

*APLICACIÓN DE MICROONDAS PARA
LA REDUCCIÓN DE LAS POBLACIONES
DE MICROORGANISMOS EN
MOSTO DE UVA*



LOPEZ GRESTA, Juliana
LICENCIATURA EN BROMATOLOGÍA



FCA
FACULTAD DE
CIENCIAS AGRARIAS

Mendoza, 26 de Julio de 2017



UNCUYO
UNIVERSIDAD
NACIONAL DE CUYO

Tema:

“Aplicación de microondas para la reducción de poblaciones de microorganismos en mosto de uva”.

Tesista:

Lopez Gresta, Juliana
jlopezgresta@gmail.com

Directora de Tesis:

Dra. Laura Analía Mercado
mercado.laura@inta.gob.ar

Co-Directora de Tesis:

Dra. Mariana Combina
combina.mariana@inta.gob.ar

Miembros del comité evaluador:

Presidente:

Msc Lic. Laura Sanchez

Vocales:

Lic. Valeria Chimeno
Lic. Nora Martinengo

Suplente:

Msc Silvia Paladino

“No os dejéis corromper por un escepticismo estéril y deprimente; no os desalentéis ante la tristeza de ciertas horas que pasan sobre las naciones. Vivid en la serena paz de los laboratorios y las bibliotecas. Preguntaos primero: ¿Qué he hecho por instruirme? y, después, al ir progresando. ¿Qué he hecho por mi patria? Hasta que llegue el día en que podáis sentir la íntima satisfacción de pensar en que de alguna manera habéis contribuido al progreso y bienestar de la humanidad”.

Louis Pasteur (1822-1895)

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL.....	III
ÍNDICE DE TABLAS.....	V
ÍNDICE DE FIGURAS.....	VI
RESUMEN.....	VIII
AGRADECIMIENTOS.....	IX
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Vinificación.....	1
1.1.1. Breve Reseña Histórica.....	1
1.1.2. Principios Básicos de la Vinificación.....	2
1.1.3. Panorama Vitivinícola Mundial.....	4
1.1.4. Panorama Vitivinícola Argentino.....	4
1.2. Microorganismos asociados a la uva y a la vinificación.....	5
1.2.1. Deterioro microbiano.....	7
1.2.1.1. Origen de los microorganismos alteradores del vino.....	7
1.2.2. Principales géneros de levaduras involucrados en el deterioro del vino.....	8
1.2.3. Deterioro provocado por bacterias del ácido acético.....	10
1.2.4. Deterioro provocado por bacterias del ácido láctico.....	11
1.3. Uso de anhídrido sulfuroso en la elaboración de vinos.....	13
1.3.1. Propiedades del anhídrido sulfuroso en los vinos.....	14
1.3.2. Efectos del sulfuroso sobre las características sensoriales de los vinos.....	15
1.3.3. Efectos del sulfuroso sobre la salud del consumidor	15
1.4. Uso de ondas electromagnéticas de alta frecuencia en la industria vitivinícola.....	16
1.4.1. Beneficios del uso de microondas en la industria vitivinícola.....	18
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	20
2.1. Hipótesis.....	20
2.2. Objetivos generales y particulares.....	20
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
3.1. Evaluación de la elevación de la temperatura en distintos tiempos de microondas.....	21
3.2. Microorganismos del trabajo.....	21
3.3. Medios de cultivo e inoculación.....	21
3.4. Diseño experimental	22

3.5. Análisis estadístico de resultados.....	23
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	24
4.1. Efecto de la temperatura vs dosis de microondas y tiempo de tratamiento.....	24
4.2. Evaluación de la relación temperatura y tiempo de tratamiento a una potencia de microondas de 250 watts.....	25
4.3. Efecto del tratamiento con microondas para cada grupo microbiano.....	26
4.3.1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	26
4.3.2. <i>Pichia membranaefaciens</i>	29
4.3.3. <i>Dekkera bruxellensis</i>	29
4.3.4. <i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	30
4.3.5. <i>Hanseniaspora uvarum</i>	31
4.3.6. <i>Acetobacter spp</i>	31
4.3.7. <i>Lactobacillus spp</i>	32
4.4. Evaluación comparada del efecto de los tratamientos de microondas para los diferentes microorganismos	34
4.4.1. Efecto del tiempo en microondas para 2 minutos de tratamiento.....	35
4.4.2. Efecto del tiempo en microondas para 3 minutos de tratamiento.....	35
4.4.3. Efecto del tiempo en microondas para 4 minutos de tratamiento.....	36
5. CONCLUSIONES.....	40
6. BIBLIOGRAFÍA.....	41
ANEXO I.....	47
ANEXO II.....	48
ANEXO III.....	50
ANEXO IV.....	52

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Datos de la producción vitivinícola argentina. Fuente: Instituto Nacional de Vitivinicultura (INV).....	5
Tabla 2: Identificación de los cultivos de la Colección de microorganismos en la EEA Mendoza INTA, utilizados en este estudio.....	21

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Producción mundial de vino en 2015. Fuente: Elaboración Observatorio Vitivinícola Argentino en base a OIV.....	4
Figura 2: Incubación en estufa con agitación.....	22
Figura 3: Microondas usado para el tratamiento.....	22
Figura 4: Esquema del diseño experimental.....	23
Figura 5: Temperatura vs dosis de microondas y tiempo de tratamiento.....	25
Figura 6: Relación del aumento de temperatura respecto al tiempo de tratamiento a 250W.....	26
Figura 7: Poblaciones viables de <i>S. cerevisiae</i> luego de los tratamientos en microondas a 250W.....	27
Figura 8: Colonias de <i>S.cerevisiae</i> desarrolladas en el medio WL luego de cada tratamiento.....	28
Figura 9: Poblaciones viables de <i>P. membranaefasiens</i> luego de los tratamientos en microondas a 250W.....	29
Figura 10: Poblaciones viables de <i>D. bruxellensis</i> luego de los tratamientos en microondas a 250W.....	30
Figura 11: Poblaciones viables de <i>Z. rouxii</i> luego de los tratamientos en microondas a 250W.....	30
Figura 12: Poblaciones viables de <i>H. uvarum</i> luego de los tratamientos en microondas a 250W.....	31
Figura 13: Poblaciones viables de <i>Acetobacter spp</i> luego de los tratamientos en microondas a 250W.....	32
Figura 14: Poblaciones viables de <i>Lactobacillus spp</i> luego de los tratamientos en microondas a 250W.....	32
Figura 15: Colonias de <i>Lactobacillus spp.</i> desarrolladas en medio MRS luego de cada tratamiento.....	33
Figura 16: Tratamiento con microondas para cada microorganismo estudiado.....	34
Figura 17: Resultados para el tiempo de tratamiento 2 minutos. Se grafican medias e intervalos de confianza (0,95). A: <i>Acetobacter spp.</i> B: <i>D. bruxellensis</i> , H: <i>H. uvarum</i> , L: <i>Lactobacillus spp.</i> P: <i>P. membranaefasiens</i> , S: <i>S. cerevisiae</i> , Z: <i>Z. rouxii</i>	35

Figura 18: Resultados para el tiempo de tratamiento 3 minutos. Se grafican medias e intervalos de confianza (0,95). A: *Acetobacter spp.* B: *D. bruxellensis*, H: *H. uvarum*, L: *Lactobacillus spp.* P: *P. membranaefasiens*, S: *S .cerevisiae*, Z: *Z. rouxii*.....36

Figura 19: Resultados para el tiempo de tratamiento 4 minutos. Se grafican medias e intervalos de confianza (0,95). A: *Acetobacter spp.* B: *D. bruxellensis*, H: *H. uvarum*, L: *Lactobacillus spp.* P: *P. membranaefasiens*, S: *S.cerevisiae*, Z: *Z. rouxii*.....37

RESUMEN

La producción de vid y la elaboración de vino constituyen por excelencia dos actividades de amplia tradición y gran impacto económico en Mendoza. Dos aspectos fundamentales para potenciar el desarrollo de dichas actividades son el aumento de la calidad en la producción de vinos y brindar un alimento seguro para el consumidor. Ambas perspectivas pueden abordarse desde una estrategia microbiológica, considerando que entre las levaduras y bacterias presentes en el mosto se encuentran las principales responsables de la fermentación alcohólica y maloláctica del vino, así como también microorganismos responsables del deterioro del mismo. El conocimiento y la comprensión de los fenómenos que determinan la presencia de distintas cepas de bacterias y levaduras constituyen una herramienta imprescindible para el abordaje de los desafíos actuales que plantea la producción de vinos a nivel mundial. En el presente estudio se propuso evaluar el uso de ondas electromagnéticas de alta frecuencia (microondas) como alternativa a emplear en la industria vitivinícola para disminuir la población microbiana en mosto, lo cual directamente permite disminuir la cantidad necesaria de SO₂ a utilizar. Para ello, se evaluaron las poblaciones de *Saccharomyces cerevisiae*, *Hanseniaspora uvarum*, *Pichia membranaefaciens*, *Zygosaccharomyces rouxii*, *Dekkera bruxellensis*, *Lactobacillus spp* y *Acetobacter spp* inoculadas en mosto de uva antes y después del tratamiento en microondas a una potencia de 250 watts, durante 2,3 y 4 minutos. Se pudo verificar que *S. cerevisiae* y *Lactobacillus spp.* fueron los microorganismos que mostraron mayor resistencia al tratamiento de microondas, por otro lado *D. bruxellensis* y *H. uvarum*, fueron los microorganismos más sensibles. La información generada demuestra que la reducción de las poblaciones microbianas de mostos de uva mediante tratamiento con microondas dependió del microorganismo que se trata.

Palabras clave: Microondas, mosto, población microbiana, anhídrido sulfuroso.

AGRADECIMIENTOS

A mis papás, Eric y Norma, por su amor incondicional y por ayudarme a ser la persona que soy.

A mi hermana, Jimena, por enseñarme que siempre se puede lograr lo que uno que se propone.

A mi novio, Renzo, por su apoyo y su amor infinito.

A los amigos que me dio la Facultad, Agostina y Joan, pilares importantes en toda mi carrera.

A la Facultad de Ciencias Agrarias, por formarme personal y profesionalmente.

A mis directoras de Tesis, Laura y Mariana, por su calidez y sencillez para brindar sus conocimientos y por ayudarme a concluir mi tesis de grado.

A mis amigos y familia que siempre están.

A Dios, por la vida que me regala todos los días.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Vinificación

1.1.1. Breve Reseña Histórica

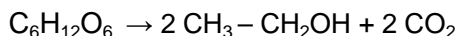
El origen de las bebidas fermentadas se encuentra unido a la evolución de los seres humanos, siendo probablemente la miel diluida de abejas silvestres la primera de estas bebidas, también conocida como "hidromiel"; apareciendo posteriormente las derivadas de los cereales o "cerveza", así como también las de la uva o "vino". La localización histórica de estas bebidas, coincide con la de los orígenes del cultivo de la vid por la mano del hombre en Oriente Medio, pasando después al área mediterránea de Grecia, y por fin hacia Roma, donde las extendieron por todo su Imperio en la actual Europa (Hidalgo Togados, 2011).

La etimología de la palabra fermentación procede del latín *fervere*, que literalmente significa hervir, queriendo expresar en el proceso de transformación del mosto en vino, el fenómeno espontáneo de subida de temperatura y desprendimiento de gas carbónico. En la antigüedad parecía inexplicable y algo mágico, que un líquido azucarado como es el mosto, se transformase de manera espontánea en otro líquido distinto, el vino, logrando una bebida que poseía propiedades sensoriales agradables y también euforizantes.

Las teorías sobre esta transformación llamada "fermentación" por ignorancia del exacto proceso, fueron múltiples e incluso por su misterio, formaron durante cientos de años parte de la Alquimia; pero los avances de las ciencias en los últimos siglos, develaron el secreto de este singular fenómeno. El holandés Van Leeuwenhoek (1680) inventó el primer microscopio y observó en la cerveza fermentada unos pequeños corpúsculos ovalados, a los cuales llamó "animáculas", responsables probablemente del fenómeno de la fermentación. Sin embargo, este descubrimiento quedó en el olvido, hasta que, a finales del siglo XVII, el científico francés Antoine-Laurent de Lavoisier, emitió la primera hipótesis de la fermentación, conocida como la teoría mecánica, donde se desarrolla la primera ecuación de la transformación del mosto en vino:

Mosto de uva= Anhídrido carbónico + Alcohol

Más adelante Gay-Lussac (1813) representó el proceso fermentativo con la siguiente expresión:



Algo más tarde entre los años 1835 y 1837, tres investigadores: Caignard Latour, Kützing y Schwann formularon la *teoría vitalista* de la fermentación, rescataron las observaciones de Van Leeuwenhoek, y explicaron este fenómeno por intervención de seres vivos microscópicos y pertenecientes al reino vegetal. El último denominó a los microorganismos de la cerveza como "zuckerpilz" que significa "hongo del azúcar", y luego Meyen en 1838 los clasificó como *Saccharomyces*, siendo más tarde conocidas como "levaduras" cuyo término procede de "levare" o levantar (Ribéreau-Gayon y col., 2006).

Sin embargo, en contra del concepto vitalista muy en boga en aquellos tiempos, un grupo de científicos, Wöhler, Liebig y Berzelius entre otros, negaban la intervención de los seres vivos, aunque reconocían su presencia en los medios fermentativos, y desarrollaron una teoría química, donde las transformaciones se producían por reacciones meramente químicas, debidas a la acción catalítica de las levaduras, pero sin participar directamente en el proceso.

Louis Pasteur demostró en 1866 de manera irrefutable, la naturaleza biológica de las fermentaciones, contradiciendo la teoría de la “generación espontánea”, y explicando que sin la presencia de microbios o gérmenes específicos, no se podía producir una fermentación. Curiosamente Pasteur inició sus investigaciones microbiológicas con el vino, para luego terminar con las enfermedades infecciosas humanas (Fleet, 1993).

En 1858 Traube había anticipado la hipótesis de que la levadura degrada el azúcar, gracias a un “principio activo”, que más tarde se conocería como “enzima”, llegando incluso Pasteur a buscarlo sin encontrarlo, bajo el nombre de “alcoholasa”. Después de la muerte de Pasteur, los hermanos Buchner en 1896, logran separar la enzima de la fermentación de las levaduras, obteniendo la prueba de la naturaleza enzimática de las fermentaciones, llamando a esta sustancia como “zimasa alcohólica”.

Además de las levaduras, las uvas, mostos y vinos pueden contener otros microorganismos como son los mohos, bacterias lácticas y acéticas; cuya presencia en éstos es inevitable, salvo en el caso de la “fermentación maloláctica” que está considerada en algunos casos como una transformación beneficiosa. (Hidalgo Togores, 2011).

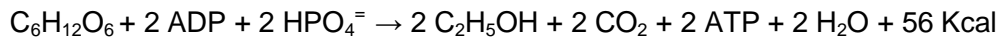
1.1.2. Principios Básicos de la Vinificación

El Código Alimentario Argentino (CAA) define como mosto virgen de uva al: jugo obtenido por expresión o molienda de la uva fresca, sin hollejos pepitas ni escobajos, en tanto no haya comenzado a fermentar (Código Alimentario Argentino, 2017). Por su parte, la Organización Internacional de la Viña y el Vino (OIV) define al vino (del latín *vinum*) como “bebida resultante de la fermentación alcohólica, completa o parcial de la uva fresca, estrujada o no, o del mosto de uva” (Organización Internacional de la Viña y el Vino, 2017).

La vinificación se puede definir como el conjunto de operaciones y prácticas que se llevan a cabo con el fin de transformar la uva en vino, respetando al máximo las cualidades intrínsecas que posee dicha uva para obtener el mejor resultado posible (Suarez e Iñigo, 2004). Este proceso es el resultado de numerosas reacciones bioquímicas, que implican la interacción de muchas especies microbianas, representadas por levaduras, bacterias y hongos filamentosos (Fleet, 2007; Fugelsang y Edwards, 2007).

La elaboración del vino incluye dos transformaciones principales, fermentación alcohólica (FA) y fermentación maloláctica (FML), tanto la FA como la FML contribuyen esencialmente a la calidad final del producto (Swiegers y col., 2005) y se llevan a cabo por una sucesión de microorganismos fundamentalmente levaduras y bacterias lácticas.

Fermentación alcohólica (FA): proceso bioquímico por el cual los azúcares del mosto se transforman principalmente en etanol y dióxido de carbono, mediante una sucesión de reacciones en cadena que tienen lugar en el citoplasma de las levaduras y que puede expresarse mediante la siguiente ecuación global simplificada:



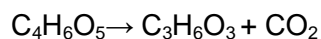
Paralelamente y de forma asociada a la degradación de los azúcares, las levaduras utilizan otros compuestos presentes en el mosto, que son necesarios para su desarrollo y multiplicación, dando lugar a gran cantidad de metabolitos secundarios:

-Alcoholes superiores procedentes del metabolismo nitrogenado de las levaduras que participan en el equilibrio aromático del vino.

-Ésteres formados a partir de alcoholes superiores, la mayoría de los cuales contribuyen de forma muy positiva al aroma de los vinos.

-Sustancias azufradas que pueden influir en el equilibrio organoléptico del vino y que se forman a partir de los compuestos derivados del azufre y presentes en el mosto.

Fermentación maloláctica (FML): consiste en la desacidificación biológica del vino que resulta de la transformación del ácido L (-) málico (dicarboxílico) en ácido L (+) láctico (monocarboxílico) y dióxido de carbono por acción de las bacterias lácticas. Bioquímicamente es el resultado de la actividad de la enzima maloláctica característica de las bacterias lácticas que precisa de los cofactores NAD^+ y Mn^{2+} , según la siguiente reacción:



Esta transformación tiene un doble efecto: por un lado, desacidifica el vino, es decir eleva el pH, tanto más cuanto más alto es el contenido inicial de ácido málico, y por otra parte lo suaviza, al hacer desaparecer el sabor ácido y duro del ácido málico y sustituirlo por el sabor más suave del ácido láctico. Por lo tanto, la FML modifica las características organolépticas del vino a la vez que contribuye a su estabilidad microbiológica, por lo que se considera indispensable para afinamiento y estabilidad del vino, constituyendo el primer paso hacia la fase de envejecimiento.

Al igual que las levaduras en la FA, las bacterias lácticas son capaces de metabolizar un número importante de sustancias que contiene el vino, produciendo numerosos metabolitos secundarios:

-Los azúcares residuales de la FA suministran la energía suficiente a las bacterias lácticas para su crecimiento y permiten la formación de biomasa que llevará a cabo la FML. Sin embargo, la fermentación de estos azúcares también conduce a la formación de ácido acético lo que produce un aumento en la acidez volátil.

-El ácido cítrico es también un sustrato importante para las bacterias lácticas, a partir del cual no sólo se genera ácido acético, sino también otros productos como diacetilo que contribuye al aroma del vino y su complejidad.

-Los aminoácidos del vino son utilizados por las bacterias lácticas para la síntesis de proteínas, pero este metabolito nitrogenado puede también producir aminas biógenas y carbamato de etilo, que pueden resultar perjudiciales para la salud humana.

1.1.3. Panorama Vitivinícola Mundial

Según estadísticas de la OIV la producción mundial de vino en 2015 (excluyendo jugos y mostos), con 274,4 millones de hectólitros, aumentó un 2,2% respecto al año anterior. Gracias a un crecimiento en la producción del 12% con respecto al 2014, Italia fue el primer productor a nivel mundial (49,5 millones de hectólitros), seguido de Francia y España. Los Estados Unidos registraron por tercer año consecutivo un incremento en su producción. Argentina se encuentra entre los 10 países con mayor producción anual de vino (OIV, 2017) (Figura N° 1).

Producción de vino 2015		
	Millones de Hectólitros	Variación 2015/2014
Italia	50	12,0%
Francia	48	2,0%
España	37	-6,0%
Estados Unidos	22	1,0%
Argentina	13	-12,0%
Chile	13	28,0%
Australia	12	0,0%
Sudáfrica	11	-2,0%
China	11	-5,0%
Alemania	9	-4,0%
Resto	49	
TOTAL	274	2,0%

Figura 1: Producción mundial de vino en 2015. Fuente: Elaboración Observatorio Vitivinícola Argentino en base a OIV.

1.1.4. Panorama Vitivinícola Argentino

La vid se cultiva en el país entre los 25° y 42,5° de latitud sur. El desarrollo de este cultivo se localiza principalmente a lo largo del oeste del territorio en los valles precordilleranos argentinos, desde la provincia de Salta en la región Noroeste, descendiendo por los oasis productivos centrales de Catamarca, La Rioja, San Juan y Mendoza, hasta la región patagónica en las provincias de Río Negro y Neuquén. También se elabora vino en mucha menor proporción en las provincias de Tucumán, Entre Ríos, Córdoba, Chubut y Buenos Aires (INV, 2016).

La producción argentina de vinos y mostos representa el 8,2% de la producción mundial, ocupando el primer lugar en Sudamérica. La superficie implantada se estima en 221.000 ha, de las cuales el 92,3% presenta uvas para vinificar. De éstas, 135.000 ha son de alta calidad enológica, como Malbec, Cabernet Sauvignon, Bonarda, Syrah, Merlot, Tempranillo, Pinot Negro, Cabernet Franc y Tannat, entre las tintas; y Torrontés, Chardonnay, Sauvignon Blanc, Viognier, Pedro Giménez, Moscatel y Chenin, entre las blancas (INV, 2016).

En la tabla N° 1 se muestran los principales datos de la producción vitivinícola durante la temporada 2016. (INV 2016).

Tabla 1: Datos de la producción vitivinícola argentina. Fuente: Instituto Nacional de Vitivinicultura (INV).

Superficie cultivada (2015)	224.707 ha
Cantidad de Bodegas Elaboradoras	864
Cosecha de uvas (2016)	1.703 mil. K
Elaboración de vinos (al 15/05/16)	875 mil. l
Consumo Interno (noviembre 2016)	795.637 hl
Exportaciones de vino (noviembre2016)	182.836 hl
Exportaciones de mosto(noviembre2016)	7.463 t
Comercialización de vinos(noviembre2016)	978.472 hl

1.2. Microorganismos asociados a la uva y a la vinificación

La ecología microbiana de la uva es muy compleja, incluye levaduras, bacterias y hongos filamentosos, que tienen diversas características y efectos fisiológicos en la elaboración del vino (Barata y col., 2012). Algunas especies se encuentran solamente en las uvas como son los hongos parásitos o ciertas bacterias ambientales, mientras que otras tienen la capacidad de sobrevivir y crecer en el vino, constituyendo el ecosistema microbiano del mismo. Este ecosistema comprende levaduras, bacterias lácticas y bacterias acéticas. La proporción de estos microorganismos en la uva depende de la etapa de maduración en que se encuentre el fruto y de la disponibilidad de nutrientes. Por otro lado, la microbiota de las bayas se ve afectada, fundamentalmente, por el estado sanitario de las mismas, de tal modo que en uvas dañadas se encuentran mayor número de microorganismos y mayor diversidad de especies (Garijo Jimenez, 2013).

La transformación del mosto de uva en vino es desde el punto de vista microbiológico un proceso complejo que involucra interacciones entre diferentes tipos de microorganismos como son las levaduras, hongos filamentosos y bacterias (Sangorrín y col., 2004). Entre otros organismos las levaduras desempeñan un papel central. Se trata de hongos superiores unicelulares que se multiplican formando yemas. De acuerdo con su desarrollo sexual, es decir con el modo de formación de esporas, pueden clasificarse en Ascomycetes y Basidiomycetes. Las levaduras encontradas en la uva y el vino pertenecen principalmente al grupo de los Ascomycetes (Ribéreau-Gayon y col., 2000).

Tradicionalmente la producción del vino se ha llevado mediante fermentación espontánea, es decir que se produce por la acción de cepas de levaduras procedentes de la superficie de las uvas y del ambiente de las bodegas (prensas, tanques, fermentadores, bombas, etc.). Se ha demostrado también que viven en asociación con la vid, hallándose usualmente sobre la corteza, las hojas, las flores, y en la pruina de la baya. Las levaduras alcanzan las uvas por el efecto de la diseminación del viento y de los insectos y están presentes en las viñas desde el inicio de la maduración del fruto (Escalante-Minakata e Ibarra-Junquera, 2007). Las especies predominantes (en un 50-75 %) en la superficie de la uva corresponden a los géneros *Kloeckera* y *Hanseniaspora*. En menor proporción es posible encontrar otras especies de levadura estrictamente oxidativas o débilmente fermentativas y poco tolerantes a etanol, pertenecientes a *Metschnikowia*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Pichia*, *Kluyveromyces* y *Hansenula* (Fleet y Heard, 1993; Ribéreau-Gayon y col., 2000). Las especies fermentativas de *Saccharomyces* se han aislado en muy baja población sobre uvas sanas y han sido extrañamente aisladas de granos de uva intactos y de suelos de viñedos (Berradre y col., 2012). Antes de la maduración, las uvas poseen una muy baja población de *S. cerevisiae* (~ 0,05%), mientras que el 25% de las uvas maduras albergan tales levaduras. Por lo que esto sugiere que *S. cerevisiae* no se encuentra en el aire, y que requiere un vector para moverse, probablemente animales, insectos como abejas y avispas (Stefanini y col., 2012). A su vez se ha comprobado que estas especies fermentativas están asociadas con el área de la bodega y que son incorporadas dentro del mosto durante el tratamiento mecánico de la uva y el proceso de fermentación (Berradre y col., 2012).

Las levaduras encontradas en el mosto durante las primeras horas de llenado de los tanques corresponden a los mismos géneros identificados en la uva, con un predominio de *Hanseniaspora* y *Kloeckera*. En estas condiciones de vinificación espontánea, levaduras del género *Saccharomyces*, y principalmente de la especie *S. cerevisiae* empiezan a desarrollarse tras una veintena de horas, coexistiendo con las otras levaduras de la uva. Después de tres o cuatro días de fermentación predominan y son las últimas responsables de la fermentación alcohólica (Ribéreau-Gayon y col., 2000). Este cambio poblacional está relacionado fundamentalmente con la presencia creciente de etanol, así como con las condiciones de anaerobiosis, el sulfitado durante la vendimia y en el mosto, la cantidad de azúcar y la mayor tolerancia a temperaturas más altas que presenta *S. cerevisiae* frente a otras levaduras (Fleet y Heard, 1993). La mayor o menor persistencia de las levaduras salvajes depende también de la temperatura a la que se lleve a cabo la fermentación, de la disponibilidad de nutrientes, y de la calidad e identidad de los organismos presentes inicialmente (Pretorius, 2000).

En la actualidad la estrategia habitual para llevar a cabo la producción del vino incluye la inoculación en el mosto de levaduras seleccionadas en forma de levadura seca activa, práctica que empezó a desarrollarse en los años setenta. Este método de inoculación permitiría una disminución en la fase de latencia, asegurar una rápida y completa fermentación en el mosto y conducir a un grado importante de reproducibilidad en el producto final año tras año (Fleet y Heard, 1993; Pretorius, 2000). La levadura utilizada como inóculo ha de ser cuidadosamente seleccionada. Degré (1993) sugirió que estas levaduras deberían conducir fermentaciones vigorosas con cortas fases de latencia y sin dejar azúcares residuales (o dejando cantidades muy pequeñas), tener características fermentativas reproducibles, ser tolerantes a presiones

elevadas, etanol y temperaturas no óptimas y producir glicerol y β -glucosidasa en cantidades adecuadas para conseguir un buen aroma. También se han planteado otros aspectos de interés entre los que podemos destacar: capacidad de fermentar a temperaturas bajas, producir baja formación de espuma, poseer factor *killer*, ser cepas floculantes o ser fácilmente separables del medio (Degré, 1993; Zaworski y Heimsch 1987), presentar determinados niveles de ciertas actividades enzimáticas (Darriet y col., 1988) y mostrar resistencia a las condiciones adversas de crecimiento (condiciones de estrés) que tienen lugar durante la producción de vino (Zuzuarregui y col., 2004).

1.2.1. Deterioro microbiano

El proceso de elaboración de vino incluye múltiples etapas en donde puede ocurrir deterioro microbiano, alterando la calidad y las características organolépticas del vino haciéndolo inaceptable. Los principales organismos causantes de deterioro incluyen especies de levaduras de los géneros *Dekkera*, *Candida*, *Hanseniaspora*, *Pichia*, *Zygosaccharomyces*, etc., bacterias ácido lácticas de los géneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, etc. y bacterias ácido acéticas del género *Acetobacter* y *Gluconobacter*. En general los defectos incluyen amargor y sabores no deseados (fenólico, vinagre, manteca), y problemas “cosméticos” como turbidez, viscosidad, sedimento y formación de film. Algunos de estos organismos alteradores también pueden afectar la inocuidad del vino produciendo compuestos alergénicos o con potencial carcinogénico como las aminas biógenas y precursores de etilcarbamato. El uso de preservativos químicos, como dióxido de azufre (SO₂) durante el proceso de elaboración de vino, disminuye el riesgo de deterioro microbiano pero las cepas varían considerablemente en su sensibilidad al SO₂. A pesar de eso, actualmente hay una tendencia a disminuir el uso de preservativos químicos debido a los efectos adversos que pueden provocar en personas sensibles.

En particular, se pueden considerar como microorganismos alteradores del vino a aquellos encontrados en el lugar y en el momento inadecuado, incluyendo microbios deseables normalmente y que contribuyen a la calidad del producto final (Los Andes, 2009). El proceso de elaboración de vino es un nicho ecológico complejo donde la bioquímica y la interacción de levaduras, bacterias y hongos juegan un rol fundamental en el producto final.

1.2.1.1. Origen de los microorganismos alteradores del vino

Hay tres instancias en donde los microorganismos pueden ingresar al proceso de elaboración de vino y afectar la calidad del producto final. La primera instancia involucra la materia prima. Las uvas están en contacto directo con el equipamiento de bodega (prensas, tanques, tuberías, bombas, unidades de filtración, etc.) y cuando el equipamiento no está adecuadamente sanitizado puede servir como inóculo del mosto de uva. Las uvas entregadas a la bodega no siempre están en buen estado sanitario, y esto puede afectar la biodiversidad natural de microorganismos presentes en el mosto. La microbiota natural es afectada indirectamente por condiciones externas como variedad de uva, estado de uva en la cosecha, sanidad de la uva, temperatura, lluvia, suelo, uso de insecticidas y fungicidas, y otras prácticas viticulturales (Fleet y Heard, 1993; Pretorius y col., 1999).

La segunda instancia de deterioro puede ocurrir durante la fermentación. En el momento de iniciar esta etapa el mosto contiene la microbiota natural de la uva junto con la albergada en la bodega y su equipamiento. La composición del mosto (azúcar, acidez y bajo pH) y la adición de SO₂ al mismo ejercen presión selectiva en el desarrollo de levaduras y bacterias durante la fermentación alcohólica.

El tercer momento en el cual el producto puede ser susceptible a deterioro es después de la fermentación. El mismo puede ocurrir en la botella o durante la conservación en barricas de roble. Durante esta etapa los factores críticos son buena sanitización de la bodega, exclusión de oxígeno y correcta dosificación de agentes antimicrobianos para asegurar un producto estable que pueda resistir al ataque de levaduras y bacterias alteradoras (Sponholz, 1993).

1.2.2. Principales géneros de levaduras involucrados en el deterioro del vino

Levaduras apiculadas

Las levaduras apiculadas, es decir con forma de limón, incluyen especies del genero *Kloeckera/Hanseniaspora*. Están presentes generalmente en la superficie de la uva y en el mosto después de la molienda de uva (Fleet y col., 2002). Estas especies son fácilmente controladas con manejo adecuado durante la elaboración de vino (baja temperatura, dióxido de azufre, higiene) y son inhibidas durante la fermentación. La producción de cantidades indeseables de metabolitos como etil acetato (provocando olor a vinagre) puede ocurrir por el desarrollo de este tipo de levaduras en mostos blancos con largos periodos o con largo tiempo de contacto con la piel y en largas maceraciones prefermentativas durante la elaboración de vino tinto. Esta actividad deteriorante se debe a su rápido crecimiento, pero no es habitualmente una gran preocupación para los enólogos porque se pueden implementar medidas preventivas.

Levaduras formadoras de film

La denominación "levaduras formadoras de film" incluye un grupo de especies capaz de crecer en la superficie del vino, desarrollando películas. Especies del genero *Candida* y *Pichia* son conocidas como típicas levaduras formadoras de film, además algunas cepas de *S. cerevisiae*, *D. bruxellensis* o *Z. bailii* que también pueden ser recuperadas de películas de vino (Farris y col., 2002; Ibeas y col., 1996). En el caso de *S. cerevisiae* la producción de películas es siempre una característica deseable para la producción de vino jerez (Suárez e Iñigo 2004). La habilidad para formar films por *Pichia* y *Candida* es probablemente explicada por su naturaleza aerobia y su rápido crecimiento. En vinos a granel, estas levaduras, pueden cubrir rápidamente la superficie del vino cuando el aire no ha sido removido de la parte superior de los recipientes de almacenamiento, y producir acetaldehído, que imparte aroma oxidado. Aunque esto no es frecuente, puede afectar a vinos tintos jóvenes antes de la fermentación maloláctica cuando los niveles de sulfito son bajos y los tanques no están llenos. A pesar de que cepas de *Candida spp.* o *Pichia spp.* pueden ser tolerantes a conservantes, su control en vinos se logra principalmente a través de su poca tolerancia a tensiones de oxígeno bajo, que mejora el efecto inhibitorio de alcohol o conservantes a ser usados. En vinos embotellados, estas levaduras pueden causar sedimentos si la carga de contaminación inicial es alta, por lo tanto, estas especies son consideradas como indicadores de malas prácticas de manufactura (Loureiro y

Malfeito-Ferreira 2003). También pueden producir una película o un anillo de células adherentes al vidrio durante el embotellamiento si el cierre no previene la difusión de oxígeno, el nivel de anhídrido sulfuroso libre es muy bajo y el nivel de contaminación inicial es alto.

Levaduras fermentativas

S. cerevisiae y *S. bayanus* son agentes deseables de la fermentación vínica. Sin embargo, también pueden ser responsables del deterioro de vino. Durante la fermentación un desbalance nutricional en el mosto puede conducir a que se produzcan sabores desagradables impartidos por compuestos reducidos de azufre (Bell y Henschke 2005). Sistemas modernos de elaboración de vino, con mosto bombeado en condiciones anaeróbicas, tiende a incrementar el problema, en contraste con viejos sistemas donde la aireación del mosto estaba presente. Si no es tratado a tiempo, estos problemas pueden persistir durante el almacenamiento y en vinos embotellados.

Por otro lado, estas especies presentes en vinos con restos de azúcar pueden producir refermentaciones en las botellas produciendo rechazos de los lotes ya embotellados.

Otro problema que puede relacionarse a estas especies es perturbación del normal desarrollo de la fermentación que conduce a paradas de fermentación (Bisson y Butzke 2000). Este fenómeno es multicausal y en general es resultado de condiciones del medio ambiente (por ejemplo, temperatura, falta de nutrientes en el mosto) y cambios en el metabolismo de levaduras.

Dekkera/Brettanomyces

El papel desempeñado por la especie *D. bruxellensis* en el deterioro del vino tinto debido a la producción de aromas desagradables descritos como “sudor de caballo”, “establo”, “farmacéutico”, etc. (debido a la producción de etilfenoles) en barricas o vinos embotellados ha sido ampliamente descrito (Loureiro y Malfeito-Ferreira 2003). Estos efectos son particularmente notorios en vinos tintos de alta calidad añejados en costosas barricas de roble, lo cual ha aumentado el impacto de las pérdidas económicas provocadas por levaduras deteriorantes en la industria del vino. Actualmente, esta especie es considerada como la principal amenaza a la calidad del vino provocada por levaduras. El efecto no es solamente directo, debido a la producción de fenoles volátiles, sino también indirecto debido a las medidas tecnológicas necesarias para controlar su actividad que pueden reducir los atributos del vino.

Dekkera ha sido conocida mucho tiempo como un contaminante indeseable, debido a la producción de ácido acético. El amplio uso de barricas de roble para vinos tintos añejados, ha puesto en evidencia su habilidad de producir etilfenoles y ha contribuido significativamente a esta notoriedad.

Dekkera es una levadura que resulta difícil de aislar en vinos contaminados simultáneamente con otras levaduras debido a su baja tasa de crecimiento. El uso de medios selectivos y largos periodos de incubación es esencial para su recuperación. *Dekkera* ha sido aislada solo raramente de uvas y del medio ambiente de bodegas (Connel y col., 2002), siendo dominante en vinos tintos embotellados, como productora de etilfenoles, o en vinos

espumantes. En términos relativos, a pesar de que es muy tolerante al etanol, resulta menos tolerante al etanol o preservativos químicos como *S. cerevisiae* o *Z. baillii* pero tiene la habilidad de permanecer con vida por largos periodos y de proliferar cuando las condiciones se vuelven menos restrictivas (Renouf y col., 2007). La detección ocasional de esta levadura en vinos espumantes puede estar relacionada a su resistencia al dióxido de carbono.

1.2.3. Deterioro provocado por bacterias del ácido acético

Las bacterias del ácido acético (BAA) pertenecen a la familia *Acetobacteriaceae* y son comúnmente conocidas como bacterias del vinagre. Las BAA son Gram negativas o Gram variables, de forma elipsoidal o cilíndrica, pueden encontrarse solas, en parejas o formando cadenas. Son aerobias, presentando exclusivamente un metabolismo respiratorio utilizando el oxígeno como aceptor final de electrones. Son catalasa positiva y oxidasa negativa. Son móviles por la presencia de flagelos. Su temperatura óptima de crecimiento está entre 25- 30°C y su pH óptimo entre 5-6, aunque crecen bien en pH inferiores a 4. Estas bacterias se encuentran naturalmente sobre sustratos azucarados y/o con presencia de alcohol tales como zumos de frutas, vino, sidra, cerveza y vinagre. Sobre estos sustratos llevan a cabo una oxidación incompleta de los azúcares y los alcoholes, produciendo una acumulación de ácidos orgánicos como productos finales. Cuando el sustrato es etanol, se produce ácido acético; de ahí deriva el nombre corriente con el que se conocen estas bacterias (Guillamón y col., 2005).

Se diferencian dos géneros de BAA de importancia para la industria del vino: *Acetobacter* y *Gluconobacter*. Los resultados obtenidos con técnicas taxonómicas modernas confirman que estos géneros están muy relacionados y pertenecen a una misma familia (Drysdale y Fleet, 1988; Swings, 1992). Ambos géneros se asemejan por el hecho de que pueden oxidar etanol en ácido acético (proceso llamado acetificación), y se diferencian en que *Acetobacter* spp. puede sobre-oxidar ácido acético y ácido láctico en CO₂ y H₂O a través de la vía del Ciclo del Ácido Tricarboxílico.

El aislamiento de BAA en uvas, bodegas, vinos y barricas de roble está bien estudiado. *Gluconobacter* tiene preferencia por medios ricos en azúcar donde el alcohol está presente en bajas concentraciones. Esto explica por qué *Gluconobacter* es normalmente aislada de uvas y mosto y desaparece cuando comienza la fermentación alcohólica. *Acetobacter* spp. es más tolerante al etanol, puede sobrevivir durante la fermentación alcohólica y ejercer influencia en el producto final si no se tomaron precauciones.

Productos del deterioro por BAA:

Acidez volátil

El ácido acético es el mayor componente presente en el vino asociado con acidez volátil, también puede modificar la percepción de otros constituyentes importantes del vino. Por ejemplo, intensificando la percepción de taninos y ácidos fijos. Los ésteres de acetato, especialmente etil acetato, son los mayores contribuyentes a este defecto en vino. El acetato de etilo es percibido como “esmalte de uñas”.

Dihidroxiacetona

El glicerol producido por levaduras y hongos sirve como fuente de carbono para *A. aceti* y *G. oxydans*. Estas dos especies pueden convertir glicerol en dihidroxiacetona bajo condiciones aerobias, compuesto que puede afectar la calidad sensorial del vino. La dihidroxiacetona también puede actuar con prolina y producir aroma a corteza. Además puede afectar la actividad antimicrobiana en el vino ya que tiene la capacidad de ligarse a SO₂ (Eschenbruch y Dittrich, 1996).

Acetaldehído

Los vinos que contienen altas cantidades de BAA, pueden contener cantidades importantes de acetaldehído, un metabolito intermediario en la producción de ácido acético bajo pequeñas concentraciones de oxígeno. Los descriptores de este defecto en vino van de nuez a jerez, que recuerda a manzana madura. El acetaldehído se liga al SO₂ y puede afectar su actividad antimicrobiana en vino. Este compuesto combinado puede enmascarar el olor a acetaldehído (Fugelsang y Edwards, 2007).

Acetoína

Algunas cepas de *Acetobacter* y *Gluconobacter* pueden oxidar ácido láctico a acetoína bajo condiciones de poco oxígeno. La acetoína tiene un aroma y sabor característico descrito como “mantequilla”. Sumado a que afecta la calidad sensorial, el aumento de acetoína en vino por BAA puede ligar el SO₂ libre y eliminar su actividad antimicrobiana.

1.2.4. Deterioro provocado por bacterias del ácido láctico

Las bacterias del ácido láctico (BAL) tienen un rol principal conduciendo la fermentación maloláctica, la fermentación secundaria durante la producción del vino. Pero también pueden ser perjudiciales para la calidad del vino como microorganismos deteriorantes si la proliferación de ciertas BAL ocurre en un momento inadecuado durante el proceso de elaboración de vino.

Las BAL son un grupo heterogéneo, que presenta características comunes como: son Gram positivas, catalasa negativa, no esporuladas, microaerófilas o anaerobias facultativas y fermentadoras de azúcares en condiciones diversas, respondiendo a dos tipos de morfología: cocos y bacilos. Producen principalmente ácido láctico como producto final de la fermentación de carbohidratos (Suárez e Iñigo, 2004). En el vino las BAL que se pueden encontrar son de dos familias: *Lactobacillaceae* con los géneros *Lactobacillus* (con numerosas especies) y *Pediococcus*, y la familia *Leuconostocaceae* con los géneros *Leuconostoc*, *Oenococcus* y *Weissella* (Du Toit y col., 2011).

En el vino se desarrollan un número limitado de especies debido principalmente al bajo pH, los escasos elementos nutritivos y el contenido de etanol. Es así como bacterias lácticas pertenecientes a los géneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Oenococcus* son las encontradas en los vinos (Ilabaca et al, 2014).

La principal especie que realiza la FML es *Oenococcus oeni*, ya que puede soportar bajos pH (< 3,5), altas concentraciones de etanol (>10%) y altos niveles de SO₂ que se pueden encontrar en el vino (Costantini y col., 2009). La población de BAL durante una vinificación varía durante todo el proceso. Es así, como acabada la FA, la población de BAL alcanza sólo entre 10¹ a 10³ UFC/ml. Para tener un buen desarrollo de la FML es necesario activar el crecimiento y la multiplicación de las BAL para lograr una población mínima de 10⁶ UFC/ml (Suarez e Iñigo, 2004). La FML puede ocurrir de forma espontánea, sin saber a ciencia cierta cuál será el resultado final de este proceso, o bien ser inducida por la inoculación de cultivos iniciadores de bacterias comerciales, que cumplan con los requerimientos de la producción de un vino.

Si bien la FML es un proceso importante que se debe desarrollar durante la elaboración de los vinos, el desarrollo de esta fermentación debe ser controlado, ya que al ser realizado por microorganismos, como son las BAL, el resultado puede ser completamente adverso, ya que si bien la principal transformación que se realiza en esta fermentación es la transformación del ácido málico a láctico, existen otras actividades enzimáticas durante la FML, que dan lugar, en la mayoría de los casos, a alteraciones o enfermedades, que incluso pueden disminuir la calidad del vino (Carrascosa y col., 2005).

Productos del deterioro por BAL:

Formación de Ácidos

Las BAL pueden aumentar el contenido ácido en el vino produciendo ácido láctico y ácido acético. El ácido D-láctico está asociado con deterioro, y el ácido L-láctico es producido durante la fermentación maloláctica (Fugelsang y Edwards 2007).

Esta alteración denominada “Picadura láctica” ocurre generalmente en determinadas condiciones que favorecen un crecimiento bacteriano, como son las interrupciones o paradas de la FA, o las FA incompletas. Si el desarrollo de las BAL se produce antes de que todo el azúcar del mosto haya sido transformado en etanol, utilizan las hexosas produciendo etanol y CO₂ al igual que las levaduras, en ácido acético. Debido a la formación de ácido acético y un exceso de ácido láctico en el medio, la acidez volátil aumenta considerablemente (Lonvaud-Funel, 1999).

Huang y col. (1996) demostraron que las BAL pueden afectar la tasa de levaduras que conducen la fermentación alcohólica.

Refermentación

Es conocida como fermentación maloláctica fuera de lugar, y puede ocurrir en vino embotellado con pH mayor a 3,5 en presencia de BAL y nutrientes (ácido málico o azúcar residual).

Manitol

El manitol es producido por lactobacilos heterofermentativos además de propanol, butanol y ácido acético a partir de la fructosa. Los vinos atacados presentan aspecto turbio. Cuando la

alteración ha evolucionado, se percibe un gusto a fruta pasada y algo a vinagre. La sensación en conjunto es agrídulce, marcada por el ácido acético y el manitol.

Viscosidad

Los vinos con un aumento en viscosidad y una apariencia babosa son llamados viscosos. La viscosidad es atribuida a la producción de un polisacárido extra-celular, D-glucano, y los géneros *Leuconostoc* y *Pediococcus* han sido implicados en su producción (Lonvaud-Funel, 1999; Fugelsang y Edwards, 2007). La viscosidad solo ocurre durante la fermentación alcohólica o después de embotellado cuando el etanol está presente.

Aminas biógenas

Las BAL están involucradas también en la producción de aminas biógenas y etil carbamato, compuestos que no deterioran el vino con malos sabores o problemas organolépticos, pero implican potenciales problemas de salud para el consumidor, afectando la calidad higiénica del vino. Las aminas son producidas por aminoácido descarboxilasas desde su respectivo precursor aminoácido. La histamina es la amina biógena mejor estudiada y puede provocar dolores de cabeza, hipotensión y problemas digestivos. El carbamato de etilo es una sustancia considerada por la Organización Mundial de la Salud como agente carcinógeno y genotóxico.

1.3. Uso de anhídrido sulfuroso en la elaboración de vinos

La adición de anhídrido sulfuroso durante la elaboración de vinos parece hoy en día indispensable debido a sus propiedades. Tradicionalmente el sulfuroso se ha utilizado para proteger el vino mediante el control de microorganismos no deseados y para evitar oxidaciones. Hay una creciente preocupación por parte de la sociedad por el consumo de alimentos que contienen "sulfitos", entre ellos el vino, debido a los efectos alérgicos que puedan darse en personas sensibles. Esta preocupación se ha traducido en nuevas normativas que restringen su uso y que van encaminadas hacia su disminución e incluso su prohibición. En nuestro país el INV establece un límite de SO₂ total de 130 mg/l para vino tinto seco, 180 mg/l en vino blanco y rosado seco, 180 mg/l en vino tinto abocado dulce y 210 mg/l en vino blanco y rosado abocado dulce, todos valores para libre circulación con una tolerancia de 35 mg/l en más o en menos (Resolución INV N° C-143/94) (INV, 2016).

No es fácil calcular las cantidades precisas de adición de sulfuroso debido al complejo equilibrio químico de esta molécula en el vino. A pesar de que normalmente se expresa como SO₂, existen diferentes formas del mismo en el vino. Se encuentra en formas libres y combinadas, siendo una de las formas libres, la forma molecular "SO₂" (dióxido de azufre), la que posee las propiedades antioxidantes y antisépticas. La forma combinada está compuesta por el sulfuroso unido a otros compuestos que se encuentran en el vino como los polifenoles, aldehídos y cetonas. El "sulfuroso libre" sumado al "sulfuroso combinado" es lo que se conoce como "sulfuroso total" (Guerrero Hidalgo y col., 2015).

La concentración de las distintas formas en las que el sulfuroso puede encontrarse en el vino depende del pH del vino y en menor medida de la temperatura. En el rango de pH de los

vinos (3-4), el sulfuroso se encuentra en un gran porcentaje como la forma bisulfito y en bajo porcentaje como la forma sulfito. Ninguna de estas dos formas tiene la capacidad protectora del sulfuroso. La forma molecular SO_2 , que es la forma que posee las propiedades antioxidantes y antisépticas, también se encuentra en bajas concentraciones. Cuanto menor sea el pH del vino, mayor será la concentración de la forma activa SO_2 . Es por esta razón que se aconseja añadir el metabisulfito potásico después de acidificación del mosto o vino. Así el pH del vino será más bajo y favorecerá la aparición de un mayor porcentaje de la forma activa (Guerrero Hidalgo y col., 2015).

1.3.1. Propiedades del anhídrido sulfuroso en los vinos

Protege contra la oxidación

Muchos constituyentes del vino son susceptibles de ser oxidados durante el proceso de vinificación y pueden dar lugar a un detrimento de su calidad sensorial y nutricional. Estos procesos de oxidación pueden producirse en la uva, el mosto y/o el vino durante su elaboración. La acción antioxidante del sulfuroso se debe a tres mecanismos: Eliminación de oxígeno disuelto; reacción con peróxido de hidrógeno presente en pequeñas cantidades; y reducción de las quinonas convirtiéndolas en su forma fenólica. Además de los mecanismos químicos anteriores, el sulfuroso es capaz de inhibir a enzimas como la polifenol oxidasa, principalmente responsable del pardeamiento de uva, así como de la enzima peroxidasa. También inhibe las reacciones de Maillard que pueden dar lugar a cambios en aroma y color del vino (Guerrero Hidalgo y col., 2015).

Evita contaminaciones microbianas

Dependiendo de su concentración el sulfuroso inhibe el desarrollo de microorganismos tales como levaduras, bacterias lácticas y, en menor medida, las bacterias acéticas. Su acción evita la formación de turbidez debida a levaduras, las fermentaciones secundarias indeseables y el crecimiento de *Brettanomyces*. La actividad antimicrobiana del sulfuroso disminuye a medida que el pH del vino aumenta, lo que hace más difícil estabilizar microbiológicamente vinos con baja acidez.

El sulfuroso es el aditivo más frecuente para controlar el crecimiento de bacterias lácticas y evitar la fermentación maloláctica en vinos blancos (Guerrero Hidalgo y col., 2015).

Poder disgregante

Esta propiedad es debida a la capacidad del SO_2 para romper las paredes celulares de la piel de la uva, disgregándola y facilitando así la extracción de sus componentes al mosto o vino. El aumento de la eficacia de maceración en presencia de sulfuroso para la extracción de pigmentos de uva es indiscutible, y es utilizado para la preparación industrial de colorantes comerciales.

Sin embargo, dado que sólo el SO_2 libre es activo, y que esta forma desaparece rápidamente en las uvas molidas, este efecto de disgregación parece ser ejercido sólo durante un breve momento. Al final de la fermentación, los efectos del tiempo de maceración, de la

temperatura y de los remontados son más significativos sobre la extracción que el efecto del propio sulfuroso. El efecto de disgregación mediante el sulfitado con respecto a los compuestos fenólicos, es importante en el caso de maceraciones limitadas (Guerrero Hidalgo y col., 2015).

1.3.2. Efectos del sulfuroso sobre las características sensoriales de los vinos

El sulfuroso se utiliza normalmente en enología, pero puede causar algunos efectos no deseados en el vino como la formación de aromas indeseables como por ejemplo, el sulfuro de hidrógeno.

El uso excesivo de sulfuroso puede producir sabores y aromas desagradables e incluso turbidez durante su almacenamiento. A dosis altas, se neutralizan los aromas, y en cantidades excesivas produce un defecto característico en el aroma de los vinos. Se produce un olor a "lana húmeda" que se convierte rápidamente en sofocante e irritante y que además da lugar a una sensación de ardor-amargor en el retrogusto.

En la elaboración del vino tinto, el sulfitado favorece la disolución de minerales, ácidos orgánicos y compuestos fenólicos (sobre todo antocianos y taninos) que constituyen las sustancias responsables del color de los vinos tintos. Sin embargo, cuando las vinificaciones se llevan a cabo en uvas sanas, no se produce una mejora significativa del color.

El sulfitado, a menudo mejora el aroma del vino en el caso de uvas con estado sanitario deficiente o variedades neutras. También protege ciertos aromas de los vinos jóvenes. Por el contrario, en ciertas vinificaciones, tales como las fermentaciones sin presencia de oxígeno o el envejecimiento especialmente prolongado sobre lías, pueden conducir a la formación de sulfuro de hidrógeno y mercaptanos, que producen aromas a huevos podridos y putrefacto.

El sulfuroso también es importante para minimizar la velocidad de polimerización de los compuestos polifenólicos y, por tanto, de la pérdida de color durante el envejecimiento del vino. El sulfuroso reacciona con ciertos componentes del vino, evitando la reacción de los compuestos polifenólicos con ellos, ralentizando los procesos de polimerización, y por tanto la pérdida de color.

Se ha publicado que la presencia de sulfuroso en el vino promueve el consumo de aminoácidos por parte de la levadura durante la fermentación alcohólica, dando aromas más complejos y mejor estabilidad (Guerrero Hidalgo y col., 2015).

1.3.3. Efectos del sulfuroso sobre la salud del consumidor

La utilización de sulfuroso como conservante alimentario se ha asociado con algunos riesgos para la salud. Se ha relacionado a los sulfitos resultantes de la adición de sulfuroso en el vino con reacciones alérgicas en algunos consumidores. Los individuos sensibles a los sulfitos reaccionan negativamente a su ingestión a partir de 10 mg de ingesta. Es por ello, que en el caso de vinos con concentraciones de sulfuroso mayores a ésta, se debe indicar la presencia de sulfitos en la etiqueta. Los individuos sensibles pueden experimentar una variedad de síntomas que incluyen dolores de cabeza, náuseas, dermatitis, urticaria, angioedema, dolor abdominal, diarrea, broncoconstricción y anafilaxia.

Los asmáticos que son dependientes de los esteroides o que tienen un mayor grado de hipersensibilidad de las vías respiratorias están en mayor riesgo de sufrir una reacción a los alimentos que contienen sulfitos. En este tipo de población, las reacciones de sensibilidad a los sulfitos pueden ser severas. Así, se ha visto la necesidad de reducir la cantidad de sulfuroso, ya que este compuesto no sólo se encuentra en el vino, sino que además se encuentra en muchos productos alimenticios como aditivo y la cantidad consumida es acumulativa en el organismo (Guerrero Hidalgo y col., 2015).

Se suele añadir a los mostos una concentración aproximada de 80 mg/L de sulfuroso para vinos blancos y 50 mg/L para vinos tintos. Más del 50% de la cantidad añadida inicialmente termina como formas combinadas, que no tienen actividades antisépticas ni antioxidantes. Pero por desgracia, todavía conserva sus contraindicaciones relacionadas con la salud (Guerrero Hidalgo y col., 2015).

1.4. Uso de ondas electromagnéticas de alta frecuencia en la industria vitivinícola

La existencia de ondas electromagnéticas, de las cuales las microondas forman parte del espectro de alta frecuencia, fueron predichas por Maxwell en 1864 a partir de sus famosas “Ecuaciones de Maxwell”. En 1888, Heinrich Rudolf Hertz fue el primero en demostrar la existencia de ondas electromagnéticas mediante la construcción de un aparato para generar y detectar ondas de radiofrecuencia (Pozar, 2012).

Se denomina microondas a las ondas electromagnéticas definidas en un rango de frecuencias determinado; generalmente entre 300 MHz y 300 GHz, que supone un período de oscilación de 3 ns (3×10^{-9} s) a 33 ps (33×10^{-12} s) y una longitud de onda en el rango de 1 m a 1 mm. El rango de las microondas está incluido en las bandas de radiofrecuencia, concretamente en las de UHF (ultra-high frequency - frecuencia ultra alta) 0,3–3 GHz, SHF (super-high frequency - frecuencia super alta) 3–30 GHz y EHF (extremely-high frequency, frecuencia extremadamente alta) 30–300 GHz (Pozar, 2012).

La microonda es una forma de energía electromagnética y no calorífica, la cual se caracteriza por ser una onda corta que viaja a la velocidad de la luz y tiene la propiedad de hacer vibrar las moléculas de los cuerpos que atraviesa, calentándolos. El proceso con microondas genera calor desde el interior del alimento al exterior a través de las vibraciones moleculares, en cambio con el calentamiento convencional, el calor se aplica desde el exterior hacia el interior, generando un aumento de temperatura en el alimento. Este incremento está determinado por la potencia del equipo, así como por las propiedades físicas y térmicas de la muestra. Un alimento que posea un bajo valor de conductividad térmica puede calentarse rápidamente utilizando microondas, lo cual no ocurre en los métodos tradicionales. Cuando el alimento es sometido a irradiación por microondas, el calor es producido dentro del alimento debido a la vibración de las moléculas de agua originada por la absorción de energía. Las moléculas actúan como barras magnéticas tratando de orientarse o polarizarse ellas mismas bajo la acción del campo electromagnético. Este movimiento entre las moléculas causa una fricción interna, la cual a su vez da lugar a unas condiciones hipertérmicas que afectan a las moléculas ionizables y polares (sales minerales y agua, principalmente) e interfieren en las membranas celulares disminuyendo su actividad fisiológica y supervivencia.

Una de las aplicaciones más conocidas de las microondas es el horno de microondas, que usa un magnetrón para producir ondas a una frecuencia de aproximadamente 2,45 GHz (Cano-Montiel, 2008).

La ubicuidad de los microorganismos en el medio ambiente, la resistencia de algunos de estos a temperaturas elevadas y a sustancias antisépticas hacen necesaria la búsqueda de algún método de esterilización rápido y eficiente en materiales utilizados en la elaboración de vino. Una alternativa para la sanitización de materiales de bodega es la utilización de microondas (Díaz y col., 2004).

La esterilización comprende la destrucción completa y total de todos los microorganismos cualquiera sea su forma o especie (Rodríguez, 2000). La capacidad de la radiación para inactivar microorganismos ha sido la principal razón del uso de la radiación en alimentos. La radiación ha demostrado ser un medio efectivo de destrucción tanto de bacterias patógenas como no patógenas; así como también de parásitos y en menor grado, de virus. La radiación, tanto ionizante como no ionizante, inactiva los microorganismos mediante el daño que realiza sobre el material genético. Este daño que evita la multiplicación celular, tiene lugar como resultado de una colisión directa entre la energía radiante y el material genético, o como resultado de la ionización radiante de una molécula adyacente que reacciona con el material genético. En la mayoría de las células, la molécula adyacente es agua (Grecz y col., 1983).

Diversos trabajos citan la reducción en el número de microorganismos al ser tratados con microondas, sirviendo como punto de referencia para comparar los efectos que puede tener el uso de microondas en mosto de uva. Investigaciones realizadas por Garófalo y colaboradores (2005) donde se estudió la incidencia de las microondas en mohos y levaduras de la mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth) con el fin de esterilizar y prolongar su conservación sin necesidad de frío arrojó un resultado favorable en la utilización de las microondas. Las moras expuestas a las microondas retardaron su maduración y la carga microbiana inicial se redujo considerablemente al pasar de $1,3 \cdot 10^4$ ufc/ml a una carga de $40 \cdot 10^1$ ufc/ml luego de 15 segundos de tratamiento. Velásquez y Sánchez, (2008) determinaron la eficiencia del sistema de procesado del microondas para inactivar la carga microbiana presente en el jugo de mango preparado a partir de fruta fresca. En este estudio, la población microbiana debida principalmente a *Aspergillus sp* disminuyó el 89% durante el tiempo de tratamiento. Tremonte, (2014), estudió el efecto de microondas en leche, donde el tratamiento a 900 watts durante 75 segundos fue efectivo, reduciendo la población microbiana y preservando la calidad nutricional. Song (2016), demostró la inactivación de *Salmonella senftenberg*, *Salmonella Typhimurium* y *Salmonella Tennessee* en mantequilla de maní con 915 MHz durante 5 minutos sin producir deterioro en la calidad. Clodoveo y colaboradores (2016) estudiaron los beneficios del microondas en la elaboración de vino, indicando que su aplicación puede aumentar los componentes de extracción durante la maceración de mosto, produciendo vinos de alta calidad con baja población de microorganismos deteriorantes, permitiendo la disminución en el uso de SO_2 y agregando valor en términos nutricionales o sensoriales al vino final.

1.4.1. Beneficios del uso de microondas en la industria vitivinícola

El conocimiento de la composición química de la uva y el vino, y particularmente de la composición fenólica y odorante, constituye una herramienta clave en el monitoreo y mejoramiento de la calidad de los productos, debido a su impacto directo sobre las características organolépticas y a sus propiedades funcionales. Actualmente, la tendencia del mercado del vino tinto se encuentra orientada hacia la elaboración de productos con un alto contenido polifenólico y complejidad aromática.

Los compuestos fenólicos constituyen unos de los principales metabolitos secundarios presentes en las uvas, y según su estructura química pueden ser divididos en dos grandes grupos: no-flavonoides (ácidos fenólicos y estilbenos) y flavonoides (antocianinas, flavanoles y flavonoles). En las bayas, se distribuyen principalmente en hollejos y semillas (no-flavonoides y flavonoides) y en menor proporción en la pulpa (no-flavonoides) (Monagas y col., 2005). Las antocianinas constituyen la familia de compuestos directamente responsables del color de las uvas y vinos tintos jóvenes, los flavanoles (monómeros, oligómeros y polímeros) contribuyen a la astringencia, amargor y estructura de los vinos (Gawel, 1998), en tanto, los flavonoles se relacionan con el amargor y junto con los flavanoles participan del color a través de reacciones de copigmentación y/o condensación (Monagas y col., 2005).

Por su parte, los compuestos odorantes volátiles son también factores muy importantes que afectan el *flavor* y la calidad de la uva, y contribuyen al carácter sensorial del vino. Estos compuestos presentes en el vino provienen de las distintas etapas del proceso vitivinícola.

La extracción de los compuestos fenólicos y odorantes de las partes sólidas de la baya y su transferencia al vino depende de las condiciones de contacto con el líquido, es decir la maceración. En general, las técnicas enológicas reportadas para mejorar la extracción de estos compuestos, como la aplicación de enzimas pectolíticas (Ayestarán y col., 2004), la maceración prefermentativa en frío, la termo vinificación., la flash expansión, y el pigeage o delestage (Sacchi y col., 2005), entre otras mencionadas involucran ciertos costos asociados con el manejo del mosto durante el tiempo de contacto, tales como la aplicación de anhídrido sulfuroso (SO₂) para inhibir levaduras nativas no-*Saccharomyces*, consumo de tiempo y personal de trabajo, consumo energético elevado, entre otros. Una alternativa puede ser la extracción asistida por microondas.

La maceración asistida por microondas como alternativa a la maceración tradicional, permitiría potenciar la extracción de compuestos volátiles y no volátiles a partir de uvas provenientes de viñedos de alto rendimiento cultivados en zonas cálidas (Sari S. comunicación personal). Adicionalmente, el empleo de esta técnica favorecería la inactivación de enzimas y la inhibición del desarrollo de la flora microbiana nativa, disminuyendo la utilización de antisépticos como un método efectivo en vendimias alteradas. Finalmente, el empleo de microondas en comparación con la termomaceración, ofrece la ventaja de disminución de costos de equipamiento, energía y menor uso de agua.

Resulta una característica importante de las propiedades físicas de las microondas y de sus interacciones la rapidez con que se produce el aumento de calor comparado con el calentamiento convencional. Las ventajas que el calentamiento en hornos microondas presenta respecto a otros más tradicionales son: limpieza, ahorro de energía, control preciso del proceso y los tiempos de iniciación y terminación son más cortos (Decareau, 1985).

El presente trabajo espera demostrar que el uso de las ondas electromagnéticas de alta frecuencia (microondas) es una alternativa a emplear en la industria vitivinícola para disminuir la población microbiana en mosto, lo cual directamente disminuye la cantidad necesaria de SO₂ a utilizar. Además esta tecnología es amigable con el medio ambiente, compatible con los procesos enológicos, rápida y fácil de emplear.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1. Hipótesis

- ✓ El uso de microondas disminuye la población microbiana en mostos de uva.
- ✓ La reducción de las poblaciones microbianas de mostos de uvas mediante tratamiento con microondas es dependiente del microorganismo que se trata.

2.2. Objetivos generales y particulares

Objetivo general

- ✓ Evaluar el efecto de microondas para la reducción de las poblaciones microbianas en mosto.

Objetivos particulares

- ✓ Conocer la relación entre el aumento de temperatura y el tiempo de exposición del mosto en microondas a una potencia determinada.
- ✓ Evaluar distintos tiempos de exposición a una potencia baja de microondas para la reducción de diferentes especies de levaduras.
- ✓ Evaluar distintos tiempos de exposición a una potencia baja de microondas para la reducción de bacterias lácticas y acéticas.
- ✓ Determinar el porcentaje de reducción de las diferentes poblaciones microbianas luego del tratamiento de mostos de uva con microondas.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

En este capítulo, se detallan los materiales y la metodología utilizados para realizar el estudio sobre el uso de microondas para reducir las poblaciones de microorganismos en mosto de uva. La formulación de medios de cultivo, soluciones y reactivos utilizados se detalla en el Anexo I.

3.1. Evaluación de la elevación de la temperatura en distintos tiempos de microondas

Con el objeto de conocer el aumento de temperatura durante la exposición a microondas, se realizó un ensayo por quintuplicado utilizando 100 ml de mosto de uva a 24°Brix el cual fue expuesto a una potencia de 100, 250, 400, 550 y 750 watts de microondas registrando los aumentos de temperatura en diferentes periodos de tiempo.

Sobre la base de los resultados anteriores se seleccionó para el ensayo la potencia de 250 watts y los tiempos 2, 3 y 4 minutos. Se consideraron como criterios importantes a lograr durante el tratamiento que la temperatura del mosto no supere los 70°C y que el aumento de la misma sea gradual con el objeto de reducir el impacto del tratamiento sobre las características sensoriales del vino.

3.2. Microorganismos del trabajo

Se utilizaron microorganismos depositados en la Colección de microorganismos asociados a uva y vino de la EEA Mendoza (INTA), la cual está asociada a la Red de recursos genéticos de INTA (Tabla 2).

Las especies que se evaluaron son: *Saccharomyces cerevisiae*, *Hanseniaspora uvarum*, *Pichia membranaefaciens*, *Zygosaccharomyces rouxii*, *Dekkera bruxellensis*, *Lactobacillus spp* y *Acetobacter spp*

Tabla 2: Identificación de los cultivos de la Colección de microorganismos en la EEA Mendoza INTA, utilizados en este estudio

Especie	Identificación de la cepa	Origen de aislamiento
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Mza	Mosto Malbec en fermentación
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	BHU9	Mosto Malbec
<i>Pichia membranaefaciens</i>	51	Uva con podredumbre ácida
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	MC9	Mosto concentrado alterado
<i>Dekkera bruxellensis</i>	CH29	Vino tinto con defecto fenólico
<i>Lactobacillus spp</i>	Spp Heterofermentativo	Vino con picadura láctica
<i>Acetobacter spp</i>	Spp	Vino comercial

3.3. Medios de cultivo e inoculación

Los distintos microorganismos se sembraron en medio de cultivo YPD (Yeast Peptone Dextrose) para levaduras y bacterias acéticas y en medio MRS (Man, Rogosa, Sharpe) para bacterias lácticas. Las levaduras y bacterias acéticas se incubaron en estufa a 28°C en

aerobiosis y las bacterias lácticas se incubaron a 28°C en anaerobiosis. Se detuvo la incubación cuando los microorganismos desarrollaron colonias visibles.

Luego del tiempo de incubación, se observaron las levaduras al microscopio óptico (objetivo 40x) para verificar la pureza de las mismas, y para bacterias acéticas y bacterias lácticas se realizó Tinción de Gram y posterior observación al microscopio óptico (objetivo 100x con aceite de inmersión).

Una vez verificada la pureza de todos los microorganismos se sembraron para tener un crecimiento confluyente en 3 placas de Petri con el medio de cultivo YPD (Yeast Peptone Dextrose) para levaduras y bacterias acéticas y con el medio MRS (Man, Rogosa, Sharpe) para bacterias lácticas. Las levaduras y bacterias acéticas se incubaron en estufa a 28°C durante 2-5 días en aerobiosis y las bacterias lácticas se incubaron a 28°C durante 7 días en anaerobiosis.

Para el ensayo se utilizó mosto de uva concentrado y fue diluido con agua hasta obtener 24°Brix, se agregó 1g/l de extracto de levadura, luego se ajustó el pH a 3.5 con HCl y se fraccionó en unidades experimentales de 100 ml que se esterilizaron en autoclave a 120°C 15 minutos.



Figura 2: Incubación en estufa con agitación

Los mostos se inocularon por triplicado y se incubaron en estufa con agitación a 200 rpm durante 2 h para aclimatación y activación de las células, luego se realizaron los tratamientos de microondas (Figura 2).

3.4. Diseño experimental

Se trabajó con un microondas convencional de uso doméstico, marca Philco (Figura 3), utilizando una potencia de 250 watts y se evaluaron los diferentes tiempos de exposición, monitoreando la temperatura en cada tratamiento para evitar un aumento de la misma por encima de 70°C. Cada tratamiento se aplicó para cada microorganismo de modo individual y fueron realizados por triplicado.



Figura 3: Microondas usado para el tratamiento

Finalizada la incubación de los mostos en estufa, se midió la temperatura inicial de cada uno y se recogió 1 ml en tubo eppendorf identificado como T_0 . Luego se repitió lo mismo para los tiempos de tratamiento, de 2, 3 y 4 minutos, recogiendo 1 ml en cada uno previa agitación del mismo. Los tubos eppendorf se identificaron como T_1 , T_2 y T_3 respectivamente.

A partir de cada muestra se realizaron diluciones seriadas colocando 100 μ l en tubos eppendorf de 1,5 ml con 900 μ l de agua peptonada 0,1% estéril. Cien microlitros de las muestras sin diluir y sus respectivas diluciones se sembraron en el medio de cultivo adecuado para cada grupo microbiano:

- Para levaduras: Medio WL (Oxoid) suplementado con cloranfenicol (50 μ g/ml)
- Para bacterias lácticas: Medio MRS (Oxoid) suplementado con 15% de jugo de tomate y 1 g/l de pimaricina.
- Para bacterias acéticas: Medio CARR (5 g/l de extracto de levadura, 2 g/l de agar, 22 mg/l verde bromocresol, 1 g/l pimaricina, 2 % etanol).

Las placas fueron incubadas a 28°C hasta desarrollo visible de colonias. Se procedió al recuento y al cálculo del porcentaje de la reducción de población en cada tratamiento aplicado. El resultado se expresó en ufc/ml (ufc: unidades formadoras de colonias).

Un esquema del procedimiento aplicado se demuestra en la figura 4.

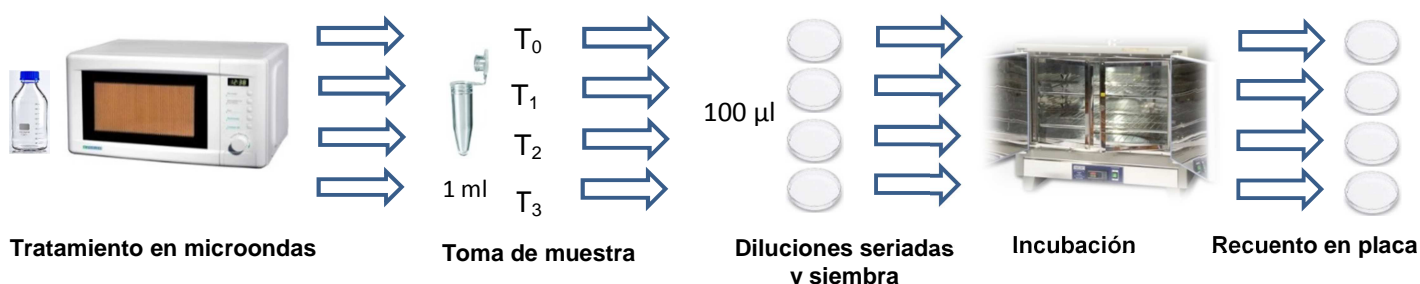


Figura 4: Esquema del diseño experimental

3.5. Análisis estadístico de resultados

Los datos obtenidos fueron procesados empleando el método de la diferencia significativa mínima de Fisher (LSD) para comparaciones múltiples y la prueba de Kruskal-Wallis por medio del programa estadístico Statgraphic Plus 5.1.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación se presentan los resultados obtenidos de los ensayos que evalúan el uso de microondas en mosto de uva para disminuir la carga microbiana en mosto de uva.

4.1. Efecto de la temperatura vs dosis de microondas y tiempo de tratamiento

La figura 5 muestra las curvas de la temperatura alcanzada respecto del tiempo de tratamiento para cada dosis de microondas evaluada. Se observó una relación lineal entre la temperatura de mosto y el tiempo de exposición en cada una de las distintas potencias de microondas aplicada. Se observó que el mosto alcanzó una temperatura de 70°C en 60 segundos para la potencia de 750 watts, en 70 segundos para la potencia 550 watts y en 120 segundos para la potencia 400 watts. Dichas potencias fueron descartadas para el ensayo ya que, prácticas enológicas, como la maceración, recomiendan no superar temperaturas de 60°C (Ribéreau-Gayon y col., 2006).

Las dos potencias menores evaluadas (250W y 100W) produjeron leves y graduales aumentos de temperatura en los tiempos evaluados (Figura 5). El aumento de temperatura verificado para 100 watts fue muy lento llegando a 58°C en 420 segundos, el último tiempo evaluado. Este periodo de tiempo podría representar una extensión innecesaria del tiempo de tratamiento. Mientras que la potencia de 250W produjo una curva de aumento de temperatura en los rangos de tiempos deseados, alcanzando los 65 °C en 300 segundos (5 minutos) (Figura 5).

Samani y colaboradores (2015) estudiaron el efecto de la potencia de microondas, la temperatura y el tiempo de exposición sobre *S. cerevisiae* en jugo de naranja. La temperatura final del jugo de naranja derivada de la potencia de microondas fue considerada como contribuyente a la reducción de *S. cerevisiae*, es decir que el aumento de la temperatura contribuye a la reducción en la población de *S. cerevisiae*. Sin embargo, el aumento de la potencia de microondas se caracterizó por una ligera pendiente de reducción de la población comparada con la temperatura. En temperaturas más bajas, el aumento de la potencia de microondas no afectó la tendencia de reducción de *S. cerevisiae*, pero el aumento de la temperatura a 50 °C dio como resultado una mayor reducción de *S. cerevisiae*.

Considerando los resultados anteriores se eligió trabajar con 250 watts ya que produce un aumento gradual de la temperatura en tiempos accesibles para los tratamientos.

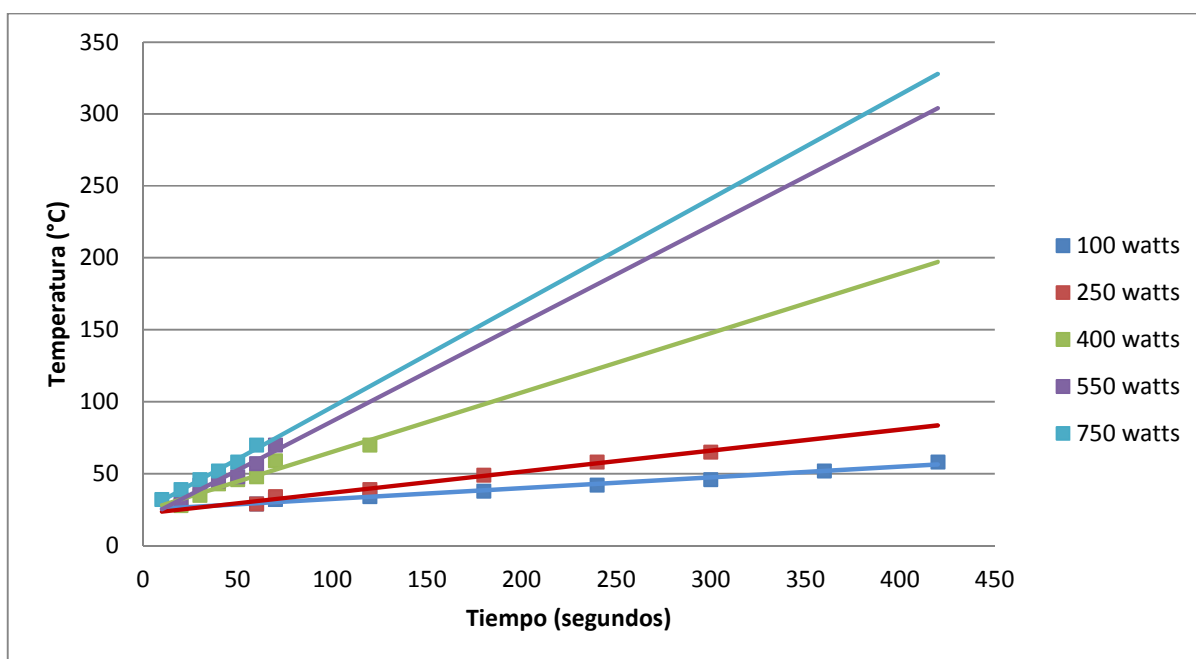


Figura 5: Temperatura vs dosis de microondas y tiempo de tratamiento

4.2. Evaluación de la relación temperatura y tiempo de tratamiento a una potencia de microondas de 250 watts

La potencia se encuentra relacionada con la velocidad de calentamiento, de tal forma que cuanto mayor es la potencia, menos tiempo se tarda en alcanzar la temperatura deseada. La potencia necesaria para producir un calentamiento uniforme depende de las características propias del producto, así como de su temperatura inicial (Schiffmann, 1990) y de la frecuencia de radiación (Mudgett, 1989). El calor específico de un alimento influye en el tratamiento térmico con microondas. El calor específico se puede definir como la cantidad de calor ganada o perdida por unidad de peso en un producto, para alcanzar una variación deseada en la temperatura sin producir alteración en el estado físico del mismo (Heddleson y col., 1994).

La figura número 6, muestra la relación lineal de la temperatura alcanzada en el mosto para cada tiempo de tratamiento aplicado. Se observa que a medida que aumenta el tiempo de tratamiento, aumenta la temperatura. Dichos valores indican que cada 1 minuto de tratamiento a 250 W de un volumen de mosto de 100 ml se espera que la temperatura aumente 9,27°C. La pendiente de la recta es 9,2751 y la ordenada al origen 26,95 (temperatura promedio inicial del mosto). El coeficiente de determinación R^2 0,99 indica que el modelo de regresión lineal explica el 99% de la variabilidad de los datos. Los valores obtenidos permitirían correlacionar los datos de tiempo de exposición a microondas a 250 W y temperatura para este ensayo de la siguiente manera, si la temperatura inicial de los mostos es de $26,00 \pm 1,97^\circ\text{C}$ (promedio \pm desviación estándar) luego de dos minutos de tratamiento se alcanza una temperatura de $47,24 \pm 2,56^\circ\text{C}$, luego de 3 minutos una temperatura de $55,24 \pm 2,24^\circ\text{C}$ y luego de 4 minutos $62,81 \pm 2,62^\circ\text{C}$.

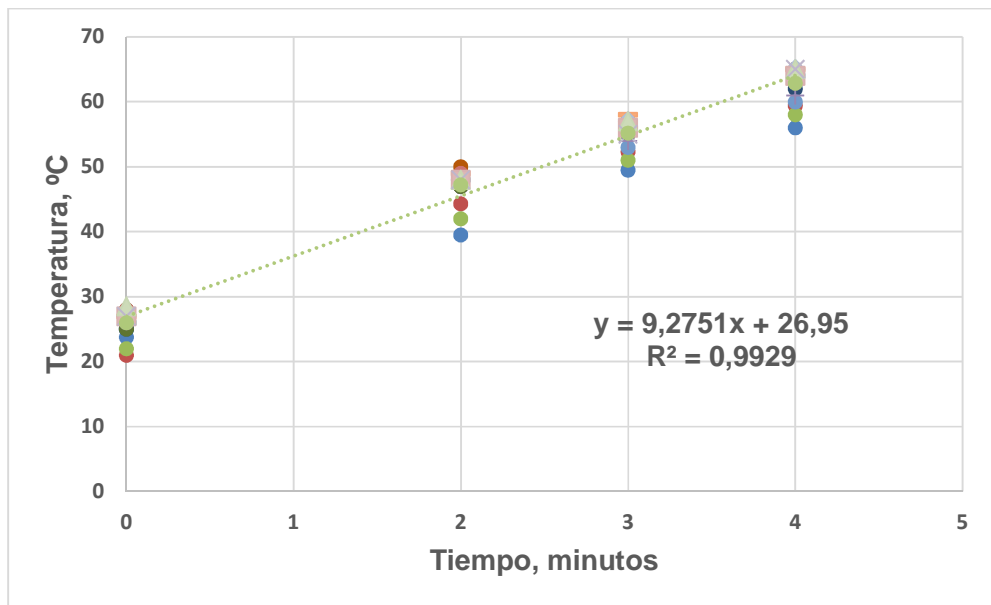


Figura 6: Relación del aumento de temperatura respecto al tiempo de tratamiento a 250W.

4.3. Efecto del tratamiento con microondas para cada grupo microbiano

A continuación se presentan los resultados obtenidos cuando diferentes especies de microorganismos fueron tratados con microondas a 250W.

4.3.1. *Saccharomyces cerevisiae*

En la figura número 7 se observa que el tratamiento de microondas a 250W sobre una población de *S. cerevisiae* produce una reducción importante a los 4 minutos de tratamiento en la cual partiendo de una población inicial de $6,9 \cdot 10^7$ ufc/ml se reduce la población de células viables a una población $5 \cdot 10^4$ ufc/ml. A los 2 y 3 minutos de tratamiento los efectos en la reducción de la población no son tan marcados, mostrando poblaciones viables luego del tratamiento de $5,3 \cdot 10^7$ ufc/ml y $1,4 \cdot 10^7$ ufc/ml respectivamente.

Los resultados sugieren una relación con la temperatura, la cual solo cuando se superan los 50 °C podría observarse un efecto sobre la viabilidad de esta especie. La temperatura es el factor físico más importante desde el punto de vista del crecimiento de las levaduras y del avance de la fermentación (Fleet y Heard, 1993). *S. cerevisiae* muestra una temperatura óptima de crecimiento alrededor de los 30°C, aunque puede adaptarse a un amplio rango de temperaturas, con un máximo de 40°C, a partir de la cual se observa una caída de la capacidad de crecimiento y consecuentemente en su viabilidad (Watson, 1987). Los resultados obtenidos corroboran esta afirmación.

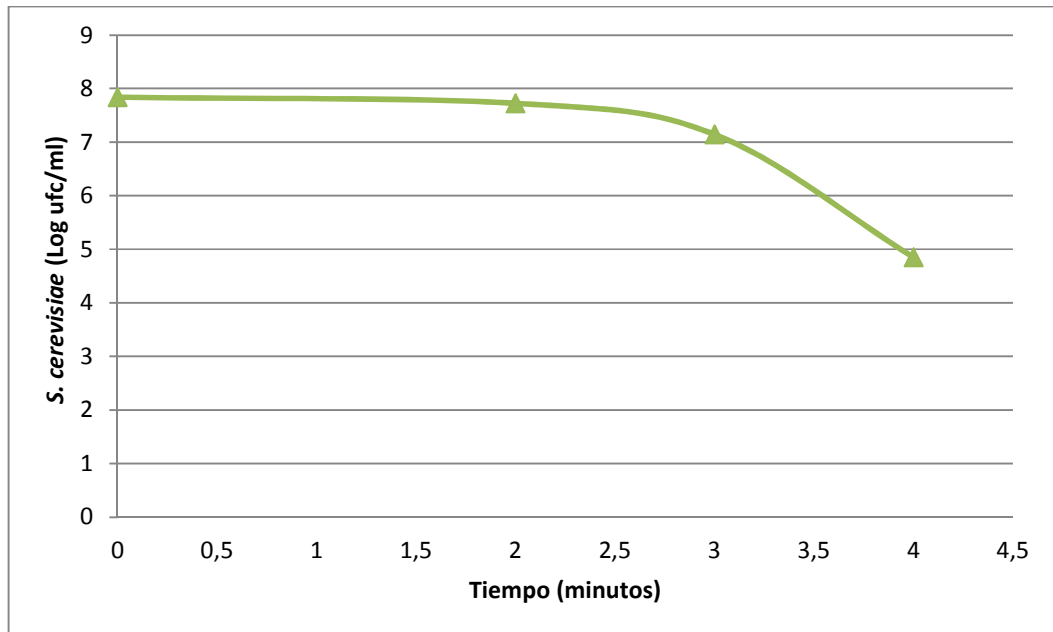


Figura 7: Poblaciones viables de *S. cerevisiae* luego de los tratamientos en microondas a 250W.

En la Figura 8 se muestra a modo de ejemplo ilustrativo el crecimiento de las colonias de *S. cerevisiae* luego del tratamiento con microondas para las diluciones 10^{-3} y 10^{-4} sembradas en superficie del medio de cultivo WL.

“Aplicación de microondas para la reducción de las poblaciones de microorganismos en mosto de uva”
Lopez Gresta, Juliana

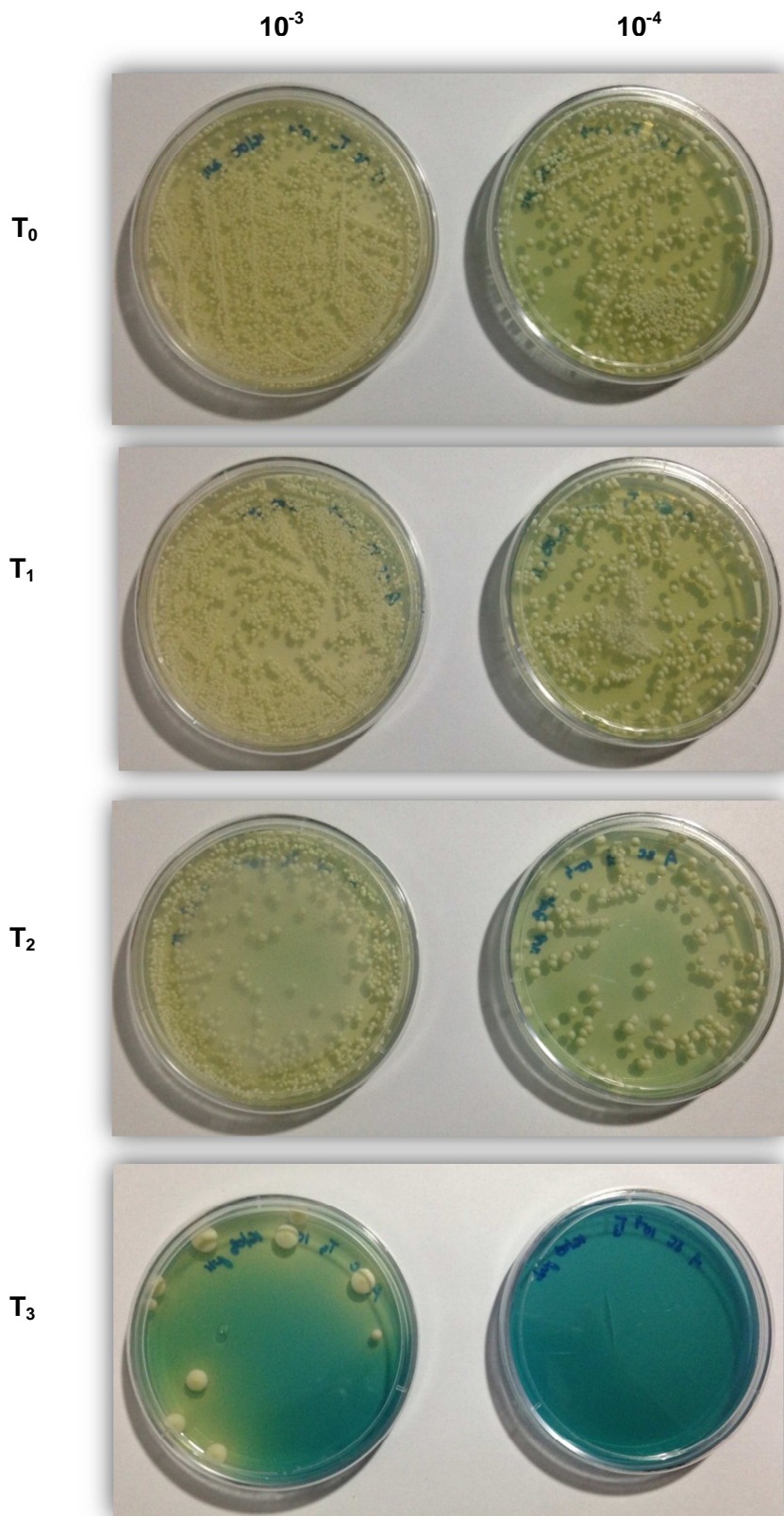


Figura 8: Colonias de *S. cerevisiae* desarrolladas en el medio WL luego de cada tratamiento

4.3.2. *Pichia membranaefaciens*

En la figura 9 se muestran los resultados obtenidos para *P. membranaefaciens*. Se observa que a partir de los 3 minutos de tratamiento se logra una reducción de la población inicial de $1,15 \cdot 10^8$ ufc/ml a $1,7 \cdot 10^6$ ufc/ml. En el tratamiento con microondas a 4 minutos se reduce la población de *P. membranaefaciens* a $1 \cdot 10^3$ ufc/ml.

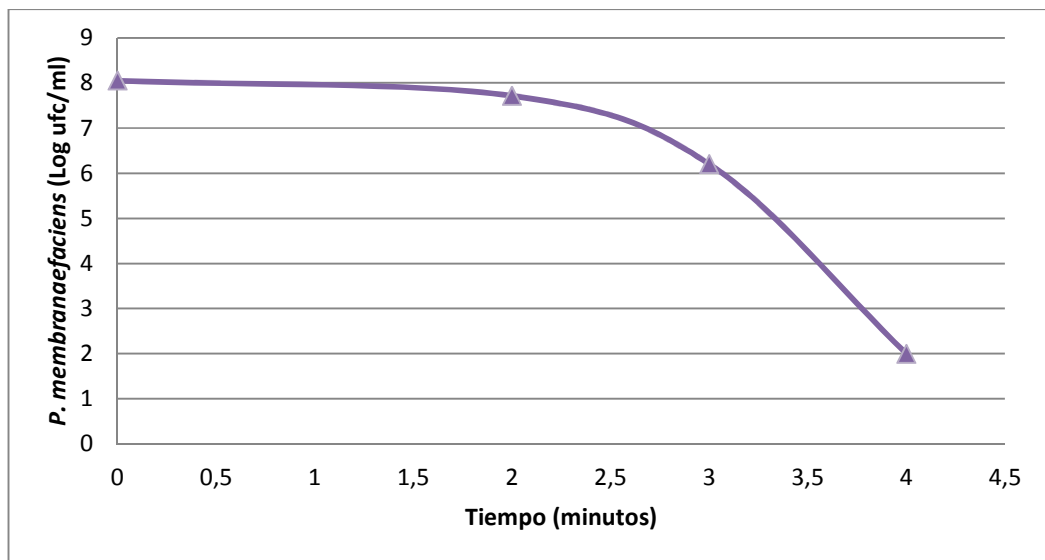


Figura 9: Poblaciones viables de *P. membranaefaciens* luego de los tratamientos en microondas a 250W

4.3.3. *Dekkera bruxellensis*

En cuanto a *D. bruxellensis* (figura 10) se observa que el tratamiento microondas produce una curva de reducción sigmoidea, donde el menor tiempo evaluado produce un leve cambio en la población inicial, mientras los tratamientos de 3 y 4 minutos producen una reducción marcada y similar logrando reducir la población inicial de *D. bruxellensis* de $2,8 \cdot 10^6$ ufc/ml a 20 y 10 ufc/ml respectivamente.

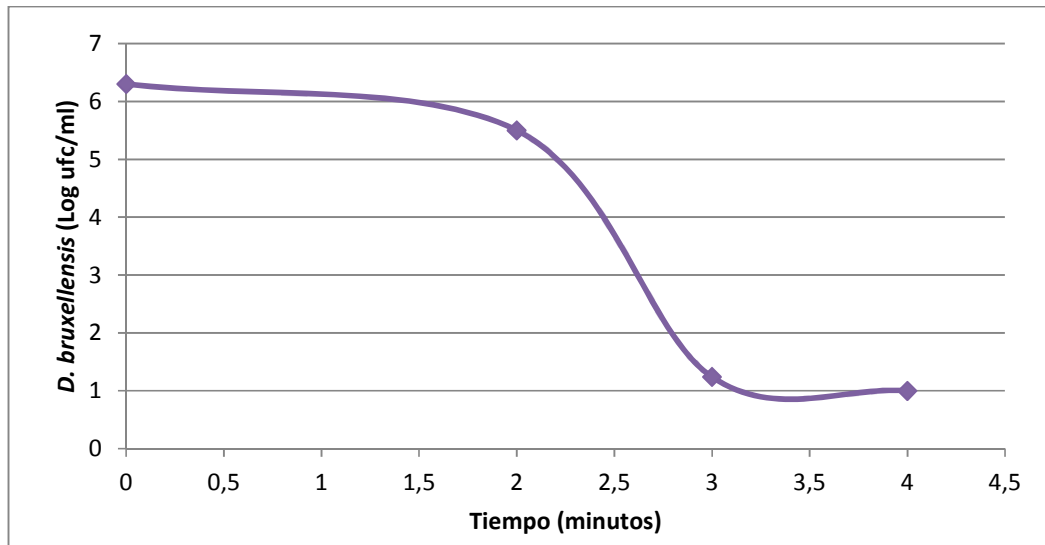


Figura 10: Poblaciones viables de *D. bruxellensis* luego de los tratamientos en microondas a 250W

4.3.4. *Zygosaccharomyces rouxii*

En la figura 11 se muestran los resultados obtenidos para *Z. rouxii*. Puede observarse que luego de 2 minutos de tratamiento comienza a reducirse la población alcanzando $3,3 \cdot 10^6$ ufc/ml a partir de una población inicial de $6,8 \cdot 10^7$ ufc/ml. Luego de 3 minutos se reduce la población a $2,3 \cdot 10^3$ ufc/ml y la población continúa disminuyendo levemente hasta $4,95 \cdot 10^2$ ufc/ml a los 4 minutos de tratamiento.

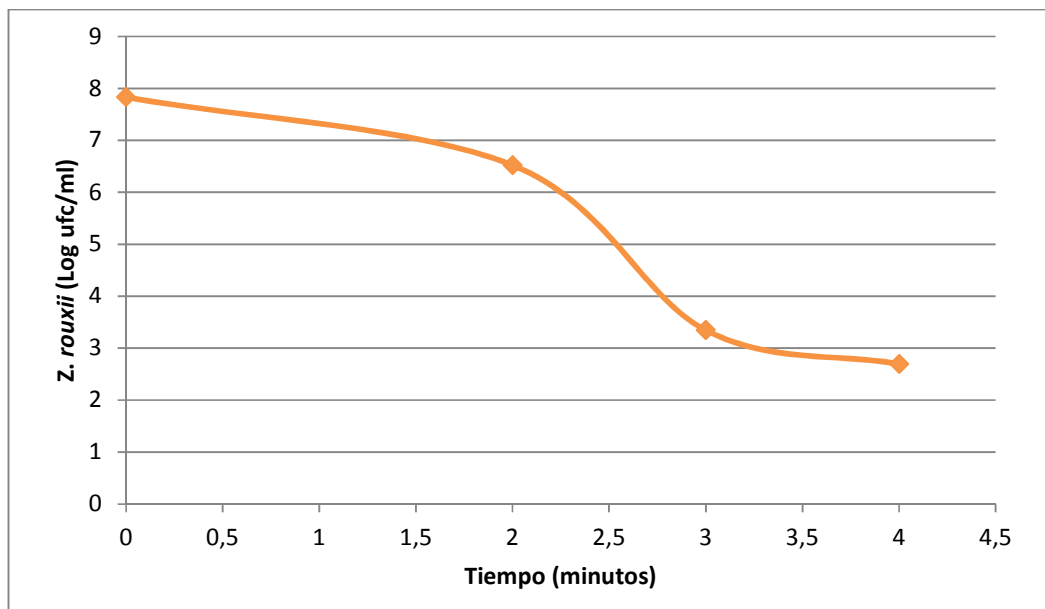


Figura 11: Poblaciones viables de *Z. rouxii* luego de los tratamientos en microondas a 250W

4.3.5. *Hanseniaspora uvarum*

En la figura 12 se muestra la curva de reducción de la viabilidad de *H. uvarum* con los distintos tratamientos aplicados. Nuevamente observamos una curva sigmoidea donde los dos tiempos superiores aplicados 3 y 4 minutos producen una reducción de la población muy marcada y en similar magnitud, reduciendo una población inicial de *H.uvarum* de $8,3 \cdot 10^5$ ufc/ml a 55 y 5 ufc/ml respectivamente.

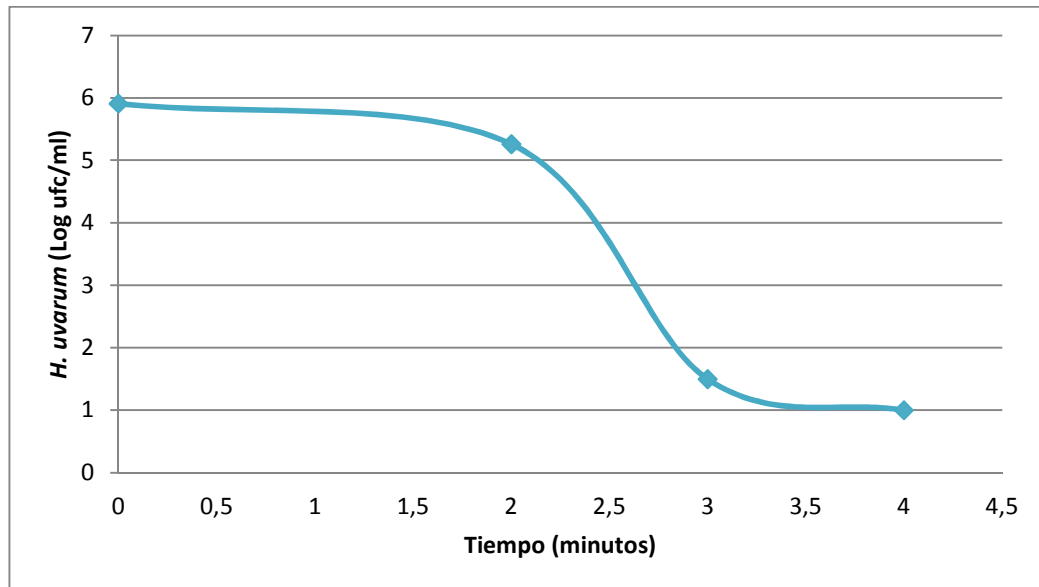


Figura 12: Poblaciones viables de *H. uvarum* luego de los tratamientos en microondas a 250W

4.3.6. *Acetobacter spp.*

En la figura 13 se observa que luego de 4 minutos de tratamiento se reduce la población de *Acetobacter spp* partiendo de una población inicial de $2,7 \cdot 10^6$ ufc/ml a 20 ufc/ml. Los dos tiempos anteriores de tratamientos 2 y 3 minutos logran una reducción menor y parcial de las poblaciones de *Acetobacter spp*.

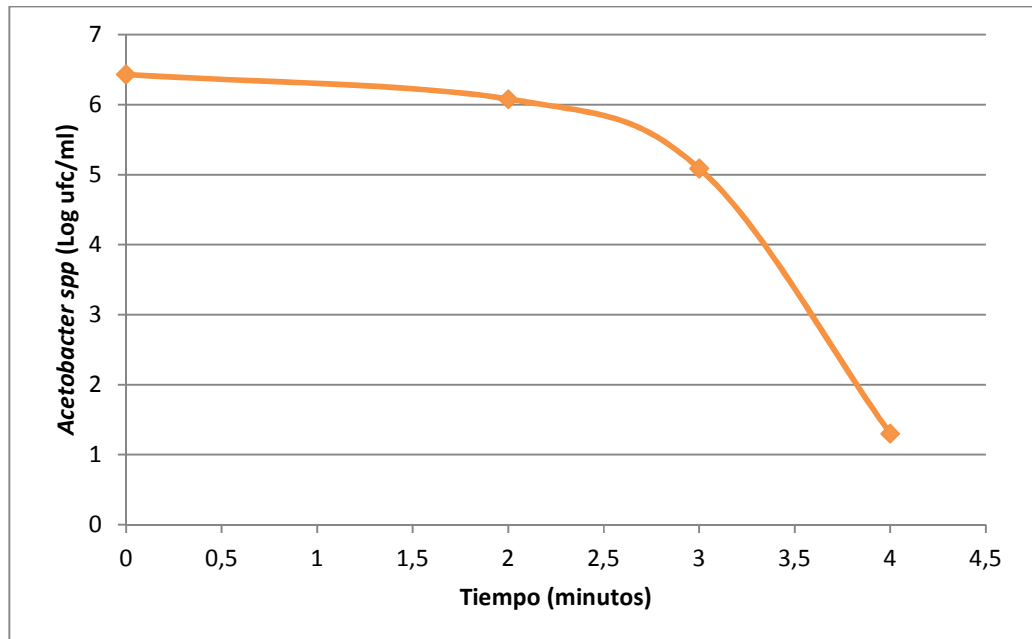


Figura 13: Poblaciones viables de *Acetobacter spp* luego de los tratamientos en microondas a 250W

4.3.7. *Lactobacillus spp.*

En la figura 14 se observa que una leve disminución de la población de *Lactobacillus spp.* a lo largo de todo el tratamiento. A partir de una población inicial de $3,9 \cdot 10^7$ ufc/ml, luego de 4 minutos de tratamiento la población final es de $6,8 \cdot 10^4$ ufc/ml.

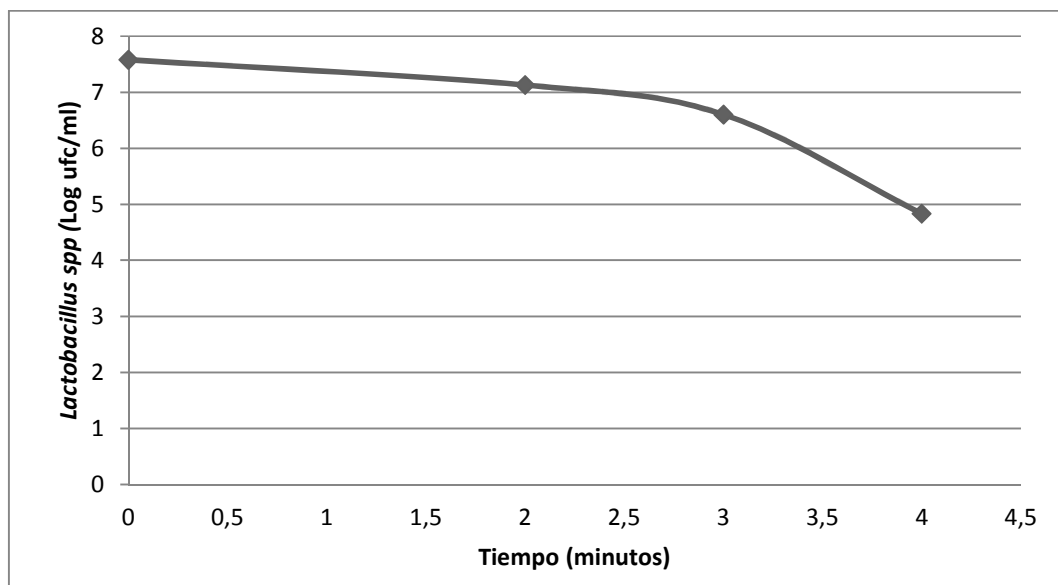


Figura 14: Poblaciones viables de *Lactobacillus spp* luego de los tratamientos en microondas a 250W

La figura 15 se muestran las colonias de *Lactobacillus spp.* desarrolladas en el medio MRS luego del tratamiento con microondas a 250W para las diluciones 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3} .

“Aplicación de microondas para la reducción de las poblaciones de microorganismos en mosto de uva”
Lopez Gresta, Juliana

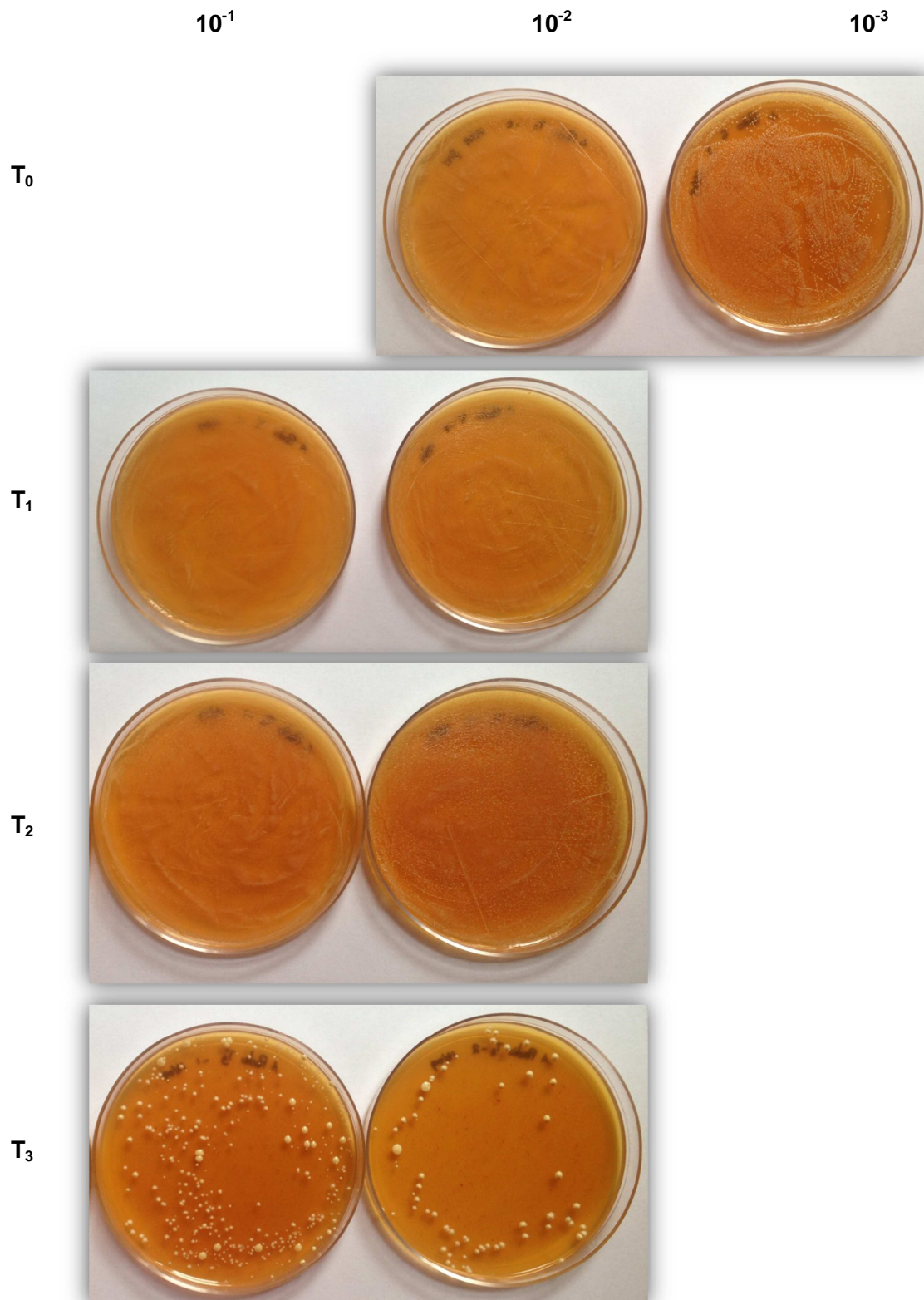


Figura 15: Colonias de *Lactobacillus spp.* desarrolladas en medio MRS luego de cada tratamiento

4.4. Evaluación comparada del efecto de los tratamientos de microondas para los diferentes microorganismos

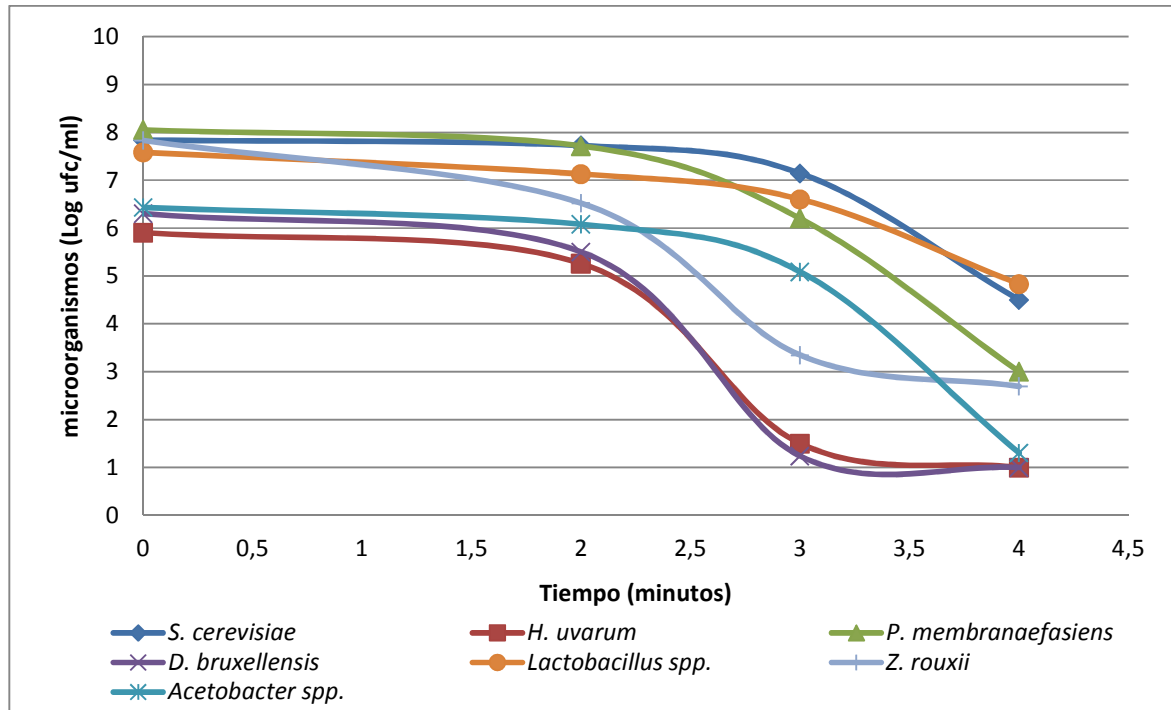


Figura 16: Tratamiento con microondas para cada microorganismo estudiado

La figura 16 tiene por objeto mostrar las curvas de supervivencia de los diferentes microorganismos de manera comparada para poner en evidencia los diferentes comportamientos ante un mismo tratamiento. De este modo observamos en general dos tipos de curvas, la curva cóncava descendente (*S. cerevisiae*, *P. membranaefaciens*, *Acetobacter spp.* y *Lactobacillus spp.*) en la cual el máximo tratamiento aplicado es el que produce la máxima reducción de la población, mientras en las curvas sigmoideas (*D. bruxellensis*, *H. uvarum* y *Z. rouxii*), el tratamiento de 3 minutos ya logra la máxima reducción manteniendo el mismo recuento a 4 minutos de tratamiento. En general se observa que *S. cerevisiae* y *Lactobacillus spp.* muestran mayor resistencia que el resto de los microorganismos. Se puede observar que parte de la población de los microorganismos estudiados aún sobrevive, lo que hace entonces necesario realizar más estudios para llegar a determinar si es posible eliminarla o no completamente.

Para realizar un análisis comparado más detallado para cada microorganismo y tiempo de tratamiento se calculó la proporción relativa de los recuentos obtenidos luego de cada tratamiento respecto al recuento inicial, obteniendo valores que oscilan entre 0 y 1 donde 0 significa que la población se redujo completamente y 1 que la población se mantuvo sin reducción. Para el análisis estadístico, primero se comprobó la normalidad de los datos, los cuales no cumplieron los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianza, por lo tanto se aplicaron test no paramétricos. Se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis para encontrar diferencias

significativas entre los tratamientos y el test de rangos múltiples para determinar diferencias significativas entre pares. Los datos se muestran más claramente utilizando las medias e intervalos de confianza.

4.4.1. Efecto del tiempo en microondas para 2 minutos de tratamiento

El test de Kruskal-Wallis prueba la hipótesis nula de que los valores de proporción del recuento para todos los microorganismos estudiados para el tiempo de tratamiento 2 provienen de la misma población. Ya que el valor P fue mayor o igual a 0,05, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre los valores hallados para los diferentes grupos (microorganismos) con un nivel de confianza del 95.0% (Ver anexo II).

Para determinar qué medias muestrales fueron significativamente diferentes, se realizó el test de múltiples rangos. Para el tiempo de tratamiento 2 minutos se demostró una diferencia estadísticamente significativa entre la respuesta al tratamiento para *S. cerevisiae* y *D. bruxellensis*-*H. uvarum*-*Z. rouxii*. Para el resto de los microorganismos no existió una diferencia estadísticamente significativa. Este resultado indicaría que *S. cerevisiae* fue el microorganismo que mostró mayor resistencia a los 2 minutos de tratamiento y que *D. bruxellensis*, *H. uvarum* y *Z. rouxii* serían las más sensibles, mostrando reducciones en este tiempo de tratamiento (Ver anexo II). La figura 17 muestra de modo gráfico los resultados obtenidos.

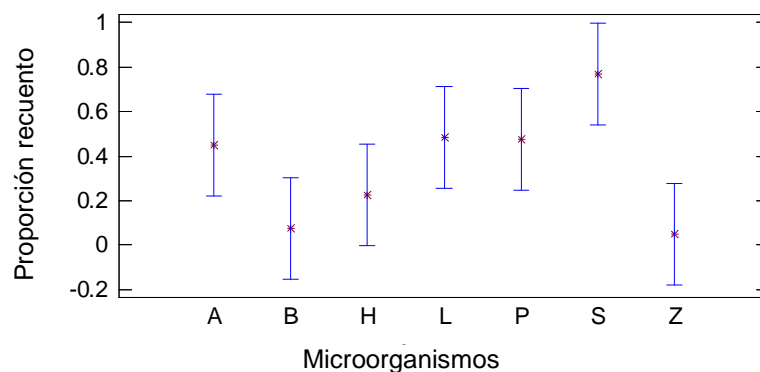


Figura 17: Resultados para el tiempo de tratamiento 2 minutos. Se grafican medias e intervalos de confianza (0,95). A: *Acetobacter spp.* B: *D. bruxellensis*, H: *H. uvarum*, L : *Lactobacillus spp.* P. *membranaefasiens*, S : *S. cerevisiae*, Z : *Z. rouxii*

4.4.2. Efecto del tiempo en microondas para 3 minutos de tratamiento

El test de Kruskal-Wallis para el tiempo de tratamiento 3 indicó que no existe una diferencia estadísticamente significativa entre los valores hallados para los diferentes grupos (microorganismos) con un nivel de confianza del 95.0% (Ver anexo III).

El test de múltiples rangos para el tiempo de tratamiento 3 demostró una diferencia estadísticamente significativa entre la respuesta al tratamiento para *S. cerevisiae* y *D. bruxellensis*-*H. uvarum*-*P. membranaefasiens*-*Z. rouxii*. Para el resto de los microorganismos no existe una diferencia estadísticamente significativa. Al igual que para el tiempo de tratamiento 2,

se observó que *S. cerevisiae* es el microorganismo que mostró mayor resistencia a los 3 minutos de tratamiento (Ver anexo III).

En la figura 18 se muestra la proporción del recuento para el tiempo de tratamiento 3 respecto del recuento inicial para cada microorganismo.

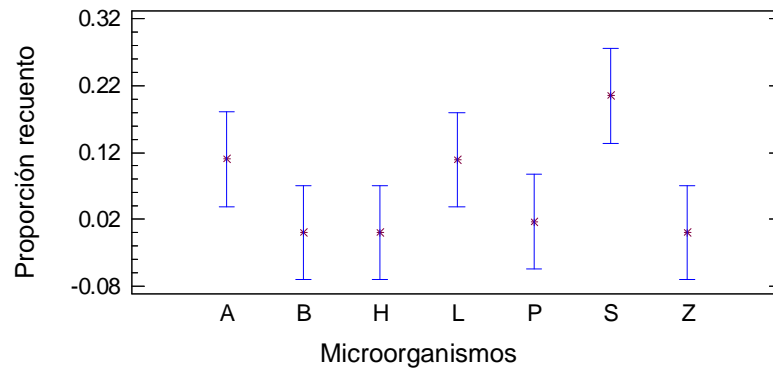


Figura 18: Resultados para el tiempo de tratamiento 3 minutos. Se grafican medias e intervalos de confianza (0,95). A: *Acetobacter spp.* B: *D. bruxellensis*, H: *H. uvarum*, L: *Lactobacillus spp.* P: *P. membranaefasiens*, S: *S. cerevisiae*, Z: *Z. rouxii*

4.4.3. Efecto del tiempo en microondas para 4 minutos de tratamiento

El test de Kruskal-Wallis para el tiempo de tratamiento 4 indicó que no existe una diferencia estadísticamente significativa entre los valores hallados para los diferentes grupos (microorganismos) con un nivel de confianza del 95.0% (Ver anexo IV).

El test de múltiples rangos para el tiempo de tratamiento 4 demostró una diferencia estadísticamente significativa entre la respuesta al tratamiento para *S. cerevisiae* y el resto de los microorganismos estudiados. También demostró una diferencia estadísticamente significativa entre la respuesta al tratamiento para *Lactobacillus spp.* y los demás microorganismos. Para el resto no existe diferencia significativa. A diferencia del tiempo de tratamiento 2 y 3, se observa que *S. cerevisiae* junto a *Lactobacillus spp.* son los microorganismos que muestran mayor resistencia a los 4 minutos de tratamiento (Ver anexo IV).

En la figura 19 se muestra la proporción del recuento para el tiempo de tratamiento 4 respecto del recuento inicial para cada microorganismo.

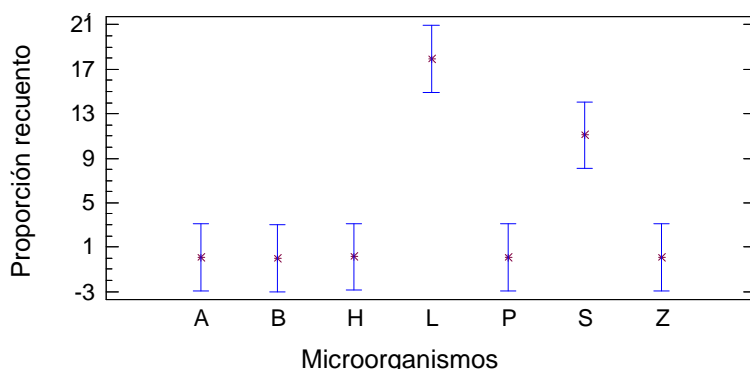


Figura 19: Resultados para el tiempo de tratamiento 4 minutos. Se grafican medias e intervalos de confianza (0,95). A: *Acetobacter spp.* B: *D. bruxellensis*, H: *H. uvarum*, L : *Lactobacillus spp.* P: *P. membranaefasiens*, S: *S. cerevisiae*, Z: *Z. rouxii*

Las diferencias en la inactivación de los distintos grupos microbianos ante un mismo tratamiento de microondas era un hecho esperable y es conocido que cada microorganismo presenta una resistencia característica a diferentes factores, la cual es variable dependiendo de la cepa y el medio en el cual se encuentre. Es así entonces que la mayor resistencia al tratamiento que se observa durante los tiempos 2, 3 y 4 minutos para *S. cerevisiae* y durante el tiempo de tratamiento 4 minutos para *Lactobacillus spp.* puede deberse a la mayor termotolerancia de estas especies. Por otro lado, resulta importante destacar que el medio de cultivo también puede influir en la supervivencia de los diferentes grupos microbianos. La concentración de carbohidratos puede haber afectado la sensibilidad de los microorganismos al calor, ya que las elevadas concentraciones de hidratos de carbono presentes en el mosto pueden asociarse con un incremento de la resistencia térmica de los microorganismos (Velásquez y Sánchez, 2008).

Por otro lado, y en línea con nuestros resultados, estudios realizados por otros autores han mencionado que las bacterias Gram positivas en general y los bacilos heterofermentativos muestran mayor resistencia a las radiaciones (Suarez, 2010), y además la alta resistencia de *Saccharomyces* a diferentes condiciones de estrés también ha sido reportada (García y col., 2015).

El uso de microondas es una tecnología emergente en la conservación de alimentos debido a sus efectos antimicrobianos directos en los microorganismos o en la posibilidad de promover la síntesis de un gran número de compuestos antimicrobianos. El uso de esta tecnología es ampliamente propuesto por estudios científicos recientes. (Gould Grahame, 2010).

Teniendo en cuenta la cinética de la inactivación microbiana, varias discusiones científicas se han centrado en los efectos no térmicos del calentamiento por microondas además de los efectos mortales del calentamiento (Vadivambal y Jayas, 2010). Básicamente se han propuesto dos enfoques para la inactivación de microorganismos. El primero sugiere que la muerte de los microorganismos es completamente debida al calor que causa un cambio en la naturaleza de las proteínas, actividad anormal de las enzimas y degradación de la membrana (Heddleson, 1994). En el segundo enfoque, se plantea la hipótesis que además del calor, los efectos no

térmicos también están involucrados en la inactivación de microorganismos. Las teorías desarrolladas para el efecto de calor incluyen el calentamiento selectivo (calentamiento efectivo de microorganismos por radiación de microondas), electropermeabilización (fugas debidas a la creación de poros en la membrana celular de los microorganismos), destrucción de la membrana celular y lisis celular bacteriana (debido a la interacción del campo y moléculas vitales) (Kozempel y col., 1998). Sin embargo, en la mayoría de las investigaciones, la erradicación de los microorganismos por microondas se ha relacionado con efectos térmicos (Cañumir y col., 2002).

Estudios previos han mostrado que la dosis de microondas utilizada puede tener efectos muy diferentes sobre los microorganismos. Zeng y colaboradores (2014) evaluaron los efectos de la dosis y el tiempo de irradiación de microondas sobre el crecimiento y la permeabilidad de la membrana celular de la levadura *Brettanomyces custersii* cepa ZSM-001, aislada de pasta de arroz fermentada espontáneamente. Cuando se trató a una dosis de microondas de 1,0 a 1,6 W/g durante 90s o en la dosis mayor de 1,6 W/g durante 120s, el crecimiento de la levadura se vio favorecido y las células de levadura mostraron membranas casi intactas con superficies lisas. Mientras tanto, el ADN, las proteínas y las fugas de electrolitos, así como la fluidez de H⁺ y Ca⁺² aumentaron en comparación con el control que no fue tratado dentro de este intervalo de evaluación que demostró tener efectos reversibles. Por el contrario, a una dosis de microondas por encima de 2,0 W/g o una duración de más de 160s, la tasa de crecimiento de la levadura disminuyó, y las células se colapsaron y se electro-permeabilizaron mostrando superficies rugosas. Por lo tanto, las microondas aplicadas en baja intensidad (dosis de 1,6 W/g o duración de 120s) favorecieron el crecimiento de la levadura e indujeron un aumento reparable en la permeabilidad de la membrana celular sin daño celular. Las microondas de alta intensidad dieron lugar a la muerte de la célula de la levadura principalmente debido a un aumento irreversible del electrolito Ca⁺² y de la fuga de ADN. En nuestro estudio una dosis de 2,5 W/ml fue aplicada sobre las levaduras y bacterias ensayadas, lo que estaría en concordancia con los resultados previos donde dosis mayores a 2 W/g resultan letales para las levaduras si son aplicadas por más de 3 minutos (180 segundos).

Estudios realizados en vinos, demostraron que el tratamiento con microondas fue capaz de destruir microorganismos nativos peligrosos para la calidad del vino, los cuales actualmente se controlan con la adición de SO₂ (Clodoveo y col., 2016). Carew y colaboradores (2013a) reportaron un efecto similar a una pasteurización cuando las microondas fueron aplicadas en la molienda de uva. El efecto antimicrobiano las microondas también se ha demostrado para sanitizar barricas de roble; en efecto González-Arenzana y colaboradores (2013) propusieron una tecnología de microondas basada en el uso de un nuevo equipamiento que aprovecha altas frecuencias de microondas para reducir población microbiana en barricas de roble y observaron una reducción del 36–38% para el total de levaduras (35 a 67% para *Brettanomyces*) y alrededor de 91–100% para bacterias lácticas y acéticas usando un tratamiento muy corto (3 min).

Los resultados obtenidos demuestran la factibilidad y eficiencia del uso de microondas para la reducción de poblaciones microbianas en mostos de uva. Para algunos grupos microbianos más resistentes, se plantea la necesidad de evaluar el efecto del uso de una potencia de mayor intensidad o un mayor tiempo de exposición para lograr reducciones mayores.

Por otro lado, y a pesar de que aspectos como extracción de aromas y polifenoles, no fueron evaluados en el presente trabajo, los aspectos positivos de un leve calentamiento de los mostos para favorecer la extracción de estos compuestos han sido demostrados, incluso con el uso de microondas (Carew y col., 2014).

Los resultados obtenidos en el presente trabajo son promisorios ya que demuestran que el microondas puede ser utilizado como estrategia para lograr una reducción de las poblaciones microbianas nativas, permitiendo una reducción en el uso del SO₂, el cual podría ser utilizado en dosis menores para obtener aquellos beneficios como evitar la oxidación y otros que fueron mencionados anteriormente, pero respetando los niveles recomendados y reduciendo los efectos negativos de las elevadas dosis.

La utilización de microondas presenta ventajas, ya que es un método rápido y fiable, basado en la utilización de un generador de pulsos de alta frecuencia. Es un proceso eco-eficiente a nivel energético, ya que necesita poca energía y el empleo de agua es muy bajo comparado con otras alternativas tecnológicas. Por otro lado, el uso de microondas no genera vertidos contaminantes ni utiliza productos químicos, por lo que es muy sostenible frente a la huella de carbono y el cuidado por el medio ambiente.

5. CONCLUSIONES

La reducción de las poblaciones microbianas de mostos de uva mediante tratamiento con microondas dependió del microorganismo que se trata.

S. cerevisiae y *Lactobacillus spp.* fueron los microorganismos que mostraron mayor resistencia al tratamiento de microondas aplicado a una potencia de 2,5 W/g aun en el mayor tiempo de exposición evaluado (4 minutos).

D. bruxellensis y *H. uvarum*, fueron los microorganismos más sensibles alcanzando la máxima reducción de sus poblaciones a un menor tiempo de exposición (3 minutos) con una dosis de microondas de 2,5 W/g.

Los resultados obtenidos demuestran la factibilidad y eficiencia del uso de microondas para la reducción de poblaciones microbianas en mostos de uva.

6. BIBLIOGRAFIA

- Alturria L., Antonioli E., Ceresa A., Solsona J., Winter P. (2008). Elaboración de vinos: defectos en el proceso que originan costos de no calidad. *Revista FCA UNCuyo*. Tomo XL N°1, 1-16.
- Ayestaran B., Zenaida G., León D. (2004). Quantification of major grape polysaccharides 162 (Tempranillo v.) released by maceration enzymes during the fermentation process. *Analytica Chimica Acta*, 163 513:29.39.
- Barata A., Malfeito-Ferreira M., Loureiro V. (2012). The microbial ecology of wine grape berries. *International Journal of Food Microbiology*, 153 (3), 243–259.
- Belda I., Navascués E., Alonso A., Marquina D., Santos A. (2014). Microbiología del proceso de vinificación: selección de levaduras *Saccharomyces cerevisiae* autóctonas con óptimas propiedades enológicas. *Reduca (Biología)*. Serie Microbiología, 7(1), 1-14.
- Berradre M., Sulbarán B., Ojeda de Rodríguez G., Fernández V., Soto L., Martínez J., Esteve-Zarzoso. (2012). Dinámica poblacional de levaduras durante la fermentación espontánea de uva blanca variedad Malvasía. *Revista de la Facultad de Agronomía (LUZ)*, 29: 453-474.
- Bell S., Henschke P. (2005). Implications of nitrogen nutrition for grapes, fermentation and wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 11: 242–295.
- Bisson L., Butzke C. (2000). Diagnosis and rectification of stuck and sluggish fermentations. *American Journal of Enology and Viticulture*, 51(2), 168-177.
- Cano-Montiel A. A. (2008). Uso de microondas para calentamiento de alimentos. *Temas selectos de ingeniería de alimentos*, 2: 58-65.
- Cañumir J. A., Celis Hidalgo J. E., De Brujin J., Vidal L. (2002). Pasteurization of apple juice by using microwaves. *Food Science and Technology*. Vol. 35 (5): 389-392.
- Carew A., Smith P., Close D.C., Curtin C., Damberg R. G. (2013). Yeast Effects on Pinot noir Wine Phenolics, Color, and Tannin Composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61: 9892–9898
- Carew A. L., Sparrow A. M., Curtin C. D., Close D. C., Damberg R. G. (2014). Microwave Maceration of Pinot Noir Grape Must: Sanitation and Extraction Effects and Wine Phenolics Outcomes. *Food Bioprocess Technology*, 7: 954-963.
- Carrascosa A., Muñoz R., González R. (2005). Microbiología del vino. AMV Ediciones, Madrid.
- Clodoveo M. L., Dipalmo T., Rizzello C. G., Corbo F., Crupi P. (2016). Emerging technology to develop novel red winemaking practices: An overview. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 38: 41–56.
- Código Alimentario Argentino, Capítulo XIII: Bebidas Fermentadas. Buenos Aires, Argentina [en línea] http://www.anmat.gov.ar/alimentos/codigoa/Capitulo_XIII.pdf (Consulta: 8 Marzo 2017).
- Combina M. M., Mercado L., Borgo P., Elia A., Jofre V., Ganga A., Martinez C., Catania C. (2005). Yeasts associated to Malbec grape berries from Mendoza, Argentina. *Journal of Applied Microbiology*, 98: 1055–1061.
- Connel L., Stender H., Edwards C. G. (2002). Rapid detection and identification of *Brettanomyces* from winery air samples based in peptide nucleic acid analysis. *American Journal of Enology and Viticulture*, 53 (2002), pp. 24-27.

- Costantini A., García-Moruno E., Moreno-Arribas M. V. (2009). Biochemical transformations produced by malolactic fermentation. *Wine Chemistry and Biochemistry*. Moreno-Arribas MV, Polo MC, editor. New York, Springer; pp. 27–57.
- Couto J. A., Neves F., Campos F., Hogg T. (2005). Thermal inactivation of the wine spoilage yeasts *Dekkera/Brettanomyces*. *International Journal of Food Microbiology*. Vol 104 (3) : 337-344.
- Darriet P., Boidron J., Dubourdieu D. (1988). L'hydrolyse des hétérosides terpéniques du muscat a petits grains par les enzymes périplasmiques de *Saccharomyces cerevisie*. *Connaiss Vigne Vin*, 22, 189–195.
- Decareau, R. V. (1985). *Microwaves in the Food Processing Industry*. Orlando, Academic Press Inc.
- Degré R. (1993). Selection and commercial cultivation of wine yeast and bacteria. *Wine Microbiology and Biotechnology* Ed. Fleet, G. pp. 421-447. Switzerland: Harwood Academic
- Díaz Morcillo A. B., Monzó Cabrera J., Domínguez Tortajada E., Requena Perez M. E. (2004). Principios Fundamentales y Aplicaciones del Calentamiento por Microondas. Repositorio digital Escuela Técnica Superior de Ingeniería de Telecomunicación. Universidad Politécnica de Cartagena.
- Drysdale G. S., Fleet G. H. (1988). Acetic acid bacteria in winemaking: a review. *American Journal of Enology and Viticulture*, 39, 143–154.
- Du Toit M., Pretorius I. S. (2011). Nuevas bacterias de ácido láctico para su uso como iniciadores de la fermentación maloláctica. ACENOLOGÍA, [en línea] http://www.acenologia.com/cienciaytecnologia/nuevas_bacterias_FML_cienc0412.htm (Consulta 9 de junio 2017).
- Epifanio S. (2005). Influencia de la tecnología de la vinificación en la microbiología y el desarrollo de la fermentación alcohólica. Tesis doctoral. Universidad de La Rioja, España.
- Escalante-Minakata P., Ibarra-Junquera V. (2007). Los cultivos mixtos y las fermentaciones alcohólicas. *Bioteología*, 11 (3).
- Eschenbruch B., Dittrich H. (1986). Metabolism of acetic acid bacteria in relation to their importance to wine quality. *Zentralblatt Für Mikrobiologie*, 141 (4): 279- 289
- Fang Y., Hu J., Xiong S., Zhao S. (2011). Effect of low-dose microwave radiation on *Aspegillus parasiticus*. *Food control*, 22, 1078-1084.
- Farris G. A., Zara S., Pinna G., Budroni M. (2002). Genetic aspects of flor yeasts Sardinian strains, a case of study. En: Ciani M (ed) *Biodiversity and Biotechnology of wine yeasts*. Research Signpost, Kerala, India, pp 71–83.
- Fleet, G.H., (1993). The microorganisms of winemaking isolation enumeration and identification. En: Fleet, G.H. (Ed.), *Wine Microbiology and Biotechnology*. Harwood Academic Publishers, Chur, Switzerland, pp. 1 – 27.
- Fleet G. H. (2007). Yeasts in foods and beverages: impact on product quality and safety. *Current Opinion in Biotechnology*, 18(2): 170-175.
- Fleet G. H., Prakitchaiwattana C., Beh A. L., Heard G. (2002). The yeast ecology of wine grapes. En: Ciani, M. (Ed.), *Biodiversity and Biotechnology of Wine Yeasts*. Research Signpost, Kerala, India, pp. 1 – 17.
- Fleet G. H., Heard G. (1993). Yeasts growth during fermentation. En: Fleet, G.H. (Ed.), *Wine Microbiology and Biotechnology*. Harwood Academic Publishers, Chur, Switzerland, pp. 27 – 55.

- Fungelsang K., Edwards C. (2007). Wine microbiology, practical applications and procedures 2nd ed. New York: Springer Science + Business Media, LLC.
- García Martínez T., Moreno J., Mauricio J. C., Peinado R. (2015). Natural sweet wine production by repeated use of yeast cells immobilized on *Penicillium chrysogenum*. *LWT Food Science Technology*, 61 503–509.
- Garijo Jimenez M. P. (2013). Tesis doctoral: Estudio del aire como vía de diseminación de microorganismos enológicos. Universidad de la Rioja.
- Garófalo N., Perez X., Paredes M. (2005). Incidencia de microondas y temperaturas de almacenamiento en la vida útil de la mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth) irradiada. *Alimentos, Ciencia e Ingeniería*. N° 14 (2).
- Gawel, R. (1998). Red wine astringence. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 4 :74-95.
- Gilbert J.; Van Der Lelie D.; Zarraonaindia I. (2014). Microbial terroir for wine grapes. *PNAS* 111(1), 5–6.
- Gonzalez M., Lerena C., Ciklic I., Combina M., Mercado L. (2016). El ecosistema del viñedo funciona como reservorio dinámico de la biodiversidad de levaduras *Saccharomyces*. Congreso Mundial de la Viña y el Vino (OIV), Bento Gonçalves, Brasil.
- González-Arenzana L., Santamaria P., Lopez R., Garijo P., Gutiérrez, A. R. Garde-Cerdán T., Lopez-Alfaro I. (2013). Microwave technology as a new tool to improve microbiological control of oak barrels: A preliminary study. *Food Control*, 30(2), 536–539.
- Gould Grahame W. (2000). *New Methods of Food Preservation*. New York, NY: Chapman & Hall.
- Grecz N., Rowley D. B., Matsuyama A. (1983). The action of radiation on bacteria and viruses. *Preservation of Foods by Ionizing Radiation*. Vol. 2. CRC Press, Boca Raton, Fl.
- Guerrero Hidalgo R. F., Cantos Villar E., Puertas García B., Ortiz Somovilla V. (2015). Sulfuroso en la elaboración de vinos. [en línea] https://hortintl.cals.ncsu.edu/sites/default/files/articles/sulfuroso_elaboracion_vinos.pdf (Consulta 19 de mayo 2017).
- Guillamón J. M., Mas A. (2005). Bacterias acéticas. *Microbiología del vino*. Carrascosa A., Muñoz R., González. Ediciones Madrid: A. Madrid Vicente Ediciones: pp 273-295.
- Heddleson R. A., Doores S., Anantheswaran, R.C. (1994). Parameters Affecting Destruction of *Salmonella* spp. by Microwave Heating. *Journal of Food Science*, 59, 447-451.
- Hidalgo Togores, J. (2011). *Tratado de Enología I*. Cap. VIII Transformaciones microbianas. Levaduras, bacterias y virus.
- Huang Y. C., Edwards G., Peterson J. C., Haag K. M. (1996). Relationship between sluggish fermentations of grape juice and the antagonism of yeast by lactic acid bacteria. *American Journal of Enology and Viticulture*, 47, 1–10.
- Ibeas J. I., Lozano I., Perdigonés F., Jimenez J. (1996). Detection of *Dekkera-Brettanomyces* strains in sherry by anested PCR method. *Applied Environmental Microbiology*, 62:998–1003.
- Ilabaca C., Jara C., Romero J. (2014). The rapid identification of lactic acid bacteria present in Chilean winemaking processes using culture independent analysis. *Annals of Microbiology* 64 (4) : 1857-1859.
- INV (2016). Instituto Nacional de Vitivinicultura Argentina. [en línea] http://www.inv.gov.ar/inv_contenidos/pdf/fiscalizacion/ToleranciasAnaliticasResolucionesRegla

mentarias.pdf (Consulta 10 noviembre 2016).

- Kozempel M. F., Bassam Annous, Cook R. D., Whiting R. C. (1998). Inactivation of bacteria with microwaves at reduced temperatures. *Journal of food protection*, 61(5) : 582-5.
- Krishnaswamy K., Orsat V., Gariépy Y. (2013). Optimization of microwave-assisted extraction of phenolic antioxidants from grape seeds (*Vitis vinifera*). *Food Bioprocess Technology*, 6, 441-455.
- Liazid A., Guerrero R. F., Cantos E., Palma M., Barroso C. G. (2011). Microwave assisted extraction of anthocyanins from grape skins. *Food Chemistry*, 124, 1238-1243.
- Lonvaud-Funel A. (1999). Lactid acid bacteria in the quality improvement and depreciation of wine. *Anton. Leeuw*, 76, 317-331.
- Los Andes (2009). Las levaduras: héroes o villanos del vino. [en línea] <http://www.losandes.com.ar/article/fincas-401279> (Consulta 9 de junio de 2017).
- Loureiro, V., Malfeito-Ferreira, M. (2003). Spoilage yeasts in the wine industry. *International Journal of Food Microbiology*, 86, 23-50.
- Maktabi, S., Watson, I., Parton, R. (2011). Synergistic effect of UV, laser and microwave radiation or conventional heating on *E. coli* and on some spoilage and pathogenic bacteria. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 12, 129-134.
- Malfeito-Ferreira, M. (2010). Yeasts and wine off- flavours : a technological perspective. *Annals Microbiology*, 61, 95-102.
- Manzanares P., Vallés S. (2005). Levaduras. No *Saccharomyces*. Microbiología del vino. Carrascosa A., Muñoz R., González. Ediciones Madrid: A. Madrid Vicente Ediciones: pp 114-142.
- Martinez P., Vicente V. (2012). Utilización de microondas en la carga microbiana de queso fresco. Tesis. Universidad Nacional "José Faustino Sanchez Carrión". Peru. 118 p.
- Marx G., Moody A., Aguirre D. (2011). A comparative study on the structure of *Saccharomyces cerevisiae* under nonthermal technologies: High hydrostatic pressure, pulsed electric fields and thermo-sonication. *International Journal of Food Microbiology*, 151, 327-337.
- Miranda Castilleja D. E., Ortiz Barrera E., Arvizu Medrano S. M., Pacheco J. R., Aldrete Tápia J. A., Martínez Peniche R. A. (2015). Aislamiento, selección e identificación (2015). Aislamiento, selección e identificación de levaduras *Saccharomyces spp.* nativas de viñedos en Querétaro, México. *Revista Agrociencia* 49 (7): 759-773.
- Monagas M., Bartolomé B., Gómez Cordovés C. (2005). Updated knowledge about the presence of phenolic compounds in wine. *Critical Reviews, Food Science & Nutrition*, 45: 85-118.
- Mudgett R. (1989). Microwave food processing. *Food Technology*. 43:117–126.
- Muñoz R., Moreno Arribas V., De las Rivas B. (2005) Bacterias lácticas. Microbiología del vino. Carrascosa A., Muñoz R., González (Eds) Madrid: A. Madrid Vicente Ediciones: pp 19-56.
- Organización Internacional de la Viña y el Vino. Definiciones y descripciones de los productos de la vid [en línea] <http://www.oiv.int/public/medias/3736/definicion-de-productos-es.pdf> (Consulta: 8 Marzo 2017).
- Ozbec, B., Dadali, G. (2007). Thin-layer drying characteristics and modelling of mint leaves undergoing microwave treatment. *Journal of Food Engineering*, 83, 541-549.

- Parenti, A., Spugnoli P., Calamai L., Ferrari S., Gori C. (2004). Effects of cold maceration on red wine quality from Tuscan Sangiovese grape. *European Food Research and Technology*, 218 (4): 360–366.
- Pozar D. (2012) Ingeniería de microondas. 4º Ed. Hoboken, N.J.: Wiley.
- Ramirez E., Palacios A. (2011). Limpieza y desinfección de barricas a través de microondas de alta frecuencia. *Revista enólogos*, Vol. 75, p. 34-38.
- Pretorius I. S. (2000). Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast* ;15:675–29.
- Pretorius I. S., Van der Westhuizen T.J., Augustyn O.P.H. (1999). Yeast biodiversity in vineyards and wineries and its importance to the South African wine industry. *South African Journal for Enology and Viticulture*, 20 (1999), p 61-74.
- Regier, M. (2015). Microwave processing of foods and its combination with electron beam processing. 49-60.
- Renouf V., Lonvaud Funel A. (2007). Development of an enrichment medium to detect Dekkera/Brettanomyces bruxellensis, a spoilage wine yeast, on the surface of grape berries. *Microbiological Research*, 162 (2) : 154-67.
- Ribéreau-Gayon P., Dubordieu D, Donèche B, Lombaud A. (Eds.) (2000). Handbook of enology. Volume 2. The Chemistry of Wine Stabilization and Treatments, 2nd edition.
- Rodríguez de Stouvenel, A. (2000). Tratamientos térmicos. Facultad de ingeniería. Universidad del valle, Pág. 26.
- Routray, W., Orsat, V. (2012). Microwave-assisted extraction of flavonoids: a review. *Food Bioprocess Technology*, 5, 409-424.
- Sacchi K. L., Bisson L. F., Adams D. O. (2005). A review of the effect of winemaking techniques on phenolic extraction in red wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 56: 197–206.
- Samani B. H., Khoshtaghaza M. H., Lorigooini Z., Minaei S., Zareiforoush H. (2015). Analysis of the combinative effect of ultrasound and microwave power on *Saccharomyces cerevisiae* in orange juice processing. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 32, 110-115.
- Sangorrín M., Giraudo M. R., Caballero A. C., Rodríguez M. E., Lavalle L., Zajonskovsky I., Lopez C. A., Barbagelata R., Mariconda L., Arcucci G., Méndez P. (2004). Diversidad de levaduras nativas de la Región Vitivinícola Sur. *El Vino y la Industria*. Vol. 19, 55-56.
- Schiffmann R. (1990). Microwave foods: basic design considerations. *Tappi J.* 1990;73:209–212
- Song, W., Kang, D. (2016). Inactivation of *Salmonella Senftenberg*, *Salmonella Typhimurium* and *Salmonella Tennessee* in peanut butter by 915 MHz microwave heating. *Food microbiology*, 53, 48-52.
- Sponholz W. (1993). Spoilage by wine microorganisms. En Fleet, G. H. (ed.), *Wine Microbiology and Biotechnology*. Harwood Academic Publishers, Switzerland, p. 395–420.
- Stefanini I., Dapporto L., Legras J., Calabretta A., Di Paola M., De Fillippo C., Viola R., Capretti P., Polsinelli M., Turillazzi S., Cavalieri D. (2012). Role of social wasps in *Saccharomyces cerevisiae* ecology and evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109(33):13398-403.
- Suarez J. A., Iñigo B. (2004). Microbiología enológica. Fundamento de vinificación 3ra edición. Mundiprensa.

- Swiegers J., Kievit R. L., Siebert T., Lattey K. A., Bramley B. R., Francis I. L., King E. S., Pretorius I.S. (2005). Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavor. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 11: 139–173.
- Swings, J. (1992). The genera *Gluconobacter* and *Acetobacter*. In *The Prokaryotes, a Handbook on Habitats, Isolation and Identification of Bacteria* ed. Starr, M.P., Stolp, H., Truper, H.G., Balows, B. and Schlegel, H.G., vol. 1, pp. 2268–2286. Berlin: Springer-Verlag.
- Tremonte P., Tipaldi L., Succi M., Pannella G., Falasca L., Capilongo V., Coppola R., Sorrentino E. (2014). Raw milk from vending machines: Effects of boiling, microwave treatment, and refrigeration on microbiological quality. *Journal Dairy Science*, 97, 3314-3320.
- Vadivambal R., Jayas D. S. (2010). White NDG. Disinfestation of stored corn using microwave energy. *Agriculture and Biology Journal of North America*. 1:18–26
- Vally H., Misso N. (2012). Adverse reactions to the sulphite additives. *Gastroenterology and Hepatology. Bed to Bench*. 5(1):16-23.
- Velásquez A., Sanchez R. (2008). Utilización de microondas en el tratamiento de jugo de mango. *Revista Lasallista de Investigación*. Vol 5, N°2: 13-19.
- Watson, K. (1987). Temperature relations. In *The Yeasts*, Vol. 2, 2nd edn ed. Rose A.H. and Harrison, J.S. pp. 41–71 London: Academic Press.
- Zaworski P. G., Heimsch R. C. (1987). The isolation and characterization of flocculated yeasts. En G. G.Hiebsch (Ed), *Biological Research on industrial yeast III*, 185-195.
- Zeng S., Huang Q., Zhao S. (2014). Effects of microwave irradiation dose and time on Yeast ZSM-001 growth and cell membrane permeability. *Food control*, 360-367.
- Zuzuarregui A., Carrasco P., Palacios A., Julien A., Del Olmo M. (2004). Analysis of the expression of some stress induced genes in several commercial wine yeast strains at the beginning of vinification. *Journal of Applied Microbiology*. Vol 98(2), 299-307.

ANEXO I

Formulación de medios de cultivo

Todos los medios de cultivos fueron esterilizados en autoclave a 120°C durante 15 minutos.

Medio de cultivo YPD

Componentes	Cantidad para 1 L
Extracto de levadura	5,0 gr
Peptona	5,0 gr
Glucosa	40,0 gr
Agar	20,0 gr

Medio de cultivo MRS

Componentes	Cantidad para 1 L
Agar MRS	62,0 gr
Jugo de tomate (ácido pantoténico)	150,0 ml
Pimaricina	1,0 gr

Antes de autoclavar, ajustar con HCl a pH 4,5

Medio BRETT

Componentes	Cantidad para 1 L
Extracto de levadura	10,0 gr
Glucosa	10,0 gr
Agar	15,0 gr
Cloranfenicol	0,50 gr
Cicloheximida	0,050 gr
Ácido p-cumárico	0,40 gr
Etanol 96% (después de autoclave)	62,50 ml

Antes de autoclavar, ajustar con HCl a pH 4,7-5

MEDIO CARR

Componentes	Cantidad para 1 L
Extracto de levadura	5,0 gr
Agar	20,0 gr
Verde bromocresol (4,4%)	0,50 ml
Pimaricina	1,0 g/L
Etanol 96% (después de autoclave)	20,0 ml

Antes de autoclavar, ajustar con HCl a pH 4,8-5,5

MEDIO WL

Componentes	Cantidad para 1 L
Agar WL	75,0 gr
Cloranfenicol 50 µg/ml (después de autoclave)	1,0 ml

ANEXO II

Test de Kruskal-Wallis para el tiempo de tratamiento 2

Tpo 2 Tamaño muestra Promedio

A	2	9.5
B	2	3.5
H	2	6.5
L	2	9.5
P	2	9.5
S	2	12.5
Z	2	1.5

Test estadístico = 10.2857 P-Valor = 0.11312

Test de múltiples rangos para el tiempo de tratamiento 2

Método: 95% LSD

Tpo 2 Casos Media Grupos homogéneos

Z	2	0.0494997	X
B	2	0.0762584	X
H	2	0.226455	X
A	2	0.449109	XX
P	2	0.475406	XX

*“Aplicación de microondas para la reducción de las poblaciones de microorganismos en mosto de uva”
Lopez Gresta, Juliana*

L	2	0.484978	XX
S	2	0.768513	X

Contraste	Diferencia	+/- Límites
-----------	------------	-------------

A - B	0.372851	0.457703
A - H	0.222654	0.457703
A - L	-0.0358694	0.457703
A - P	-0.0262975	0.457703
A - S	-0.319404	0.457703
A - Z	0.399609	0.457703
B - H	-0.150197	0.457703
B - L	-0.40872	0.457703
B - P	-0.399148	0.457703
B - S	*-0.692254	0.457703
B - Z	0.0267587	0.457703
H - L	-0.258523	0.457703
H - P	-0.248951	0.457703
H - S	*-0.542057	0.457703
H - Z	0.176956	0.457703
L - P	0.00957197	0.457703
L - S	-0.283534	0.457703
L - Z	0.435479	0.457703
P - S	-0.293106	0.457703
P - Z	0.425907	0.457703
S - Z	*0.719013	0.457703

* indica diferencia estadísticamente significativa.

ANEXO III

Test de Kruskal-Wallis para el tiempo de tratamiento 3

Tpo 3 Tamaño muestra Promedio

A	2	10.5
B	2	1.5
H	2	4.5
L	2	10.5
P	2	8.0
S	2	13.0
Z	2	4.5

Test estadístico = 11.7143 P-Valor = 0.0686549

Test de múltiples rangos para el tiempo de tratamiento 3

Método: 95% LSD

Tpo 3 Casos Media Grupos homogéneos

B	2	0.00000467929	X
Z	2	0.0000332504	X
H	2	0.0000568321	X
P	2	0.0164984	X
L	2	0.10933	XX
A	2	0.109963	XX
S	2	0.205079	X

Contraste Diferencia +/- Límites

"Aplicación de microondas para la reducción de las poblaciones de microorganismos en mosto de uva"
Lopez Gresta, Juliana

A - B	0.109959	0.141901
A - H	0.109907	0.141901
A - L	0.000633176	0.141901
A - P	0.0934651	0.141901
A - S	-0.0951157	0.141901
A - Z	0.10993	0.141901
B - H	-0.0000521528	0.141901
B - L	-0.109326	0.141901
B - P	-0.0164937	0.141901
B - S	*-0.205074	0.141901
B - Z	-0.0000285712	0.141901
H - L	-0.109273	0.141901
H - P	-0.0164415	0.141901
H - S	*-0.205022	0.141901
H - Z	0.0000235817	0.141901
L - P	0.0928319	0.141901
L - S	-0.0957488	0.141901
L - Z	0.109297	0.141901
P - S	*-0.188581	0.141901
P - Z	0.0164651	0.141901
S - Z	*0.205046	0.141901

* indica diferencia estadísticamente significativa.

ANEXO IV

Test de Kruskal-Wallis para el tiempo de tratamiento 4

Tpo 4 Tamaño muestra Promedio

A	2	6.5
B	2	1.5
H	2	8.0
L	2	13.5
P	2	6.5
S	2	11.5
Z	2	5.0

Test estadístico = 11.0286 P-Valor = 0.0874975

Test de múltiples rangos para el tiempo de tratamiento 4

Método: 95% LSD

Tpo 4 Casos Media Grupos homogéneos

B	2	0.0000023208	X
Z	2	0.00000734194	X
P	2	0.00000905671	X
A	2	0.0000098136	X
H	2	0.0000127145	X
S	2	0.00110723	X
L	2	0.0017912	X

Contraste Diferencia +/- Límites

*“Aplicación de microondas para la reducción de las poblaciones de microorganismos en mosto de uva”
Lopez Gresta, Juliana*

A - B	0.0000074928	0.000601833
A - H	-0.00000290086	0.000601833
A - L	*-0.00178138	0.000601833
A - P	7.5689E-7	0.000601833
A - S	*-0.00109741	0.000601833
A - Z	0.00000247166	0.000601833
B - H	-0.0000103937	0.000601833
B - L	*-0.00178887	0.000601833
B - P	-0.00000673591	0.000601833
B - S	*-0.00110491	0.000601833
B - Z	-0.00000502114	0.000601833
H - L	*-0.00177848	0.000601833
H - P	0.00000365775	0.000601833
H - S	*-0.00109451	0.000601833
H - Z	0.00000537252	0.000601833
L - P	*0.00178214	0.000601833
L - S	*0.000683968	0.000601833
L - Z	*0.00178385	0.000601833
P - S	*-0.00109817	0.000601833
P - Z	0.00000171477	0.000601833
S - Z	*0.00109989	0.000601833

* indica diferencia estadísticamente significativa.