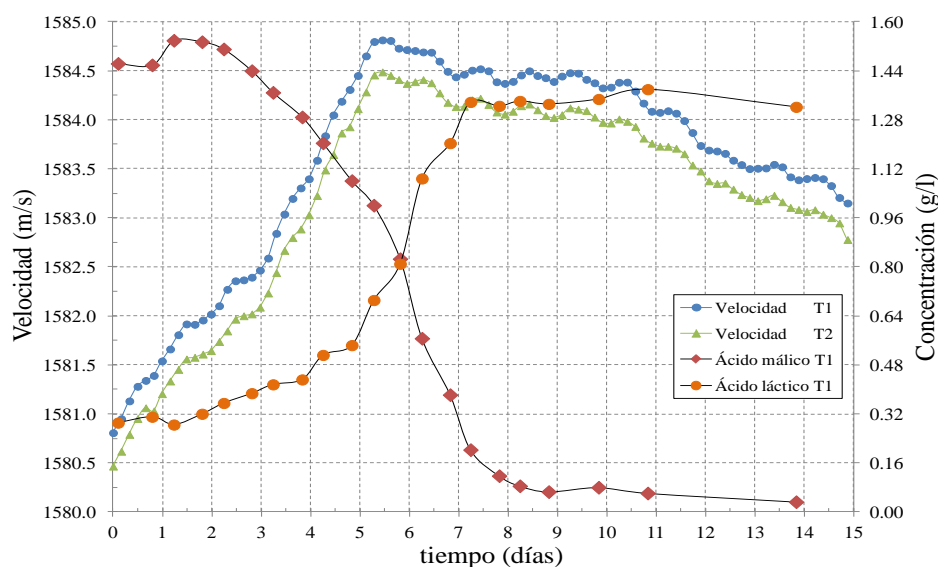


Figura 6.32 Evolución de la velocidad ultrasónica durante el desarrollo de la FML del vino almacenado en *Tanque1* (T1) y *Tanque2* (T2) vs. Evolución de las concentraciones de los ácidos málico y láctico del vino en *Tanque1* (T1).

6.3.2.3 Análisis correlativo de los resultados obtenidos

En la Tabla 6.4 se resumen los valores del coeficiente de correlación de Pearson y del p-valor, calculados para analizar las posibles relaciones que se puedan dar entre las diferentes medidas llevadas a cabo (convencionales y ultrasónicas de forma indiferente). A modo de filtro, en la tabla se enseñan solamente los resultados que presentan una relación estadísticamente significativa ($p < 0,005$). Por otro lado, al contar con más cantidad de medidas ultrasónicas que convencionales, se realiza una selección de aquellas velocidades de la Figura 6.31 que coinciden en tiempo con el momento en que se llevo a cabo la medida convencional.

De esta manera y para ambos tanques, se pueden observar los altos valores del coeficiente de correlación de Pearson encontrados entre los llamados parámetros convencionales, un hecho que confirma, como podría esperarse, la estrecha relación entre la actividad de las BAL y los cambios químicos experimentados por el vino.

Así, la degradación del ácido málico muestra su fuerte influencia ante la aparición de ácido láctico, la reducción en la acidez (aumentando el pH, sustituyendo la presencia de un ácido fuerte por uno más débil y disminuyendo la acidez total) y el crecimiento de la población bacteriana. Circunstancias que dan a este ácido el papel de protagonista principal durante el desarrollo de la FML.

Tanque		Conc. Málico	Conc. Láctico	pH	Acidez total	Turbidez	Conc. Bacterias
<i>Tanque 1</i>	Velocidad	-0,888 (0,000)	0,909 (0,000)		-0,872 (0,002)	-0,843 (0,000)	0,917 (0,000)
	Conc. Málico		-0,994 (0,000)	-0,903 (0,000)	0,995 (0,000)		-0,909 (0,000)
	Conc. Láctico			0,899 (0,000)	-0,996 (0,000)		0,914 (0,000)
	pH				-0,909 (0,000)		0,796 (0,001)
	Acidez total						-0,898 (0,000)
<i>Tanque 2</i>	Velocidad	-0,907 (0,000)	0,885 (0,000)		-0,870 (0,001)	-0,844 (0,000)	0,934 (0,000)
	Málico		-0,986 (0,000)	-0,863 (0,000)	0,987 (0,000)		-0,930 (0,000)
	Láctico			0,879 (0,000)	-0,986 (0,000)		0,888 (0,000)
	pH				-0,898 (0,000)		0,780 (0,003)
	Acidez total						-0,888 (0,000)

Tabla 6.4 Coeficiente de correlación de Pearson y p-valor (segunda cantidad entre paréntesis) calculados entre las medidas llevadas a cabo durante la FML de cada tanque (convencionales y ultrasónicas de forma indiferente)

Igualmente, la población de bacterias también presenta una alta correlación con la gran mayoría de los otros parámetros. Este hecho es de esperarse si se tiene en cuenta que, al fin y al cabo, el objetivo de las BAL es crecer y mantenerse, haciendo uso de los recursos útiles disponibles y entregando productos de desecho. Acciones que, de una u otra forma, son las causantes de las alteraciones en varias de las características fisicoquímicas del vino.

Por otro lado, la turbidez es la única medida que presenta correlación significativa con uno sólo de los otros parámetros convencionales (concentración de bacterias) y además, es el valor de coeficiente de correlación más bajo entre todos los presentados.

Finalmente, la velocidad ultrasónica presenta una alta correlación con las concentraciones de los dos ácidos de interés, málico y láctico. Un hecho que, sin lugar a dudas, es de gran importancia en la tarea de analizar la capacidad de la técnica con ultrasonidos como herramienta de monitorización y control de la FML. Además, la correlación entre velocidad y los otros parámetros tenidos en cuenta (incluyendo la turbidez) también es bastante significativa.

En relación a esta última observación, cabe destacar el hecho de que el valor de correlación más alto se presenta entre la velocidad y la concentración de bacterias. Este resultado concuerda con los obtenidos por Resa *et al.* (2007) donde los autores monitorizaron la fermentación láctica llevada a cabo por las BAL usando ondas de ultrasonido y midiendo velocidad. Sus resultados mostraban la existencia de una relación lineal, de pendiente positiva, entre velocidad y población de bacterias y además, determinaban que la población de bacterias debe incrementarse en aproximadamente $6,10^9$ UFC/ml para reportar un aumento en velocidad de 0,1 m/s ó menos, ya que como reconocen los propios autores, si se tiene en cuenta la evolución de otros factores que intervienen, el resultado obtenido sería aún menor. Sin embargo, en nuestras pruebas la población de bacterias aumentó aproximadamente de 10^5 a 10^7 UFC/ml y en consecuencia, podría despreciarse la incidencia directa del crecimiento bacteriano sobre la velocidad ultrasónica, otorgando a las ondas de ultrasonido más relevancia en la tarea de detectar cambios más importantes durante la FML.

6.3.2.4 Análisis comparativo de los resultados obtenidos

Una vez se ha podido comprobar, mediante los resultados del apartado anterior, la existencia de una correlación estadística significativa entre las medidas convencionales de los principales parámetros enológicos usados para monitorizar la FML y las medidas de velocidad ultrasónica, en este apartado se buscará aportar un mejor entendimiento de lo que ocurre con la propagación de las ondas de ultrasonido durante las dos FML's monitorizadas, utilizando los resultados obtenidos con las pruebas de laboratorio. Específicamente, se lleva a cabo el cálculo teórico de la forma como debería evolucionar la velocidad ultrasónica en el vino tinto, en primer lugar, según la evolución de parámetros enológicos medidos y, en segundo lugar, complementando este primer resultado con el anexo de los efectos de las variaciones de temperatura.

6.3.2.4.1 Evolución teórica de la velocidad, primera propuesta

En este primer intento, se realiza el cálculo de lo que llamaremos evolución teórica de la velocidad ultrasónica ($Vel_{teó1}$). Es decir, con ayuda de los datos presentados en las Figuras 6.25, 6.26, 6.29 y 6.30, se calcula una evolución de la velocidad donde sólo se tenga en cuenta los cambios que aportan las variaciones del ácido málico (0,2 m/s por g/l reducido, apartado 6.2.3.3), las variaciones del ácido láctico (0,3 m/s por g/l producido, apartado 6.2.3.4) y las variaciones en turbidez (0,008 m/s por NTU reducida, apartado 6.2.4). Los resultados de cada tanque se pueden observar en las Figuras 6.33 y 6.34 donde igualmente, se anexan las respectivas curvas de velocidad experimental (Vel_{exp}) del apartado 6.3.2.2 y las de las respectivas concentraciones de los ácidos málico y láctico.

Comparando las curvas de las velocidades experimentales con sus respectivas curvas teóricas, se pueden destacar algunas similitudes y diferencias. La diferencia más notable es la discrepancia en magnitud entre curvas, que puede llegar a ser, en los puntos máximos, de 3 m/s. Por otro lado, también es relevante que la evolución teórica no presenta el intervalo de descenso entre la máxima velocidad registrada y la llegada a la fase estacionaria como se puede observar en las curvas experimentales. En cuanto a similitudes, es destacable el parecido en evolución entre las curvas y sobre todo, que el inicio de la fase estacionaria en los dos casos (teórico y experimental) está definido pasado el día 7. Por lo tanto, prácticamente se mantiene el mismo desfase de, aproximadamente, un día comparado con la curva de referencia (evolución del ácido málico).

Ahora, es importante considerar que esta primera aproximación teórica no tiene en cuenta toda la complejidad que realmente envuelve a la FML. Seguramente, aspectos como la producción de CO₂ y otros productos minoritarios (como el ácido acético, el diacetil y la acetoína) combinados con más cambios fisicoquímicos (como la precipitación de sal y polifenoles), están vinculados con las diferencias observadas entre curvas experimentales y curvas teóricas. Además, las curvas teóricas se han realizado sin tener en cuenta la influencia de un parámetro que, como se ha venido mencionado, juega un papel muy importante en la velocidad de propagación de los ultrasonidos: la temperatura, incluso, siendo más específicos para nuestro caso, la influencia de la combinación grado alcohólico-temperatura. Si recordamos, las pruebas de la evolución de la velocidad ante variaciones de ácido málico y ácido láctico se hicieron asumiendo temperatura y grado alcohólico constantes (22 °C y 12% vol.), algo que, como se verá a continuación, en las pruebas fuera del laboratorio (en bodega) no es posible de cumplir cuando de la temperatura se trata.

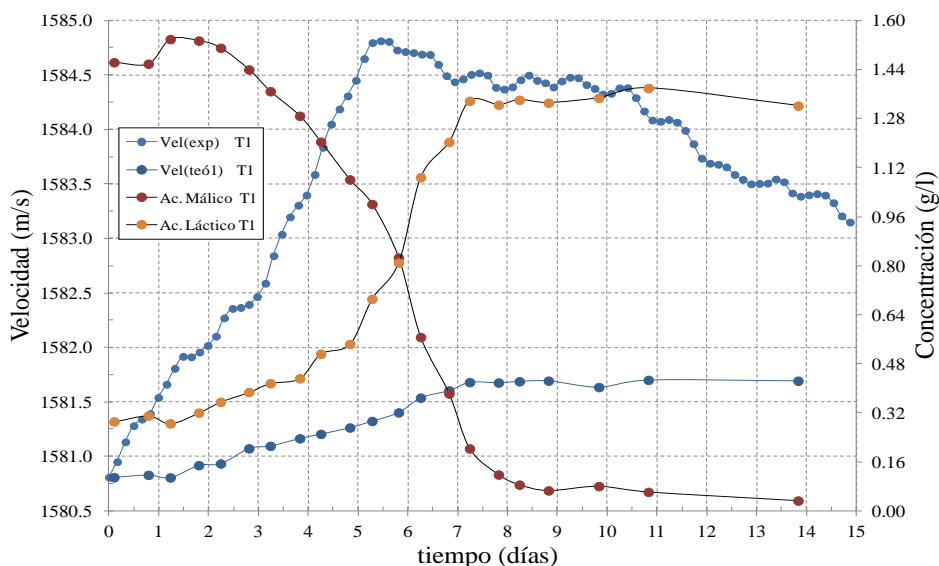


Figura 6.33 Evolución teórica y experimental de la velocidad ultrasónica ($Vel_{teó1}$, Vel_{exp}) vs. Concentración de los ácidos málico y láctico para el vino almacenado en Tanque1 (T1).

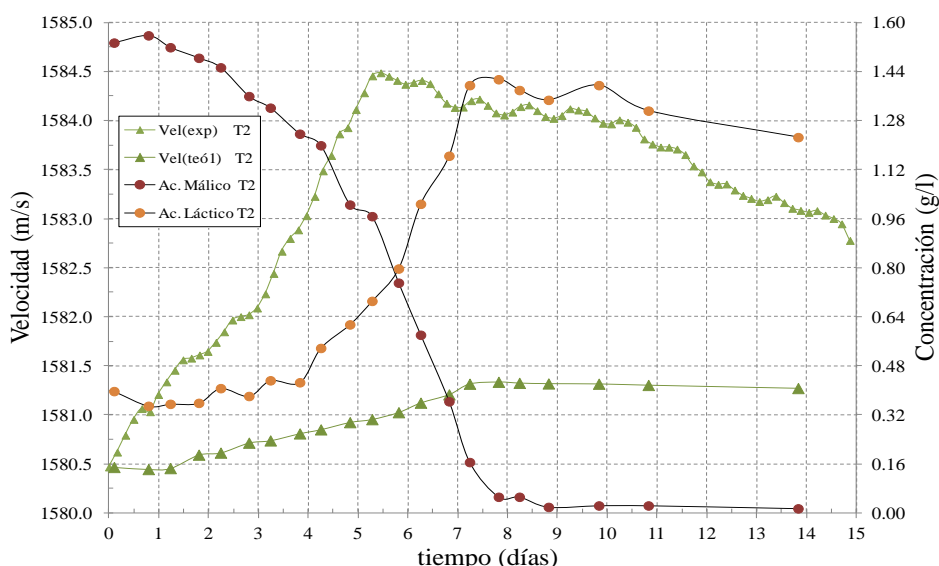


Figura 6.34 Evolución teórica y experimental de la velocidad ultrasónica ($Vel_{teó1}$, Vel_{exp}) vs. Concentración de los ácidos málico y láctico para el vino almacenado en Tanque2 (T2).

6.3.2.4.2 Variaciones de temperatura durante la monitorización de la FML

Antes de continuar y como preámbulo a lo que se hará en el siguiente apartado, es necesario recurrir y analizar los datos de temperatura medidos por la sonda que fue adaptada al sensor para mantenerse prácticamente en contacto directo con el interior de cada tanque. Dichos datos equivalen a una medida de la temperatura cada 4 horas, coincidiendo con el momento en que se realiza cada toma de dato ultrasónico.

Las curvas de la Figura 6.35 son una clara evidencia de lo que se ha venido discutiendo con respecto a la influencia de la temperatura sobre la velocidad de propagación de las ondas de ultrasonidos. Comparando estas curvas con las de velocidad de la Figura 6.31, se hace notorio el gran parecido entre ellas en cuanto a comportamiento. Si bien es cierto que la temperatura no muestra grandes cambios antes del primer día, si se puede destacar su posterior aumento hasta pasado el día 5, momento en el cual, al igual que la velocidad, alcanza su máximo valor para luego empezar a descender durante un par de días antes de asumir cierta estabilidad. Por otro lado, es destacable que en cada curva se presenta una especie de oscilación triangular cuyo período es aproximadamente 1 día. Comparando con la información de los registros almacenados, se puede comprobar que el tramo creciente está limitado entre las 09:00 y las 21:00 horas y el decreciente con entre las 21:00 y las 09:00 horas aproximadamente, es decir, la oscilación está inducida por los cambios normales de la temperatura ambiente que se presentan entre el día y la noche. Más adelante se propondrá una opción para minimizar la influencia que puedan tener estas oscilaciones.

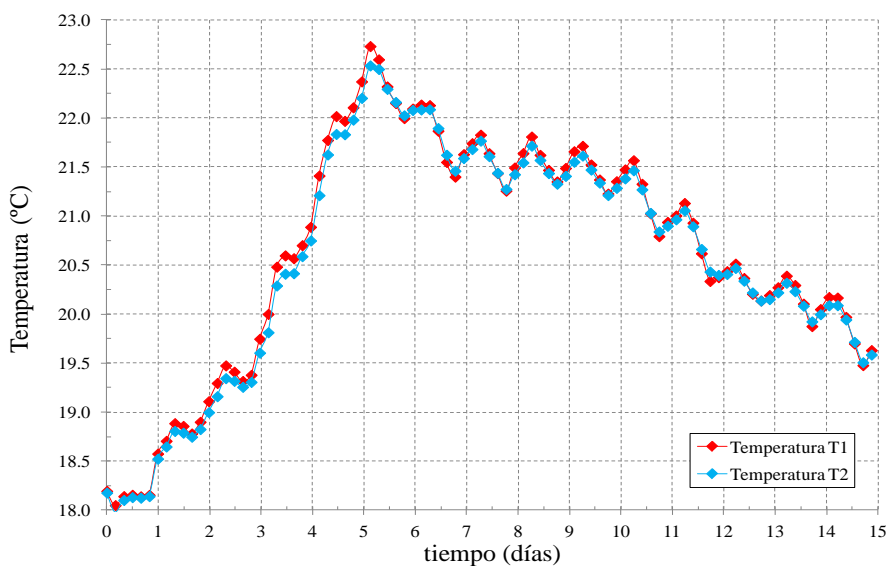


Figura 6.35 Evolución de la temperatura en el vino contenido en *Tanque1* (T1) y *Tanque2* (T2) durante el desarrollo de la FML.

Para intentar dar una explicación más profunda que ayude a interpretar lo que ocurre con la temperatura en las muestras de vino y su respectiva influencia sobre la evolución de la velocidad de propagación ultrasónica en las mismas, debería considerarse el balance calorimétrico que se produce durante todo el proceso. Así, si se analiza la transferencia de calor en el vino almacenado en cada tanque, deberían tenerse en cuenta dos factores:

- a) El calor debido a la variación de entalpía de la reacción maloláctica (q_1).

b) La transferencia de calor entre el tanque que contiene el vino y el exterior (q_2).

Analizando el primer factor, suponiendo que es posible calcular el calor q_1 debido a la variación de la entalpía de la reacción maloláctica a partir de los datos termodinámicos de los productos principales que intervienen en el proceso (ácidos málico y láctico), nos encontraríamos con que la conversión de málico a láctico es un proceso ligeramente endotérmico. Sin embargo, medidas calorimétricas experimentales con ácido málico y bacterias capaces de convertirlo en ácido láctico muestran que lo que se produce es un ligero aumento en la temperatura de la muestra (Kunkee, 1967), indicando el carácter exotérmico del proceso.

Considerando el segundo factor, la transferencia de calor q_2 entre el tanque que contiene la muestra de vino y el exterior es función del coeficiente de transferencia de calor de dicho recipiente (K_i), de la superficie del tanque en contacto con el exterior (S) y del gradiente de temperatura entre la muestra de vino y el exterior (Δt). Todo ello según la ecuación:

$$q_2 = K_i \cdot S \cdot \Delta t . \quad (6.2)$$

Entonces, si la temperatura del vino es mayor que la del exterior, el gradiente de temperatura Δt , y por consiguiente q_2 , será de signo negativo, es decir, en este caso, la transferencia de calor será desde el vino hacia el exterior.

El balance calorimétrico resultante en la muestra de vino es la suma de los dos factores:

$$q = q_1 + q_2 . \quad (6.3)$$

De esta forma, suponiendo que al inicio de la FML el vino en el tanque está a la misma temperatura que el exterior, podremos afirmar que q_2 será nulo y por consiguiente, el calor q_1 generado por la FML empezará produciendo un aumento de la temperatura del vino.

A medida que el proceso maloláctico avanza, el ácido málico se va agotando, las bacterias van agotando su ciclo y el calor q_1 generado por la fermentación va disminuyendo. Cuando la FML concluye, dicho calor pasa a valer cero ($q_1 = 0$). Por otro lado, el incremento de temperatura que se ha producido en el vino hace que la transferencia de calor q_2 con el exterior aumente, cuanto mayor sea la temperatura de la muestra respecto al exterior, más negativo será q_2 y mayor será la transferencia de calor del vino al exterior.

Resumiendo, a medida que avanza la FML, q_1 es cada vez más pequeño y q_2 más negativo. En el momento en que la suma de los dos factores ($q_1 + q_2$) se vuelva negativa, significa que la muestra de vino pasará a enfriarse. Debe notarse que esto sucederá, no en el momento en que la FML ha finalizado (cuando $q_1 = 0$), sino un poco antes. Esto explicaría el

por qué el máximo de la temperatura en la Figura 6.35 no coincide con el final de la FML y el motivo del intervalo de descenso durante casi dos días hasta que q_1 sea cero o despreciable.

Volviendo de nuevo al comportamiento similar observado entre las curvas que representan la evolución de la velocidad de propagación ultrasónica (Figura 6.31) y las curvas de temperatura (Figura 6.35), podríamos afirmar que esto era de esperar ya que, al fin y al cabo, sabemos que la velocidad de propagación de los ultrasonidos es altamente dependiente de la temperatura, un comportamiento que se suma a los aportes hechos por las variaciones en la concentración de los ácidos málico y láctico, lo cual justificaría que:

a) La diferencia entre las curvas teórica y experimental de las velocidades de propagación de los ultrasonidos ($Vel_{teó1}$ y Vel_{exp}) es debida, junto con otros aspectos ya mencionados, a la variación de temperatura del vino en cada tanque en la medida en que la FML avanza. Como se describió, para los datos teóricos (pruebas en laboratorio) las muestras se termostataban cuidadosamente, descartándose cualquier alteración por temperatura.

b) El aporte sobre la velocidad de propagación de los ultrasonidos debido a los cambios de temperatura es más evidente que lo aportado por los cambios en la concentración de los ácidos málico y láctico, razón por lo cual, la curva de la velocidad en el vino de cada tanque se parece bastante a su respectiva curva de temperatura. En otras palabras, la segunda evolución condiciona el comportamiento de la primera y ya que la temperatura empieza a disminuir antes de que la FML concluya, como ya se ha argumentado, la velocidad de propagación de los ultrasonidos en los vinos también lo hace de forma similar. Como consecuencia, el máximo de velocidad no coincide con el fin de la FML, presentándose antes de que la fermentación se considere finalizada.

Finalmente, es importante recalcar que esta explicación es de carácter orientativa ya que, dada la complejidad de la mezcla que compone al vino y de la FML en sí, no se han tenido en cuenta otras reacciones exotérmicas que las BAL generan como resultado del catabolismo, muchas veces en paralelo, de algunas sustancias (azúcares y otros ácidos).

6.3.2.4.3 Evolución teórica de la velocidad, segunda propuesta

Como respuesta a parte de las observaciones y conclusiones expuestas en los dos apartados anteriores, en este apartado se presenta una segunda propuesta de velocidad teórica ($Vel_{teó2}$) que, básicamente, consiste en agregar a las curvas $Vel_{teó1}$ de las Figuras 6.33 y 6.34 los efectos que aportan las variaciones de temperatura según el grado alcohólico del vino en cada tanque. Con ayuda de la Ec. 6.1, podemos determinar que la constante de compensación a aplicar ante variaciones de temperatura, en un vino con grado alcohólico 14,2% vol., es 0,91 m/s por °C. Nuevamente, ya que la curva de temperatura contiene más puntos que la de velocidad

teórica, se hace una selección de las temperaturas que coinciden en tiempo con el momento en que se hizo la medida de las concentraciones de los ácidos málico y láctico. En la Figura 6.36 se pueden observar los resultados para el caso de *Tanque1* y en la Figura 6.37 para el de *Tanque2*.

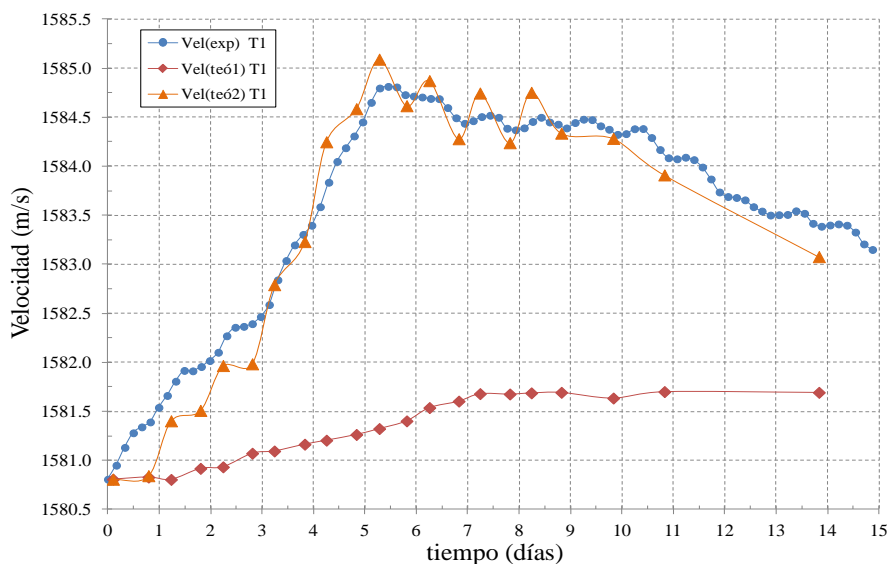


Figura 6.36 Evolución teórica de la velocidad ultrasónica ($Vel_{teó1}$ y $Vel_{teó2}$) vs. Velocidad experimental (Vel_{exp}) para el vino almacenado en *Tanque1*.

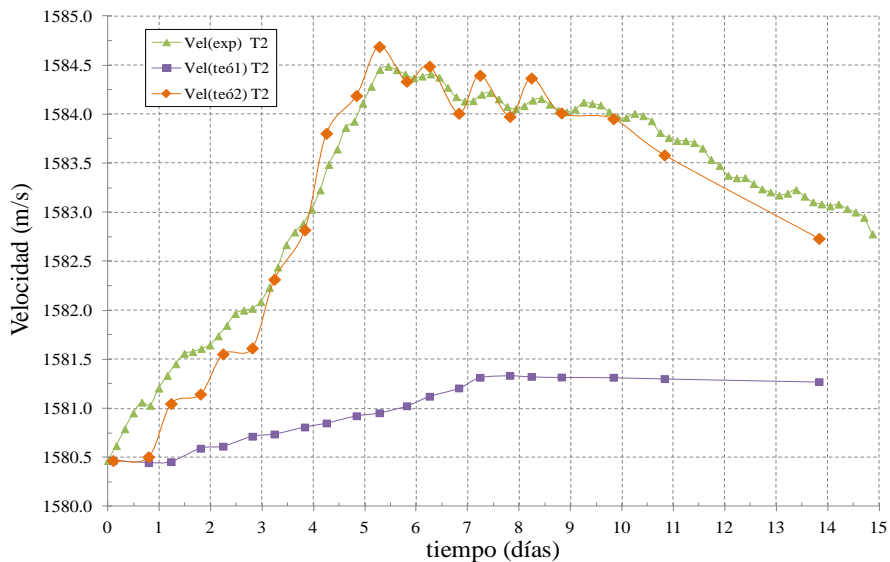


Figura 6.37 Evolución teórica de la velocidad ultrasónica ($Vel_{teó1}$ y $Vel_{teó2}$) vs. Velocidad experimental (Vel_{exp}) para el vino almacenado en *Tanque2*.

Indudablemente, esta segunda propuesta de velocidad teórica muestra una alta concordancia con las curvas de velocidad experimental, demostrando la necesidad y utilidad de monitorizar la temperatura cada vez que se realiza una medida ultrasónica y ayudando a fortalecer la validez de los resultados presentados.

Sin embargo, ya que se mantiene presente la oscilación del día y la noche en las curvas de temperatura, e incluso éstas se manifiestan levemente en las de velocidad experimental, la propuesta teórica hereda acentuadamente dicha alteración. Por otro lado, se puede observar que su efecto es más acusado pasado el punto máximo de temperatura, momento en el cual el calor q_1 aportado por la FML empieza a disminuir y por tanto, a perder influencia quedando más a merced del intercambio de calor con el ambiente.

Por lo tanto, se propone una alternativa relativamente sencilla y útil consistente en pre-procesar la información de temperatura y velocidad con un filtro paso bajo. De esta manera, se minimiza el efecto día-noche y posteriormente, se podrá volver a calcular la curva de velocidad teórica $Vel_{teó2}$.

Las Figuras 6.38 y 6.39 contienen las curvas originales de temperatura junto con los resultados después de aplicar el filtro. Como se puede observar, con la curva filtrada se elimina la oscilación día-noche apropiadamente manteniendo el mismo comportamiento de la curva original.

La Figura 6.40 contiene las curvas originales de velocidad experimental medidas y el resultado de las mismas después de aplicar el filtro paso bajo. Similar a lo que ocurre con la temperatura, en este caso se puede observar que, aunque la curva original no acentúa tanto los cambios del día-noche, el suavizado es bastante adecuado y fiel al comportamiento de la velocidad original.

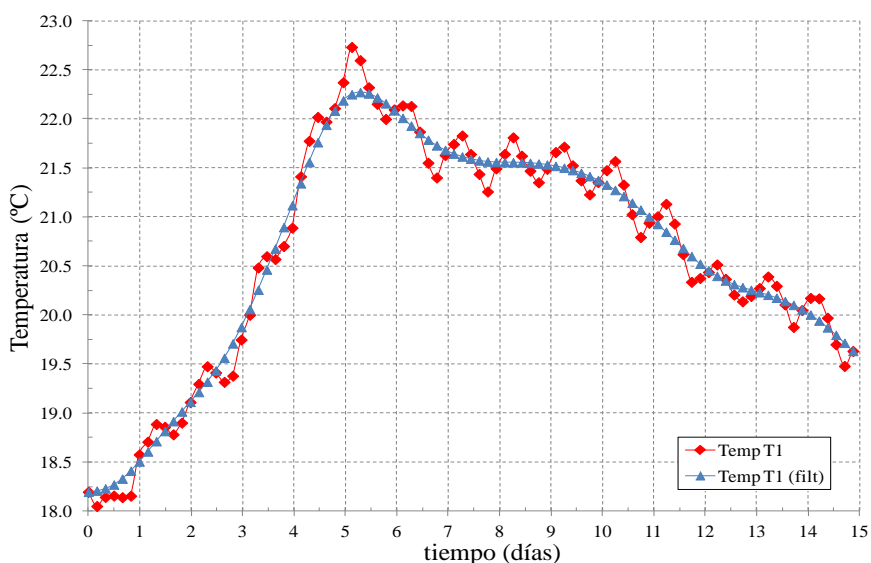


Figura 6.38 Evolución de la temperatura para el vino almacenado en *Tanque1* (T1), original y filtrada.

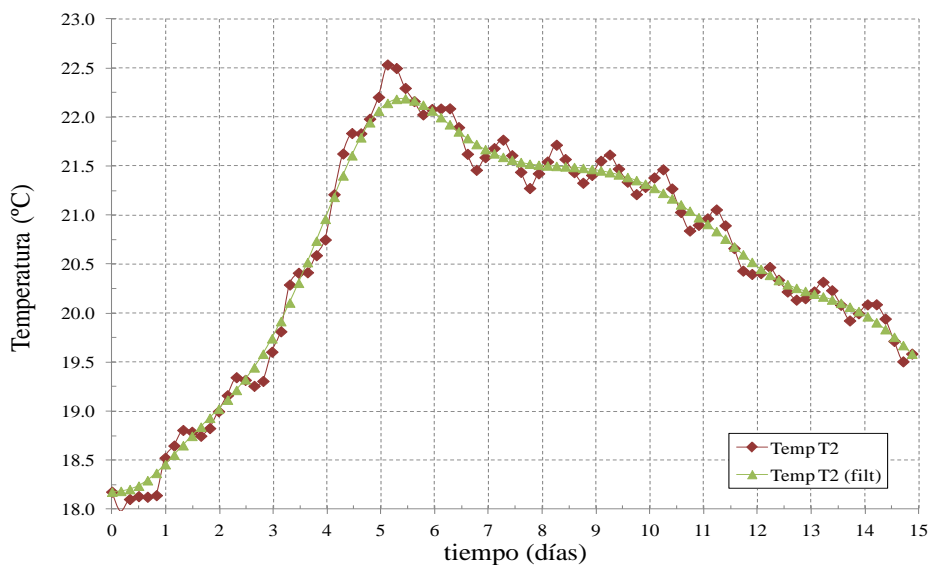


Figura 6.39 Evolución de la temperatura para el vino almacenado en *Tanque2* (T2), original y filtrada.

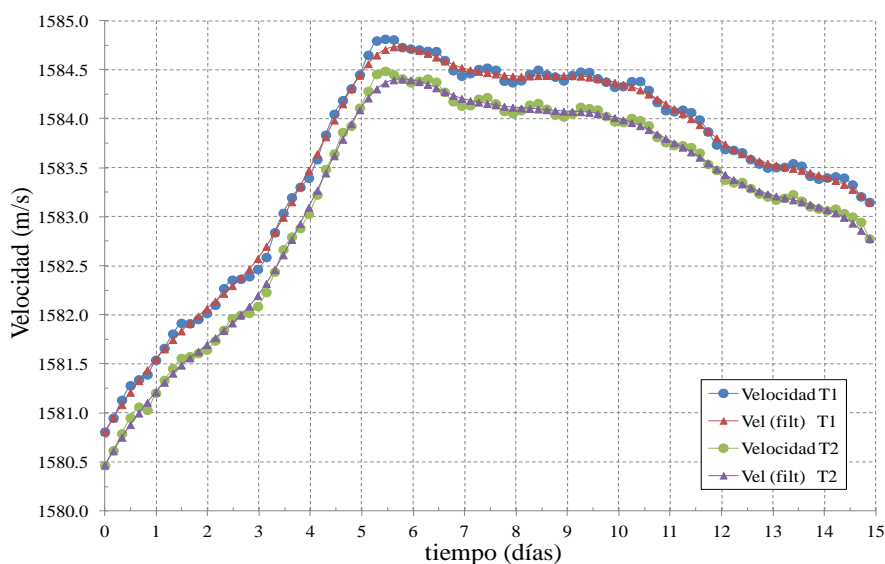


Figura 6.40 Evolución de las velocidades para el vino almacenado en *Tanque1* (T1) y *Tanque2* (T2), originales y filtradas.

Así, en las Figuras 6.41 y 6.42 se presentan los nuevos cálculos, para *Tanque1* y *Tanque2*, de $Vel_{teó2}$ utilizando las curvas de temperatura y velocidad experimental filtradas. De esta manera, se consigue una gran aproximación entre evolución de la velocidad experimental (original y filtrada) y evolución de la velocidad teórica producto de pruebas de laboratorio previas y medidas de parámetros enológicos convencionales. Resultados que van respaldando y estructurando el camino en el objetivo de utilizar a las ondas de ultrasonido como herramienta en la monitorización de la FML.

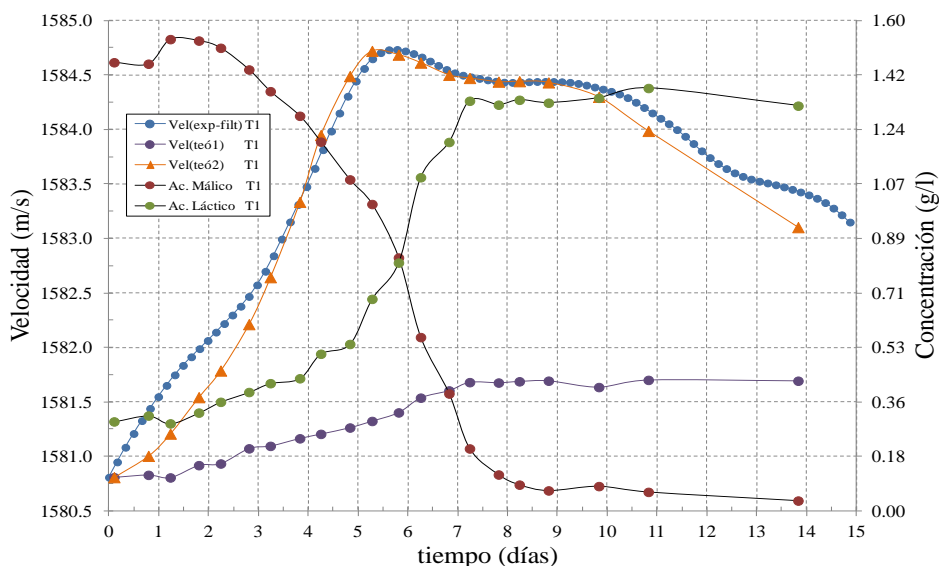


Figura 6.41 Evolución teórica ($Vel_{teó1}$, $Vel_{teó2}$) y experimental filtrada ($Vel_{exp-filt}$) de la velocidad ultrasónica vs. Concentración de los ácidos málico y láctico en el vino de *Tanque1* (T1).

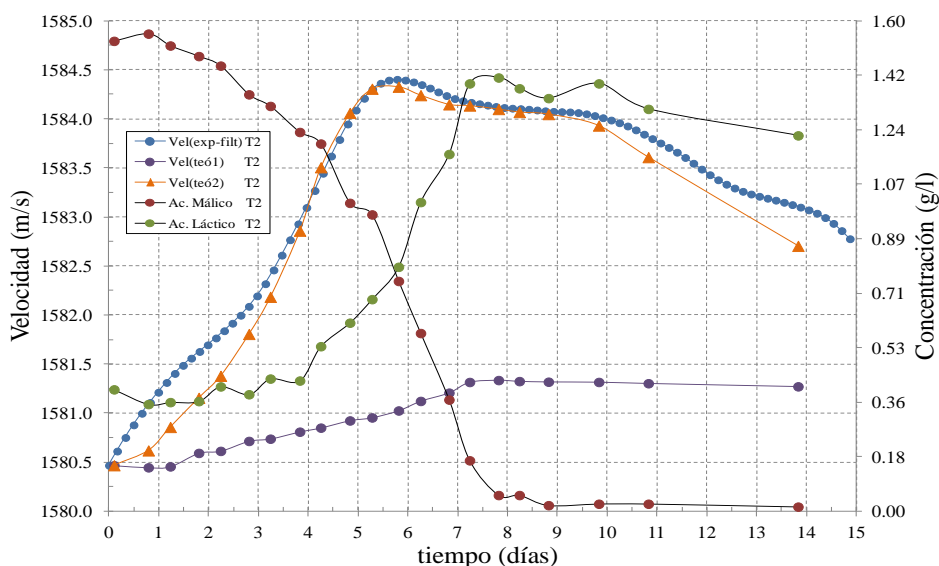


Figura 6.42 Evolución teórica ($Vel_{teó1}$, $Vel_{teó2}$) y experimental filtrada ($Vel_{exp-filt}$) de la velocidad ultrasónica vs. Concentración de los ácidos málico y láctico en el vino de *Tanque2* (T2).

Finalmente, teniendo en cuenta los mismos criterios que se acaban de aplicar para el análisis teórico de la velocidad ultrasónica y volviendo a los datos de las medidas con INCAVI (*conjunto2*, apartado 6.3.1.2), también es posible calcular las dos propuestas de evolución teórica de la velocidad ($Vel_{teó1}$ y $Vel_{teó2}$) para dicho caso de estudio.

En las Figuras 6.43, 6.44 y 6.45 se pueden observar los resultados de dicha evolución teórica para cada vino monitorizado. Para obtener $Vel_{teó1}$, el cálculo se hace en base a los aportes a la velocidad que hacen las variaciones en la concentración de los ácidos málico y láctico y

para obtener Vel_{te02} , se agregan los aportes de las variaciones de temperatura, según el grado alcohólico volumétrico, a Vel_{te01} . Por otro lado, dado que en esta ocasión la variación día-noche de la temperatura es casi inapreciable, se considera que no es necesario hacer un segundo cálculo de Vel_{te02} con el filtrado previo de la curva de temperatura. Por último, también se incluyen la velocidad experimental original (Vel_{exp}) y la velocidad experimental compensada por variaciones de temperatura (Vel_{comp}), representadas por las muestras que se usaron para el cálculo del coeficiente de correlación de Pearson (apartado 6.3.1.2.2).

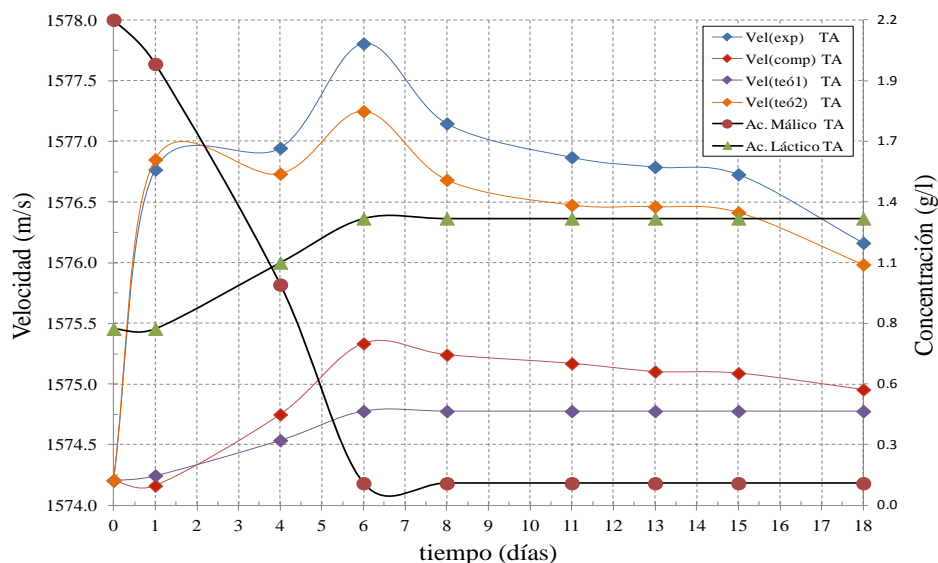


Figura 6.43 Evolución teórica (Vel_{te01} , Vel_{te02}), experimental (Vel_{exp}) y experimental compensada (Vel_{comp}) de la velocidad ultrasónica vs. Concentración de los ácidos málico y láctico en el vino de *TanqueA* (TA) para las medidas *conjunto2* realizadas con INCAVI.

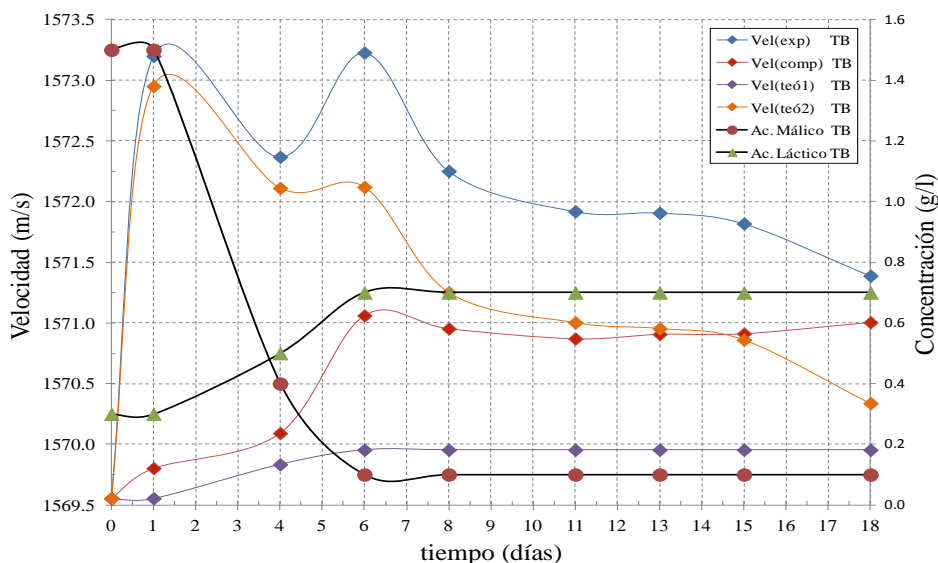


Figura 6.44 Evolución teórica (Vel_{te01} , Vel_{te02}), experimental (Vel_{exp}) y experimental compensada (Vel_{comp}) de la velocidad ultrasónica vs. Concentración de los ácidos málico y láctico en el vino de *TanqueB* (TB) para las medidas *conjunto2* realizadas con INCAVI.

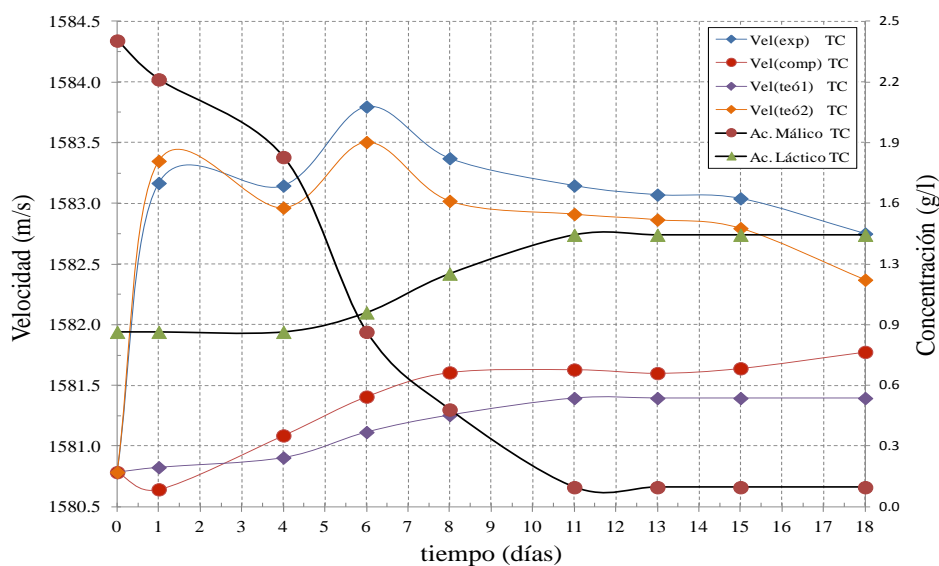


Figura 6.45 Evolución teórica ($Vel_{teó1}$, $Vel_{teó2}$), experimental (Vel_{exp}) y experimental compensada (Vel_{comp}) de la velocidad ultrasónica vs. Concentración de los ácidos málico y láctico en el vino de *TanqueC* (TC) para las medidas *conjunto2* realizadas con INCAVI.

Como se puede observar en los tres tanques, la evolución de la curva $Vel_{teó2}$ presenta un comportamiento muy similar al de la velocidad original y, de forma inversa, la resultante Vel_{comp} se asemeja a la evolución de $Vel_{teó1}$. De esta manera, se reafirma la posibilidad de poder utilizar la información de la temperatura para aplicar ajustes en cualquiera de los dos sentidos. Por otro lado, la diferencia más destacable, en cuanto a magnitudes, la encontramos en *TanqueB* que casualmente es el vino que menos concentración de ácido málico contiene al inicio de la FML y por consiguiente, el que menos ácido láctico produce al final.

6.3.3 Medidas en la bodega Vega de Ribes

Siguiendo con el desarrollo de medidas que pongan a prueba el funcionamiento y resultados del sistema de medida ultrasónico, se lleva a cabo una primera monitorización de la FML en condiciones reales de proceso en una bodega particular, medidas que nos han permitido encontrarnos con un caso particular e interesante.

Como se describió en el capítulo anterior (apartado 5.4.3), en esta prueba se monitorizó el proceso de FML llevada a cabo por un vino de la variedad Cabernet Sauvignon (12% vol.), contenido en un tanque de 3000 l y ubicado en la bodega Vega de Ribes (Cataluña). Los valores medidos de la velocidad ultrasónica se pueden observar en la Figura 6.46. Las muestras fueron tomadas cada 6 horas durante 13 días consecutivos y a partir del momento en que se inocularon las BAL. Igualmente, se anexan las medidas de las concentraciones de los ácidos málico y láctico realizadas como parte del control enológico que suele llevarse a cabo.

Como se puede observar y llama inmediatamente la atención, la evolución de la curva de velocidad en esta prueba es decreciente, un comportamiento que no se había presentado hasta el momento y que contradice el análisis teórico desarrollado que establece que, ante la reducción del ácido málico y el incremento del ácido láctico, los resultados en velocidad deben ir en aumento.

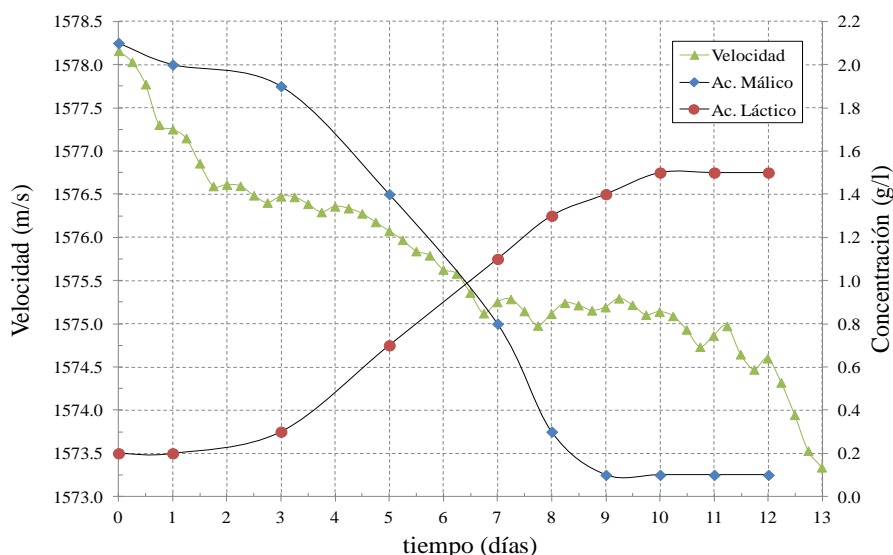


Figura 6.46 Velocidad de propagación ultrasónica vs. Concentración de los ácidos málico y láctico en el vino Cabernet Sauvignon elaborado en la bodega Vega Ribes.

Analizando los datos recopilados, se sospecha que la evolución de la velocidad pueda estar fuertemente ligada al comportamiento de la temperatura. En esta oportunidad, se ha podido comprobar que debido a las condiciones de temperatura ambiente, la posición geográfica de la bodega y el mes en que se realizaron las medidas (segunda quincena de septiembre), la temperatura del vino empezó en un valor aproximado de 25,6 °C y a medida que pasaba el tiempo, dicho registro iba en descenso hasta reportar temperaturas entre 21 y 22 °C al final de la FML. Como ya se ha visto en las pruebas anteriores, la evolución de la temperatura se suma a los efectos que las variaciones de los ácidos málico y láctico producen en la velocidad ultrasónica, llegando incluso a ser la más influyente de los tres y por lo tanto, como se puede observar en la figura anterior, es la responsable de que la velocidad presente la pendiente decreciente durante, aproximadamente, los primeros 7 días. A partir del séptimo día, la velocidad se vuelve constante (fase estacionaria) presentando una variación periódica día/noche como la que se analizó en el apartado 6.3.2. Por lo tanto, aún evolucionando de forma decreciente, la velocidad registra una fase estacionaria que, comparada con la fase estacionaria de la curva del ácido málico, ocurre aproximadamente un día antes de que empiece a reportarse el final de la FML.

6.3.4 Medidas en la bodega Torre del Veguer

Por último, en la bodega de Torre del Veguer se lleva a cabo la monitorización de la FML en un tanque de 5000 l de capacidad con vino tinto de la variedad Petite Sirah (12,46% vol.). Los resultados de la evolución de la velocidad de propagación ultrasónica registrada durante 20 días, usando intervalos de 6 horas, se pueden observar en la Figura 6.47.

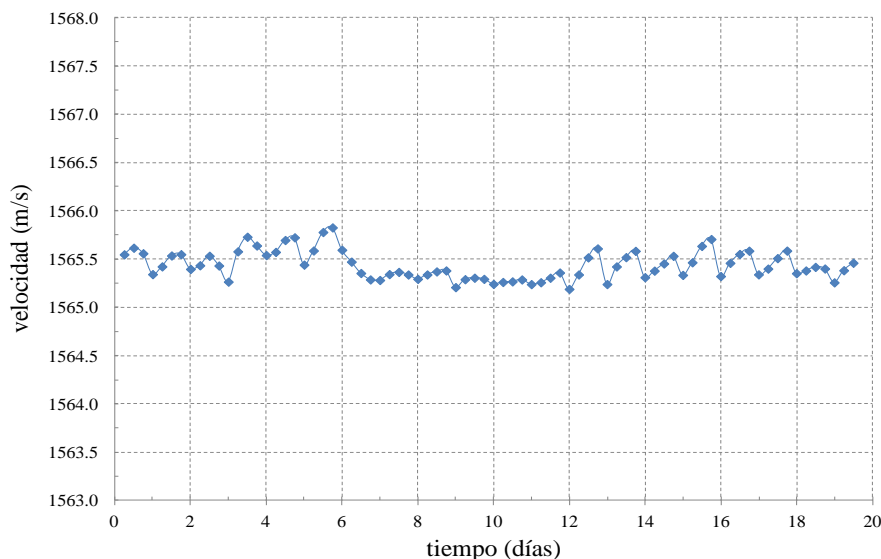


Figura 6.47 Velocidad de propagación ultrasónica registrada durante la monitorización de la FML en el vino Petit Sirah (bodega Torre del Veguer).

En este caso, se puede apreciar un comportamiento prácticamente plano de la velocidad que sólo parece ser alterado por las oscilaciones debidas a la variación de temperatura entre el día y la noche. Como se recordará de la descripción hecha en el capítulo anterior (apartado 5.4.4), en esta oportunidad no se inocularon BAL comerciales a la espera de que la FML se produjera de forma espontánea, un acontecimiento que finalmente no tuvo lugar y que explicaría la evolución de la curva en la Figura 6.47. En otras palabras, esta prueba ha sido útil para comprobar que ante la ausencia del proceso maloláctico, el sistema de medida es capaz de reportar dicho acontecimiento a través de la no variación de la velocidad ultrasónica.

7. CONCLUSIONES Y APORTACIONES DE LA TESIS

7.1 Conclusiones

A lo largo de esta Tesis, se ha explorado en la viabilidad del uso de las técnicas de ultrasonidos para el análisis y monitorización *on-line* de la fermentación maloláctica en el vino tinto. Igualmente, se ha contribuido al desarrollo de un sistema ultrasónico de cuatro canales, fácilmente escalable, idóneo para medidas no invasivas y no destructivas, capaz de funcionar de forma simultánea, automática e ininterrumpida, y apto para ser utilizado en hasta cuatro tanques de fermentación de acero inoxidable ubicados en bodegas y con mínimos requerimientos de modificaciones. Entre las conclusiones más relevantes conseguidas en esta Tesis se pueden destacar:

En relación al sistema de medida diseñado.

- Se ha desarrollado un sensor válido para ser acoplado en depósitos (tanques de fermentación) de vino de cualquier tipo y dimensiones. De esta manera, adoptando la técnica de *pulso-eco* y aprovechando las ventajas que ofrece el mecanismo *buffer rod*, el sensor diseñado evita el efecto disipador que, sobre las ondas de ultrasonidos, es de esperar en la mayoría de tanques de fermentación industriales. Efecto causado, principalmente, porque los tanques se fabrican en acero inoxidable, presentan un gran volumen y suelen estar rodeados por sistemas de refrigeración tales como camisas de agua o serpentines (agregando un obstáculo más que tendría que ser atravesado por las ondas ultrasónicas). Además, el diseño del sensor resuelve los problemas que presenta la interfase acero-vino para la transmisión de una adecuada parte de la onda ultrasónica incidente; da solución al inconveniente higiénico que impide poner el transductor ultrasónico en contacto directo con el vino; adapta convenientemente la distancia a recorrer por las ondas que se propagan en el vino; y permite monitorizar simultáneamente la evolución de la temperatura en el interior de cada tanque.

- Se determina que el *PEAD* es el material más adecuado para el mecanizado de los diferentes *buffer rods* a utilizar. Por encima de la opción de usar un material metálico como el propio acero inoxidable, los materiales plásticos han demostrado presentar mejores condiciones para el acoplamiento acústico con el vino tinto a la vez que, facilitan el montaje de sensores más ligeros, de menor tamaño y menores costes. Además, con la elección del *PEAD*, se cumple satisfactoriamente el requisito de usar materiales permitidos para el contacto directo con alimentos.
- Para el procesamiento de los datos ultrasónicos recopilados, dentro del conjunto de opciones seleccionado, se ha constatado como, en el dominio del tiempo, el método de la *correlación cruzada* es el que proporciona los mejores resultados, facilitando su aplicación directa sin necesidad de filtrar previamente las señales (si los niveles de *SNR* no son muy bajos) y presentando un coste computacional no muy elevado. En cuanto al dominio de la frecuencia, el método de la *diferencia de fases* es el que presenta los mejores resultados, tanto para señales con bajo nivel de *SNR* como en comparación con los métodos en el dominio del tiempo analizados. De esta manera, la *diferencia de fases* demostró ser el método más robusto, con los mejores niveles de resolución, de mayor eficacia ante anomalías imprevistas y el único que puede aplicarse en un amplio rango de niveles de *SNR* sin necesidad de una etapa de filtrado previa. Sin embargo, también se confirma que el precio a pagar por tan alto rendimiento es un elevado coste computacional, consecuencia que podría dificultar la implementación del método en equipos electrónicos portátiles de bajo coste diseñados para la monitorización *on-line* de procesos.
- El diseño del sistema de medida ultrasónico desarrollado, ha demostrado ser fácilmente escalable a entornos industriales. De esta manera, el fácil acoplamiento del sensor de ultrasonidos a los tanques donde se desarrolla la FML, el rápido procesamiento de la información recopilada y la adecuada presentación de los resultados, permitirán una monitorización continua, automática y en tiempo real de todo el proceso maloláctico.

Respecto a la monitorización ultrasónica de la FML del vino tinto.

- El uso de técnicas basadas en ultrasonidos han resultado ser satisfactorias en la monitorización de la FML del vino tinto. Favorablemente, se comprobó en el laboratorio el aumento de la velocidad de propagación ultrasónica, en mezclas

de agua-etanol-ácido málico-ácido láctico, cuando la concentración del ácido málico disminuye en pro del aumento de la del ácido láctico, fenómeno característico de la FML.

- En procesos reales, la medida de la velocidad de propagación ultrasónica presenta unos valores de correlación significativos respecto a varios de los parámetros, de interés enológico, representativos de la FML en el vino tinto. En especial, es de resaltar la buena correlación existente entre velocidad y los niveles de concentración de los ácidos málico y láctico. Este hecho pone de manifiesto que las variaciones de velocidad están directamente relacionadas con el desarrollo de la FML, aunque se debe tener en cuenta que no son únicamente debidas a la evolución de los ácidos málico y láctico. Además, se constata que cuando la FML llega a su fin, las medidas de velocidad manifiestan muy pocas variaciones presentando, prácticamente, un comportamiento constante. Igualmente, se comprueba que cuando las BAL no son capaces de llevar a cabo el proceso maloláctico, la evolución de la curva de velocidad presenta un comportamiento, aproximadamente, nulo.
- Los resultados obtenidos prueban que el comportamiento de la velocidad de propagación en el vino tinto es útil en la predicción *on-line* del final de la FML o bien, en el anuncio de que se puede estar produciendo alguna incidencia. De esta manera, ya que la curva de velocidad de propagación ha demostrado mantener una evolución plana cuando la FML llega a su fin, esta técnica podría ser de gran ayuda para los enólogos, favoreciendo aspectos como el manejo y organización del personal y de las acciones enológicas que se deben llevar a cabo inmediatamente después de la FML (p.ej. el trasiego de vinos y el sulfitado).
- La gran dependencia de la velocidad de propagación de los ultrasonidos con las variaciones de temperatura, hacen necesario controlar o en su defecto, en entornos industriales, monitorizar muy bien este parámetro con el fin de compensar su efecto a la hora de procesar la información recopilada.

7.2 Contribuciones originales

Las aportaciones más significativas de esta Tesis son:

- Diseño, desarrollo y validación experimental de un sistema de medida basado en ultrasonidos para la monitorización *on-line* de la FML del vino tinto

almacenado en tanques de acero inoxidable. La base principal del sistema es un sensor ultrasónico (transductor-*buffer rod-reflector*) de ondas longitudinales que hace uso de la técnica de *pulse-echo* para el seguimiento de la velocidad de propagación o su variación en medio líquido (vino tinto).

- Descripción de un procedimiento analítico para el dimensionamiento adecuado de *buffer rods*, de plástico o metal, usados en sensores de ultrasonidos destinados a la caracterización de materiales. Además, complementando dicho procedimiento, se presenta un método para redimensionar la longitud de los *buffer rods*, consiguiéndose significativas reducciones de longitud que favorecen su fabricación. De esta manera, se logra un importante aporte en la reducción del peso y ahorro en costes de este componente. Asimismo, los *buffer rods* fabricados siguiendo este método, manifiestan mejoras de *SNR* y más facilidades a la hora de su ensamblaje a los sistemas de medida ultrasónicos como el de este trabajo.
- Estudio y evaluación de un conjunto de métodos destinados a la obtención del tiempo de vuelo *TOF* y/o variaciones del tiempo de vuelo ΔTOF de las ondas de ultrasonidos recopiladas. Asimismo, también se lleva a cabo una propuesta de clasificación efectividad-coste computacional que ofrece la oportunidad de elegir cualquiera de los métodos según la capacidad de cálculo y/o aplicación del sistema donde se quiera implementar.
- Medida y caracterización de la velocidad de los ultrasonidos en mezclas binarias agua-ácido málico, agua-ácido láctico y agua-etanol; en disoluciones ternarias agua-etanol-ácido málico y agua-etanol-ácido láctico; y en disoluciones cuaternarias agua-etanol-ácido málico-ácido láctico.

7.3 Publicaciones derivadas de la Tesis

Contribuciones a revistas científicas

Artículos publicados:

García-Álvarez, J., García-Hernández, M.J., Novoa-Díaz, D.F., Turó Peroy, A., Chávez Domínguez, J.A. & Salazar Soler, J. (2013). Resizing buffer rods for ultrasound testing of food products with acoustic noise considerations. *Ultrasonics*, 53, 294-301.

Novoa-Díaz, D., García-Álvarez, J., Chávez, J.A., Turó, A., García-Hernández, M. & Salazar, J. (2012). Comparison of methods for measuring ultrasonic velocity variations during ageing or fermentation of food materials. *IET Science, Measurement and Technology*, 6 (4), 205-212.

Novoa-Díaz, D.F., Puig-Pujol, A., García-Álvarez, J., Chávez, J.A., Turó, A., Mínguez, S., García-Hernández, M.J., Bertran, E. & Salazar, J. (2012). Ultrasonic preliminary measurements of oenological malolactic fermentation parameters in red wine. *IOP Conference Series: Materials, Science and Engineering (Online)*, 42, 1-4.

Artículo aceptado para publicación:

Novoa-Díaz, D., Rodríguez-Nogales, J.M., Fernández-Fernández, E., Vila-Crespo, J., García-Álvarez, J., Amer, M.A., Chávez, J.A., Turó, A., García-Hernández, M.J. & Salazar, J. Ultrasonic monitoring of malolactic fermentation in red wines. *Ultrasonics* (In press).

Artículo sometido a revisión:

García-Álvarez, J., Novoa-Díaz, D.F., Bertran, E., Chávez, J.A., Puig-Pujol, A., Turó, A., Mínguez, S., García-Hernández, M.J., Capdevila, J. & Salazar, J. Preliminary measurements of acoustic properties of red wine using ultrasonics. *International Journal of Food Engineering*.

Artículo en preparación:

Amer, M.A., Novoa-Díaz, D.F., Puig-Pujol, A; Capdevilla, J; Chávez, J.A., Turó, A., García-Hernández, M.J. & Salazar, J. Ultrasonic velocity of water-ethanol-malic acid-lactic acid mixtures during malolactic fermentation.

Contribuciones a congresos

Novoa-Díaz, D.F., Puig-Pujol, A., Rodríguez-Nogales, J.M., Fernández-Fernández, E., Vila-Crespo, J., Capdevila, F., Amer, M.A., García-Álvarez, J., Chávez, J.A., García-Hernández, M.J., Turó, A. & Salazar, J. (2013). Monitorización del proceso de fermentación maloláctica en el vino tinto mediante propagación de ondas de ultrasonido. *XII Congreso de los Grupos de Investigación Enológica (GIENOL2013)*, Madrid, España.

Puig-Pujol, A., Novoa-Díaz, D.F., Capdevila, F., Amer, M.A., García-Álvarez, J., Chávez, J.A., García-Hernández, M.J., Turó, A. & J. Salazar. (2013). Sistema de mesura mitjançant ultrasons per monitoritzar en temps real la fermentació malolàctica. *1ª Jornada de Recerca en Enologia i Viticultura a Catalunya*, Tarragona, España.

Novoa-Díaz, D.F., Puig-Pujol, A., García-Álvarez, J., Chávez, J.A., Turó, A., Mínguez, S., García-Hernández, M.J., Bertran, E. & Salazar, J. (2012). Ultrasonic preliminary measurements of oenological malolactic fermentation parameters in red wine. *Ultrasound in the Control of Industrial Processes (UCIP2012)*, Madrid, España.

Novoa-Díaz, D.F., Puig-Pujol, A., García-Álvarez, J., Chávez, J.A., Turó, A., Mínguez, S., García-Hernández, M.J., Bertran, E. & Salazar, J. (2012). Safe and non-invasive monitoring of malolactic fermentation in red wine by means of ultrasound. *2nd International CIGR Workshop on Food Safety: Technologies and Innovations Applied to Food Safety*, Valencia, España.

Puig-Pujol, A., García-Álvarez, J., Masqué, M., Novoa-Díaz, D.F., Chávez, J.A., Bertran, E., García-Hernández, M.J., Turó, A. & Salazar, J. (2012). Monitorización on-line de la fermentación maloláctica mediante un sistema de medida ultrasónico. *6^a Reunión de la Red Temática BAL*, Tarragona, España.

García-Álvarez, J., Novoa-Díaz, D.F., Bertran, E., Chávez, J.A., Puig-Pujol, A., Turó, A., Mínguez, S., García-Hernández, M.J. & Salazar, J. (2011). Ultrasonic study of red wine properties: preliminary measurements. *XXXIV World Congress of Vine and Wine*, Porto, Portugal.

7.4 Otras publicaciones

Contribuciones a revistas científicas

Artículo publicado:

Ramírez-Muñoz, D., Casans-Berga, S., Novoa-Díaz, D.F., García-Gil, R. & Navarro-Antón, A.E. (2009). Transconductance converters based on current mirrors applied to pH measurement using ISFET sensors. *IEEE Transactions on Instrumentation and Measurement*, 58 (2), 434-440.

Contribuciones a congresos

Novoa-Díaz, D.F., Ramírez-Muñoz, D., Sánchez-Moreno, J. & Castro-Montero, E. (2008). Análisis y diseño de un circuito driver basado en convertidor generalizado de impedancias para un actuador piezoeléctrico. *6th Ibero-American Congress on Sensors (Ibersensor2008)*, Montevideo, Brazil.

7.5 Líneas futuras de investigación

Los resultados aportados en esta Tesis han demostrado que las técnicas de ultrasonidos pueden llegar a desempeñar un importante papel en el diseño de sistemas de medida *on-line* para la monitorización y control de la FML en el vino tinto. Algunas líneas futuras de investigación planteadas a partir del trabajo realizado en esta Tesis se podrían resumir en:

- Estudio y análisis de la influencia que, sobre las características de propagación acústica, podrían tener otros parámetros del vino presentes durante la FML. Teniendo en cuenta la complejidad que envuelve a la FML, es interesante ampliar el estudio para determinar cómo influyen parámetros como los diferentes niveles de ácido tartárico, el azúcar residual, el nivel ácido acético y la acidez total entre otros, sobre la sensibilidad de las medidas realizadas por el sistema de medida ultrasónico desarrollado.
- Estudio de acciones de mejora para la compensación de los efectos de la temperatura en las medidas experimentales. Influencia de la temperatura ambiente en los cambios de temperatura que experimenta el vino durante la actividad de las BAL.
- Estudio del comportamiento y respuesta del sistema de medida ultrasónico ubicando, simultáneamente, varios sensores a diferentes alturas del tanque de fermentación. Con el objetivo de aprovechar los recursos disponibles y llevar a cabo el mínimo de modificaciones en los tanques de fermentación, el sensor fue diseñado para facilitar su acoplamiento a través del agujero roscado DN-50 que poseen los tanques para realizar el vaciado del vino y que, consecuentemente, está ubicado en la parte inferior del depósito. Por lo tanto, es interesante confirmar que se puede aprovechar con garantías este agujero ya que su ubicación puede estar expuesta a la influencia de aspectos como una mayor concentración de sedimentos. Igualmente, mediante el uso de transductores con diferentes frecuencias de trabajo, es interesante llevar a cabo el estudio de la influencia que, sobre las medidas ultrasónicas, podrían ejercer otros efectos presentes en el proceso maloláctico. Frecuencias por debajo de 500 kHz estarían más expuestas a perturbaciones por la presencia de burbujas (CO₂) y frecuencias por encima de los 100 MHz lo harían ante la multiplicación de microorganismos como las BAL.
- Estudio de la viabilidad del sistema de medida ultrasónico desarrollado para monitorizar FML's cuando se lleva a cabo la inoculación de las BAL de las otras

dos maneras posibles: inoculación simultánea levaduras-BAL (co-inoculación) e inoculación durante la FA.

- Estudio y desarrollo de un procedimiento con el cual, a través de las medidas de velocidad ultrasónica, se pueda realizar un seguimiento continuo de los niveles de concentración de los ácidos málico y láctico en el vino tinto. De esta manera, también se podría usar el equipo de medida en aquellas aplicaciones enológicas en las que no se desea acabar con toda la concentración del málico, evitándose la necesidad de estar tomando, constantemente, muestras para el análisis en laboratorio.

BIBLIOGRAFÍA

Abrahamse, C.E. & Bartowsky, E.J. (2011). Timing of malolactic fermentation inoculation in Shiraz grape must and wine: Influence on chemical composition. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, DOI: 10.1007/s11274-011-0814-3.

Adamowski, J.C., Buiochi, F. & Sigelmann, R.A. (1998). Ultrasonic measurement of density of liquids flowing in tubes. *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics and Frequency Control*, 45, 48-56.

Ahmed, N. & Natarajan, T. (1983). Discrete-Time Signal and Systems. *Reston Publishing*. ISBN 0835913759.

Álava, J.M., Sahi, S.S., García-Álvarez, J., Turo, A., Chavez, J.A., García, M.J. & Salazar, J. (2007). Use of ultrasound for the determination of flour quality. *Ultrasonics*, 46, 270-276.

Alcaide-Hidalgo, J.M., Moreno-Arribas, M.V., Martín-Álvarez, P.J. & Polo, M.C. (2007). Influence of malolactic fermentation, postfermentative treatments and ageing with lees on nitrogen compounds of red wines. *Food Chemistry*, 103, 572-581.

Alexandre, H., Costello, P.J., Remize, F., Guzzo, J. & Guilloux-Benatier, M. (2004). *Saccharomyces cerevisiae* - *Oenococcus oeni* interactions in wine: current knowledge and perspectives. *International Journal of Food Microbiology*, 93, 141-154.

Aouzale, N., Chitnalah, A. & Jakjoud, H. (2010). Moroccan oil characterization using pulse-echo ultrasonic technique. *El Jadida, MAROC: Physical and chemical news*, 54, 8.

Arrigo, G.D' & Paparelli, A. (1988). Sound propagation in water-ethanol mixtures at low temperatures. I. Ultrasonic velocity. *Journal of Chemical Physics*, 88 (1), 405-415.

Bachaman, S., Klimaczak, B., & Gasyna, Z. (1978). Non-destructive viscometric studies of enzymic milk coagulation. *Acta Aliment.Polon.*, 4 (28), 55-62.

Bakkali, F., Moudden, A., Faiz, B., Amghar, A., Maze, G., Montero de Espinosa, F. & Akhnak, M. (2001). Ultrasonic measurement of milk coagulation time. *Measurement Science and Technology*, 12, 2154-2159.

Barshan, B. (2000). Fast processing techniques for accurate ultrasonic range measurements. *Measurement Science and Technology*, 11, 45-50.

Bartowsky, E.J. & Henschke, P.A. (2004). The "buttery" attribute of wine-diacetyl-desirability, spoilage and beyond. *International Journal of Food Microbiology*, 96, 235-252.

Bartowsky, E.J., Henschke, P.A. (1999). Use of a polymerase chain reaction for specific detection of the malolactic bacterium *Oenococcus oeni* (formerly *Leuconostoc oenos*) in grape juice and wine samples. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 5, 39-44.

Bartowsky, E.J., Henschke, P.A. (1995). Malolactic fermentation and wine flavour. *The Australian Grape grower and Winemaker*, 23rd Technical Issue 378a, 83-94.

Bauer, R. & Dicks, L.M.T. (2004). Control of malolactic fermentation in wine: A review. *South African Journal for Enology and Viticulture*, 25 (2), 74-87.

Becker, T., Mitzscherling, M. & Delgado, A. (2001). Ultrasonic velocity -A non-invasive method for the determination of density during beer fermentation. *Chemical Engineering and Technology*, 24, 61-67.

Becker, T., Mitzscherling, M. & Delgado, A. (2002). Hybrid data model for the improvement of an ultrasonic-based gravity measurement system. *Food Control*, 13, 223-233.

Benedito, J., Carcel, J.A., Sanjuan, N. & Mulet, A. (2000). Use of ultrasound to assess cheese characteristics. *Ultrasonics*, 38, 727-730.

Benedito, J., Carcel, J., Gisbert, M. & Mulet, A. (2001). Quality control of cheese maturation and defects using ultrasonics. *Journal of Food Science*, 66 (1), 100-104.

Benedito, J., Carcel, J.A., González, R. & Mulet, A. (2002). Application of low intensity ultrasonics to cheese manufacturing processes. *Ultrasonics*, 40, 19-23.

Bilaniuk, N. & Wong, G.S.K. (1993). Speed of sound in pure water as a function of temperature. *Journal of the Acoustical Society of America*, 93(3), 1609-1612.

Carreté, R., Vidal, M.T. & Bordons, A. (2002). Inhibitory effect of sulphur dioxide and other stress compounds in wine on the ATPase activity of *Oenococcus oeni*. *FEMS Microbiology Letters*, 211, 155-159.

Carreté, R., Reguant, C., Rozès, N., Constantí, M. & Bordons, A. (2006). Analysis of *Oenococcus oeni* strains in simulated microvinifications with some stress compounds. *American Journal of enology and viticulture*, 57 (3), 356-362.

Catania, C.D. & Avagnina de del Monte, S. (1994). Fermentación Maloláctica. *Revista UVA* No 50, 18-24.

Catania, C.D. & Avagnina de del Monte, S. (2007). Curso superior de degustación de vinos. Eea Mendoza. INTA. Argentina.

Cereser Camara, V. & Laux, D. (2010). Moisture content in honey determination with a shear ultrasonic reflectometer. *Journal of Food Engineering*, 96 (1), 93-96.

Cobus, L.A, Ross, K.A, Scanlon, M.G. & Page, J.H. (2007). Comparison of ultrasonic velocities in dispersive and non-dispersive food materials. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 8889-8895.

Comitini, F., Ferretti, R., Clementi, F., Mannazzu, I. & Ciani, M. (2005). Interactions between *Saccharomyces cerevisiae* and malolactic bacteria: preliminary characterization of a yeast proteinaceous compound(s) active against *Oenococcus oeni*. *Journal of Applied Microbiology*, 99, 105-111.

Costello, P.J., Henschke, P.A. & Markides, A.J. (2003). Standardised methodology for testing malolactic bacteria and wine yeast compatibility. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 9, 127-137.

Costello, P., (2006). The chemistry of malolactic fermentation. In: Morenzoni, R. (ed.). *Malolactic fermentation in wine - understanding the science and the practice*. Lallemand, Montréal. pp. 4.1-4.11.

Coupland, J.N. (2004). Low Intensity Ultrasound. *Food Research International*, 37(6), 537-543.

Davis, CR., Wibowo, D., Eschenbruch, R., Lee, T.H. & Fleet, G.H. (1985). Practical implications of malolactic fermentation: A review. *American Journal of Enology and Viticulture*, 36, 290-301.

Deventer, J., Löfqvist, T. & Delsing, J. (2000). Pspice simulation of ultrasonic systems. *IEEE Transactions on Ultrasonics Ferroelectrics and Frequency Control*, 47 (4), 1014-1024.

Deventer, J. (2004). One dimensional modelling of a step-down ultrasonic densitometer for liquids. *Ultrasonics*, 42, 309-314.

Elmehedi, H.M., Page, J.H. & Scanlon, M.G. (2003). Monitoring dough fermentation using acoustic waves. *Trans IChemE*, Vol. 81, Part C, 217-223.

Elmehedi, H.M., Page, J.H. & Scanlon, M.G. (2004). Ultrasonic Investigation of the Effect of Mixing Under Reduced Pressure on the Mechanical Properties of Bread Dough. *Cereal Chemistry*, 81, 504-510.

Elvira, L., Sampedro, L., Matesanz, J., Gómez-Ullate, Y., Resa, P., Iglesias, J.R., Echevarría, F.J. & Montero de Espinosa, F. (2005). Non-invasive and non-destructive ultrasonic technique for the detection of microbial contamination in packed UHT milk. *Food Research International*, 38 (6), 631-638.

Elvira, L., Duran, C., Sierra, C., Resa, P. & Montero de Espinosa, F. (2007). Ultrasonic measurement device for the characterization of microbiological and biochemical processes in liquid media. *Measurement Science and Technology*, 18, 2189-2196.

Elvira, L., Rodríguez, J. & Lynnworth, L.C. (2009). Sound speed and density characterization of milk adulterated with melamine. *Journal of the Acoustical Society of America*, 125, EL178-EL182.

EU Commission (2006). Towards a sustainable European wine sector. *Communication from the commission to the council and the European parliament*, ec.europa.eu/agriculture/capreform/wine/com2006_319_en.pdf

Fernández, F.A.N., Linhares, F.E. & Rodríguez, S. (2008). Ultrasound as pre-treatment for drying of pineapple. *Ultrasonics Sonochemistry*, 15(6), 1049-1054.

Fox, P., Smith, P.P. & Sahi, S. (2004). Ultrasound measurements to monitor the specific gravity of food batters. *Journal of Food Engineering*, 65, 317- 324.

Gamella, M., Campuzano, S., Conzuelo, F., Curiel, J.A., Muñoz, R., Reviejo, A.J. & Pingarrón, J.M. (2010). Integrated multienzyme electrochemical biosensors for monitoring malolactic fermentation in wines. *Talanta*, 81, 925-933

García-Alvarez, J., Yanez, Y., Prego, J.L., Túro, A., Chavez, J.A., García, M.J. & Salazar, J. (2006). Noise level analysis in buffer rod geometries for ultrasonic sensors. *Ultrasonics*, 44, e1093-e1100.

García-Álvarez, J., Gómez, M., Turó, A., Chávez, J.A., García, M.J. & Salazar, J. (2007). Acquisition of ultrasound signals for flour products testing. *In International Congress on Acoustics ICA07*, Madrid, Spain.

García-Álvarez, J., Salazar, J. & Rosell, C.M. (2011). Ultrasonic study of wheat flour properties. *Ultrasonics*, 51 (2), 223-228.

García-Álvarez, J., García-Hernández, M.J., Novoa-Díaz, D.F., Turó Peroy, A., Chávez Domínguez, J.A. & Salazar Soler, J. (2013). Resizing buffer rods for ultrasound testing of food products with acoustic noise considerations. *Ultrasonics*, 53, 294-301.

Giacomini, A. (1947). Ultrasonic velocity in ethanol-water mixtures. *The Journal of the Acoustical Society of America*, 19 (4), 701-702.

Gómez, M., Oliete, B., García-Álvarez, J., Ronda, F. & Salazar, J. (2008). Characterization of cake batters by ultrasound measurements. *Journal of Food Engineering*, 89, 408-413.

Grosso, V.A. & Mader, C.W. (1972). Speed of sound in pure water. *Journal of the Acoustical Society of America*, 52, 1442-1446.

Henick-Kling, T. & Park, Y.H. (1994). Considerations for the use of yeast and bacterial starter cultures: SO₂ and timing of inoculation. *American Journal of Enology and Viticulture*, 45, 464-469.

Hidalgo, J. (2011). Tratado de Enología 2da Edición. *Mundi-Prensa*, Madrid, España.

Hoppe, N., Puttmer, A. & Hauptmann, P. (2003). Optimization of buffer rod geometry for ultrasonic sensors with reference path. *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics and Frequency Control*, 50, 170-178.

Hutchens, C.G. & Morris, S.A. (1984). A Three Port Model for Thickness Mode Transducers Using SPICE II. *IEEE 1984 Ultrasonics Symposium*, 897-902.

Ibáñez, A., Parrilla, M., García, M. & Martínez, O. (2000). Determinación del tiempo de vuelo de señales ultrasónicas, con resolución superior a un período de muestreo, por análisis de fase. *XXXI Congreso Nacional de Acústica Tecni-Acústica 2000*, Madrid, España, Ultrasonidos, ULT-13.

Julio, C.A., Flavio, B., Claudio, S., Emilio, C.N.S. & Rubens, A.S. (1995). Ultrasonic measurement of density of liquids. *The Journal of the Acoustical Society of America*, 97, 354-361.

Jussier, D., Momeau, A.D. & Mira de Orduña, R.M. (2006). Effect of simultaneous inoculation with yeast and bacteria on fermentation kinetics and key wine parameters of cool-climate Chardonnay. *Applied and Environmental Microbiology*, 72,221-227.

King, S. & Beelman, R.B. (1986). Metabolic interactions between *Saccharomyces cerevisiae* and *Leuconostoc oenos* in a model grape juice/wine system. *American Journal of Enology and Viticulture*, 37, 53-60.

Kollar, S. & Brown, N. (2006). Monitoring malolactic fermentation. In: Morenzoni, R. (ed). *Malolactic fermentation in wine - understanding the science and the practice*. Lallemand, Montréal. pp. 14.1-14.8.

Krieger, S. (2006a). Historia de la bacteria maloláctica en el vino. Informe técnico "Fermentación Maloláctica", *Fundación para la cultura del vino*, Madrid, 9-17.

Krieger, S. (2006b). Determining when to add malolactic bacteria. In: Morenzoni, R. & Spech, K. (ed). *Malolactic Fermentation in Wine: Understanding the science and the practice*. Lallemand, Montréal, pp. 12:1-12:10.

Krieger, S. (2006c). Los tipos de vino y el momento óptimo para la inoculación: cómo controlar el proceso. Informe técnico: "Fermentación Maloláctica", *Fundación para la cultura del vino*, Madrid, 87-95.

Lallemand Inc. (2005). Malolactic Fermentation in Wine: Understanding the science and the practice. http://www.lallemandwine.com/IMG/pdf_LALLEMAND_MLF_IN_WINE.pdf.

Lamberti, N., Ardia, L., Albanese, D. & Di Matteo, M. (2009). An ultrasound technique for monitoring the alcoholic wine fermentation. *Ultrasonics*, 49, 94-97.

Larsen, J.T., Nielsen, J.-C., Kramp, B., Richelieu, M., Bjerring, P., Riisager, N.A. & Edwards, C.G. (2003). Impact of different strains of *Saccharomyces cerevisiae* on malolactic fermentation by *Oenococcus oeni*. *American Journal of Enology and Viticulture*, 54, 246-251.

Leach, W.M Jr. (1994). Controlled-source analogous circuits and SPICE models for piezoelectric transducers. *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics and Frequency Control*, 41 (1), 60-66.

Lee, S., Pyrak-Nolte, L.J. & Campanella, O. (2004). Determination of ultrasonic based rheological properties of dough during fermentation. *Journal of Texture Studies*, 35, 33-52.

Lerm, E., Engelbrecht, L. & du Toit, M. (2010). Malolactic fermentation: the ABC's of MLF. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 31, 186-212.

Letang, C., Piau, M., Verdier, C. & Lefebvre, L. (2001). Characterization of wheatflour-water doughs: a new method using ultrasound. *Ultrasonics*, 39, 133-141.

Liu, S.Q. (2002). A review: Malolactic fermentation in wine - beyond deacidification. *Journal of Applied Microbiology*, 92, 589-601.

Lonvaud-Funel, A. & Matsumoto, N. (1979). Le coefficient de solubilité du gaz carbonique dans les vins. *Vitis*, 18, 137-147.

Lonvaud-Funel, A., Joyeux, A. & Desens, C. (1988). The inhibition of maloláctica fermentation of wines by products of yeast metabolism. *Journal Food of Science and Technology*, 44,183-191.

Lonvaud-Funel, A. (1999). Lactic acid bacteria in the quality improvement and depreciation of wine. *Antonie van Leeuwenhoek*, 76, 317-331.

Lonvaud-Funel, A. (2004). Bacterias lácticas y fermentación maloláctica. *El vino y su Industria*, Nro 5, 42-50.

Maicas, S. (2001). The use of alternative technologies to develop malolactic fermentation in wine. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 56, 35-39.

Marioli, D., Narduzzi, C., Offeli, C., Petri, D., Sardini, E. & Taroni, A. (1991). Digital time of flight measurement for ultrasonic sensors. *IEEE Transactions on Instrumentation and Measurement*, 41, 93-7.

Martin, K & Spinks, D. (2001). Measurement of the speed of sound in ethanol/water mixtures. *Ultrasound in Medicine & Biology*. 27 (2), 289-291.

Matthews, A., Grimaldi, A., Walker, M., Bartowsky, E., Grbin, P. & Jiranek, V. (2004). Lactic acid bacteria as a potential source of enzymes for use in vinification. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 5715-5731.

McClements, D.J. & Fairley, P. (1991). Ultrasonic pulse echo reflectometer. *Ultrasonics*, 29, 58-62.

Mc Clements, D.J. (1997). Ultrasonic characterization of foods and drinks: Principles, methods and applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 37 (1), 1-46.

Mizrach, A. (2008). Ultrasonic technology for quality evaluation of fresh fruit and vegetables in pre- and postharvest processes. *Postharvest Biology and Technology*, 48, 315-330.

Morris, S.A. & Hutchens, C.G. (1986). Implementation of Mason's Model on Circuit Analysis Programs. *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics and Frequency Control*, 33, 295-298.

Nassar, G., Nongailard, B. & Noël, Y. (2001). Monitoring of milk gelation using a low-frequency ultrasonic technique. *Journal of Food Engineering*, 48, 351-359.

Osborne, J.P. & Edwards, C.G. (2006). Inhibition of malolactic fermentation by *Saccharomyces* during alcoholic fermentation under low- and high nitrogen conditions: A study in synthetic media. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 12, 69-78.

OIV (2012). Compendium of International Methods of Wine and Must Analysis. *Edition 2012*, International Organization of Vine and Wine, Paris, France.

Parrilla, M., Anaya, J. & Fritsch, C. (1991). Digital signal processing techniques for high accuracy ultrasonic range measurements. *IEEE Transactions on Instrumentation and Measurement*, 40, 759-763.

Povey, M.J.W. & Wilkinson, J.M. (1980). Applications of ultrasonic pulse-echo techniques to egg albumen quality testing: a preliminary report. *British Poultry Science*, 21, 489-495.

Povey, M.J.W. (1999). Ultrasonic determination of the properties of food dispersions. In: *Seminars in Food Analysis*. J.N Coupland (ed.), CRC press, Chapman and Hall, London, UK.

Povey, M.J.W., Hindle, S., Kennedy, J.D., Stec, Z. & Taylos, R.G. (2003). The molecular basis for sound velocity in n-Alkanes, 1-Alcohols and dimethylsiloxanes. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 5, 73-78.

Puttmer, A., Hoppe, N. & Hauptmann, P. (1999). Low noise design of ultrasonic transducers. *Proceedings IEEE Ultrasonics Symposium 1999*, 2, 1177- 1180.

Queirós, R., Corrêa, F., Silva, P. & Cruz, A. (2010). Cross-correlation and sine-fitting techniques for high-resolution ultrasonic ranging. *IEEE Transactions on Instrumentation and Measurement*, 59, 3227-3236.

Reissland, M.U. (1989). Electrical Measurements: Fundamentals, Concepts, Applications. *John Wiley & Sons, New York*.

Resa, P., Elvira, L. & Montero de Espinosa. (2004). Concentration control in alcoholic fermentation processes from ultrasonic velocity measurements. *Food Research International*, 37, 587-594.

Resa, P., Elvira, L., Montero de Espinosa, F. & Gómez-Ullate, Y. (2005). Ultrasonic velocity in water-ethanol-sucrose mixtures during the alcoholic fermentation. *Ultrasonics*, 43/4, 247-252.

Resa, P., Bolumar, T., Elvira, L., Pérez, G. & Montero de Espinosa, F. (2007). Monitoring of lactic acid fermentation in culture broth using ultrasonic velocity. *Journal of Food Engineering*, 78, 1083-1091.

Resa, P., Elvira, L., Montero de Espinosa, F., González, R. & Barcenilla, J. (2009). On-line ultrasonic velocity monitoring of alcoholic fermentation kinetics. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 32, 321-331.

Riberau Gayon, P. (1985). New developments in wine microbiology. *American Journal of Enology and Viticulture*, 36, 1-10.

Ribéreau-Gayon, P., Dubordieu, D., Dooonèche, B. & Lonvaud-Funel, A. (2000). Handbook of Enology: Volume. 1. The Microbiology of Wine and Vinifications. England: John Wiley & Sons, Ltd.

Romero, S.V. (2010). Influencia de las condiciones de vinificación y las bacterias lácticas sobre la formación de carbamato de etilo. *Tesis Doctoral Universitat Rovira i Virgili*.

Rosi, I., Fia, G. & Canuti, V. (2003). Influence of different pH values and inoculation time on the growth and malolactic activity of strain of *Oenococcus oeni*. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 9, 194-199.

Ruiz, P., Seseña, S., Izquierdo, P.M. & Palop, M.L. (2010). Bacterial biodiversity and dynamics during malolactic fermentation of Tempranillo wines as determined by a culture-independent method. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 86 (5), 1555-1562.

Salazar, J., Alava, J.M., Sahi, S.S., Turo, A., Chavez, J.A. & Garcia, M.J. (2002). Ultrasound measurements for determining rheological properties of flour-water systems. *Ultrasonics Symposium, 2002. Proceedings. 2002 IEEE*, 1, 877-880.

Salazar, J., Turó, A., Chávez, J. A. & García, M. J. (2004). Ultrasonic inspection of batters for on-line process monitoring. *Ultrasonics*, 42(1-9), 155-159.

Shimazu, Y., Uehara, M. & Watanbe, M. (1985). Transformation of citric acid to acetic acid, acetoin and diacetyl by wine making lactic acid bacteria. *Agricultural and biological chemistry*, 49, 2147-2157.

Sierra, C., Elvira, L., Garcia, J.L., Resa, P. & Galan, B. (2010). Monitoring *Escherichia coli* growth in M63 media by ultrasonic noninvasive methods and correlation with spectrophotometric and HPLC techniques. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85, 813-821.

Théodore, D., Krieger, S., Costello, P. & Dumont, A. (2005). Bacterial nutrition the key to successful malolactic fermentation. *Australian and New Zealand Grapegrower & Winemaker*, April, 65-68.

Therriault, M., Pomar, C. & Castonguay, F.W. (2009). Accuracy of real-time ultrasound measurements of total tissue, fat, and muscle depths at different measuring sites in lamb. *Journal of Animal Science*, 87(5), 1801-1813.

Ting, C.-H., Kuo, F.-J., Lien, C.-C. & Sheng, C.-T. (2009). Use of ultrasound for characterizing the gelation process in heat induced CaSO₄·2H₂O tofu curd. *Journal of Food Engineering*, 93(1), 101-107.

Turo, A., Salazar, J., Chavez, J.A., Ortega, J.A. & Garcia, M.J. (1999). Performance improvement of ultrasonic therapy equipment by modifying the classical transducer design. *IEE Proceedings on Science, Measurement and Technology*, 146, 107-112.

Ugliano, M. & Moio, L. (2005). Changes in the concentration of yeast-derived volatile compounds of red wine during malolactic fermentation with four commercial starter cultures of *Oenococcus oeni*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 10134- 10139.

Van Sint Jan, M., Guarini, M., Guesalaga, A., Pérez-Correa, J.R. & Vargas, Y. (2008). Ultrasound based measurements of sugar and ethanol concentrations in hydroalcoholic solutions. *Food Control*, 19, 31-35.

Vatandas, M., Bulent Koc, A. & Koc, C. (2007). Ultrasonic velocity measurements in ethanol-water and methanol-water mixtures. *Eur. Food Res. Technol.*, 225, 525-532.

Versari, A., Parpinello, G.P. & Cattaneo, M. (1999). *Leuconostoc oenos* and malolactic fermentation in wine: A review. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 23, 447- 455.

Wibowo, D., Eschenbruch, R., Davis, C.R., Fleet, G.H. & Lee, T.H. (1985). Occurrence and Growth of lactic acid bacteria in wine: a review. *American Journal of Enology and Viticulture*, 36, 302-313.

Winder, W.C., Aulik, D.J. & Rice, A.C. (1970). An ultrasonic method for direct and simultaneous determination of alcohol and extract content of wines. *American Journal of enology and Viticulture*, 21 (1), 1-11.

Zapparoli, G., Tosi, E., Azzolini, M., Vagnoli, P. & Krieger, S. (2009). Bacterial inoculation strategies for the achievement of malolactic fermentation in highalcohol wines. *South African Journal for Enology and Viticulture*, 30, 49-55.