



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza



Trabajo Fin de Grado en Veterinaria

Aplicación de la tecnología de Pulsos eléctricos de Alto Voltaje (PEAV) para el control de los microorganismos alterantes del vino

Application of Pulsed Electric Fields (PEF) to control spoiling microorganisms of wine

Autor/es

Pablo Gracia Pardo

Director/es

Javier Raso Pueyo

Índice:

1. Resumen / Abstract:	2
2. Introducción:	3
2.1 Situación actual del sector del vino:	3
3. Justificación y objetivos:	5
4. Metodología:	5
5. Resultados y discusión:	7
5.1 Proceso de elaboración de vino:	7
5.1.1 Etapas previas y recepción:	8
5.1.2 Despalillado, estrujado y sulfitado:	9
5.1.3 Fermentación alcohólica:	9
5.1.4 Descube:	10
5.1.5 Fermentación maloláctica:	10
5.1.6 Estabilización:	11
5.1.7 Crianza y embotellado:	11
5.2 Alteración microbiana:	12
5.2.1 Problemas del SO₂:	14
5.3 Pulsos eléctricos de alto voltaje:	16
5.3.1 Mecanismo de acción:	17
5.3.2 Aspectos técnicos:	18
5.3.3 Ruptura dieléctrica:	21
5.3.4 Circuito de un equipo de PEAV:	21
5.3.5 Resistencia microbiana al tratamiento PEAV:	22
5.3.6 Aplicación de PEAV en vino:	23
5.3.7 Análisis económico del uso de los PEAV:	28
5.4 Optimización de los parámetros de los pulsos eléctricos de alto voltaje en el laboratorio sobre un vino tinto comercial:	29
6. Conclusiones:	34
7. Valoración personal:	35
8. BIBLIOGRAFÍA:	36

1. Resumen / Abstract:

Resumen: La presencia de microorganismos alterantes durante la elaboración del vino es una de las principales problemáticas de la industria vinícola ya que genera numerosas pérdidas económicas, especialmente cuando se generan cambios sensoriales que afectan la calidad del vino final. Actualmente las técnicas que se aplican para su control son la ampliamente utilizada adición de dióxido de azufre (SO₂) y la filtración esterilizante. Sin embargo, la adición de SO₂ a pesar de ser muy eficaz puede generar problemas de salud en los consumidores sensibles por lo que las bodegas están muy interesadas en su reducción o eliminación. Por otro lado, la filtración puede afectar a las propiedades sensoriales de los vinos y no ofrece una eficacia total en la eliminación de estos microorganismos alterantes. Por ello, recientemente se ha incrementado la búsqueda de nuevas técnicas o métodos para una mejora en el control de bacterias y levaduras alterantes en el vino sin afectar a sus propiedades sensoriales. Entre ellas la tecnología de Pulsos Eléctricos de Alto Voltaje (PEAV) se ha demostrado ampliamente eficaz en la inactivación de formas vegetativas de bacterias y levaduras alterantes presentes en el vino en diferentes etapas de su proceso de elaboración.

Abstract: Spoiling microorganisms in winemaking is one of the main problems in this sector. If a final wine is altered there are a lot of economic losses involved due to a lack of quality, especially when sensorial alterations occur. Nowadays, the leading techniques required for its control are the addition of sulfur dioxide (SO₂) and sterilizing filtration. However, these techniques are not foolproof, sometimes spoiling microorganism manage to spoil the wine. Moreover, SO₂ presence can generate health problems in sensitive customers, so the wineries are very interested in reducing its use. On the other hand, filtration problems are related to sensory aspects and a lack of antimicrobial efficacy. Therefore, new technologies are being investigated to combat spoilage on wine at the same time as preserving wine's sensorial characteristics. Between them, Pulsed Electric Fields (PEF) has been shown highly effective in the inactivation of bacterias and yeast present in wine.

2. Introducción:

El vino es una bebida con más de 7000 años de historia. Su elaboración ha ido evolucionando y se ha enfrentado a diversos problemas a lo largo del tiempo. Aunque este producto ha acompañado a la humanidad desde hace milenios, los fundamentos y procesos detrás de su elaboración fueron descubiertos el siglo pasado. Fueron ciencias como la microbiología y la bioquímica las primeras ciencias implicadas en el estudio de los procesos relacionados con el vino hasta llegar a formar una rama especializada denominada enología. La enología es el conjunto de conocimientos relativos a la elaboración del vino (RAE, 2020).

2.1 Situación actual del sector del vino:

El sector del vino puede parecer estable debido a las grandes cantidades de hectolitros que se producen, pero, como se muestra en la figura 1, debido a que la producción de uvas es altamente dependiente de las condiciones climáticas se observa importantes variaciones en la cantidad de vino producido anualmente. Lo que se suele mantener más estable es el nivel de consumo de vino como se muestra en la figura 2.

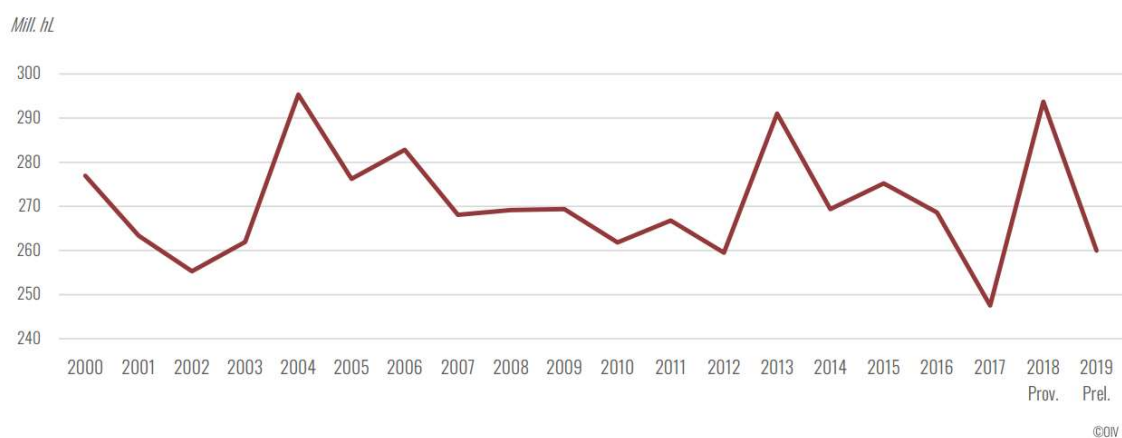


Figura 1: Producción de vino a nivel Mundial. Obtenido de la Organización Internacional de la Viña y el Vino (OIV)

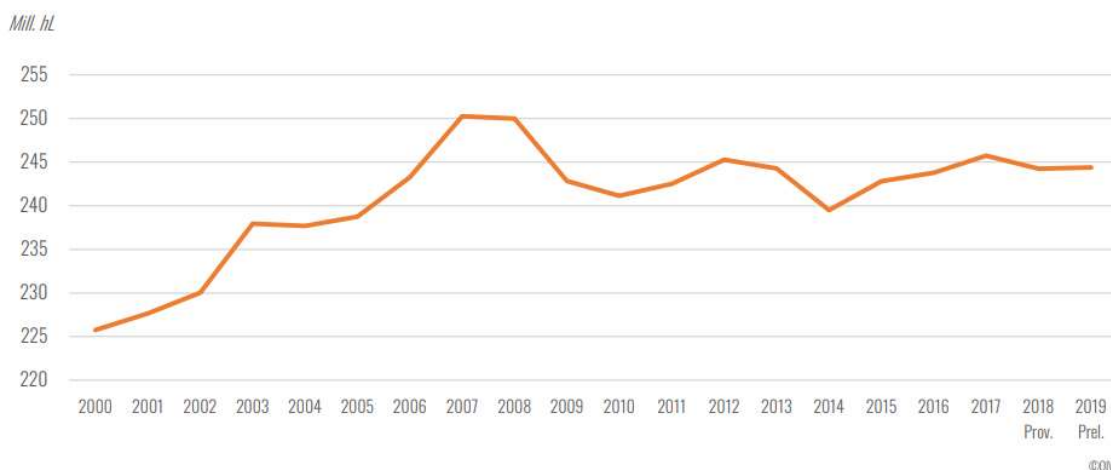


Figura 2: Consumo de vino a nivel Mundial. Obtenido de la Organización Internacional de la Viña y el Vino (OIV)

Según la Organización Internacional de la Viña y el Vino (OIV) la superficie del viñedo mundial se estima entorno a los 7,4 millones de hectáreas, las cuales permanecen estables desde 2016. En el análisis de las gráficas mostradas anteriormente señala una marcada disminución (11,5%) en la producción en el año 2019 al compararla con la históricamente alta producción del año 2018. Este valor no es alarmante porque, por el momento, simplemente es una vuelta al valor medio de producción. El consumo de vino apenas se ha visto modificado, pero si se observa un aumento del 0,1% con respecto al año anterior. Al parecer, lo que está experimentando un aumento tanto en volumen como en valor económico es la exportación mundial de vino.

Aun así, el impacto que ha tenido el Covid-19 en todos los sectores no ha dejado al sector vinícola atrás. En palabras de Pau Roca, director general de la OIV, el 23 de 2020 actualmente no se puede saber a ciencia cierta hasta qué punto ha afectado o afectará la situación actual de la pandemia:

“En esta fase inicial, la información y los datos estadísticos disponibles son insuficientes para proporcionar un pronóstico preciso y poder anticipar el escenario del sector vitivinícola en el futuro. Sin embargo, gracias al contacto permanente con los Estados miembros de la Organización, la OIV tiene cierta información cualitativa a su disposición.”

Las bodegas han tenido que adaptarse y cambiar de estrategia durante este periodo, la hostelería ha permanecido cerrada y, por lo tanto, la distribución de los vinos se ha visto

reducida. Se han establecido medidas provisionales de marketing en las cuales el objetivo era alcanzar el consumidor final fomentando la venta directa online. En ocasiones estas medidas iban acompañadas de descuentos que, a pesar de no ser lo más óptimo, eran necesarios para alcanzar la liquidez (Manso, 2020). Aunque se ha observado una cierta recuperación de la costumbre de su consumo en el hogar y se espera que se mantenga esta tendencia, todavía no hay datos concluyentes al respecto. El enoturismo es uno de los valores a tener en cuenta, y todavía hay bastante incertidumbre sobre el futuro próximo y sobre cómo esta pandemia afectará a este parte del sector.

El sector vinícola, como tantos otros, se ha visto fuertemente alterado y por lo tanto la OIV tiene que adaptar el plan Estratégico que se había aprobado por la Asamblea General en octubre de 2019.

3. Justificación y objetivos:

En el proceso de elaboración del vino, los principales métodos de control microbiano tienen algunas deficiencias. Entre ellas que pueden llegar a afectar a la calidad sensorial del vino, no son siempre completamente eficaces en todos los tipos de vinos e incluso, como es el caso del SO₂, pueden llegar a afectar a la salud del consumidor. Es por ello que se lleva más de una década investigando nuevas posibles tecnologías que sustituyan o mejoren las ya presentes. La tecnología de pulsos eléctricos de alto voltaje se lleva usando varios años en la industria alimentaria, y se está intentando implementar en el sector enológico.

El objetivo del presente trabajo es describir el conocimiento actual sobre la tecnología de pulsos eléctricos de alto voltaje en relación a su potencial para el control de microorganismos alterantes en las diferentes etapas del proceso productivo del vino. Así mismo, se pretende obtener una conclusión global sobre las fortalezas y limitaciones de la tecnología para su futura implementación industrial con el objetivo de ser una alternativa a las estrategias actuales.

4. Metodología:

Para la realización de este Trabajo de Fin de Grado se han empleado diversas bases de datos bibliográficas para llevar a cabo la búsqueda de información. Entre ellas destacan Alcorze,

PubMed, ScieDirect, Wiley Online Library y Google Scholar. Además, se han empleado las páginas oficiales de entidades como La Organización Internacional de la Viña y el Vino (OIV) y de la Unión Europea, más en concreto EUR-Lex para la búsqueda de algunos reglamentos.

Para comprender el proceso de elaboración del vino, he visualizado el documental por capítulos sobre el proceso de elaboración del vino visto desde una bodega en el canal de YouTube de Vinopediatv y para entender la problemática de la alteración microbiana del vino he leído la Tesis Doctoral – “*Aplicación de Pulsos Eléctricos de Alto Voltaje en el Vino Tinto*, (2009)” cuyo autor es Eduardo Puértolas.

El primer buscador utilizado fue Alcorce, con las palabras clave: “Pulsos Eléctricos de Alto Voltaje + Vino”. Con esa búsqueda se encontraron un total de 10 resultados, de los cuales 4 tenían un título relacionado con el trabajo, tras acceder a ellos 2 eran de acceso restringido y los otros dos al leer el resumen trabajaban con tecnologías emergentes diferentes a los PEAV por lo que se desecharon.

La siguiente búsqueda fue enfocada a ver en qué se estaba trabajando con pulsos eléctricos y fue con las palabras clave: “pulsos eléctricos de alto voltaje” de esta búsqueda se obtuvieron 80 resultados y la lectura de los títulos sirvió para hacerse una idea de en qué se estaban empleando este tipo de tratamientos y la cantidad de información en español de la que se disponía. Con esta búsqueda se obtuvieron un par de artículos relacionados con la inactivación microbiana a nivel general y fundamentos de la tecnología de Pulsos de Alto Voltaje, pero no enfocados en el vino.

Tras haber buscado en español, la siguiente búsqueda fue enfocada a textos en inglés y con las palabras clave de: “pulsed electric fields + wine” en Alcorce aparecen 646 resultados. La inmensa mayoría de los artículos tenían títulos referidos al tratamiento del vino mediante campos eléctricos, pero enfocados en la extracción fenólica y relacionados con la transferencia de masa de esta tecnología, lo cual no es objeto de estudio en este trabajo. Para limitar la búsqueda se añadió a las palabras clave: “pulsed electric field + wine + SO₂ alternative” y se encontraron 12 resultados, de los cuales uno resultó ser muy útil (“*Alternative Methods to SO₂ for Microbiological Stabilization of Wine*, (Tiziana et al., 2019)”) para encajar los PEAV dentro del contexto de alternativas para el SO₂ en la elaboración del vino.

En PubMed con las mismas palabras clave de “pulsed electric fields se encontraron 33 resultados, varios relacionados con el vino y en concreto 5 que además trataban el tema de la

inactivación microbiana. Otra combinación de palabras clave bastante útil fue: “Microbian inactivation + wine + PEF” con la cual se obtuvieron 35 resultados en Alcorze y 272 en ScienceDirect.

Los buscadores de Wiley Online Library y ScienceDirect se utilizaron para la búsqueda de artículos que aparecían citados en los documentos anteriormente encontrados, de esta forma se encontraron nuevos artículos para completar el trabajo.

5. Resultados y discusión:

5.1 Proceso de elaboración de vino:

El vino es la bebida resultante de la fermentación alcohólica, completa o parcial de la uva fresca, estrujadas o no del mosto de uva de la uva mediante la fermentación alcohólica de su mosto o zumo (Beltrán, 2011). El proceso de elaboración del vino, como tal, comienza en la recepción de la uva (figura 3), pero no cualquier uva sirve para elaborar cualquier vino.



Figura 3: Diagrama de flujo de las principales fases del proceso de elaboración de vino

5.1.1 Etapas previas y recepción:

Hay que considerar que, en gran medida, las características finales del vino van a depender de las características que tenía la uva cuando se empezó a procesar. Las labores llevadas a cabo antes de llegar a la bodega son importantes. Entre estos procesos cabe destacar la elección de la viña y la variedad de uva, adecuándola tanto para la zona en la que se va a cultivar como para la producción del vino a la que se va a destinar. Todos los trabajos de labranza y cuidado de la viña tienen que estar muy controlados ya que la calidad de la uva depende de estas tareas previas.

Antes incluso de la recepción de la uva es muy importante el preparar la vendimia y realizar un clareado para llevar el resto de la viña hasta las características que interesan (Vinopediatv, 2010a). Estas características deben ser monitorizadas conforme se acerca la temporada de recogida de la uva para asegurar que la uva se está recogiendo en el momento más óptimo. Esto se debe a que cada año, en función de la climatología, la uva tiene pequeñas variaciones en su composición. Por tanto, no se puede establecer un día concreto de recogida porque el tiempo que tarda la uva en alcanzar su punto óptimo de maduración depende de las condiciones climáticas (Beltrán, 2011).

Para conocer el momento óptimo de la vendimia y antes de comenzar la recogida en masa de la uva se deben tomar muestras representativas de algunos granos. En el laboratorio se analizan características básicas como el pH, la acidez y los grados Brix (concentración de azúcar); los cuales son indicadores de madurez (Ribéreau-Gayon, 2006).

Una vez determinada la fecha de recogida de la uva se procede a la vendimia y se transporta hasta la bodega. Allí, se revisan otros indicadores para determinar la calidad de la uva como es la densidad del mosto, el nitrógeno fácilmente asimilable (FAN), el color, el contenido en polifenoles y el estado sanitario de la uva.

Otro parámetro que se analiza es la acidez total la cual se considera aceptable cuando se encuentra entorno a los 4 y 15 g/L de ácido tartárico según la variedad y zona de cultivo (Ribéreau-Gayon, 2006). El pH normal se sitúa entre 3 y 4, siendo normalmente entre 3,4 y 3,7. Los grados Brix son medibles con un refractómetro bien calibrado y los valores entre 19 y 24 son los requeridos para obtener las concentraciones alcohólicas deseadas (Puértolas, 2009).

El FAN es muy importante desde el punto de vista de la fermentación alcohólica ya que si este parámetro es inferior a 200 mg/L pueden aparecer problemas en el crecimiento de las

levaduras responsables de esta etapa (Ribéreau-Gayon, 2006). Se puede llegar a corregir, en caso de ser necesario, con la adición de sustancias nitrogenadas respetando lo legalmente establecido.

5.1.2 Despalillado, estrujado y sulfitado:

La uva se recoge en racimos enteros por lo que en esta fase se elimina el raspón, se estruja la uva para obtener el mosto y se añade anhídrido sulfuroso (SO₂). El mosto o zumo exprimido de uva, antes de la fermentación, es susceptible del crecimiento bacteriano, y la presencia del SO₂ supone una barrera para aquellos microorganismos que se encuentran de forma ubicuitaria sobre la uva, especialmente las bacterias lácticas (Puértolas, 2009). Esto, además, facilita el desarrollo de los cultivos iniciadores añadidos para obtener la fermentación deseada.

El SO₂ tiene más funciones además de sus cualidades antisépticas, es un fuerte antioxidante y facilita la extracción de las sustancias fenólicas (Salaha et al., 2008). Estas cualidades hacen que su presencia sea interesante a lo largo de las etapas de elaboración. Si a lo ya comentado se le añade la facilidad de uso del compuesto, se entiende que la adición de SO₂ haya perdurado hasta nuestros días, siendo en la actualidad, la técnica de control microbiano más generalizada en las bodegas.

5.1.3 Fermentación alcohólica:

Antes de la fermentación alcohólica puede realizarse limpieza del mosto en algunos vinos, en el caso del vino blanco se establece un reposo de 24-48h en presencia de enzimas que modifican el color zumo de melocotón inicial del mosto a uno más verde lima cuando se extrae por la parte superior del depósito. (Robles, 2005)

En la etapa de fermentación los azúcares reductores del mosto son transformados parcial o totalmente en alcohol a partir de los procesos fermentativos de levaduras del género *Saccharomyces*. Es habitual el uso de cultivos starter para este proceso otorgando control y homogeneidad sobre el proceso. Sin los cultivos starter la fermentación se realizaría con la flora microbiana presente ya en la uva, la cual es diferente cada año y en ocasiones podría suponer la adición de aromas no deseables. Con la siembra de levaduras conseguimos que se establezca en el depósito una población de levaduras conocidas que sabe que no dan problemas durante la fermentación ni tampoco generan aromas desagradables al vino. (Vinopediatv, 2010c)

Durante los 7 a 20 días que suele durar este proceso es necesario realizar un seguimiento a mediante la monitorización de la temperatura de fermentación y la densidad del mosto. Temperaturas demasiado elevadas darían lugar a fermentaciones no deseables y pérdidas de la calidad del vino final.

Durante la fermentación se realizan procesos para homogeneizar el contenido de los depósitos, ayudando a una correcta fermentación. A estos procesos se les denomina remontados y pueden ser de distintos tipos, pero todos tienen como objetivo evitar zonas con mayor temperatura o zonas heterogéneas en respecto a la concentración de azúcares. Además, para evitar el crecimiento de bacterias acéticas en la parte superior de los depósitos se suelen realizar vaciados del líquido de los depósitos para después verterlo de nuevo sobre la superficie del depósito. Otra opción es romper “el sombrero”, formado por el desplazamiento de los hollejos a la parte superior de los depósitos, mediante procesos mecánicos. El remontado pone en contacto el mosto y los hollejos lo que favorece la transferencia de masa. A veces, el remontado es abierto, esto significa que el líquido se airea para luego volverlo a introducir, esto ayuda a que las levaduras crezcan rápidamente al principio de la fermentación (Robles, 2005). Estas operaciones ayudan a la extracción fenólica y a que todos los componentes del mosto puedan macerarse.

La fermentación se considera terminada tras un descenso de la densidad. Desde una densidad inicial de 1100 g/L se va disminuyendo progresivamente hasta que se estabiliza entorno a los 990 g/L (Puértolas, 2009).

5.1.4 Descubre:

Una vez terminada la maceración y fermentación es el momento de vaciar los depósitos para obtener el vino. Para ello, se realiza un sangrado desde la parte inferior del depósito y se obtiene así el denominado vino yema, vino considerado de más calidad. Después se procede al prensado de los hollejos y se obtiene más vino, en este caso denominado vino prensa, cuya calidad será menor cuanto más intenso sea el prensado (Puértolas, 2009)

5.1.5 Fermentación maloláctica:

El objetivo de esta segunda fermentación es disminuir la acidez total del vino y estabilizarlo microbiológicamente, ya que el ácido málico es fácilmente asimilable por multitud de microorganismos (Izquierdo-Cañas et al., 2008). Además, se obtiene un mejor sabor en el vino al transformar el ácido málico del vino en ácido láctico puesto que este segundo es más

agradable en la boca. Además, realizar este proceso de forma controlada evita que se produzca más tarde durante la crianza y se genere turbidez en las botellas. (Vinopediatv, 2011a).

5.1.6 Estabilización:

Aquí se engloban una serie de procesos que determinan las propiedades finales del vino antes de pasar a la crianza o durante la misma. La clarificación es un proceso de filtración donde se obliga a pasar al vino por una serie de filtros sometándolo a altas presiones. Como el nombre del proceso indica, se obtiene un vino más claro y limpio que está listo para comenzar ser embotellado.

En la crianza en bodega se realiza el trasiego, proceso por el cual el vino se estabiliza de forma natural. Consiste en el drenaje y lavado de las bodegas cada 4-6 meses, el vino se vuelve a reintroducir en la bodega tras haber eliminado la suciedad y sedimentos. (Robles, 2005).

Además, hay otros tratamientos de estabilización que también se aplican comúnmente en la bodega, destacan la clarificación por encolado, la estabilización por el frío, y la centrifugación. Todos con el objetivo de reducir las partículas en suspensión del vino y disminuir así la turbidez del mismo.

5.1.7 Crianza y embotellado:

La crianza del vino es el último proceso llevado a cabo y permite estabilizar las características del vino mediante un proceso de envejecimiento. Hay crianzas de diferentes tipos según el vino final que se quiera obtener y según los procedimientos llevados a cabo. Desde el punto de vista tecnológico se aprecia la crianza oxidativa y la reductora, en función de si existe o no presencia de oxígeno durante esta fase de elaboración. La crianza en bodega (oxidativa) además proporciona un intercambio de aromas entre el vino y esta que le confiere un cierto sabor a madera. Tras la crianza en la bodega se realizaría el embotellado donde al ser un cierre hermético se produciría una crianza reductora (Puértolas, 2009).

Los tiempos de crianza dependen de la categoría y características de cada vino en concreto, pero se establece mediante la legislación el tiempo mínimo de crianza en función de la denominación comercial que se le quiera dar.

A las bodegas les interesa tener un producto homogéneo que el consumidor pueda identificar como marca. Todos los años puede haber modificaciones de sabores, aromas,

texturas y otras características, es por eso que un enólogo se encarga de realizar una cata mezclando incluso vinos de diferentes años hasta obtener el vino que la bodega quiere embotellar para comercializar. Este proceso se denomina ensamblaje y una vez establecida la mezcla deseada se prepara a gran escala y se embotella. Tras esto se dispone a colocar el etiquetado, embalar y distribuir el vino final (Vinopediatv, 2011d).

5.2 Alteración microbiana:

Como se ha comentado anteriormente, en la recepción de la uva no solo se contemplan parámetros fisicoquímicos de la uva, sino que también se analiza su estado sanitario, no interesan uvas con mohos o levaduras. Tradicionalmente era esta microbiota, presente de forma natural en la uva, la que fermentaba el vino. Sin embargo, conforme han evolucionado las técnicas de elaboración se ha optado por el uso de cultivos iniciadores. Esto permite tener un mayor control sobre la fermentación y las características organolépticas del producto final. El desarrollo de la flora autóctona de la uva puede provocar la aparición de aromas no deseados en el vino.

Las principales alteraciones en el vino pueden dividirse en dos grupos, las producidas por levaduras y las producidas por bacterias. La siguiente tabla recoge las principales alteraciones microbianas del vino:

Tabla 1: Principales alteraciones microbianas del vino tinto. (Puértolas, 2009)

<i>Alteración microbiana</i>	<i>Agente causal</i>	<i>Efecto</i>
<i>Alteraciones producidas por levaduras</i>		
“Gusto a ratón”	<i>Dekkera/Brettanomyces</i>	Alteración del aroma y del sabor
“Olor a cuero”	<i>Dekkera/Brettanomyces</i>	Alteración del aroma
“Flores” del vino	<i>Pichia membranifaciens, Candida mycoderma, Hansenula anomala y Zygosaccharomyces acidifaciens</i>	Formación de velo superficial y caída del grado alcohólico y de la acidez total
Refermentación del vino	<i>Saccharomyces</i>	Aumento del grado alcohólico, pérdida de azúcares y turbidez
<i>Alteraciones producidas por bacterias</i>		
Picado láctico	<i>Bacterias lácticas (Lactobacillus)</i>	Aumento de la acidez, turbidez, color y aroma alterado y sabor ácido o agrídulce
“El ahilado”	Bacterias lácticas	Aspecto filante o aceitoso
“La vuelta”	Bacterias lácticas	Turbidez y color alterado
Enfermedad del amargor	Bacterias lácticas	Turbidez, color alterado y sabor amargo
Picado acético	<i>Bacterias acéticas (Acetobacter y Gluconobacter)</i>	Aumento de acidez, disminución del grado alcohólico, avinagrado y formación de velo

Es importante, por lo tanto, eliminar cualquier opción de crecimiento de estos microorganismos, no solo por las alteraciones que hemos visto que producen sino porque también podrían llegar a producir un efecto negativo en las poblaciones de levaduras que añadamos como cultivo starter (Puértolas, 2009).

Es importante el estado sanitario de todo el proceso, aunque la recepción de la uva sea el punto de entrada más obvio de los microorganismos hay otras fases donde también el vino se puede contaminar. Durante la crianza el vino va a estar durante varios meses, incluso años, almacenado en barricas o botellas. Una limpieza deficiente en la bodega puede contaminar el vino y echar a perder todo el trabajo realizado.

Las pérdidas económicas por estos agentes alterantes son muy importantes, es por eso que en las bodegas emplean diferentes técnicas para luchar contra los microorganismos alterantes. Entre éstas, como ya se ha comentado, la más destacada e importante es la adición de anhídrido sulfuroso (SO_2). Este compuesto permite controlar el crecimiento de un gran número de microorganismos perjudiciales y, como ya se ha indicado, favorece la extracción de los compuestos fenólicos y tiene cierta actividad antioxidante (Salaha et al., 2008; Tiziana Lisanti, et al., 2019). Todo ello, añadido a su facilidad de uso, ha hecho que la adición de SO_2 haya perdurado hasta nuestros días siendo, en la actualidad, la técnica de control microbiano más generalizada en las bodegas.

5.2.1 Problemas del SO_2 :

A pesar de todos los efectos positivos del anhídrido sulfuroso, esta sustancia, en dosis elevadas, puede provocar la aparición de olores y sabores no deseados (Guerrero y Cantos-Villar, 2015) y, lo que es más importante, en personas especialmente sensibles al mismo, ciertos efectos tóxicos (dermatitis, urticaria, dolor abdominal, diarrea, broncoconstricción o anafilaxis) (Vally et al., 2009; Vally et al., 2012). La propia Organización Mundial de la Salud (OMS) recomendó limitar su uso o sustituirlo por otra sustancia o técnica sin efectos perjudiciales en la salud humana. Además, a pesar de su uso generalizado, las alteraciones microbianas siguen generando grandes pérdidas económicas en las bodegas. Por todo ello, en los últimos años, se está realizando un gran esfuerzo con el fin de sustituir el uso del SO_2 por otras técnicas más efectivas o, cuanto menos, desarrollar nuevas estrategias que permitan reducir las dosis utilizadas del mismo (Suárez et al., 2007).

El anhídrido sulfuroso está regulado en la Comunidad Europea por el Reglamento (UE) 2019/934 de la Comisión, de 12 de marzo de 2019, por el que se completa el Reglamento (UE) nº 1308/2013 del Parlamento Europeo y del Consejo en lo que se refiere a las zonas vitícolas donde el grado alcohólico pueda verse incrementado, las prácticas enológicas autorizadas y las restricciones aplicables a la producción y conservación de los productos vitícolas, el porcentaje mínimo de alcohol para subproductos y la eliminación de estos, y la publicación de las fichas de

la OIV. En el Anexo I en el apartado B se establecen los límites máximos para este producto. Hay excepciones en función del tipo de vino y particularidades concretas, pero por regla general para los vinos tintos el límite se encuentra en 150 mg/L y en 200 mg/L para el caso de los vinos blancos y rosados. En este reglamento también se recogen las prácticas enológicas autorizadas, desde tratamientos hasta adición de compuestos enológicos. Aún con estos límites establecidos la OMS sigue recomendando reducir su uso por los efectos negativos sobre la salud. (Guerrero y Cantos-Villar, 2015)

La mayoría de las alternativas buscan sustituir las características antioxidantes y antimicrobianas del SO₂, pero hasta ahora sin mucho éxito (Tiziana et al., 2019).

Por el momento se ha tratado de buscar sustancias químicas que sustituyan el papel inhibidor de microorganismos del SO₂, pero se hace complicado atendiendo a que una de las ventajas del SO₂ es que las bacterias presentan la mayor sensibilidad, y después las levaduras que no son del género *Saccharomyces*. Esto favorece el crecimiento de las levaduras que nos interesan para la fermentación del vino. La mayoría de las nuevas sustancias aprobadas por la UE se están empleando, pero se complementan con el SO₂ a dosis mucho más bajas (Idareta, M., 2016; Tiziana, et al., 2019) por lo que su uso sigue estando presente.

Algunos compuestos propuestos son proteínas clarificantes, pero afectaban al color y el aroma; Bacteriocinas, que actualmente no está permitido su uso; Lisozimas, pero no son de amplio espectro y solo afectan a bacterias Gram positivas; o incluso el uso de levaduras transgénicas, las cuales tienen la limitación de competir solo sobre otras levaduras y además de no estar autorizadas (Puértolas, 2009).

Otros métodos que se han desarrollado son procesos físicos como los que se emplean altas presiones, ultrasonidos, radiación ultravioleta, microondas y pulsos eléctricos de alto voltaje. Algunos problemas de estas tecnologías es que pueden afectar a las cualidades organolépticas del vino durante el tiempo de crianza o acelerando procesos degradativos. Otro problema es que al tratarse de innovaciones en el sector muchos de ellos están en proceso experimental y los datos que se están obteniendo todavía no se consideran fiables por la escasez de los mismos. En la mayoría de casos se ha demostrado la eficacia a nivel de laboratorio, pero no están validados en la elaboración del vino o no se han desarrollado estudios acerca de las consecuencias organolépticas que pudieran producir estos tratamientos. (Puértolas, 2009; Tiziana, et al., 2019)

5.3 Pulsos eléctricos de alto voltaje:

En la búsqueda de técnicas que permitan procesar los alimentos sin alterar sus características organolépticas surge la tecnología de la aplicación de pulsos eléctricos de alto voltaje (PEAV).

Los tratamientos de PEAV consisten básicamente en la aplicación de campos eléctricos de alta intensidad y corta duración (microsegundos) a un producto colocado entre dos electrodos. Estos tratamientos provocan la permeabilización de las membranas celulares sin aumentar sustancialmente la temperatura del alimento. Cimentándose en este fenómeno denominado electropermeabilización, la tecnología posee diversas aplicaciones potenciales en la industria alimentaria, como la inactivación microbiana o la mejora de los procesos de transferencia de masa.

Esta tecnología está incluida entre las tecnologías de tratamiento no térmico de los alimentos, tratando de sustituir a las de tratamiento térmico las cuales en el caso del vino afectarían a las características organolépticas de este (Puértolas, 2009).

Esta tecnología en ocasiones no puede competir con las técnicas modernas de tratamientos térmicos a la hora de inactivar microorganismos, pero es de interés en aquellos productos que además de tener en cuenta la inactivación microbiana se busca una transferencia de masa, como podría ser en la extracción de zumos y de compuestos intracelulares, la aceleración de procesos de deshidratación y la mejora de procesos de curado o salazón de productos cárnicos o de la pesca al favorecer la entrada de los productos al interior celular (Vorobiev y Lebovka, 2006).

La principal limitación que encuentra esta tecnología es a la hora de pasar de los ensayos experimentales en los laboratorios a su aplicación a nivel industrial. Los equipos necesarios para tratamientos a nivel comercial necesarios son uno de los factores limitantes a la hora de su implementación (Puértolas, 2009).

La permeabilización de las membranas no solo es útil en el campo de la tecnología alimentaria, sino que también son de utilidad en los campos de la biotecnología y de la genética.

En el campo alimentario, las principales aplicaciones de los PEAV se encuentran en la inducción de respuestas al estrés, inactivación microbiana en alimentos líquidos, inactivación enzimática en alimentos líquidos y la mejora de procesos de transferencia de masa (extracción

de componentes intracelulares, obtención de zumos de frutas, extracción de aceites de origen vegetal, deshidratación, curado y marinado de carnes y pescados).

5.3.1 Mecanismo de acción:

Los campos eléctricos de alto voltaje generan cambios estructurales a nivel de membrana, esto se debe al cambio de cargas producido en la membrana. A partir de un umbral las cargas de la membrana celular hacen que poros hidrofóbicos se conviertan en poros hidrofílicos y esto se aplica a toda la membrana aumentando el número y tamaño de estos últimos. (Tylewicz, 2020). Este fenómeno es lo que permite la permeabilización de la membrana y que se potencie la extracción o absorción de compuestos de interés necesarios para la optimización del procesamiento de algunos alimentos.

Una intensidad de campo eléctrico que alcance el umbral comentado producirá cambios en la estructura de la membrana celular. Una vez este tipo de tratamiento termina, la célula puede recuperar su estabilidad de membrana y se conoce con el nombre de electroporación reversible. Por el contrario, si se aplica un campo eléctrico de alto voltaje con una intensidad muy por encima del umbral se producen daños en la membrana celular. Este tipo de tratamientos no permiten que la célula se estabilice de forma inmediata tras el tratamiento haciendo que el cierre final de los poros sea dependiente de las condiciones de recuperación.

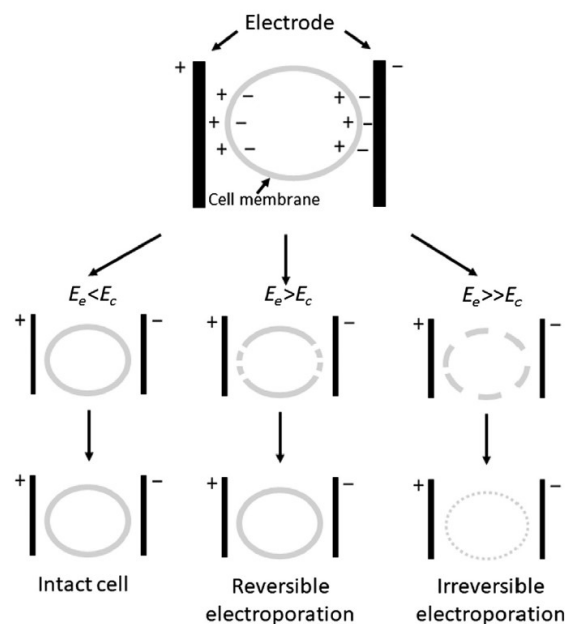


Figura 4: Esquema del mecanismo de permeabilización de la membrana celular inducido por un campo eléctrico de alto voltaje externo (Tylewicz, 2020).

Estos poros formados se pueden clasificar en transitorios (electroporación reversible) o permanentes (electroporación irreversible), fenómeno que es dependiente de la intensidad del campo eléctrico aplicado. La energía necesaria para lograr estos fenómenos se ve modificada por factores como el tipo de célula, las características de sus envolturas celulares, su tamaño, su forma, su estado fisiológico y factores genéticos (Puértolas, 2009; Tylewicz, 2020). En cualquier caso, la energía necesaria para alcanzar la electroporación irreversible siempre será superior a la requerida para lograr una electroporación reversible.

Basándose en estos conceptos se deduce que el empleo de la característica de mejora de transferencia de masa de esta tecnología requiere menos energía que la necesaria para la inactivación celular.

Para provocar la muerte celular de un microorganismo en comparación a la permeabilización reversible de una célula vegetal, se va a necesitar más energía. Esto se debe a que posee un tamaño menor y que se busca una permeabilización irreversible. Este aspecto es importante porque si necesitamos más energía, se traduce en un proceso más caro en términos económicos.

5.3.2 Aspectos técnicos:

A la hora del empleo de esta tecnología se establecen una serie de parámetros que serán los que hay que ajustar a la hora de proporcionar el tratamiento deseado. En los siguientes apartados se explican los conceptos más relevantes para entender el ajuste de los tratamientos.

Intensidad del campo eléctrico:

Este parámetro es el más importante, porque como ya se ha indicado, se necesita superar un umbral de intensidad de un determinado campo eléctrico para que tenga lugar la electroporación.

Este parámetro se define como la diferencia de potencial (V) existente entre los dos electrodos donde se coloca el alimento dividido entre la distancia entre ellos (d):

$$E = \frac{V}{d}$$

Una vez superado ese valor crítico, el incremento del campo eléctrico se asocia generalmente a un aumento de la eficacia del proceso (López et al., 2009a, 2009b; Vorobiev y Lebovka, 2006). Sin embargo, se ha constatado en células eucariotas y procariontas que por encima de un determinado valor este aumento no provoca un incremento sustancial en la eficiencia del tratamiento (Lopez et al., 2009b).

No solo basta con conocer el valor de la intensidad sino también la distribución del campo eléctrico. Interesa que sea lo más homogénea posible dentro de la cámara de tratamiento para que no se produzcan zonas de mayor temperatura ni zonas donde no se alcanzan los valores necesarios para obtener el efecto antimicrobiano.

Forma y anchura del pulso:

Los principales tipos de pulsos son los de onda cuadrada y los de caída exponencial, la principal diferencia entre ellos es la regulación o no de la descarga de los condensadores. En los pulsos de caída exponencial la descarga de los condensadores se realiza de una forma completa y no controlada. Los de onda cuadrada se mantienen durante un determinado tiempo y después caen.

Cualquiera de los dos puede ser a su vez monopolar o bipolar, cuya única implicación es que, mediante equipos más sofisticados, se consigue que los pulsos tengan polaridades alternas; siendo uno positivo, el siguiente negativo y así, sucesivamente.

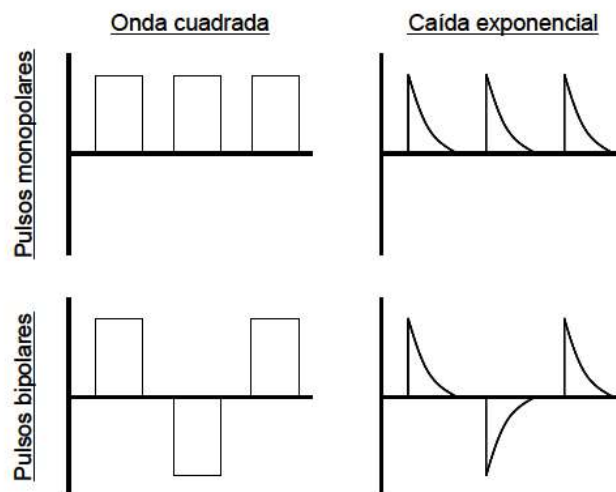


Figura 5: Formas del pulso más comunes utilizadas en los tratamientos de pulsos eléctricos de alto voltaje. (Puértolas, 2009)

Energía por pulso:

Matemáticamente esta energía se representa mediante la siguiente fórmula:

$$W = \frac{1}{2} \times C \times V^2$$

donde W es la energía almacenada en el condensador expresada en julios (J), C es la capacidad del condensador expresada en faradios (F) y V , la diferencia de potencial entre los electrodos expresada en voltios (V).

Como no se suele aplicar un único pulso sobre una muestra, el parámetro empleado para medir la energía total (W') utilizada en el proceso son normalmente los kJ/kg, esto permite comparar las energías necesarias según el producto sobre el que se apliquen. Para calcularlo se multiplica la energía de un pulso por el número total de pulsos aplicados (n) y se divide entre la masa del producto procesado (m):

$$W' = \frac{W \times n}{m}$$

Frecuencia:

La frecuencia representa el número de pulsos aplicados por unidad de tiempo. La frecuencia utilizada en este tipo de tratamientos es bastante variable pudiendo oscilar entre 1 y 5000 Hz (Puértolas, 2009).

Resistencia de la cámara de tratamiento:

La resistencia de la cámara de tratamiento determina la forma del pulso, la máxima diferencia de potencial alcanzada entre los electrodos durante la descarga del condensador, el calentamiento del producto al paso de la corriente y la configuración eléctrica del equipo (Puértolas, 2009)

Dicha resistencia se calcula mediante la fórmula:

$$R = \frac{\rho \times d}{A}$$

donde R es la resistencia de la cámara de tratamiento expresada en ohmios (Ω); ρ es la resistividad expresada en ohmios por metro (Ωm); d es la distancia entre electrodos en metros (m) y A , el área del electrodo (m^2).

La resistividad del medio es el inverso de su conductividad eléctrica, la cual se expresará en Siemens dividido por metro (S/m), aunque se suele expresar en milisiemens dividido por centímetro (mS/cm).

5.3.3 Ruptura dieléctrica:

Toda sustancia es capaz de soportar hasta una intensidad de un campo eléctrico, una vez superado este máximo la sustancia pasa a ser un conductor de corriente eléctrica. El fenómeno de transformación de una sustancia aislante a una conductora se le denomina ruptura dieléctrica.

En el procesado por PEAV se tiene que evitar la ruptura dieléctrica. En esta se forma un arco eléctrico de gran cantidad de electricidad que, además de producir el fenómeno de un rayo luminoso, produce formación de burbujas de gas y de otros productos sólidos. Este fenómeno también afecta y perjudica la calidad de los electrodos.

5.3.4 Circuito de un equipo de PEAV:

Un equipo de PEAV consta principalmente de un generador de corriente eléctrica continua de alto voltaje, uno o varios condensadores, un interruptor y en ocasiones un transformador. A esto se le añade la cámara de tratamiento y diversos aparatos de medida que proporcionen datos para comprobar los parámetros con los que estamos trabajando, algunos ejemplos son osciloscopios y sondas de temperatura.

El mecanismo funciona de la siguiente manera: el generador crea una corriente continua a partir de la alterna que le llega y carga los condensadores, que es donde se almacena la electricidad que luego se libera conforme interese. La descarga de estos condensadores se regula mediante un interruptor. Tras éste se sitúa un transformador en caso de ser necesario ampliar el voltaje de la señal. Y finalmente, se encuentra la cámara de

tratamiento a la que llega el pulso configurado y donde se forma el campo eléctrico produciendo un cierto efecto sobre la muestra.

El interruptor es de las piezas más importantes puesto que es el que permite ajustar la frecuencia de los pulsos y la anchura de estos.

Cámaras de tratamiento hay de diferentes tipos: estáticas y de flujo continuo, estas segundas son las que interesan a nivel industrial. Además, las hay de diferentes modelos según donde se posicionen los electrodos.

En el laboratorio de la universidad de zaragoza actualmente se están empleando cámaras de flujo continuo de tipo de electrodos paralelos, que tienen la gran ventaja de proporcionar campos eléctricos con una uniformidad mayor y una mayor facilidad a la hora de su cálculo (Puértolas, 2009).

5.3.5 Resistencia microbiana al tratamiento PEAV:

Además de los parámetros procesado, las características intrínsecas de los microorganismos y el medio de tratamiento (tabla 2) suponen cambios importantes en la eficacia de los PEAV.

Tabla 2: Principales parámetros que determinan la resistencia microbiana a los pulsos eléctricos de alto voltaje. Adaptado de Wouters et al. (2001a). (Puértolas, 2009)

<i>Características microbianas</i>	<i>Características del medio de tratamiento</i>	<i>Parámetros del proceso</i>
Tipo de microorganismo	Constitución	Intensidad del campo eléctrico
Tamaño	pH	Tiempo de tratamiento
Forma	Actividad de agua	Forma del pulso
Cepa microbiana	Conductividad eléctrica	Energía aplicada
Fase de crecimiento		Tempeartura
Condiciones de cultivo		
Condiciones de recuperación		

La eficacia de los PEAV para la inactivación microbiana depende de numerosos factores, algunos son intrínsecos al propio microorganismo como la forma, tamaño, tipo de microorganismo, cepa, fase de crecimiento, etc. (Wouter et al., 2001; Puligundla et al., 2018;

González-Arenzana et al., 2015). Los microorganismos también dependen del medio en el cual se encuentran. Al igual que no todos pueden crecer en los mismos sustratos debido a limitaciones como es el pH, la actividad de agua o componentes del medio, la supervivencia de los microorganismos tras el tratamiento también se ve modificada (González-Arenzana et al., 2015). A parte, a la hora de aplicar un tratamiento, de PEAV en este caso, se tienen en cuenta la intensidad del campo eléctrico, el tiempo de tratamiento, la forma y anchura del pulso, la energía aplicada, el tiempo de tratamiento, la frecuencia y la temperatura alcanzada (Álvarez, Condón y Raso, 2006).

5.3.6 Aplicación de PEAV en vino:

Como se ha indicado anteriormente, la aplicación de esta tecnología provoca una permeabilización de la membrana citoplasmática de las células lo que puede causar la inactivación microbiana y una mejora en la transferencia de masa cuando se quieren extraer componentes localizados en el interior de las células. En el vino, ambas características son interesantes.

El tratamiento del vino con PEAV es una técnica prometedora como sustituyente del SO₂ en la elaboración del vino porque, a diferencia de otras tecnologías y métodos, ésta puede llegar a sustituir por completo su acción antimicrobiana. La tecnología de los pulsos eléctricos de alto voltaje aplicado sobre los mostos sumada a almacenamiento controlado del vino final resultante podría suponer la posibilidad de producir vinos sin necesidad de SO₂ (Garde-Cerdán et al., 2008).

5.3.6.1 Inactivación microbiana en el vino:

La presencia de microorganismos durante el proceso de elaboración del vino es fundamental ya que determina las cualidades organolépticas finales. Por ello, es necesario regular su presencia a lo largo de todo el proceso.

Esta tecnología ha sido ampliamente estudiada y se ha demostrado su eficacia a la hora de producir un efecto letal en bacterias y levaduras en alimentos líquidos (Heinz et al., 2003; Amiali et al., 2007; Puértolas et al. 2009; Clemente et al., 2020; Mendes-Oliveira et al., 2020).

Esta tecnología se puede utilizar en distintos momentos de la elaboración del vino. La estabilización del mosto de la uva proporciona unas condiciones que permiten el crecimiento de los cultivos starter sin la presencia de microorganismos competidores. Otra fase, donde más interés tiene la aplicación de esta tecnología, es tras la fermentación alcohólica para repetir el mismo procedimiento con microorganismos como *Oenococcus oeni* que se utilizan en la fermentación maloláctica (González-Arenzada et al., 2018, 2019a). Esta tecnología también se emplea como medida de estabilización en la fase de embotellado para evitar posibles fermentaciones posteriores (González-Arenzada 2019b).

Como se ha comentado anteriormente el principal problema para implementar esta tecnología en las bodegas es la complejidad de parámetros que afectan a la resistencia microbiana. Los factores dependientes de los microorganismos y el medio de tratamiento hacen que los parámetros de tratamiento mediante PEAV sean diferentes según el estudio consultado.

Estudios relacionados con la inactivación microbiana establecen como rangos de intensidad de los campos eléctricos entre 20 y 50 kV/cm y frecuencias entre 500 y 1500 Hz (Puligundla et al., 2018). Las investigaciones en este campo también revelan el comportamiento de los principales microorganismos presentes en el vino durante su elaboración y crianza cuando son sometidos a tratamientos mediante PEAV.

En el mosto y tras la fermentación alcohólica, tal y como se muestra en las figuras 6A y 6B, la inactivación microbiana se alcanza con valores superiores a 16k V/cm en el caso de las levaduras y 22 kV/cm en el caso de las bacterias, y a partir de esos valores mínimos cuanto más intensos sean los tratamientos mayor inactivación se obtiene (Puértolas et al., 2009).

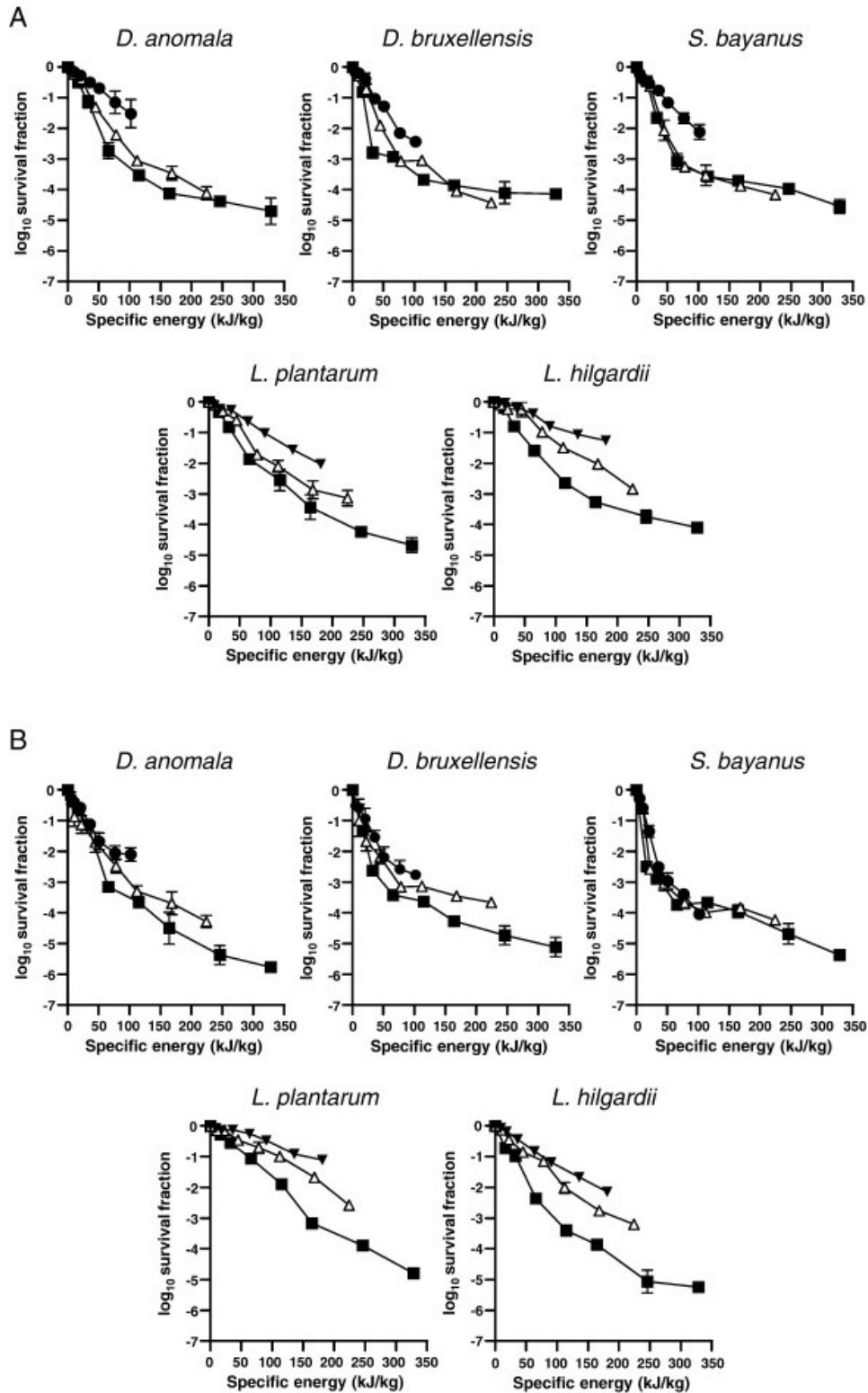


Figura 6: Curvas de supervivencia microbiana a diferentes intensidades de campos eléctricos. 16 kV/cm (●), 22 kV/cm (▼), 25 kV/cm (△), 31 kV/cm (■). Las condiciones de tratamiento son en mosto (A) y vino (B) de uvas rojas 1.97 ± 0.23 mS/cm y 2.02 ± 0.22 mS/cm respectivamente; 1Hz. (Puértolas et al., 2009)

El estudio proporcionado por González-Arenzana et al. (2015) muestra la efectividad de la tecnología de PEAV en 25 especies de levaduras, bacterias ácido-lácticas y bacterias acéticas en diferentes etapas de elaboración. Los niveles de inactivación obtenidos varían de 0,64 a 4,94 ciclos logarítmicos. Los valores más altos se obtienen, al igual que en el caso anterior, en los vinos ya que tienen una concentración de alcohol superior. Un tratamiento con PEAV puede ver su eficacia mejorada en los casos donde se emplean técnicas de control microbiano complementarias y donde el medio posea características que limiten el crecimiento de microorganismos.

Se observa un límite máximo de eficacia a partir del cual por más energía específica aplicada durante el tratamiento no se modifica de forma significativa la inactivación de las levaduras. Otro descubrimiento respecto a la bibliografía anterior al estudio, es el hecho de que la energía necesaria para inactivar las bacterias no siempre es superior que la necesaria para inactivar levaduras. En términos generales se cumple, pero no todos los microorganismos tienen las mismas características lo que refuerza la idea de que realmente las diferencias en el tamaño celular, las características de membrana y variaciones morfológicas o bioquímicas de las células son responsables de la supervivencia celular frente a tratamientos por pulsos eléctricos de alto voltaje (González-Arenzana et al., 2015).

Estudios más enfocados a la estabilización previa al embotellado muestran que el principal impacto de los PEAV en el vino es la reducción inmediata de las unidades logarítmicas de los microorganismos presentes. Tras la comparación de la eficacia tras 4 días de un tratamiento de PEAV y el tratamiento tradicional de SO₂ se observa una mayor eficacia en el tratamiento mediante pulsos eléctricos de alto voltaje. Tras 6 meses de crianza los resultados reflejan eficacias similares entre los tratamientos (González-Arenzana et al., 2019a).

Esta tecnología puede permitir un aumento de la vida útil del producto, pero en el vino se lleva a cabo un almacenamiento y una crianza que en ocasiones dura meses incluso años. Con tiempos tan prolongados, los microorganismos pueden recuperarse y multiplicarse de nuevo, y, además, aumentan las probabilidades de que surja una contaminación en los barriles debido a los poros que estos presentan. Se han observado crecimientos microbianos posteriores incluso en los vinos tratados, eso sí, en un periodo de tiempo superior en comparación con los vinos empleados como control (González-Arenzana, 2019b).

El uso de este tipo de tratamientos no garantiza la estabilidad del vino siendo necesario el empleo de SO₂, aunque habiendo reducido su concentración (González-Arenzana et al.,

2019b). No obstante, la aplicación de tratamientos PEAV combinados con medidas específicas de control ambiental y almacenamiento permiten la fabricación de vinos sin necesidad de SO₂ (Garde-Cerdán et al., 2008).

Algunos problemas a la hora de analizar los resultados obtenidos son las distintas interacciones entre los parámetros del tratamiento y el medio de tratamiento o la temperatura. El tratamiento mediante PEAV tiene implícito el aumento de temperatura de las muestras (sin alcanzar temperaturas tan altas como en los tratamientos térmicos), este fenómeno en ocasiones puede sobreestimar la eficacia de los PEAV. En los tratamientos más intensos es donde más difícil es determinar de forma individual su real implicación en la inactivación microbiana. Lo mismo sucede al valorar su efecto en vinos diferentes ya que se están modificando las condiciones como el pH y grado alcohólico del medio (Van Wyk et al., 2019).

El auténtico potencial de esta tecnología para el sector de la vinicultura necesita todavía tiempo de investigación puesto que está más estudiado su función enfocada a la transferencia de masa que no a la antimicrobiana. Además, la gran mayoría de los estudios están realizados en condiciones de laboratorio por lo que habría que adaptarlos a la realidad de las bodegas donde las cantidades de producto a tratar son superiores y cada bodega cuenta con un vino de diferentes características (Clodoveo et al., 2016).

5.3.6.2 Problemáticas derivadas de los PEAV:

Una de las principales preocupaciones del sector es la alteración de las cualidades organolépticas del vino. Por ello, cuando se trata de implementar una técnica nueva en la elaboración de vino es necesario estudiar el posible efecto sobre el producto final. En un principio los tratamientos por pulsos eléctricos de alto voltaje no deberían afectar de forma negativa a la calidad organoléptica del mismo, llegando en ocasiones incluso a mejorar estas características (Abdca and Evrendilek, 2015; González et al., 2018; Vicaş et al., 2017).

Para avanzar en el estudio de esta tecnología algunos investigadores deciden modificar los parámetros de tratamientos anteriores con el objetivo de alcanzar una optimización de estos. Cambios en el proceso de PEAV hacen necesarios nuevas comprobaciones acerca del impacto sobre la calidad del vino.

En investigaciones relacionadas con los efectos producidos tras el tratamiento mediante PEAV se encontraron efectos negativos asociados. El principal problema durante el tratamiento con pulsos eléctricos de alto voltaje en vino es la liberación de metales. Esto se debe a que,

durante la aplicación de esta técnica, el alimento está en contacto directo con los electrodos y por las características del tratamiento se puede originar dicha contaminación. Otros problemas también relacionados con la composición de los electrodos es la interacción con algunos componentes de los alimentos que provoca una degradación de los mismos (Yang et al., 2016). La concentración de hierro o cromo en vino tratado con pulsos eléctricos de alto voltaje son similares a los obtenidos mediante las técnicas tradicionales. En cambio, metales como el níquel si se han visto aumentados. A pesar de ello, los niveles de cromo y níquel obtenidos están muy por debajo de los niveles que suponen un peligro para la salud (Van wyk et al., 2019).

Por lo tanto, actualmente esta tecnología no supone ningún problema para la salud en el consumidor de los vinos tratados mediante PEAV. No obstante, se requieren de estudios constantes que garanticen la calidad y seguridad del producto conforme se optimizan los parámetros de tratamiento mediante PEAV.

5.3.7 Análisis económico del uso de los PEAV:

Al igual que la alteración del vino producida por los microorganismos alterantes supone pérdidas económicas importantes, también hay que valorar los aspectos económicos del resto del proceso de elaboración. En el caso de emplear nuevos métodos o nuevas tecnologías que ayuden a la elaboración de un mejor vino o de unas características microbiológicas mejores es necesario plantearse por muy prometedoras que sean su repercusión económica en la bodega. No sirve de nada solucionar un problema que supone pérdidas económicas si la solución va a ser todavía más costosa.

Calcular los costes económicos del uso de una tecnología en la empresa a nivel teórico es complicado porque depende de diversas variables, la mayoría de las cuales son a nivel local de la empresa (coste de agua, luz, mano de obra, materiales, etc.). Además, hay que sumar otro factor; y es que el hecho de que establecer una tecnología en una industria hace que surjan nuevas formas de abaratar los costes de inversión iniciales (Toepfl, 2007). Esto hace que cualquier estudio económico pueda quedar obsoleto en poco tiempo.

Sin entrar en detalle, como se ha dicho anteriormente, el uso de esta tecnología tiene dos funciones principales. Una es la transferencia de masa la cual requiere de menor energía para llevarse a cabo. La otra, es la capacidad de inactivación microbiana y necesita de campos eléctricos de mayor intensidad.

Basándome en el ejemplo de análisis económico propuesto por Eduardo Puértolas (2009) en la tabla 3:

Tabla 3: Características y costes generales estimados del procesado mediante PEAV para la pasteurización de alimentos y para la permeabilización de las membranas celulares con objeto de mejorar la transferencia de masa.

	<i>Pasteurización</i>	<i>Permeabilización</i>
<i>Requerimientos</i>		
Campo eléctrico (kV/cm)	25-35	1-5
Flujo (ton/h)	10	10
Energía (kJ/kg)	50-700	10-20
<i>Costes</i>		
Equipo (€)	4.000.000-5.800.000	75.000-150.000
Procesado (€/ton)	1,4-19,4	0,33-1

Aquel proceso que necesite de menor energía para ser llevado a cabo tendrá un coste económico mayor, en este caso se trata de la inactivación microbiana. Además, hay que tener en cuenta que la capacidad y limitaciones de los equipos necesarios para lograr los objetivos de pasteurización son mayores que los necesarios para lograr únicamente la permeabilización. Los equipos de pasteurización necesitan de componentes y de unas características más exigentes, esto se traduce en inversiones de los equipos superiores en comparación a los equipos de permeabilización como queda reflejado en la tabla 3.

5.4 Optimización de los parámetros de los pulsos eléctricos de alto voltaje en el laboratorio sobre un vino tinto comercial:

En este apartado se explica brevemente cómo se realizaría un estudio laboratorial que sirviese de guía hacia la optimización de los parámetros de tratamiento para la inactivación microbiana en vino mediante esta tecnología.

Como se ha explicado anteriormente, esta tecnología afecta de diferentes formas en función del tipo de microorganismo, los parámetros de procesado y las características del medio de tratamiento, por ello, este estudio se realizaría con el microorganismo de interés como es *Saccharomyces bayanus* en un vino tinto comercial. Las condiciones de tratamiento

a utilizar serían pulsos de onda cuadrada, aplicados en flujo continuo en una cámara de electrodos paralelos para asegurar una mayor uniformidad del campo eléctrico.

A partir de un criovial almacenado en congelación se recuperan los microorganismos, para la realización de las pruebas. Estos cultivos nuevos pueden ser utilizados tras la preparación de un cultivo puro una vez alcanzada la fase estacionaria. Esta se alcanza entorno a las 48h cultivándolas a 25°C, en un medio de Sabouraud dextrosa líquido, con agitación constante y sin anaerobiosis. En la fase estacionaria la concentración de levaduras suele mantenerse constante en torno a 8 unidades logarítmicas.

Para elaborar una curva de crecimiento se toman muestras a lo largo del tiempo y se realizan siembras en placa en medio APD (agar patata-dextrosa) mediante homogeneización en masa tras la dilución correspondiente en agua de peptona estéril. Para el análisis estadístico de los resultados las siembras deben realizarse al menos por duplicado para asegurar la validez de los mismos. La curva de crecimiento se realiza con los resultados obtenidos a partir de los recuentos una vez cultivadas las placas a 25°C durante 48h.

Previo a la aplicación de los tratamientos de PEAV, es interesante utilizar una cámara de recuento de Petroff-Hausser y, de esta forma, estimar la concentración de levaduras en los cultivos que van a ser inoculadas en el vino. Además, el cultivo en fase estacionaria debe ser centrifugado y posteriormente re-suspendido en el medio de tratamiento, en este caso el vino comercial. Los valores calculados como concentración inicial inoculada se comparan con los obtenidos de una primera muestra sin tratar para comprobar posibles efectos letales únicamente debidos al medio de tratamiento.

Mediante fórmulas matemáticas se ajustan de forma teórica los parámetros de tratamiento de PEAV. La figura 7 sería un esquema en Excel con las variables de entrada y de salida del equipo donde al modificar alguno de los parámetros de entrada se ven modificados los de salida.

CONTINUOUS TREATMENT						
COLINEAR TREATMENT CHAMBER - paralelos						
			IN			OUT
	Input Voltage (kV)		8		Area (cm ²)	1,50
	Pulse width (μs)		5		Volumen (ml)	0,60
	GAP (cm)		0,4		Resistance (Ohm)	83,33
	Elect. Conductivity (mS/cm)		3,2		Residence time (s)	0,77
	largo (cm)		3			
	Ancho (cm)		0,5		Field strength (kV/cm)	20,00
					Current (A)	96,00
	Flow rate (l/h)		2,8		Frequency (Hz)	44,07
	Number of pulses		34		TOTAL ENERGY (kJ/kg)	217,60
	Initial Temperature (°C)		20		POWER (kW)	0,2
					TREATMENT TIME (μs)	170,00
					Energy per pulse (kJ/kg)	6,40
					Temperature increment (°C)	55,79
					Final temperature (°C)	75,79

Figura 7: Ejemplo de parámetros de entrada y salida a tener en cuenta para ajustar las condiciones de tratamiento por PEAV en flujo continuo.

Conviene cerciorarse de que los valores de conductividad del vino, la velocidad de flujo y el voltaje de entrada no se modifican respecto al cálculo teórico realizado. Del mismo modo, se debe realizar *in situ* un registro de parámetros tales como la temperatura de entrada y salida del sistema y el amperaje real conforme se realizan los distintos tratamientos PEAV. La diferencia entre las temperaturas de entrada y salida está relacionada con la cantidad de energía suministrada.

Es interesante incluir en el circuito de PEAV un sistema de refrigeración que reduzca la temperatura de salida de la muestra hasta 1°C por debajo de la temperatura de entrada. Esto puede realizarse mediante un baño en agua fría. Este procedimiento tiene como objetivo minimizar las posibles interacciones entre la temperatura y la inactivación microbiana. La temperatura es un factor que podría sesgar los resultados obtenidos en lo referido a la eficacia del tratamiento PEAV.

Para el estudio de los datos conviene plantear una tabla de recogida de datos (Tabla 4) acompañada de los parámetros como son la anchura del pulso, la conductividad del medio, la Tª de entrada, la velocidad de la bomba y la fecha del experimento en concreto realizado.

Tras la recogida de las muestras tratadas se realizan siembras en masa en placas Petri para su posterior recuento tras 48h de incubación. Para registrar el recuento es útil también una tabla similar pero esta vez que contenga las diluciones llevadas a cabo para anotar el recuento obtenido. Para una mayor fiabilidad en este proceso se recomienda como mínimo realizar la

siembra de las muestras tratadas por duplicado y en varias diluciones para que después se pueda contabilizar un número de colonias fiables.

Además, es interesante guardar algunos tubos con una muestra del vino sin tratar con las levaduras y otra del vino tratado con el tratamiento de menor intensidad. Esto puede ser útil para comprobar la supervivencia de los microorganismos en ese medio al mismo tiempo que comprobar si el tratamiento genera daños suficientes en las levaduras como para no sobrevivir en el vino, aunque si lo hagan en el medio de cultivo de las placas. Para llevar a cabo este seguimiento es suficiente con realizar siembras periódicas que sirvan para contabilizar la evolución de los microorganismos presentes.

Para descartar o estudiar la acción de la temperatura sobre las muestras hay que realizar también estudios de termorresistencia de esta levadura a las temperaturas de salida que se está obteniendo en los tratamientos por pulsos eléctricos de alto voltaje. De esta forma se puede estudiar la acción combinada de pulsos y temperatura sobre los microorganismos. Para llevar a cabo esta tarea es necesario un equipo que permita la termostatación de la muestra a distintas temperaturas. Con estos valores se puede valorar la interacción del factor temperatura a la hora de analizar los resultados obtenidos de los tratamientos con PEAV.

Los tratamientos tanto de pulsos eléctricos como térmicos conviene valorarlos tras obtener varias réplicas de los experimentos, de esta forma se pueden obtener resultados fiables no dependientes del manejo que se les haya dado a las muestras o de posibles errores que se hayan podido cometer en el laboratorio para alguna muestra en concreto.

Tabla 4: Ejemplo de parámetros de tratamiento de vino mediante PEAV. Los números indicados en negro son los parámetros establecidos y esperados, los registrados en azul los obtenidos en el laboratorio.

INPUT (KV/cm)	Nº PULSOS	Frecuencia	Amperaje teórico	Amperaje real	Energía TOTAL (kJ/kg)	Tª salida teórica (°C)	Tª salida Real (°C)
8	15,5	20	96	154	99	45,5	46
8	13,1	17	96	150	80	41,5	40
8	10,8	14	96	145	69,1	37,7	35
8	8,5	11	96	129	54,4	34	30
8	6,2	8	96	125	40	30,1	26,5
8	3,9	5	96	116	25	26,4	23
6	27,5	36	72	124	99	45,3	47,5
6	22,3	29	72	117	80,3	40,6	40
6	19,2	25	72	109	69,1	37,7	36
6	15,3	20	72	107	55,1	34,1	31,5
6	11,5	15	72	98	41,6	30,7	27,5
6	7	9	72	93	25,2	26,4	23,5
4	61,8	80	48	73	98,8	45,3	43,5
4	50,1	65	48	69	80,1	40,55	37,5
4	43,2	56	48	61	67,1	37,7	34
4	34	44	48	61	54,4	34	30,5
4	25,5	33	48	59	40,8	30,5	26,5
4	15,6	20	48	55	25	26,4	23,5
3	110,3	143	36	54	99,3	45,45	48
3	89,5	116	36	48	80,55	40,65	40
3	76,8	99	36	47	69,1	37,7	36,5
3	61	79	36	43	54,9	34	31,5
3	45,5	59	36	40	41	30,5	28
3	27,8	36	36	37	25	26,4	24

6. Conclusiones:

La tecnología de pulsos eléctricos de alto voltaje se lleva empleando durante años para la estabilización microbiológica de alimentos líquidos como pueden ser los zumos de frutas. Además, se emplean con éxito en otros ámbitos en la industria alimentaria de forma habitual. Los tratamientos en el mosto y el vino mediante PEAV son uno de otros tantos que han surgido a partir de la necesidad de encontrar alternativas al tradicional uso del SO₂. Se trata de una técnica bastante prometedora puesto que tiene la capacidad de favorecer la extracción fenólica al tiempo que puede llegar a producir inactivación microbiana. Esto plantea la idea de sustituir el SO₂ por esta tecnología ya que son 2 de sus principales funciones en la elaboración de vino. Por el momento se ha demostrado su eficacia a la hora de mejorar la extracción fenólica en el mosto. También, se han obtenido resultados claros sobre su eficacia en inactivación microbiana en el mosto y en el vino. Al contrario que otros métodos propuestos para reducir el uso de SO₂, esta tecnología puede llegar a sustituirlo si se tienen en cuenta ciertos parámetros de temperatura y ambiente a la hora del almacenamiento del vino. Sin embargo, es una tecnología que todavía tiene mucho camino e investigación por delante. Los parámetros de tratamiento no están todavía optimizados para incorporarlos en la elaboración de vino, en parte por la complejidad y cantidad de variables que intervienen en el proceso. Cambios en la energía aplicada, en la intensidad del campo eléctrico producido, en el tiempo de tratamiento junto a otros factores externos al propio tratamiento como son los intrínsecos a los microorganismos o al tipo de vino tratado; todos ellos, cambian los resultados obtenidos.

La posibilidad de utilizar en una bodega un mismo generador de PEAV para favorecer la extracción de compuestos fenólicos y para la inactivación de microorganismos tanto en el mosto como en el vino simplemente cambiando la cámara de tratamiento puede ayudar a la implantación de esta tecnología en el sector enológico en los próximos años.

7. Valoración personal:

La elaboración de este trabajo ha supuesto un cierto reto para mí personalmente porque se tratan temas más allá de los posiblemente típicos del Grado en Veterinaria. Tuve la colaboración de un amigo que actualmente se encuentra cursando el grado de Electrónica y Automática que me ayudó a comprender las partes relacionadas con los circuitos, sus componentes y las fórmulas físicas con mayor facilidad al cual le tengo que agradecer sus explicaciones. Sin embargo, me ha resultado bastante curioso y entretenido de hacer, esta tecnología está planteada en este trabajo enfocada para el tratamiento de vino, pero las opciones para las que se puede aplicar son mucho más amplias. Incluso buscando específicamente trabajos sobre vino, además de otras industrias y aplicaciones alimentarias también salían tratamientos para según qué enfermedades o tipos de células que parecían interesantes. La tecnología PEAV llega incluso a la biotecnología y a la genética. Lo cierto, es que en un principio el tema estaba planteado como trabajo experimental con el fin de optimizar los parámetros de tratamiento para el vino tinto, pero por motivos del Covid-19 hubo que reestructurar el trabajo y convertirlo en bibliográfico. Esto al principio supuso un cambio de mentalidad que me costó asumir, pero con algo de esfuerzo creo que ha merecido la pena llevar a cabo este trabajo.

8. BIBLIOGRAFÍA:

- Abca, E.E., & Evrendilek, G.A. (2015). "Processing of red wine by pulsed electric fields with respect to quality parameters". *Journal of Food Processing and Preservation*, 39(6), 758–767. DOI: <https://doi.org/10.1111/jfpp.12285>
- Álvarez I, Condón S, Raso J, 2006. Microbial Inactivation by Pulsed Electric Fields. En Raso, J., Heinz, V. (Eds.), *Pulsed Electric Fields Technology for the Food Industry*. Fundamentals and Applications (pp. 97-129). Springer: Nueva York.
- Amiali, M., Ngadi, M. O., Smith, J. P., Raghavan, G. S. V. (2007). "Synergistic effect of temperature and pulsed electric field on inactivation of Escherichia coli O157:H7 and Salmonella enteritidis in liquid egg yolk". *Journal of Food Engineering* 79 (2), 689-694. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2006.02.029>
- Beltrán Lucena, R. (2011). *La elaboración del vino*. Facultad de Ciencias Experimentales, Universidad de Huelva. Área de Química Analítica. Disponible en: <http://www.teatrojuanbravo.org/documents/1850502/2646654/prueba-4.pdf>
- Clemente, I., Condón-Abanto, S., Pedrós-Garrido, S., Whyte, P., Lyng, J.G. (2020). "Efficacy of pulsed electric fields and antimicrobial compounds used alone and in combination for the inactivation of Campylobacter jejuni in liquids and raw chicken" *Food Control*, 107, 106491 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.01.017>
- Clodoveo M.L., Diapalmo, T., Rizello, C.G., Corbo, F., Crupi, P. (2016). "Emerging technology to develop novel red winemaking practices: An overview". *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 38, part A pp. 41-56. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2016.08.020>
- Garde-Cerdán, T., Marsellés-Fontanet, A. R., Arias-Gil, M., Ancín-Azpilicueta, C., Martín-Belloso O. (2008). "Effect of storage conditions on the volatile composition of wines obtained from must stabilized by PEF during ageing without SO₂". *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 9 (4), 469-476. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2008.05.002>
- González-Arenzana, L., López-Álvaro, I., Garde-Cerdán, T., Portu, J., López, R. Santamaría, P. (2018). "Microbial inactivation and MLF performances of Tempranillo Rioja wines treated with PEF after alcoholic fermentation" *International Journal Food Microbiology*, 269, pp. 19-26. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.01.008>

- González-Arenzana, L., López-Alfaro, I., Gutierrez, A. R., López, N., Santamaría, P., López, R. (2019b). "Continuous pulsed electric field treatments' impact on the microbiota of red Tempranillo wines aged in oak barrels" *Food Bioscience*, 27, pp. 54-59. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2018.10.012>
- González-Arenzana, L., Portu, J., López, N., Santamaría, P., Gutiérrez, A.R., López, R., & López-Alfaro, I. (2019a). "Pulsed Electric Field treatment after malolactic fermentation of Tempranillo Rioja wines: Influence on microbial, physicochemical and sensorial quality." *Innovation Food Science & Emerging Technology*, 51, 57–63. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2018.05.019>
- González-Arenzana, L., Portu, J., López, R., López, N., Santamaría, P., Garde-Cerdán, T., López-Álfaro, I. (2015). "Inactivation of wine-associated microbiota by continuous pulsed electric field treatments" *Innovate Food Science & Emerging Technologies*, 29, pp. 187-192 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2015.03.009>
- Guerrero, R. F., Cantos-Villar, E. (2015). "Demonstrating the efficiency of sulphur dioxide replacements in wine: A parameter review", *Trends in Food Science & Technology* 42 (1), pp. 27-43. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2014.11.004>
- Heinz, V., Toepfl, S., Knorr, D. (2003). "Impact of temperature on lethality and energy efficiency of apple juice pasteurization by pulsed electric fields treatment". *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 4 (2), 167-175. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1466-8564\(03\)00017-1](https://doi.org/10.1016/S1466-8564(03)00017-1)
- Idareta Erro, M. (2016) *Alternativas al SO2 como conservante del vino*. Trabajo de fin de Máster. Universidad Pública de Navarra.
- Izquierdo Cañas, P.M., García Romero, E., Gómez Alonso, S., Palop Herreros, M.L.L. (2008). "Changes in the aromatic composition of Tempranillo wines during spontaneous malolactic fermentation.", *Journal of Food Composition and Analysis* 21 (8), pp. 724-730. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2007.12.005>
- López, N., Puértolas, E., Condón, S., Raso, J., Alvarez, I. (2009a). "Enhancement of the extraction of betanine from red beetroot by pulsed electric fields", *Journal of Food Engineering*, 90 (1), pp. 60-66. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2008.06.002>

- López, N., Puértolas, E., Condón, S., Raso, J., Alvarez, I. (2009b). "Enhancement of the solid-liquid extraction of sucrose from sugar beet (*Beta vulgaris*) by pulsed electric fields", *LWT – Food Science and Technology*, 42 (10), pp. 1674-1680. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2009.05.015>
- Manso, D. (2020). "La nueva normalidad en el sector del vino". *Vinteur, La revista Digital del Vino*, 25 de mayo. Disponible en <https://www.vinetur.com/2020052560484/la-nueva-normalidad-en-el-sector-del-vino.html> (Consultado Junio 2020)
- Mendes-Oliveira, G., Jin, T.Z., Campanella, O.H. (2020). "Modeling the inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella Typhimurium* in juices by pulsed electric fields: The role of the energy density" *Journal of Food Engineering*, 282, 110001. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2020.110001>
- Organización Internacional de la Viña y el Vino (OIV). (2016). Base de datos de La Organización Internacional de la Viña y el Vino. Disponible en: <http://www.oiv.int/es/statistiques/recherche> (consultado febrero 2020)
- Organización Internacional de la Viña y el Vino (OIV). (2020). "Actualidad de la coyuntura del sector vitivinícola mundial en 2019". **OIV Press Conference 23 April 2020**. Conferencia web del 23 de abril de 2020. Disponible en: <http://www.oiv.int/public/medias/7304/es-actualidad-de-la-coyuntura-del-sector-vitivin-cola-mundia.pdf> (Consultado Junio 2020)
- Organización Internacional de la Viña y el Vino (OIV). (2020). **Situación actual del sector vitivinícola a nivel mundial**. Disponible en: <http://www.oiv.int/public/medias/7264/es-oiv-nota-de-prensa-abril-2020.pdf> (Consultado junio 2020)
- Organización Internacional de la Viña y el Vino (OIV). (2020). **State of the vitivinicultural sector in 2019**. Disponible en: <http://www.oiv.int/public/medias/7284/presentation-oiv-press-conference-april-2020.pdf> (Consultado Junio 2020)
- Puértolas Gracia, E. (2009). **Aplicación de los Pulsos Eléctricos de Alto Voltaje al Proceso de Vinificación**. Tesis doctoral. Universidad de Zaragoza pp. 10-22, 58-64, 76-157, 169-182, 363-364, 376-378.
- Puértolas, E., López, N., Condón, S., Raso, J., Álvarez, I. (2009). "Pulsed electric fields inactivation of wine spoilage yeast and bacteria", *International Journal of Food Microbiology*, 130 (1), pp. 49-55. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.12.035>

- Puligundla, P., Pyun, Y., Mok, C. (2018). "Pulsed Pulsed electric field (PEF) technology for microbial inactivation in low-alcohol red wine" *Food Science and Biotechnology*, 27 (6), pp. 1691-1696. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10068-018-0422-1>
- REAL ACADEMIA ESPAÑOLA. (2020). Definición de vino, *Diccionario de la lengua española*, 23.ª ed., [versión 23.3 en línea]. Disponible en: <https://dle.rae.es/enología> [Consultado febrero 2020].
- Reglamento Delegado (UE) 2019/934 de la Comisión, de 12 de marzo de 2019, por el que se completa el Reglamento (UE) n.º 1308/2013 del Parlamento Europeo y del Consejo en lo que se refiere a las zonas vitícolas donde el grado alcohólico pueda verse incrementado, las prácticas enológicas autorizadas y las restricciones aplicables a la producción y conservación de los productos vitícolas, el porcentaje mínimo de alcohol para subproductos y la eliminación de estos, y la publicación de las fichas de la OIV. ELI: http://data.europa.eu/eli/reg_del/2019/934/oj
- Ribéreau-Gayon, P., Duourdieu, D., Donèche, D., Lonvaud, A. (2006) *Handbook of Enology Volume 1 The Microbiology of Wine and Vinifications 2nd Edition*. Inglaterra: John Wiley & Sons, Ltd. pp. 241-445
- Robles Blanco, G. (2005). *La elaboración de los vinos*. Disponible en http://www.asturiasadaptada.org/intranet/imagenes/us2x_1_doc_201008_501.pdf
- Salaha, M.I., Kallithraka S., Marmaras I., Koussissi E. y Tzourou T. (2008). "A natural alternative to sulphur dioxide for red wine production: Influence on colour, antioxidant activity and anthocyanin content.", *Journal of Food Composition and Analysis* 21 (8), pp. 660-666. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2008.03.010>
- Suárez, R., Suárez-Lepe, J.A., Morata, A., Calderón, F. (2007). "The production of ethylphenols in wine by yeasts of the genera *Brettanomyces* and *Dekkera*: A review.", *Food Chemistry* 102 (1), pp. 10-21. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.03.030>
- Tiziana Lisanti, M., Blaiota, G., Nioi, C. & Moio, L., 2019. "Alternative Methods to SO2 for Microbiological Stabilization of Wine". *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 18, pp. 455-479. DOI: <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12422>
- Toepfl, S. (2007). *Pulsed Electric Fields (PEF) for Permeabilization of Cell Membranes in Food-and Bioprocessing-Applications, Process and Equipment Design and Cost Analysis*. Tesis Doctoral. TU Berlín, Alemania.

- Urszula Tylewicz. (2020). ***Pulsed Electric Fields to Obtain Healthier and Sustainable Food for Tomorrow***. Academic Press, pp. 3-21 DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816402-0.00001-X>
- Vally, H., Misso, N. L. A., Madan, V. (2009). "Clinical effects of sulphite additives", ***Clinical & Experimental Allergy***. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2009.03362.x>
- Van Wyk, S., Silva F., Farid, M.M. (2019) "Pulsed electric field treatment of red wine: Inactivation of Brettanomyces and potential hazard caused by metal ion dissolution" ***Innovative Food Science and Emerging Technologies***, 52 pp. 57-65. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2018.11.001>
- Vicaș, S. I., Bandici, L., Teușdea, A. C., Turcin, V., Popa, D., & Bandici, G. E. (2017). "The bio-active compounds, antioxidant capacity, and color intensity in must and wines derived from grapes processed by pulsed electric field". ***CyTA - Journal of Food***, 15(4), 553–562. DOI: <https://doi.org/10.1080/19476337.2017.1317667>
- Vinopediatv. (2010a). **Capítulo 5: El color de la vid** [Youtube]. 30 de agosto. Disponible en: <https://www.youtube.com/watch?v=jm8Qix1DvGs> (Consultado marzo 2020)
- Vinopediatv. (2010b). **Capítulo 6: Preparando la vendimia** [Youtube]. 7 de septiembre. Disponible en: <https://www.youtube.com/watch?v=jm8Qix1DvGs> (Consultado marzo 2020)
- Vinopediatv. (2010c) **Capítulo 8: Elaboración de un vino blanco** [Youtube]. 1 de octubre. Disponible en: <https://www.youtube.com/watch?v=ZskDFdZ3oLc> (Consultado marzo 2020)
- Vinopediatv. (2010d) **Capítulo 10: Elaboración de un vino tinto** [Youtube]. 1 de diciembre. Disponible en: <https://www.youtube.com/watch?v=DpMRWLAB9Nk> (Consultado marzo 2020)
- Vinopediatv. (2010e) **Capítulo 11: El descube** [Youtube]. 17 de diciembre. Disponible en: <https://www.youtube.com/watch?v=E5PBLMniqQI> (Consultado marzo 2020)
- Vinopediatv. (2011a) **Capítulo 12: La fermentación maloláctica** [Youtube]. 13 de enero. Disponible en: <https://www.youtube.com/watch?v=ULRoYsz7l1A> (Consultado marzo 2020)
- Vinopediatv. (2011b) **Capítulo 13: De la clarificación al embotellado** [Youtube]. 21 de enero. Disponible en: <https://www.youtube.com/watch?v=ZWxEVdNYK-g> (Consultado marzo 2020)

Vinopediatv. (2011c) **Capítulo 14: Crianza y trasiego de los vinos tintos** [Youtube]. 21 de enero. Disponible en: <https://www.youtube.com/watch?v=5PCm9seD3hk> (Consultado marzo 2020)

Vinopediatv. (2011d) **Capítulo 15: Ensamblajes y Embotellado** [Youtube]. 12 de mayo. Disponible en: <https://www.youtube.com/watch?v=95Py8x4ZMfM> (Consultado marzo 2020)

Vorobiev E, Lebovka NI, 2006. Extraction of Intracellular Components by Pulsed Electric Fields. En J Raso, V Heinz (Eds.), *Pulsed Electric Fields Technology for the Food Industry. Fundamentals and Applications* (pp. 153-193). Springer: Nueva York.

Yang, N., Huang, K., Lyu, C., Wang, J. (2016) "Pulsed electric field technology in the manufacturing processes of wine, beer, and rice wine: A review", *Food Control*, 61 pp. 28-38. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.09.022>