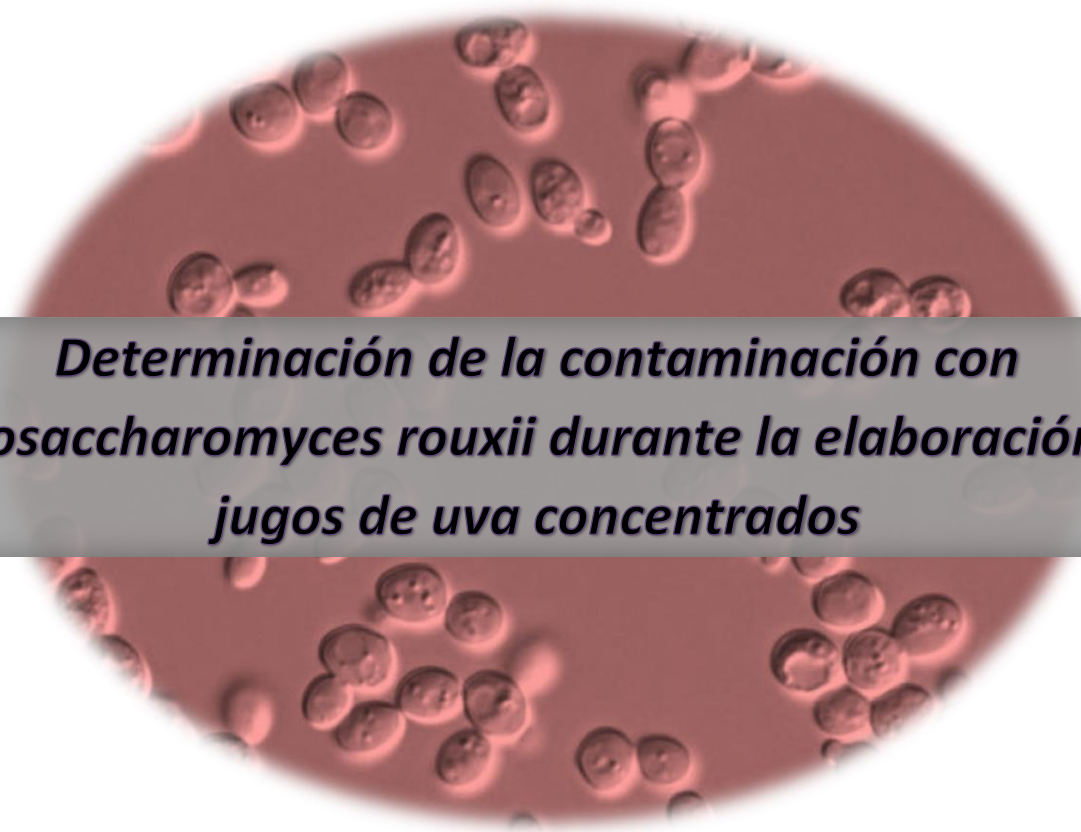


Marzo 2015



*Determinación de la contaminación con
Zygosaccharomyces rouxii durante la elaboración de
jugos de uva concentrados*

Torres Palazzolo, Carolina

LICENCIATURA EN BROMATOLOGÍA

Universidad Nacional de Cuyo

Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria



Determinación de la contaminación con *Zygosaccharomyces rouxii* durante la elaboración de jugos de uva concentrados

Trabajo presentado para optar por el título de Licenciada en bromatología

- **Autor:** Carolina Torres Palazzolo

Contacto: ctorrespalazzolo@gmail.com

- **Directora de Tesis:** Dra. Mariana Combina

Contacto: Investigador INTA. Investigador Independiente CONICET. EEA Mendoza - INTA. Tel- 0261 4963020 interno 295. E-mail: combina.mariana@inta.gob.ar

- **Codirectora de Tesis:** Dra. María Cecilia Rojo

Contacto: Microbiología Enológica - Centro de Estudios de Enología EEA Mendoza – INTA. San Martín 3853 (5507) Luján de Cuyo - Mendoza (Argentina). TE: +54 261 4963020/332 (Int.295) FAX: +54 261 4963320/32

- **Tribunal evaluador:**

Presidente:

- Dr. Ricardo Masuelli

Vocales:

- Dr. Ivan Ciklic
- MSc. María Laura Sanchez

Agradecimientos

A mi familia que me acompañó y ayudó para lograr esta meta...

A mi hijo que me inspira día a día...

A la Facultad de Ciencias Agrarias por recibirme y dejarme ser parte de esa maravillosa casa de estudios...

A mis profesoras y profesores por dar el ejemplo, por motivar e instruir. Especialmente por la amistad brindada...

A mi directora Mariana C. y a mi codirectora Cecilia R. por confiar en mí y darme un lugar en su proyecto de investigación...

A CONICET por la oportunidad de doctorarme a posteriori...

A todas aquellas personas que por breves o largos momentos tuvieron algo que ver para que hoy esté aquí...

Resumen

El Jugo de uva concentrado (JUC) es un *commodity* y por su carácter natural se utiliza para elaborar jugos mezclas, golosinas, dulces, mermeladas, jaleas, galletitas, pan, como edulcorante de bebidas gaseosas, y también en la industria farmacéutica. La producción de JUC constituye una parte importante de la industria vitivinícola argentina, siendo nuestro país el mayor exportador mundial de JUC durante el año 2014. El comercio internacional del JUC forma parte de mercados con una demanda que crece en forma sostenida. La industrialización de la uva para la obtención de jugos concentrados presenta varias etapas de procesamiento que incluyen tratamientos térmicos que afectan la microbiota presente en la materia prima. A pesar de esto, los productos no están exentos de presentar problemas microbiológicos que deterioran la calidad del mismo. El JUC es un alimento de humedad intermedia (a_w 0,7-0,8), con elevada concentración de azúcares y bajo pH. La alteración de estos sustratos es causada por levaduras osmófilas, dentro de este grupo el género que se aísla con mayor frecuencia es *Zygosaccharomyces sp.* El objetivo del presente trabajo fue la identificación de puntos críticos de contaminación con levaduras osmófilas en plantas elaboradoras, identificando las especies presentes en los jugos de uva y las superficies asociadas a su concentrado. El conocimiento de los puntos críticos de contaminación permitiría la aplicación de medidas preventivas para aumentar la estabilidad microbiana de los JUC. Para ello se eligieron tres plantas concentradoras de jugo de uva y se muestrearon los jugos de uva pre-concentrados y concentrados y las superficies asociadas a su elaboración. Se realizó el recuento de levaduras osmófilas en el medio MY50G y la posterior identificación molecular de las levaduras presentes en todas las muestras mediante secuenciación del fragmento amplificado ITS1-5.8S-ITS2. Los resultados mostraron que *Z. rouxii* fue la especie encontrada en todas las muestras de jugo de uva pre-concentrado y concentrado y en la mayoría de los casos representó el 100% de las levaduras aisladas. También se evidenció que los períodos de almacenamiento del jugo de uva pre-concentrado y concentrado fueron claves para que la población de *Z. rouxii* aumentara. Por lo cual constituyen puntos críticos en la elaboración y deberán ser cuidadosamente controlados para evitar el deterioro del producto. Por otro lado, se concluyó que en las superficies limpias, antes que entren en contacto con los jugos de uva pre-concentrados o concentrados, no hubo incidencia de *Z. rouxii*. Este hecho sugiere que las prácticas sanitarias utilizadas en las tres plantas serían capaces de eliminar las poblaciones de *Z. rouxii* de las superficies, siempre y cuando los restos de mosto sean completamente removidos de todas las áreas en contacto con el producto. Siete especies de levaduras fueron identificadas en las superficies: *Wickerhamomyces anomalus*, *Torulaspota delbrueckii*, *Citeromyces matritensis*, *Lachancea thermotolerans*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Candida orthopsilosis* y *Candida apícola*. El hallazgo de estas especies osmotolerantes, sugiere que las mismas presentan características que les permitieron persistir en las superficies higienizadas, los recuentos obtenidos fueron en muchos casos muy elevados. Estas especies han sido descritas como asociadas a los ambientes de las plantas elaboradoras de productos azucarados pero no han sido clasificadas como alterantes del producto *per se*.

Palabras clave: jugo de uva concentrado - *Zygosaccharomyces rouxii* – fuentes de contaminación microbiológica – identificación molecular de levaduras.

Índice

Agradecimientos	ii
Resumen.....	iii
Índice.....	iv
1 Introducción	1
1.1 Definición de mosto concentrado y aplicaciones	1
1.2 Importancia regional del JUC	2
1.3 Panorama internacional.....	2
1.4 Etapas de elaboración del JUC	3
1.5 Alteración microbiológica de JUC.....	6
1.5.1 Levaduras alterantes en JUC	7
1.5.2 <i>Zygosaccharomyces rouxii</i> como principal alteradora de JUC	8
1.6 Origen de la contaminación microbiana	10
1.7 Identificación molecular de levaduras	11
2 Hipótesis y objetivos	14
2.1 Hipótesis planteadas	14
2.2 Objetivo general.....	14
2.3 Objetivos específicos.....	14
3 Materiales y métodos	15
3.1 Toma de muestra y recuento de levaduras osmófilas	15
3.2 Identificación de levaduras osmófilas.....	19
3.2.1 Purificación de los cultivos	19
3.2.2 Extracción de ADN.....	19
3.2.3 Observación del ADN extraído	20
3.2.4 Amplificación de la región ITS1-5.8S-ITS2 del complejo génico nuclear del ADN	21
3.2.5 Purificación y secuenciación de los fragmentos amplificados	22
4 Resultados y discusión	23
5 Conclusiones.....	34
Bibliografía	35
Anexo A	41

1 Introducción

1.1 Definición de mosto concentrado y aplicaciones

El Código Alimentario Argentino (CAA), en su artículo 775bis - (Res 127, 20.02.89) define al Mosto Concentrado de Uva como sigue:

"Con la denominación de Mosto Concentrado de Uva o Jarabe de Uva se entiende el producto obtenido del mosto de uva sin fermentar por deshidratación parcial mediante procesos térmicos al vacío o a presión normal o cualquier otro proceso físico, sin haber sufrido una caramelización sensible.

Deberá responder a las siguientes características:

Líquido espeso, limpio, libre de depósitos, de sabor dulce.

Acidez total en ácido tartárico: Máx 9 g/kg

Acidez volátil en ácido acético: 0,0 g/kg

Alcohol v/v: 0,0%

Anhídrido sulfuroso total: Máx 70 mg/kg

Arsénico, como As: Máx 1 mg/kg

Azúcares reductores: Min, 800 g/kg

Cobre, como Cu: Máx 2 mg/kg

Extracto seco a 100°C: Min, 900 g/kg

Peso específico 15/15°C: Min, 1,30

Plomo, como Pb: Máx 1 mg/kg

Sales tartáricas 48 hs a 0°C: ausencia

Sustancias conservantes: 0,0 mg/kg

Este producto se rotulará en el cuerpo del envase: Mosto concentrado de Uva o Jarabe de Uva.

En el rotulado de los productos que los contengan deberá consignarse: "Contiene Jarabe de Uva" o "Contiene Mosto Concentrado de Uva" (CAA, 2010).

El mosto concentrado es un *commodity* y por su carácter natural se utiliza para la elaboración de alimentos para la primera infancia (Bruzzone, 1998) ya que el CAA no permite el uso de aditivos sintéticos (como edulcorantes, colorantes, etc.) en estos productos. Además se utiliza para elaborar jugos mezclas, golosinas, dulces, mermeladas, jaleas, galletitas, pan, como

edulcorante de bebidas gaseosas, y también en la industria farmacéutica (Ablin, 2012). Es por ello, que cada año las exigencias en calidad e inocuidad del JUC se hacen más estrictas en los mercados compradores (Rojo, 2014).

En el presente trabajo el término “*mosto concentrado*” será remplazado por “*Jugo de Uva Concentrado (JUC)*”, esta denominación fue adoptada como una estrategia comercial en el actual Plan Estratégico Vitivinícola (PEVI) 2020 para agregar valor al producto. Anteriormente la denominación *mosto concentrado*, se ha relacionado con excedentes de vinificación o productos secundarios de menor valor comercial.

1.2 Importancia regional del JUC

La producción de JUC constituye una parte importante de la industria vitivinícola argentina. Según datos del Observatorio Vitivinícola Argentino (OVA), en 2014 el país consiguió por primera vez posicionarse como el mayor exportador mundial de JUC con 108.560 toneladas, seguido por España e Italia. Dentro del país, las principales provincias exportadoras fueron Mendoza con el 74% y San Juan con el 17,8% del volumen nacional comercializado.

La Cámara Argentina de Exportadores de Mosto lanzó en 2009 el Plan Estratégico del Jugo de Uva Argentino, en el marco del PEVI 2020. Este tiene como objetivo fomentar la cadena de valor del jugo de uva y lograr que el producto tenga un valor propio, para que no sea considerado un simple subproducto del vino (Ablin, 2012). Los objetivos de este programa giran alrededor de cuatro ejes: especialización, industrialización, comercio exterior e investigación y desarrollo (Infocampo, 2009; Rojo, 2014). Para implementar el PEVI 2020 se crea la Corporación Vitivinícola Argentina (COVIAR) según la ley 25.849, cuya misión y objetivo es promover tanto la organización e integración de los actores de la cadena productiva, como la innovación de productos y procesos que acrediten el valor agregado del sector, con la finalidad de ganar, mantener y consolidar mercados externos, consolidar el mercado interno argentino y lograr el desarrollo sostenido del sector (Rojo, 2014).

1.3 Panorama internacional

El negocio mundial del JUC es muy dinámico y su desarrollo anual depende de distintas variables nacionales (costos, oferta de uva, precios locales) e internacionales (oferta del producto, valor de productos sustitutos, volumen de demanda, etc.). Estas variables determinan la forma como se repartirá el mapa del comercio entre los distintos países productores (Ablin, 2011).

El comercio internacional del JUC se reparte entre pocos países y maneja volúmenes relativamente pequeños a escala mundial. Sin embargo forma parte de mercados con una demanda que creció en forma sostenida hasta 2012. Los JUC blancos se comercializan como jugos naturales para endulzar bebidas y los JUC tintos son requeridos por el mercado de los colorantes naturales para alimentos. En 2014 los principales compradores de JUC argentino fueron Estados Unidos (49.600 toneladas aprox.), Japón (23.600 toneladas aprox.), Canadá (10.700 toneladas aprox.) y Sudáfrica (10.700 toneladas aprox.) (OVA, 2014).

No obstante, la industria del JUC tuvo problemas en 2014, las exportaciones nacionales de este producto siguieron retrayéndose. Los volúmenes comercializados en el primer semestre fueron 4% menores que los pertenecientes al mismo período de 2013 y un 26% menores que en 2012 (OVA, 2014). A esto se le suma la disminución internacional del precio por hectolitro, que bajó de USD\$ 1.400 a USD\$ 950 en promedio y la existencia de un *sobre-stock* que hay que conservar hasta poder colocarlo en el mercado (Gonzalez, 2014).

1.4 Etapas de elaboración del JUC

En la figura 1 se muestra de modo esquemático las diferentes etapas de la elaboración del JUC. Como se observa en el esquema, el proceso comienza con la recepción del mosto sulfitado, seguido de una decoloración mediante la adición de carbón activado y posterior clarificación por agregado de bentonita (entre 50 y 200 g/L). Luego, se realiza la filtración de los jugos de uva con filtros de tierras de diatomeas y se almacenan en piletas de hormigón armado con recubrimiento con pintura epoxi. Para aumentar la acidez y disminuir su coloración, se hace pasar el jugo por una columna de resinas catiónicas.

Para el desulfitado de los jugos de uva se utiliza un equipo que está compuesto por una columna de rectificación con lecho de anillos cerámicos, donde se elimina el anhídrido sulfuroso (SO_2) contenido en el mosto mediante un flujo de vapor a contracorriente. El vapor rico en SO_2 que sale por la cabeza de la columna se condensa y reacciona con una solución alcalina donde queda retenido. El mosto entra a la torre con una concentración total de SO_2 de 1500-1700 ppm (partes por millón) para luego salir con 60 ppm.

El jugo de uva desulfitado pasa a la etapa de pre-concentrado, donde se eleva la concentración de azúcar del mosto de 20 a 45 °Brix (sacarosa % solución p/p) mediante un evaporador de placas ascendente. El jugo de uva pre-concentrado sale con una temperatura de 45°C y pasa por un intercambiador de superficie para ser enfriado a 1-3 °C. La finalidad de esta etapa es enfriar el mosto pre-concentrado para que en la etapa siguiente precipiten los bitartratos. Luego de la decantación de las sales tartáricas se procede a la segunda filtración del mosto con el propósito de eliminar las partículas que puedan haber quedado en suspensión.

La concentración final del mosto se realiza en un evaporador concentrador de cuatro efectos. Las temperaturas alcanzadas son: 100 – 110°C en el primer efecto, 90 – 95°C en el segundo, 70-75 °C en el tercero y 40 – 50°C en el cuarto. La concentración de azúcares en el mosto al salir del equipo es de 68 °Brix.



Figura 1. Esquema del proceso para la elaboración de JUC. Adaptado de Rojo (2014).

Posteriormente, el jugo de uva concentrado es enfriado e inmediatamente almacenado en un tanque para su posterior fraccionamiento, en el cual se inyecta nitrógeno para crear una atmósfera inerte. En algunas empresas se incluye una etapa de pasteurización previa al envasado.

El fraccionado del JUC se realiza en condiciones de esterilidad. Puede ser colocado en diferentes tipos de envases (figura 2):

a - tambores metálicos de hasta 200 litros, dentro de los cuales se encuentra una bolsa de polipropileno doble, esterilizada con rayos gamma

b - bins de madera que tienen una capacidad de 300 galones (1135 litros) y en su interior se encuentra una doble bolsa de polietileno de alta densidad

c - flexitank (también llamado flexibag o flexitanque) es una bolsa multicapa flexible de gran tamaño (14000 a 24000 litros) que se coloca dentro de un *container*. Este es uno de los sistemas más utilizados en la industria del JUC.

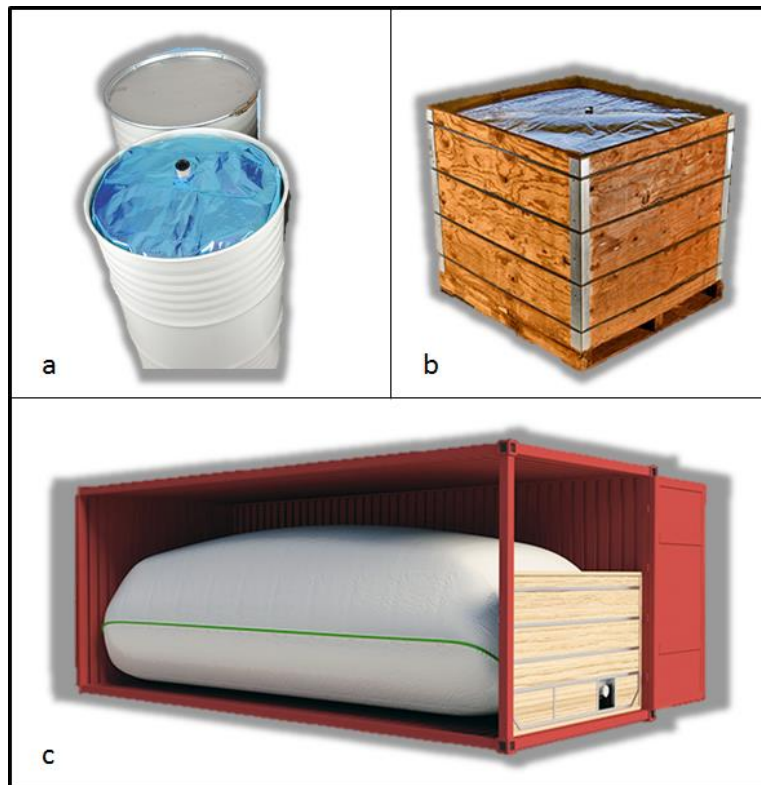


Figura 2. Envases utilizados para fraccionar JUC.

a- tambor metálico con bolsa de envasado aséptico (Aran Packaging, 2015). b- bin de madera con bolsa de envasado aséptico (Aran Packaging, 2015). c- vista lateral de un flexitank lleno dentro de un *container* (Overmeer Logistics, 2015).

1.5 Alteración microbiológica de JUC

La pérdida de los alimentos a través de la cadena productiva, la comercialización y el consumo tiene su origen en múltiples causas. Algunas de ellas son: daños que ocasionan insectos o roedores, alteración microbiológica, alteración químico-física, pérdidas durante el transporte, mermas del procesamiento posterior y descarte del producto excedente al finalizar su vida útil. Aunque según Sperber y Doyle (2009) la alteración microbiana es la principal causa de las pérdidas alimentarias durante la cadena de producción-comercialización-consumo.

Muchos tipos de microorganismos pueden encontrarse en un alimento, pero en determinados productos solo algunos de ellos pueden crecer lo suficiente como para producir alteración. Ciertos parámetros como el pH, la actividad de agua (a_w) y la temperatura de almacenamiento entre otros, ejercen una presión selectiva sobre la microbiota original. Estas variables dirigen la selección de los microorganismos que predominarán en este alimento (Sperber y Doyle, 2009).

El deterioro de alimentos por levaduras ocurre principalmente en aquellos productos donde el crecimiento bacteriano está limitado por las características intrínsecas, extrínsecas o de procesamiento. Sin esta competencia, las levaduras pueden crecer y alterar el producto. Típicamente condiciones como acidez, pH menor a 4,5, concentraciones de azúcares mayores a 10% p/v sacarosa, más de 5% p/v NaCl o la conservación con ácidos orgánicos (como ácido sórbico, ácido benzoico o ácido acético) hacen a los alimentos más propensos a ser afectados por levaduras (Querol y Fleet, 2006). Según Ingram (1958), las fuentes de contaminación con levaduras provienen de las frutas, el azúcar o los jarabes azucarados, los insectos, la suciedad y el equipamiento contaminado.

Por el catabolismo de las levaduras fermentativas, a partir de las hexosas se produce etanol y dióxido de carbono. El principal defecto originado por la producción de gas es el hinchamiento de envases sellados herméticamente y en algunos casos la explosión de los mismos (Sperber y Doyle, 2009). La alteración de los alimentos por levaduras fermentadoras no siempre cumple con la regla general que dice que *es necesario un número de microorganismos mayor a 10^6 UFC/g para que se manifieste deterioro en un alimento*. Se ha observado que tras varios meses de almacenamiento, este tipo de alteración puede manifestarse en productos con recuentos de levaduras menores o iguales a 10^4 células/g (Sperber y Doyle, 2009). Un recuento de levaduras menor a 10 UFC/mL es considerado un límite apropiado para determinar la calidad del jugo de uva concentrado (Combina y col., 2008).

Debido a los bajos pH y elevadas concentraciones de azúcares, los jugos de frutas son sustratos inadecuados para la mayoría de las bacterias. Sin embargo, son excelentes medios para el crecimiento de algunas levaduras, que utilizan sus carbohidratos y vitaminas principalmente. Por esto, los jugos y pulpas de frutas deben ser preservados de estos microorganismos deteriorantes ya sea mediante procesos químicos, pasteurización, congelación, concentración o irradiación. La falla frecuente de un solo método físico o químico para preservar subproductos de fruta ha hecho que se use la acción combinada de varios métodos como descenso de pH o a_w , uso de conservantes químicos, refrigeración o pasteurización (Deák, 2008).

La industrialización de la uva para la obtención de jugos concentrados presenta varias etapas de procesamiento que incluyen tratamientos térmicos que afectan la microbiota presente en la materia prima (ICMSF, 1980). A pesar de esto, los productos no están exentos de presentar problemas microbiológicos que deterioran la calidad del mismo. La alteración microbiana puede ocurrir en cualquier etapa de la cadena productiva, desde la materia prima hasta la manipulación y el procesamiento, e incluso en el producto envasado (Rojo, 2014). Por otro lado, la presencia de levaduras que no tienen la capacidad de desarrollar en el JUC debido a la elevada concentración de azúcares también es importante, ya que puede representar un riesgo para los alimentos donde es usado como ingrediente, pudiendo causar el deterioro de los nuevos productos donde las condiciones limitantes han cambiado (Sperber y Doyle, 2009).

En consecuencia, los rechazos por alteraciones microbianas en partidas de JUC exportadas producen grandes pérdidas económicas. Esto es debido al descarte del producto, costo de limpieza de la planta, la retirada de la partida desde el país de destino y el impacto negativo que esto genera en la imagen de la marca y la reputación de la empresa. Estos rechazos también dañan la imagen internacional del país, afectando futuras exportaciones y la apertura de nuevos mercados (Rojo, 2014).

1.5.1 Levaduras alterantes en JUC

Los alimentos de humedad intermedia incluyen aquellos productos con rangos de a_w comprendidos entre 0,60 a 0,90 (10-50% de humedad). En esta categoría se incluye al JUC, que posee una a_w comprendida entre 0,7-0,8; además presenta elevada concentración de azúcares (> 60 % p/V sacarosa) y bajo pH (< 4,5). La alteración de sustratos con estas características es causada por levaduras osmófilas, dentro de este grupo el género que se aísla con mayor frecuencia es *Zygosaccharomyces sp.* (Combina y col., 2008; Deák, 2008).

Las levaduras capaces de desarrollarse a bajos valores de a_w , han sido descritas como osmófilas, osmotolerantes, osmodúricas, xerófilas y xerotolerantes. El valor más bajo de a_w en el cual una levadura no-osmófila puede desarrollar varía en el rango de 0,85 – 0,92 (ICMSF, 1980). En este trabajo se definirá con el término “osmófila” a toda aquella levadura capaz de desarrollarse en alimentos con una alta concentración de azúcares y una $a_w < 0,85$. Por otro lado, existen levaduras que pueden sobrevivir a presiones osmóticas altas pero son incapaces de desarrollarse a valores $a_w < 0,85$ o en su defecto, lo hacen de manera muy lenta. Para una diferenciación práctica, a este grupo lo llamaremos “levaduras osmotolerantes” (Combina y col., 2008).

Aunque los mecanismos de tolerancia a elevadas concentraciones de azúcares en levaduras no están completamente elucidados, la mayoría de las investigaciones sugieren que las células son capaces de compensar la presión ejercida por un medio hipertónico mediante la acumulación de elevadas cantidades de polioles (Gervais y Marechal, 1994; Bubnová y col., 2014). Los principales solutos acumulados en levaduras expuestas a un estrés osmótico son el glicerol, arabitol y manitol (Spencer y Spencer, 1978; Deák, 2008). Otra característica de las levaduras que alteran productos líquidos con alta concentración de azúcares es la formación de “films” superficiales, ya que gracias a la alta densidad del producto pueden flotar sobre el mismo. A escala industrial los jugos de frutas almacenados en tanques son alterados por

levaduras osmófilas que flotan en la interface líquido-aire sin ser detectadas. En muchos casos la alteración es propiciada por cambios de temperatura, que producen condensaciones en el espacio de cabeza diluyendo localmente el producto y acelerando el crecimiento de las levaduras. Como la alteración no se encuentra distribuida homogéneamente en el volumen del jugo concentrado, generalmente aparece como una capa densamente contaminada cuando se vacía el tanque (Querol y Fleet, 2006).

Diferentes géneros de levaduras pueden ser aislados de jugos de frutas y alimentos ricos en azúcares: *Candida sp.*, *Debaryomyces sp.*, *Dekkera sp.*, *Hanseniaspora sp.*, *Kluyveromyces sp.*, *Lachancea sp.*, *Pichia sp.*, *Rhodotorula sp.*, *Saccharomyces sp.*, *Schizosaccharomyces sp.*, *Torulasporea sp.* y *Zygosaccharomyces sp.* (Deák, 2008). Por otro lado, en la superficie de la uva madura predominan levaduras apiculadas fermentativas como *Hanseniaspora sp.* y *Kloeckera sp.* y levaduras oxidativas como *Candida sp.*, *Pichia sp.* y *Metschnikowia sp.* (Barata y col., 2007). Es de esperar que estas levaduras osmotolerantes puedan persistir y luego sean aisladas en el producto final.

1.5.2 *Zygosaccharomyces rouxii* como principal alteradora de JUC

Trabajos anteriores realizados en el Laboratorio de Microbiología Enológica de la EEA Mendoza INTA, han permitido caracterizar la población de levaduras osmófilas y osmotolerantes en 21 muestras de jugos de uva concentrados de Argentina, mostrando que la principal levadura presente tanto en muestras alteradas (5 muestras) como sin alteración visible (16 muestras), pertenecen a la especie *Zygosaccharomyces rouxii*, acompañada por otras especies de levaduras en menor proporción como *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Pichia anomala* (anamorfo de *Wickerhamomyces anomalus*) y *Kluyveromyces delphensis* (Figura 3). Este trabajo permitió demostrar que *Z. rouxii* se aísla en la mayoría de las muestras de jugo de uva concentrado comercializable de Argentina, y que es la responsable de la alteración de los mismos (Combina y col., 2008).

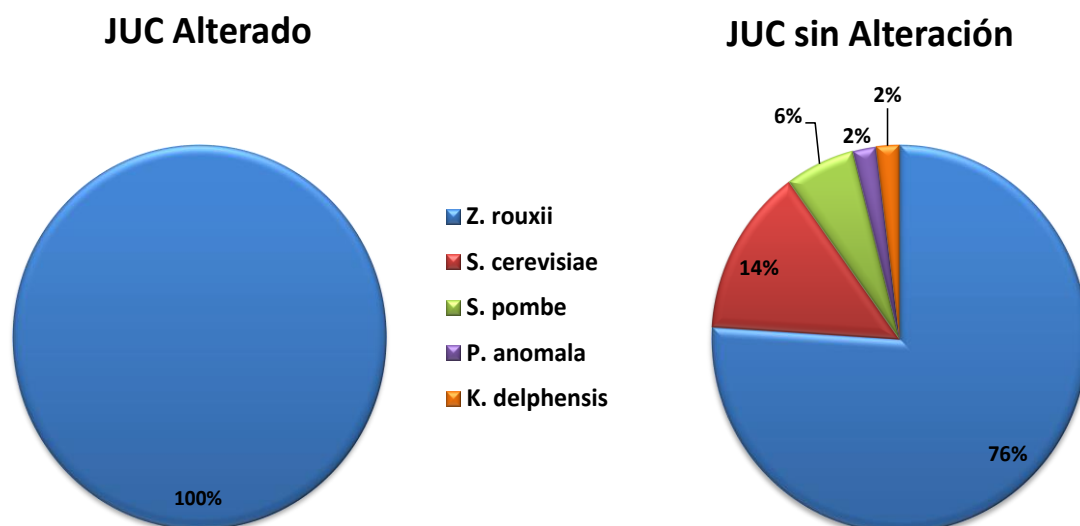


Figura 3. Porcentaje de levaduras osmófilas y osmotolerantes en JUC de Argentina. Adaptado de Rojo (2014).

Las levaduras del género *Zygosaccharomyces* pertenecen a la Familia *Saccharomycetaceae*. La morfología de las células y colonias varían según el medio de aislamiento. *Z. rouxii* presenta una morfología celular esférica, elipsoidal con gemación multilateral y puede formar pseudohifas, posee la capacidad de conjugar célula-célula y presenta un crecimiento lento (Kurtzman, 1998; Rojo, 2014). Es una especie osmófila y fructofílica (es decir que prefiere a la fructuosa como fuente de carbono). Se aísla de medios con baja a_w , especialmente cuando es causada por una concentración de azúcares mayor a 60% p/v sacarosa. Resulta ser una muy importante levadura alterante en la industria alimentaria, provocando grandes pérdidas en el sector de los alimentos con elevado contenido de azúcares (Bubnová y col., 2014). Anteriormente ha sido aislada a partir de una amplia variedad de sustratos, incluyendo la caña de azúcar, jarabe de chocolate, jugo de uva concentrado, miel, mermelada, jarabe, mazapán, vino tinto, frijoles salados, refrescos y salsa de soja (Deák, 2008; Rojo, 2014). También de jugo de naranja sin pasteurizar (Arias y col., 2002) y extractos de vegetales fermentados (Ok y Hashinaga, 1997).

Otras características que hacen de *Z. rouxii* una levadura con capacidad de producir alteración son su tolerancia a concentraciones de etanol mayores a 18% v/v, a concentraciones de ácido acético entre 2,0-2,5% p/v, a los ácidos sórbico y benzoico en cantidades de 800-1000 mg/L, al SO₂ molecular en concentraciones mayores a 3 mg/L (Rojo, 2014) y su halotolerancia (Querol y Fleet, 2006; Solieri y col., 2007). Además, en jugo de naranja sin pasteurizar se observó que esta levadura se desarrolló a temperaturas comprendidas entre 1,7°C a 10°C, con un tiempo de generación de 19,6 a 8,6 horas (Arias y col., 2002), por lo cual se puede concluir que la refrigeración no es una tecnología suficiente para controlar el crecimiento de esta levadura. Por el contrario Rojo (2014), demostró que la pasteurización resulta ser un método eficiente para reducir las poblaciones de *Z. rouxii* en JUC, recomendando un programa de pasteurización para alcanzar esterilidad industrial de 60 segundos a 85°C.

Se ha demostrado que *Z. rouxii* puede aparecer como contaminante en plantas concentradoras de jugo de uva y bodegas, la alteración que produce se manifiesta por la presencia de espuma, gas y olor a fermentado (James y Stratford, 2003). Estos defectos aparecen cuando la población de la levadura alcanza una densidad entre 10⁴-10⁵ UFC/g y terminan por evidenciarse cuando se alcanzan las 10⁷-10⁸ UFC/g (Fleet, 2011). El tiempo en el cual se llega a esta densidad poblacional depende de las condiciones de almacenamiento y de las características del producto.

1.6 Origen de la contaminación microbiana

Durante el procesamiento de frutas, la contaminación puede ocurrir de diversas maneras. Empezando por la ruptura tisular donde se pierde la esterilidad natural que existe en el interior de las frutas con los microorganismos que se encuentran en su superficie. Siguiendo con el posterior procesamiento, donde hay una contaminación adicional por la manipulación del producto. Los microorganismos pueden provenir de los operarios (de sus guantes, uniformes o aerosoles que crean al hablar, toser o estornudar), también puede existir contaminación cruzada con equipos de procesamiento mal higienizados o por el uso de agua contaminada (Sperber y Doyle, 2009).

Según Deák (2008), en la práctica se comprueba que la fuente de contaminación de jugos raramente se encuentra en la fruta, jarabes u otros ingredientes, sino que se origina en la línea de procesado. Los puntos críticos suelen ser bombas y tanques de almacenamiento, entre otros.

Usualmente se puede determinar que la limpieza y desinfección inadecuada del equipamiento o su diseño es causa de alteraciones en el producto. Por lo tanto, la aplicación de Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) en plantas de procesamiento minimizan la contaminación de los alimentos con microorganismos alteradores (Sperber y col., 2009). Las BPM son una serie de prácticas y procedimientos que se encuentran incluidas en el Código Alimentario Argentino (CAA) desde el año 1997, por lo que tienen carácter de obligatorias para todos los establecimientos que comercializan alimentos en el país y son una herramienta clave para lograr la inocuidad de los mismos. Se aplican en el procesamiento y su utilidad radica en que nos permite diseñar adecuadamente la planta y las instalaciones, realizar en forma eficaz los procesos y operaciones de elaboración, almacenamiento, transporte y distribución de alimentos (Albo Davio y col., 2011). Los beneficios de la implementación, mantenimiento y mejora de las BPM permiten obtener productos alimenticios inocuos y con la calidad deseada de forma constante, lo que permite ganar y mantener la confianza de los consumidores (Albo Davio y col., 2011).

Las BPM, según *Codex Alimentarius* se pueden desglosar en los siguientes principios generales (Albo Davio y col., 2011):

- ✓ Producción Primaria
- ✓ Proyecto y construcción de las instalaciones
- ✓ Control de las operaciones
- ✓ Instalaciones: mantenimiento y saneamiento
- ✓ Instalaciones: Higiene Personal
- ✓ Transporte
- ✓ Información sobre los Productos y Sensibilización de los Consumidores
- ✓ Capacitación

Por lo dicho hasta este momento queda claro que la Industria Argentina del JUC ha adquirido gran importancia en el ámbito de las exportaciones nacionales. Resulta importante aumentar la estabilidad microbiana del JUC, evitando rechazos de partidas exportadas. La correcta identificación de las especies presentes en el JUC y en las plantas elaboradoras y la determinación de los posibles puntos de contaminación durante la elaboración proporcionarán información útil a la industria para el adecuado diseño de un programa de calidad tendiente a controlar este problema, optimizar el tiempo de conservación y disminuir las pérdidas de producto.

1.7 Identificación molecular de levaduras

El impacto económico que tienen las alteraciones microbianas en los alimentos es actualmente reconocido. El desarrollo de una técnica de identificación rápida y precisa resulta prioritario, ya que sólo entendiendo la naturaleza de la alteración es que se puede tomar una decisión respecto a qué hacer con los procedimientos de limpieza y los productos contaminados (Hulin y Wheals, 2014).

Tradicionalmente las levaduras han sido identificadas utilizando criterios morfológicos y fisiológicos; no obstante estas características pueden variar con las condiciones de crecimiento. Algunas especies se diferencian de otras por una sola característica fisiológica, la cual es a su vez controlada por un solo gen, produciendo identificaciones erróneas cuando las condiciones de evaluación no son completamente controladas (Kurtzman y Fell, 1998; Querol y Fleet, 2006).

Otros métodos taxonómicos han sido desarrollados para la identificación de levaduras, basados en análisis de proteínas totales celulares, patrones de isoenzimas y análisis de ácidos grasos usando cromatografía gaseosa. A pesar de esto, la reproducibilidad de estas técnicas es cuestionable, ya que en muchos casos depende del estado fisiológico de la célula (Querol y Fleet, 2006).

Actualmente, las técnicas moleculares de identificación taxonómica han cobrado mayor importancia. La composición nucleotídica de su ácido desoxirribonucleico (ADN) y la secuencia de estas moléculas en el ADN ribosomal (ADNr) se utilizan para identificar, relacionar o diferenciar entre géneros y especies (Deák, 2008). En contraposición con los métodos anteriormente mencionados, las técnicas de biología molecular pueden analizar el genoma independientemente del estado fisiológico del cultivo (Querol y Fleet, 2006).

Estudios recientes basados en cruzamientos genéticos y comparaciones moleculares han mostrado que los caracteres previamente considerados como taxonómicamente definitivos varían entre cepas de la misma especie. Como consecuencia, al aplicar sólo criterios de taxonomía clásica, cepas divergentes de la misma especie podrían ser clasificados dentro de distintos taxones, mientras que nuevas especies podrían permanecer sin ser reconocidas. En la actualidad es un hecho que deben utilizarse métodos basados en biología molecular para la identificación de levaduras, si se desea obtener una correcta asignación de la especie (Kurtzman y Fell, 2004).

En el ADN, los genes ribosomales se disponen en múltiples copias (tándem) que incluyen regiones codificantes de las subunidades chicas (SUC) y grandes (SUG), y regiones no codificantes o espaciadoras. En levaduras el tamaño de la molécula de ADNr de la SUC es de 18S, en cambio la SUG contiene tres moléculas de ADNr de diferentes tamaños: 5S, 5.8S y 26S. Todas ellas son transcritas repetidas en tándem en una unidad, y sus partes son separadas por espaciadores internos y externos (ITS y ETS). Entre cada unidad hay un espaciador intergénico no transcribible (IGS o NTS) y usualmente en esta región se presenta el ADNr 5S, que es transcrito separadamente del resto del cluster (Deák, 2008) (figura 4).

Las regiones conservadas de la SUC han sido usadas para análisis filogenéticos, mientras las regiones más variables de la SUG y las secuencias ITS permitieron la resolución a nivel de especie (Deák, 2008).

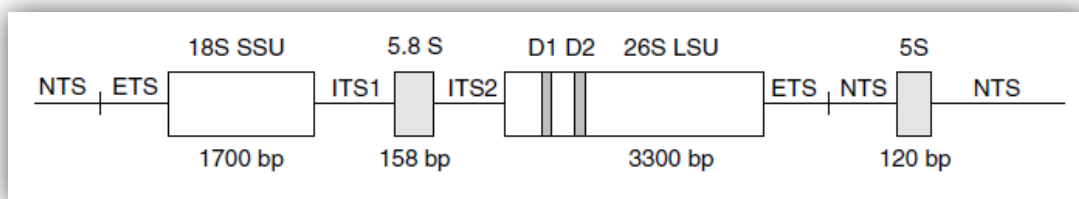


Figura 4. Estructura del ADN nuclear ribosomal (Deák, 2008).

La técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) permite la amplificación de fragmentos específicos de material genético a partir del ADN celular total. Esta técnica hace posible la secuenciación directa de las regiones de interés para una identificación precisa a nivel de especie (Querol y Fleet, 2006).

La secuenciación de un fragmento determinado de ADN amplificado por PCR, permite conocer la secuencia de las bases nucleotídicas y su posterior comparación con las bases de datos para obtener una identificación certera. La especificidad de la amplificación está determinada por el diseño de los cebadores o *primers* que se elijan, ya que según como se seleccionen serán diferentes las regiones que se amplificarán (figura 5). Previo a la secuenciación, los productos de PCR deben ser purificados para eliminar los *primers* y las bases nucleotídicas excedentes, que de otra manera podrían interferir en la reacción de secuenciación. En los sistemas de secuenciación automáticos o secuenciadores, cuatro marcadores fluorescentes son usados para identificar a cada una de las bases de nucleótidos (A, T, C y G). Los nucleótidos unidos a los marcadores fluorescentes son incorporados mediante una nueva reacción de PCR usando los mismos *primers*. Los fragmentos de ADN marcados son separados por capilaridad según su tamaño y simultáneamente excitados por láser, produciendo una emisión que es diferente para cada fluorocromo. Las señales son captadas en un receptor y transformadas por un *software* en picos de colores, cada uno de los cuales corresponde a una base nucleotídica (Querol y Fleet, 2006).

Actualmente, una de las técnicas más usadas para la identificación de levaduras es la secuenciación de las regiones amplificadas del ADNr 5.8S- ITS o el dominio D1/D2 del gen

ribosomal 26S (Hulin y Wheals, 2014). Ya se han obtenido y publicado las secuencias parciales o completas del ADNr 18S, los dominios variables D1/D2 o ADNr 26S y de las regiones ITS1-5.8S-ITS2 de muchas especies de levaduras, constituyendo una importante base de datos (Deák, 2008). Schoch y col. (2012) proponen el uso de la región ITS como marcador universal del código genético para la identificación de hongos, en su estudio se demostró que tiene una capacidad superior respecto de otras regiones para discriminar entre especies y una alta probabilidad de amplificación exitosa en la PCR.

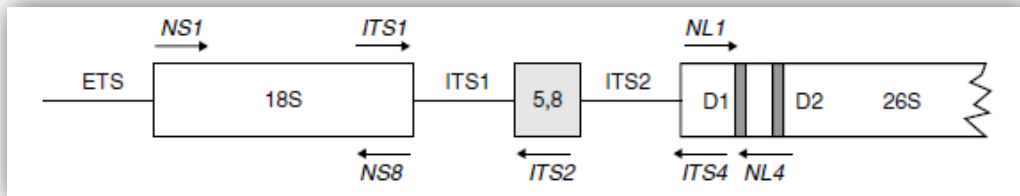


Figura 5. Diferentes regiones amplificadas del ADNr según el *primer* o cebador usado.
NS1-NS8: ADNr 18S; NS1-ITS2: secuencia 18S-ITS1; ITS1-ITS4: secuencias ITS1-5.8S ADNr-ITS2; NL1-
NL4: región D1/D2 del ADNr 26S (Deák, 2008).

2 Hipótesis y objetivos

2.1 Hipótesis planteadas

- Existe una elevada población de levaduras osmófilas en las diferentes superficies de plantas concentradoras de jugo de uva.
- *Z. rouxii* es una de las principales levaduras osmófilas presentes en los jugos de uva concentrados y las superficies de las plantas elaboradoras.
- Durante la elaboración del jugo de uva concentrado existen puntos críticos donde la contaminación con *Z. rouxii* puede ocurrir.

2.2 Objetivo general

- Identificar los puntos de contaminación con levaduras osmófilas en plantas elaboradoras de JUC, para contribuir a aumentar la estabilidad microbiana del producto.

2.3 Objetivos específicos

- Evaluar la incidencia de levaduras osmófilas en jugos de uva antes y después del concentrado y sobre distintas superficies de las plantas concentradoras de Mendoza y San Juan.
- Identificar las especies de levaduras osmófilas presentes en jugos de uva durante las diferentes etapas del concentrado y en las distintas superficies con las que entra en contacto el producto durante su elaboración.
- Identificar los puntos de contaminación con *Z. rouxii* durante la elaboración del jugo de uva concentrado que permitan tomar las medidas correctivas y preventivas correspondientes.

3 Materiales y métodos

3.1 Toma de muestra y recuento de levaduras osmófilas

Se eligieron tres plantas concentradoras de jugo de uva, diferentes en su ubicación geográfica, equipamiento, proceso de elaboración y escala de producción, como se detalla en la Tabla 1.

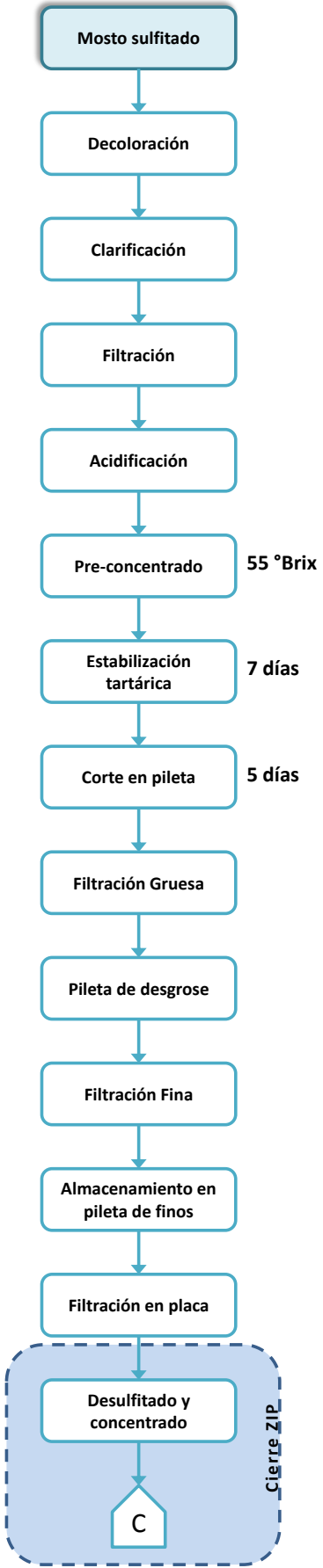
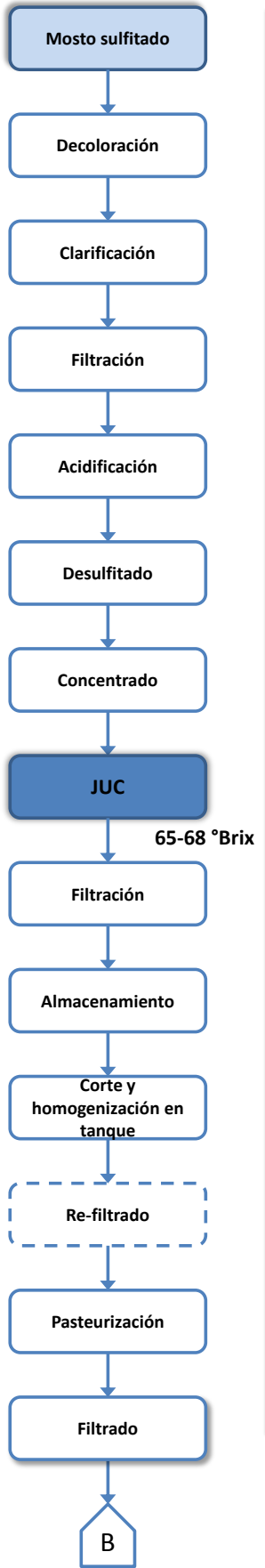
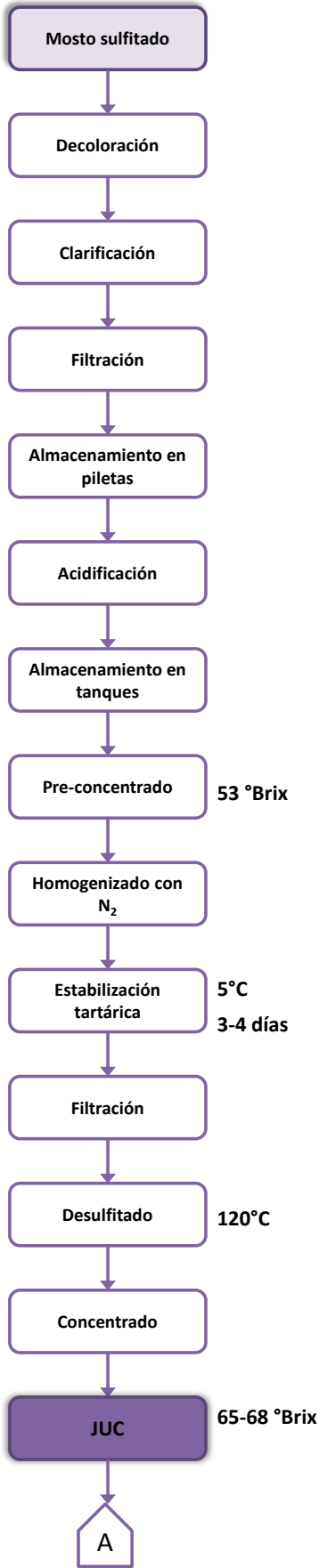
Tabla 1. Características de las plantas concentradoras de jugo de uva.

Planta	Ubicación	Producción anual (Tn)
A	Junín, Mza.	3500
B	San Juan	10000
C	Rivadavia, Mza.	25000

Durante la elaboración del jugo de uva concentrado se tomaron muestras para evaluar la presencia de levaduras osmófilas. Los puntos de muestreo se determinaron “*in situ*” dependiendo de la planta elaboradora e incluyeron muestras de jugo de uva sulfitado (JUS), jugo desulfitado, jugo de uva pre-concentrado (JUPC), jugo de uva concentrado (JUC), y muestras de superficies de mangueras, piletas, tanques, pisos y paredes (tabla 2).

Las muestras tomadas de jugos de uva y superficies asociadas incluyeron el seguimiento de un mismo lote de producto, desde su ingreso a la planta como JUS hasta su egreso como JUC envasado. Por lo tanto, las muestras se tomaron en sucesivas visitas a las plantas concentradoras de acuerdo a los tiempos y etapas en las cuales se completa el proceso para cada empresa. Las mismas se colocaron en recipientes estériles y se conservaron a 4°C hasta su procesamiento

Los diagramas de flujo para la elaboración de JUC en cada planta se muestran a continuación (figura 6).



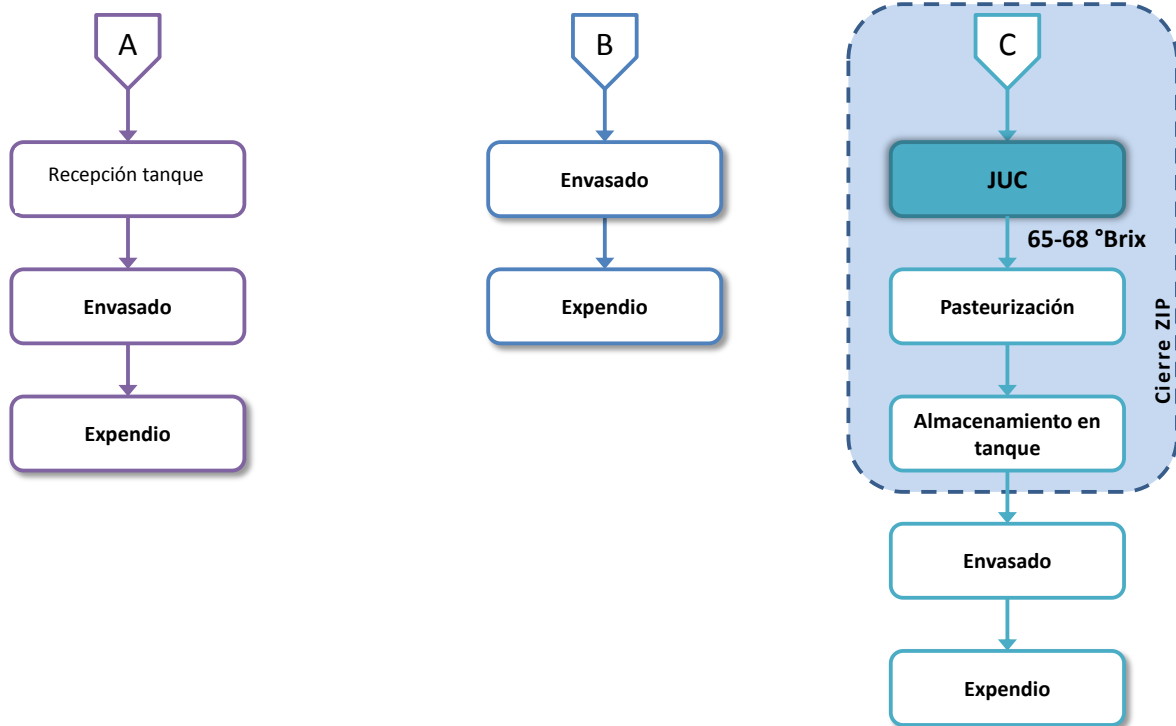


Figura 6. Diagramas de flujo de las elaboraciones de JUC en plantas A, B, C (derecha a izquierda).

Se tomaron 50 gramos de cada jugo de uva muestreado, luego cada alícuota se filtró a través de una membrana de 0,45 μm en un portafiltros estéril, previa dilución en 50 mL de solución de glucosa al 30%. La membrana filtrante se colocó en condiciones de esterilidad en la superficie del medio selectivo para levaduras osmófilas MY50G (agar 10 g/L, extracto de malta 10 g/L, extracto de levadura 2,5 g/L y glucosa 500 g/L) (Combina y col., 2008). Además las muestras de jugo de uva sulfitado fueron sembradas paralelamente en el medio para recuento general de levaduras agar nutritivo WL (Oxoid Co.). Las placas se incubaron a 28°C durante 2 a 7 días.

Para el caso de las plantas en que se tomó el agua de lavado de filtros, se sembró 0,1 mL de la muestra mediante siembra en superficie en el medio para levaduras osmófilas MY50G. Las placas de Petri se incubaron a 28 °C durante 2 a 7 días.

Por otro lado, el muestreo de las superficies se realizó con hisopos estériles utilizando una plantilla de 10 x 10 cm^2 , la cual fue colocada en diferentes sitios de la superficie a muestrear y se registró en número de veces que se realizó este procedimiento en una misma superficie. Los hisopos fueron colocados en tubos que contenían 10 mL de una solución estéril de agua glucosada al 30 % y homogenizados vigorosamente para dislocar los microorganismos retenidos en el mismo. Las muestras fueron transportadas a 4°C para su procesamiento.

Al esperarse baja carga microbiana sobre las superficies limpias, se realizó la filtración de los 10 mL de la solución donde se encontraba el hisopo a través de una membrana de 0,45 μm ; para ello se colocó con una pinza estéril la membrana de recuento sobre un portafiltros estéril. Se filtró el total de la solución glucosada y una vez concluida la misma se tomó la membrana

con esterilidad y se la colocó en el medio de cultivo MY50G (Combina y col., 2008). Las placas se incubaron a 28°C durante 2 a 7 días.

Se hizo el recuento de levaduras osmófilas para todas las muestras. Los resultados se expresaron en UFC por el total de muestra procesada o superficie hisopada. En los casos donde el desarrollo de las colonias fue tal que formó una pátina de crecimiento que no permitía su recuento, se consideró que se superaba el valor de $4 \cdot 10^3$ UFC. Este valor surge de considerar que se puede contar un máximo de 28 colonias por cuadro y multiplicar este valor por 144, que es el número de cuadros contabilizables en la membrana.

Tabla 2. Muestras líquidas durante la elaboración del JUC e hisopados de superficie de las plantas concentradoras.

Muestras		Planta A	Planta B	Planta C
Jugos de uva	JUS	✓	✓	✓
	JUS acidificado		✓	✓
	JU desulfitado	✓	✓	
	JUPC	✓		✓
	JUPC estabilizado	✓		✓
	JUPC filtrado	✓		✓
	JUC	✓	✓	✓
Superficies y agua de lavados	Tanque de ingreso JUS		✓	✓
	Tanque JUS acidificado			✓
	Tanque JUPC	✓		✓
	Tanque JUC	✓	✓	✓
	Pisos	✓	✓	✓
	Paredes	✓	✓	✓
	Mangueras	✓	✓	
	Caño de llenadora	✓	✓	
	Piletas			✓
	H ₂ O de lavado de filtros	✓	✓	
	Placa de filtro	✓		
	Guantes de operarios			✓

JUS: jugo de uva sulfitado. JU: jugo de uva. JUPC: jugo de uva pre-concentrado. JUC: jugo de uva concentrado.

3.2 Identificación de levaduras osmófilas

3.2.1 Purificación de los cultivos

Las colonias crecidas en el medio MY50G correspondientes a todas las muestras tomadas, fueron purificadas mediante siembra por estrías por agotamiento en el medio diferencial agar nutritivo WL (Oxoid Co.). Las placas se incubaron a 28°C durante 48 a 72 horas. Cuatro colonias correspondientes a cada muestra fueron repicadas en el medio agar YPD (40 g/L glucosa, 5 g/L peptona bacteriológica, 5 g/L extracto de levadura, 20 g/L agar) y se incubaron a 28°C durante 48 hs. Estos cultivos fueron recolectados y colocados en microtubos de 1,5 ml con glicerol 30% p/p para su conservación en freezer a -20°C.

La reactivación de las muestras conservadas en glicerol se realizó en agar nutritivo WL, la siembra fue mediante estrías por agotamiento y la incubación de 28°C por 48 hs. Se observó la uniformidad de las colonias presentes en la placa y de esta manera se corroboró la pureza de los aislados. Luego se pasó una colonia representativa bien aislada a un tubo inclinado con agar YPD. Los tubos fueron incubados a 28°C durante 48-72 horas y mantenidos a 4°C hasta su identificación molecular.

3.2.2 Extracción de ADN

Se utilizó la técnica modificada de Hoffman y Winston (1987) que consiste en la ruptura celular mediante lisis mecánica/química de las células, seguido de una purificación con fenol/cloroformo/alcohol isoamílico y precipitación del ADN con alcohol absoluto.

Para esto se inoculó cada levadura desde su cultivo activo en YPD sólido, en 10 mL de caldo YPD (40 g/L glucosa, 5 g/L peptona bacteriológica, 5 g/L extracto de levadura) y se incubó en estufa a 28°C. Los mismos se airearon por agitación en vortex (IKA vibrax VXR Basic) tres veces al día, hasta observar turbidez y un fino desprendimiento de gas.

Una vez que cada cultivo presentó desprendimiento de gas, se procedió a centrifugarlo durante 5 minutos a 3000 rpm (revoluciones por minuto), se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento o "*pellet*" en 500 µL de agua miliQ estéril para su lavado. Luego el contenido del tubo se trasvasó a un microtubo de 1,5 ml y nuevamente se centrifugó por 5 minutos a 13000 rpm, inmediatamente se descartó el sobrenadante. Los *pellets* se conservaron a -20°C durante 3-7 días.

La técnica de congelar de los *pellets* de células se utilizó para poder realizar la extracción de ADN de todas las muestras juntas. Motivó este procedimiento el hecho de al tratarse de diferentes aislados (los cuales podían tratarse de diferentes especies de levaduras), el crecimiento óptimo de cada uno se evidenciaba con diferentes tiempos de cultivo. Con esta metodología se obtuvieron adecuadas cantidades de ADN íntegro.

Para la extracción del ADN a partir de los *pellet* de todas las muestras, se añadió a cada tubo 200 µL de solución 1F (Tritón X-100 2%, SDS 1%, C1Na 11mM, Tris HCl pH 8 10 mM, EDTA Na 10 mM pH 8), resuspendiendo el sedimento con cuidado para no hacer burbujas; también se agregó 0,3 g de perlas de vidrio. Inmediatamente y bajo campana de gases se agregó 200 µL de

fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1) (Ambion Co.) y se agitó en vortex (IKA Vibrax VXR Basic) durante 4 minutos a 1500 rpm. Una vez retirados los tubos del vortex, se procedió a agregar 200 μ L de Buffer TE (tris EDTA: Tris HCL pH 8, 10 mM, EDTA Na pH 8, 10 mM) y se centrifugó por 5 minutos a 13000 rpm. Formadas las capas que separan los componentes celulares (figura 7), se recuperó 370 μ L de la fase acuosa superior que contenía el ADN y se trasvasó a un nuevo microtubo de 1,5 mL.

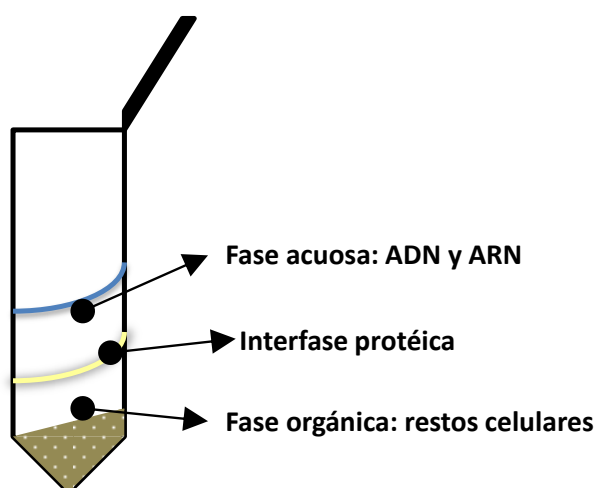


Figura 7. Fases formadas después de la centrifugación para recuperación del ADN.

Posteriormente se agregó 1 mL de etanol absoluto a -20°C , se mezcló por inversión y se centrifugó durante 2 minutos a 13000 rpm. Se eliminó el sobrenadante, se resuspendió el precipitado en 100 μ L de Buffer TE (1X) y se agregó 1 μ L de enzima ARNasa (10 U/ μ L) (Fermentas Inc., USA), seguidamente se incubó a 37°C durante 2 horas. Pasado este tiempo, se adicionó 4 μ L de acetato de amonio ($\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$ 10M) y 1 mL de etanol absoluto a -20°C , se mezcló por inversión y se centrifugó por 2 minutos a 13000 rpm. De inmediato se descartó el sobrenadante y se lavaron las paredes del tubo con 200 μ L de etanol 70% a -20°C , se centrifugó 2 minutos a 13000 rpm para luego eliminar el sobrenadante y dejar secar a temperatura ambiente unos 5 minutos. Finalmente se resuspendió el ADN en 50 μ L de buffer TE y se conservó a -20°C .

3.2.3 Observación del ADN extraído

La visualización cualitativa y cuantitativa del ADN se realizó en geles de agarosa 0,7% (Invitrogen Corporation, USA) teñidos con bromuro de etidio 0,1% p/v. La electroforesis se realizó en buffer TBE 1X (TBE 5 X: Base Tris 54 g, Ácido Bórico 27,5 g, 20 ml EDTA 0.5 M, completado a volumen 1 L con agua miliQ, pH 8) utilizando una corriente de 90 V durante 45 minutos.

Las muestras a sembrar se prepararon de la siguiente forma:

— 3 μ L de ADN + 2 μ L Loading Buffer (Blue Juice Invitrogen Co.) + 5 μ L de agua miliQ,

y para el patrón de peso molecular,

- 1µL del marcador λ EcoRI/HindIII (Fermentas Inc., USA) + 2 µL de Loading Buffer + 7 µL de agua miliQ.

Como se observa en la figura 8, las imágenes para cada uno de los ADN extraídos fueron captadas al exponer los geles a un transiluminador de UV en fotodocumentador con cámara CCD acoplada y analizadas con el software Gel Doc XR (Bio Rad Laboratorios Limited, Hemel Hempstead, UK.).

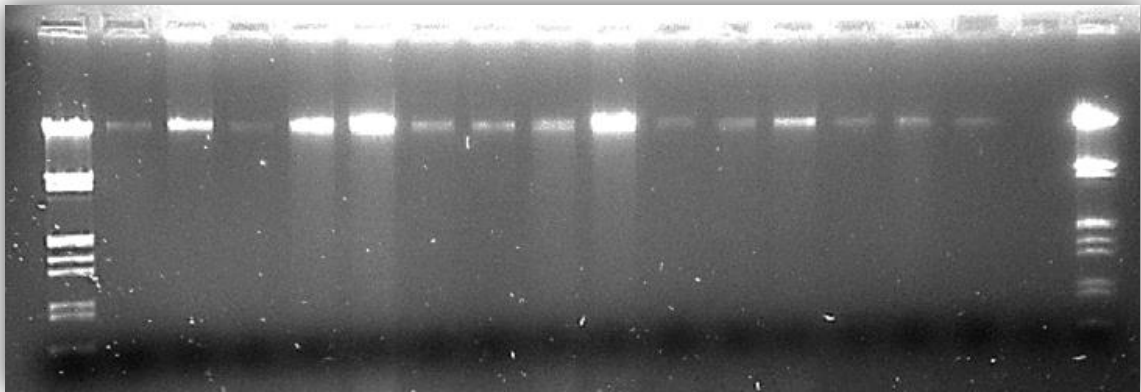


Figura 8. Visualización mediante luz UV en gel de agarosa 0,7% del ADN extraído.

3.2.4 Amplificación de la región ITS1-5.8S-ITS2 del complejo génico nuclear del ADNr

La amplificación de esta región se realizó mediante la aplicación de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) utilizando los cebadores o “*primers*” ITS1 (5’- TCC GTA GGT GAA CCT GCG G- 3’) e ITS4 (5’- TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC- 3’). Las condiciones de reacción fueron las descritas por Esteve-Zarzoso y colaboradores (1999).

La reacción fue llevada a cabo en un termociclador Mastercycler Gradient Eppendorf (Eppendorf, Hamburgo, Alemania) como se muestra en la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.3.**

Tabla 3. Temperaturas y tiempos para el ciclo de PCR.

Paso		Temperatura (°C)	Tiempo
Activación inicial		95	5 min
Ciclos X40	Desnaturalización	94	1 min
	Hibridación	55,5	2 min
	Extensión	72	2 min
Extensión final		72	10 min
Final del ciclo		4	∞

La mezcla de reacción se preparó en un volumen final de 100 µL con 10 µL de tampón de reacción 10X sin MgCl₂ (Invitrogen Corporation, USA), 5 µL de MgCl₂ 50 mM (Invitrogen

Corporation, USA), 8 μL de mezcla de dinucleótidos (dNTPs 1 mM) (Fermentas Inc., USA), 2 μL de cada cebador (50 μM), 0,5 μL de Taq polimerasa recombinante 5 U/ μL (Invitrogen Corporation, USA), 57,5 μL de agua miliQ estéril y 15 μL de ADN (50 – 100 ng).

Los fragmentos amplificados fueron separados por electroforesis en gel de agarosa (Invitrogen Corporation, USA) al 1,4 %, teñidos con Bromuro de Etidio al 0,1 %. La corrida electroforética se realizó a 100 V durante 60 minutos, utilizando buffer TBE 1X. El marcador de peso molecular fue 100bp DNA ladder (Invitrogen Corporation, USA). Las muestras a sembrar se prepararon de la siguiente forma: 4 μL de producto de amplificación + 2 μL LB + 6 μL de agua miliQ, y por otro lado, 0,5 μL de marcador de 100 bp + 2 μL de LB + 9,5 μL de agua miliQ. Luego de la electroforesis los geles fueron visualizados con luz UV en fotodocumentador (Bio Rad Laboratorios Limited, Hemel Hempstead, UK.) (figura 9).

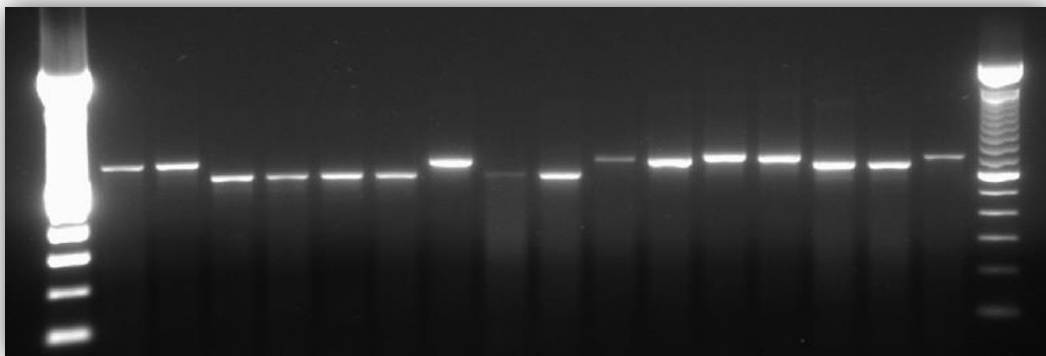


Figura 9. Observación de los productos amplificados por PCR 5.8S-ITS en gel de agarosa al 1,4%.

3.2.5 Purificación y secuenciación de los fragmentos amplificados

Previo a la secuenciación, se llevó a cabo la purificación y concentración de los productos amplificados mediante el kit PureLink™ PCR purification (Invitrogen Corporation, USA). Luego las muestras fueron enviadas al Servicio Interno de Genotificación y Secuenciación de ADN (SIGYSA) del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria INTA-Castelar, para la obtención de las secuencias de nucleótidos con cada *primer* de manera independiente. La secuenciación se basó en el método de Sanger, y el equipo utilizado para el análisis fue el 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystem, Warrington, U.K.).

Las secuencias fueron analizadas con el programa específico Sequencing Analysis 5.2 (Applied Biosystems), el cual permitió determinar la calidad de la secuencia obtenida y el electroferograma de la misma. Posteriormente se realizó el alineamiento de las secuencias mediante Contig-Express (Vector Suite Inc.). Las secuencias consenso obtenidas fueron comparadas por BLAST (Basic Lineal Alignment Search Tool) con las bases de datos disponibles en la página del Centro Nacional de Información de Biotecnología (NCBI) del Instituto Nacional de Salud de Estados Unidos (NIH) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

El tamaño de la región ITS amplificada para cada muestra y su porcentaje de homología con las secuencia de ADN homóloga de la base de datos se muestra en el Anexo A.

4 Resultados y discusión

Se tomaron muestras en las distintas etapas del proceso de elaboración del JUC y se obtuvieron los recuentos de levaduras osmófilas de cada una. En la Tabla 4 se muestra si se obtuvo recuento de levaduras osmófilas en el medio MY50G fueron positivos o no se observó crecimiento en cada una de las muestras de jugo de uva y las superficies hisopadas.

Tabla 4. Presencia de levaduras osmófilas en las muestras de jugo de uva e hisopados de superficies asociadas durante la concentración en diferentes empresas.

Muestras		Planta A	Planta B	Planta C
Jugos de uva	JUS	-	-	-
	JUS acidificado	NM	-	-
	JU desulfitado	-	-	NM
	JUPC	+	NM	+
	JUPC estabilizado	+	NM	+
	JUPC filtrado	+	NM	+
	JUC	-	+	-
	JUC pasteurizado	NM	+	-
Superficies y agua de lavados	Tanque JUS acidificado	NM	NM	-
	H ₂ O de lavado de filtros	+	+	NM
	Placa de filtro	+	NM	NM
	Piletas de JUPC	NM	NM	+
	Tanque JUPC	-	NM	+
	Tanque JUC	+	-	-
	Mangueras	NM	+	NM
	Caño de llenadora	+	-	NM
	Pisos	-	+	+
	Paredes	-	+	-
	Guantes de operarios	NM	NM	-

JUS: jugo de uva sulfitado. JU: jugo de uva. JUPC: jugo de uva pre-concentrado. JUC: jugo de uva concentrado. NM: no muestreado. Jugos de uva (-) = < 1 UFC/50g. Superficies (-) = < 1 UFC/400 cm². Medio utilizado para el recuento: MY50G.

Las superficies de cada empresa fueron hisopadas en diferentes momentos, conforme avanzaba el procesamiento del mismo lote de jugo de uva. Los recuentos de estos hisopados evidenciaron presencia de levaduras osmófilas solo en aquellas áreas asociadas al jugo de uva con algún grado de concentración (jugo de uva pre-concentrado y concentrado). Asimismo, las muestras de jugo de uva solo obtuvieron recuentos de levaduras osmófilas cuando ya se habían pre-concentrado o concentrado. Este resultado era esperable ya que como menciona Deák (2008), existe una correlación entre el tipo de microorganismo que se aísla y las

características del sustrato. Estas asociaciones pueden ser altamente específicas y definen las diferencias que existen entre las comunidades de levaduras en los distintos tipos de alimentos. Esto explica que las levaduras osmófilas solo aparezcan cuando los alimentos presentan una elevada concentración de azúcares.

En la planta A, el tanque para jugo de uva pre-concentrado (JUPE), las paredes y los pisos no presentaron recuentos de levaduras osmófilas (tabla 4). El buen estado sanitario de esta planta se debió a una correcta práctica de higiene de las instalaciones y equipamiento, como así también a que se trabaja a menor escala que las otras dos empresas. Sin embargo el caño de la llenadora presentó una gran carga de levaduras osmófilas (tabla 5), esto indica que no se realizó la correcta limpieza del mismo y puede considerarse una posible fuente de contaminación para el JUC envasado. En contraposición a la empresa A, la empresa B no tuvo presencia de levaduras osmófilas en el tanque que almacena JUC, ni tampoco en el caño de la llenadora pero sí en piso y paredes. Esta discrepancia en la distribución de la densidad poblacional de levaduras osmófilas en las fábricas A y B, se debe a que son diferentes las instalaciones, los procedimientos de limpieza y el personal; por lo tanto el grado de higiene que se logra en cada sector estará condicionado a estos factores.

Por otro lado la planta C no presentó recuentos de levaduras osmófilas en el tanque donde se almacena jugo de uva sulfitado, el tanque para JUC, las paredes y los guantes de los operarios (tabla 4). Esto demuestra que hubo una correcta sanitización de los tanques y paredes, también que la manipulación de los operarios no constituiría una fuente de contaminación con levaduras osmófilas en esta empresa.

Respecto de las muestras de jugo de uva sulfitado, no se observó desarrollo de levaduras osmófilas en el medio MY50G (tabla 4). En contraposición se observaron recuentos positivos (mayores a 10^3 UFC/50g) en el medio para recuento general de levaduras agar WL (datos no mostrados). Las levaduras crecidas fueron identificadas como *Z. rouxii* y *Schizosaccharomyces pombe*. Este hallazgo confirma nuevamente la estrecha asociación que existe entre el alimento y las especies de levaduras que se encuentran en él, puesto que ambas especies comparten la característica de elevada tolerancia al anhídrido sulfuroso (Pitt y Hocking, 2009; Martorell y col., 2007). Estas especies que normalmente se encuentran en los jugos de uva, resistieron concentraciones de 2100 ppm de SO_2 total y mantuvieron su viabilidad, pero probablemente sufrieron un daño sub-letal (Wu, 2008) que no les permitió desarrollar en el medio para levaduras osmófilas MY50G, ya que este le proporcionaba un estrés adicional (baja a_w); mientras el medio de recuento general agar WL permitió la recuperación celular y consecuentemente el crecimiento de las colonias.

En las tablas 5, 6 y 7 se muestran los valores de los recuentos para levaduras osmófilas y las especies identificadas en todas las muestras en las que se observó crecimiento de colonias, tanto en los jugos de uva como en las superficies asociadas de las tres plantas. Para un mejor entendimiento de las tablas, las muestras se ordenan siguiendo el avance del lote por la línea de procesado, diferenciando las superficies hisopadas (y aguas de lavado) de las muestras de jugo por el sombreado de las celdas.

Tabla 5. Recuentos e identificaciones de las muestras en las que se observó presencia de levaduras osmófilas en la planta A.

Lugar de toma de muestra	Recuento de levaduras osmófilas	Especies aisladas	Frecuencia de identificación*
JUPC antes de almacenar	1 UFC/50g	<i>Citeromyces matritensis</i>	3/3
Placa de filtro para JUPC	> 4.10 ³ UFC/400 cm ²	<i>Citeromyces matritensis</i>	1/3
		<i>Lachancea thermotolerans</i>	1/3
		<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	1/3
Agua de lavado de filtros	> 4.10 ³ UFC/mL	<i>Citeromyces matritensis</i>	1/4
		<i>Torulaspora delbrueckii</i>	3/4
JUPC filtrado	> 4.10 ³ UFC/50g	<i>Citeromyces matritensis</i>	2/4
		<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	2/4
Tanque que recibe JUC a la salida del concentrador	> 4.10 ³ UFC/400 cm ²	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	4/4
Caño de la envasadora	> 4.10 ³ UFC/400 cm ²	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	4/4

JUPC: jugo de uva pre-concentrado. JUC: jugo de uva concentrado. * N° identificada/ N° total colonias purificadas.

Tabla 6. Recuentos e identificaciones de las muestras en las que se observó presencia de levaduras osmófilas en la planta B.

Lugar de toma de muestra	Recuento de levaduras osmófilas	Especies aisladas	Frecuencia de identificación*
Paredes	20 UFC/400 cm ²	<i>Candida orthopsilosis</i>	1/4
		<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	3/4
Piso	> 4.10 ³ UFC/400 cm ²	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	2/4
		<i>Torulaspota delbrueckii</i>	2/4
Agua de lavado de filtros	> 4.10 ³ UFC/mL	<i>Candida apicola</i>	1/3
		<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	2/3
JUC antes de filtrar	> 4.10 ³ UFC/50g	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	4/4
JUC almacenado	> 4.10 ³ UFC/50g	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	4/4
JUC homogeneizado con aire filtrado	> 4.10 ³ UFC/50g	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	4/4
Manguera de aire filtrado para homogenización de JUC	2.10 ³ UFC/400 cm ²	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	4/4
JUC antes de pasteurizar	144 UFC/50g	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	3/3
JUC a la salida del pasteurizador	15 UFC/50g	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	3/3
JUC pasteurizado almacenado	> 4.10 ³ UFC/50g	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	4/4
JUC para envasar	> 4.10 ³ UFC/50g	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	4/4

JUC: jugo de uva concentrado. * N° identificada/ N° total colonias purificadas.

Tabla 7. Recuentos e identificaciones de las muestras en las que se observó presencia de levaduras osmófilas en la planta C.

Lugar de toma de muestra	Recuento de levaduras osmófilas	Identificaciones	Frecuencia de identificación*
Tanque JUPC	3 UFC/400 cm ²	<i>Citeromyces matritensis</i>	1/3
		<i>Torulaspota delbrueckii</i>	2/3
Piso	> 4.10 ³ UFC/400 cm ²	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	4/4
JUPC antes de filtrado grueso	> 4.10 ³ UFC/50g	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	3/3
JUPC después de filtro grueso	> 4.10 ³ UFC/50g	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	4/4
JUPC antes de filtrado fino	> 4.10 ³ UFC/50g	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	1/4
		<i>Candida magnoliae</i>	3/4
JUPC después de filtrado fino	> 4.10 ³ UFC/50g	<i>Candida magnoliae</i>	1/4
		<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	3/4
Pileta JUPC filtrado fino	> 4.10 ³ UFC/400 cm ²	<i>Citeromyces matritensis</i>	3/3
JUPC en pileta antes de concentrar	> 4.10 ³ UFC/50 g	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	4/4
JUPC en tanque pulmón (alimentación de circuito ZIP)	> 4.10 ³ UFC/50g	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	4/4
JUPC entrada del filtro de placas	> 4.10 ³ UFC/50g	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	4/4

JUPC: jugo de uva pre-concentrado. * N° identificada/ N° total colonias purificadas.

Durante el proceso de concentrado de la planta A y en el concentrado y pasteurización de la planta C, se observó una disminución de los recuentos, haciendo que no se observara presencia de levaduras osmófilas en los 50 gramos de JUC analizados (tabla 4). En estas dos plantas, la línea de envasado está directamente vinculada con el concentrador; en la planta A se fracciona directamente a medida que se va concentrando; mientras que en la planta C, el jugo de uva concentrado entra en un sistema cerrado e inertizado donde se mantiene hasta su fraccionamiento. Esto evita la recontaminación del producto luego de los tratamientos térmicos, siempre y cuando el circuito esté correctamente sanitizado. Por lo dicho es que el producto final de las empresas A y C debiera presentar una buena estabilidad microbiana si no sufriera recontaminación.

Por otro lado, la empresa B sigue un protocolo de elaboración diferente. El jugo de uva sulfitado es directamente concentrado, homogeneizado, pasteurizado y almacenado en tanques pulmón hasta su fraccionamiento (Figura 6. Diagramas de flujo de las elaboraciones de JUC en plantas A, B, C (derecha a izquierda). Figura 6). Cuando se tomaron muestras de las etapas de almacenado del JUC previo a la pasteurización se obtuvieron recuentos elevados (tabla 6). Pero por lo observado en las plantas A y C, se supone que la concentración previa del JUC almacenado debería haber reducido la carga de levaduras osmófilas. Consecuentemente, los recuentos elevados se podrían deber a una población residual que creció durante el almacenamiento o a una recontaminación por alguna superficie mal higienizada. Es improbable que el tanque pulmón sea la fuente de inóculo ya que mostró ausencia de levaduras osmófilas en la superficie muestreada. Posteriormente, el JUC almacenado se pasteurizó antes de ser fraccionado. La muestra de JUC entró al pasteurizador con una población de levaduras osmófilas de 144 UFC/50 g (esta población fue menor a la registrada en la etapa previa de homogeneizado, porque el JUC fue re-filtrado). Después del pasteurizado, el producto final presentó un recuento de 15 UFC/50 g (tabla 6). Estas levaduras fueron identificadas como *Z. rouxii*. De acuerdo a los resultados obtenidos por Rojo (2014), sobre los programas de pasteurización para alcanzar la esterilidad industrial en JUC, se puede inferir que el tratamiento térmico aplicado (94°C con un tiempo de retención de 62 segundos) habría sido suficiente para eliminar a la población de *Z. rouxii* de los jugos de uva. En este caso son dos las hipótesis que podrían justificar este recuento, por un lado podemos pensar que se debe a una población residual sobreviviente o atribuírselo a una recontaminación por contacto con cañerías mal higienizadas antes de la salida del pasteurizador.

Querol y Fleet (2006) concluyen en su libro que no deberían ser esperados casos de alteración por levaduras en productos correctamente pasteurizados. También dicen que aun así, unas pocas células pueden sobrevivir a la pasteurización si se parte de una población inicial elevada (mayor a 10^5 células/mL), en este caso los recuentos del jugo de uva previo al concentrado fueron inferiores a este valor. Además el comportamiento de *Z. rouxii* en estudios anteriores ha mostrado una inesperada sensibilidad al calor (Samson y col., 1981). Por otro lado, la termoresistencia de las levaduras puede ser aumentada por la alta concentración de azúcares en el medio, la presencia de células en la fase estacionaria de crecimiento o por la formación de ascosporas. Aunque depende de la especie, en general se puede decir que las ascosporas son 10°C más termoresistentes que su contraparte, las células vegetativas (Querol y Fleet, 2006). Pitt y Hocking (2009) describen el aumento de la termotolerancia de *Z. rouxii* en

presencia de una alta concentración de azúcares del medio y también le atribuyen la capacidad de formar ascosporas. No obstante, también existe la hipótesis de las superficies mal higienizadas. Al respecto Tilbury (1976) e Ingram (1958) dicen que el contacto con equipamiento mal higienizado o sucio es probablemente la principal causa de contaminación con levaduras alterantes en las fábricas de procesamiento de alimentos. Se ha estimado que más del 95% de los casos de bebidas analcohólicas alteradas fue a causa de la mala higiene de la fábrica (van Esch, 1987). La lista de los equipos que se contaminan con mayor frecuencia incluye a envasadoras, tapadoras, sistemas transportadores, bombas y juntas de válvulas entre otros (Scharf, 1960; Pitt y Richardson, 1973; Schmidt, 1995; Davenport, 1997).

Respecto de los jugos de uva pre-concentrados de las plantas A y C, obtuvieron recuentos que sobrepasaban las 4.10^3 UFC/50g en todas las etapas muestreadas. Incluso en los jugos pre-concentrados filtrados hubo una elevada incidencia de levaduras osmófilas, a pesar de que estas células eran retenidas en gran parte cuando pasaban a través de los filtros. Esta última afirmación se evidencia en el alto recuento de levaduras osmófilas en el agua de lavado de los filtros y por la tabla 8, donde se analizan por separado los recuentos obtenidos en los JUPC de la planta C a través de sus múltiples etapas de filtrado.

Tabla 8. Recuentos de levaduras osmófilas en jugos de uva pre-concentrado de la planta C.

Muestra	Recuento (UFC/50g)
JUPC	$> 4.10^3$
JUPC destartarizado	$> 4.10^3$
JUPC filtrado grueso	$> 4.10^3$
JUPC antes de filtrado fino	$> 4.10^3$
JUPC después del filtrado fino	< 1
JUPC entrada al filtro placa	$> 4.10^3$
JUPC salida al filtro placa	< 1
JUPC almacenado antes de concentrar	$> 4.10^3$

JUPC: jugo de uva pre-concentrado.

La planta C realiza tres etapas de filtrado del JUPC (filtrado grueso, fino y en placa), el jugo pre-concentrado es almacenado en piletas o tanques entre cada etapa. El período de permanencia en varía desde un día hasta una semana, dependiendo de la capacidad de la planta y de la demanda del mercado. Se pudo observar que el JUPC presentó un elevado recuento de levaduras osmófilas en las diferentes etapas antes del filtrado fino. Pero luego, tanto en el filtrado fino como en el filtrado en placa se retuvieron la mayoría de las levaduras, dejando a los jugos con ausencia de levaduras osmófilas en los 50 gramos muestreados. Esto permite apreciar el beneficio que tendría esta etapa en la estabilidad microbiana del producto final, reduciendo considerablemente el recuento de levaduras. Aunque esto no significa que el producto haya quedado libre de células, ya que el tiempo de almacenado entre cada filtrado permitió un nuevo aumento de la población de levaduras osmófilas. Dado que no se

obtuvieron recuentos en 50g para los jugos de uva pre-concentrados recién filtrados, nuevamente podemos pensar que el JUPC sufrió una recontaminación en el almacenamiento o que el período de mantenimiento en tanques sin control de temperatura podría haber permitido la multiplicación de la población residual.

Cuando las levaduras aisladas fueron identificadas, se observó que *Z. rouxii* fue la especie más encontrada en las muestras de jugo de uva pre-concentrado y concentrado. En la mayoría de los casos representó el total de las levaduras aisladas (tablas 5, 6 y 7). Esto refuerza la hipótesis presentada por Rojo (2014), que dice que esta levadura es la principal alterante en JUC. En la planta C hubo dos casos en los que *Z. rouxii* no fue la única levadura dominando el sustrato. En el jugo de uva pre-concentrado antes y después del filtrado fino, *Z. rouxii* apareció acompañada por otra especie identificada como *Candida magnoliae*, la cual es una levadura fructofílica capaz de crecer en amplio rango de valores de pH y en presencia de una gran concentración de azúcares. Anteriormente esta levadura fue aislada de panales de miel (Hee Yu y col., 2006) y de jugo de naranja concentrado (Kurtzman y col., 2011). Ha sido relacionada a alteraciones de alimentos ricos en azúcares junto con otra especie del género, *C. apicola* (Steels y col., 2002; Stratford y James, 2003). Tiene aplicación biotecnológica, ya que produce una gran cantidad de eritritol, un edulcorante usado en la industria alimentaria que resalta el sabor (Hee Yu y col., 2006). Esta levadura podría estar relacionada con las superficies de la etapa de filtrado fino, las cuales no pudieron ser muestreadas en este estudio. La otra excepción fue la presencia de *Wickerhamomyces anomalus* en el JUPC almacenado en pileta, en este caso el total de las levaduras aisladas en esta muestra fueron identificadas dentro de esta especie (tabla 7). *W. anomalus* es comunmente encontrada en alimentos, al respecto Deák y Beuchat (1996) calcularon la incidencia de las especies de levaduras en distintos tipos de alimentos. Considerando que 99 especies estaban presentes en los mismos, la frecuencia de ocurrencia para *W. anomalus* fue una de las más elevadas (4,56%). Esta levadura tiene una notable habilidad para crecer bajo estrés, soporta pH extremos, baja a_w , presión osmótica elevada y baja tensión de oxígeno, también puede actuar como patógena oportunista y se la ha usado como agente de biocontrol de mohos por su capacidad competitiva (Passoth y col., 2006; Kurtzman y col., 2011). Anteriormente, esta especie ha sido aislada de jugos de frutas y jugos concentrados (Deák y Beuchat, 1993).

Más allá de las dos excepciones anteriormente descritas, los resultados obtenidos confirman la estrecha asociación que existe entre el jugo de uva pre-concentrado y/o concentrado y *Z. rouxii*, la cual ha sido extensamente descrita por otros autores (Deák y Beuchat, 1993; James y Stratford, 2003; Querol y Fleet, 2006; Deák, 2008; Combina y col., 2008; Rojo, 2014). A la luz de la identificación de *Z. rouxii* en los jugos de uva pre-concentrados y concentrados, es importante recalcar que sus poblaciones son las que se incrementan considerablemente cada vez que el jugo de uva es almacenado durante el procesamiento (tablas 5, 7 y 8) y esto constituye un riesgo microbiológico para la vida útil del producto. Además, hay que tener en cuenta que algunas partidas de jugo de uva concentrado de la planta B se almacenan por varios meses en tanques pulmón antes de su comercialización. Estas partidas de JUC tienen como destino la exportación, por lo que se corre el gran riesgo de que lleguen fermentadas a destino. Esto traería aparejado problemas como pérdidas económicas, de credibilidad-confianza y cierre de mercados.

En relación a las especies de levaduras identificadas en las superficies de las tres plantas elaboradoras, se observó que en la mayoría de los casos *Z. rouxii* no estuvo presente (tablas 5, 6 y 7). Las únicas dos muestras que tuvieron incidencia de esta levadura fueron la muestra de piso en la empresa C y la manguera que insufla aire para la homogeneización de los jugos de uva concentrados en la empresa B (tabla 6 y 7). Estas dos superficies comparten una característica que parece explicar este hecho. La muestra obtenida del piso a nivel de las tapas de las piletas que almacenan JUPC, presentó un elevado recuento de levaduras osmófilas identificadas como *Z. rouxii*, esto probablemente se debió a que el piso tenía salpicaduras de JUPC, las cuales se pudieron producir durante el llenado, trasvase o limpieza de las piletas. Asimismo, la manguera por donde se insufla aire para homogeneizar el JUC presentó a *Z. rouxii* en recuentos que superaron las 10^3 UFC en 400 cm^2 . Nuevamente podríamos atribuir la presencia de *Z. rouxii* a restos de JUC adheridos en su luz interna, ya que la manguera debía ser sumergida en el producto para homogeneizarlo.

En consecuencia de lo antes expuesto podemos concluir que en las superficies limpias, antes de que entren en contacto con los jugos de uva pre-concentrados o concentrados, no hubo incidencia de *Z. rouxii*. Este hecho sugiere que las prácticas sanitarias utilizadas en las tres plantas serían capaces de eliminar las poblaciones de *Z. rouxii* de las superficies, siempre y cuando los restos de mosto sean completamente removidos de todas las áreas en contacto con el producto. En concordancia con estas observaciones Querol y Fleet (2006) han descrito a *Z. rouxii* como una levadura muy susceptible al calor y al ácido acético, la cual no tiene la propiedad de persistir tras los procedimientos de limpieza, que es raramente encontrada en las plantas elaboradoras y en la mayoría de los casos se encuentra ausente en sus superficies.

Por otro lado, la diversidad de las especies encontradas en los muestreos de superficie de las tres plantas concentradoras fue acotada (tabla 5, 6 y 7). De las ocho especies identificadas, dos se encontraron en las tres plantas: *Wickerhamomyces anomalus* y *Torulaspora delbrueckii*. Al respecto, Querol y Fleet (2006) describen los géneros de levaduras que se encuentran presentes en las superficies de las fábricas de jugos de fruta, siendo algunos de ellos *Candida sp.*, *Torulaspora sp.* y *Wickerhamomyces sp.* Como se mencionó anteriormente, *W. anomalus* es una especie osmotolerante altamente resistente y por ende puede persistir en las superficies. También *T. delbrueckii* tiene alta prevalencia en alimentos (Jay y col., 2005) y ha sido aislada de jugos de fruta concentrados (Deák y Beuchat, 1993).

En la planta A se identificaron además otras tres especies de levaduras, presentes en las superficies. Estas fueron *Citeromyces matritensis* (telomorfo de *Candida globosa*) y *Lachancea thermotolerans* (telomorfo de *Candida dattila*) que se encontraron asociadas al filtro de placas y *Metschnikowia pulcherrima* (telomorfo de *Candida pulcherrima*) asociada a un tanque receptor de JUC (tabla 5). Todas estas especies tienen carácter osmotolerante y han sido descritas en alimentos azucarados. Anteriormente, *C. matritensis* ha sido aislada de embutidos fermentados (Encinas y col. 2000), de jugos de frutas fermentados y de leche condensada (Kurtzman, 1998). *L. thermotolerans* ha sido descrita en bebidas alcohólicas, jugos de frutas y jugos concentrados (Deák y Beuchat, 1993; Deák, 2008) y *Metschnikowia pulcherrima* ha sido descrita en uvas y sus mostos (Moreno-Arribas y Polo, 2008).

Por otro lado, en la empresa B se aislaron dos especies más del género *Candida sp.*, donde *C. orthopsilosis* fue aislada de las paredes y *C. apicola* del agua de lavado de los filtros (tabla 6). Según Kurtzman y col. (2011), *C. orthopsilosis* es una especie reclasificada a partir de *C. parapsilosis* grupo II y no puede ser distinguida de esta de no ser por métodos moleculares; anteriormente ha sido aislada de los frutos de cactus (*Opuntia sp.*) (Kurtzman y col., 2011) y también de tomate (Robl y col., 2014); posee la capacidad de formar biofilms (Lattif y col., 2010) y se la clasifica como patógena oportunista emergente, ya que se aisló de tejidos humanos infectados en varias oportunidades (Kurtzman y col., 2011). Por otro lado, *C. apicola* ha estado implicada en la alteración de productos con alta cantidad de azúcares (Deák, 2008) y ya fue aislada de *pickles* de pepinos, polen, jugo de uva (Kurtzman et al., 2011), azúcar refinada y pasas de uva (Deák, 2008). Por último, de las superficies de la empresa C se aisló a *C. matritensis* de un tanque y una pileta para jugo de uva pre-concentrado y a *T. delbrueckii* acompañando a la antes citada levadura en el tanque de JUPC. Ambas especies son descriptas en este trabajo.

El hallazgo de estas especies osmotolerantes en las superficies, sugiere que estas levaduras presentan características que les permitieron sobrevivir y persistir en las superficies higienizadas ya que los recuentos obtenidos fueron en muchos casos muy elevados. Estas especies han sido descritas como asociadas a los ambientes de las plantas elaboradoras de productos azucarados pero no han sido clasificadas como alterantes del producto *per se*. Al respecto, Sand y van Grinsven (1976) investigaron los microorganismos presentes en las fábricas de bebidas y sus maquinarias, mostrando que las levaduras encontradas comúnmente pertenecían al género *Candida sp.*. Para sorpresa de los autores, las levaduras alteradoras más reconocidas se aislaron pocas veces o en la mayoría de los casos no fueron encontradas. Estudios más recientes apoyan los resultados obtenidos por Sand y van Grinsven (1976) y aunque en ese caso sí se encontraron algunas levaduras alterantes, la ausencia de *Zygosaccharomyces sp.* en las superficies fue notable. (Tudor y Board, 1993; Davenport, 1996). Al igual que lo encontrado en nuestro trabajo, las levaduras que viven en el ambiente de la fábrica, están particularmente concentradas en las zonas donde los productos azucarados son derramados, mal lavados o diluidos y en los desagües o drenajes (Davenport, 1996).

Habrá que tener especial cuidado con las especies de levaduras clasificadas como patógenas oportunistas (*W. anomalus* y *C. orthopsilosis*) aunque no representen un problema para la alteración del producto. Se debe hacer una limpieza y desinfección adecuada, poniendo énfasis en remover *biofilms* que pudieran haber formado. Estos microorganismos representan un peligro para la salud de los operarios que trabajan en ese ambiente y para los consumidores de los productos que con se elaboren con estos.

En un análisis global de los resultados obtenidos, podemos decir que a pesar de que las superficies muestreadas mostraron recuentos de levaduras osmófilas, *Z. rouxii* no fue comúnmente identificada como habitante de estas superficies. Probablemente se deba a que al estar libres de azúcares, no constituyen un medio adecuado para el crecimiento de esta levadura; diferente fue la situación de las superficies que estaban sucias con jugo de uva concentrado donde se detectó la presencia de *Z. rouxii*.

A pesar de que en nuestro trabajo, la hipótesis inicialmente planteada de que las superficies de la planta constituyen un reservorio de *Z. rouxii* que potencialmente contamina los JUC, fue parcialmente rechazada, cabe destacar la importancia del diseño higiénico de las líneas de elaboración, la correcta aplicación de los procedimientos estandarizados de saneamiento (POES) y la inclusión de sistemas de limpieza CIP (*clean in place*) en el equipamiento que no puede ser completamente desmontado, ya que la ausencia de jugos sobre las superficies implica también la ausencia de la principal levadura contaminante del producto final. La mejora de los procedimientos de limpieza en las fábricas, reducen dramáticamente las alteraciones de los alimentos producidos en ella. La falta de higiene incrementa los recuentos de microorganismos en los productos, a tal punto que los métodos de conservación usados para prevenir el deterioro de los alimentos se pueden ver sobrepasados; además una pequeña falla puede provocar un inaceptable aumento de episodios de alteración de los alimentos. Esto debe ser cuidadosamente controlado optimizando la limpieza de los establecimientos elaboradores. Existe un delicado balance entre la limpieza de la planta y la estabilidad microbiológica de los alimentos (Querol y Fleet, 2006). La correcta higiene de los establecimientos requiere de personal entrenado y bien preparado. Los errores humanos por falta de entrenamiento son la causa de la mayoría de los problemas de limpieza en las fábricas. Como la producción de alimentos se ha vuelto técnicamente más compleja, el factor humano se ha convertido en el eslabón más débil para la producción exitosa de alimentos y es la mayor causa de las posteriores alteraciones por levaduras (Querol y Fleet, 2006).

Por otro lado, también se observó que *Z. rouxii* fue la especie encontrada en todas las muestras de jugo de uva pre-concentrado y concentrado y en la mayoría de los casos representó el 100% de las levaduras aisladas. Estos resultados confirman la estrecha asociación que existe entre el jugo de uva pre-concentrado o concentrado y *Z. rouxii*. Hay que remarcar que los periodos de almacenamiento del jugo de uva pre-concentrado y concentrado fueron claves para que la población de *Z. rouxii* aumentara. Por lo cual constituyen puntos críticos en la elaboración y deberán ser cuidadosamente controlados para evitar el deterioro del producto.

5 Conclusiones

Según los resultados obtenidos en este estudio podemos concluir que:

- ✓ No se observan levaduras osmófilas en muestras de jugo de uva en etapas previas al proceso de pre-concentrado y concentrado.
- ✓ *Zygosaccharomyces rouxii* constituye la principal levadura presente en las muestras de jugo de uva pre-concentrado y concentrado.
- ✓ Las superficies correctamente higienizadas asociadas al proceso de concentrado del jugo de uva manifiestan presencia de levaduras osmotolerantes y ausencia de la levadura alterante *Z. rouxii*.
- ✓ Las superficies en donde quedan restos de jugo de uva pre-concentrado y concentrado constituyen un punto crítico de recontaminación con *Z. rouxii* para el producto en elaboración y ya elaborado.
- ✓ El almacenamiento de los jugos de uva pre-concentrados y concentrados durante la elaboración permite un aumento significativo de la población de *Z. rouxii* y por lo tanto constituye un punto crítico en el mantenimiento de la estabilidad microbiana del producto.

Bibliografía

- Ablin, A. (2011). Jugo concentrado de uva (mosto). [en línea]. Alimentos Argentinos. [http://www.alimentosargentinos.gov.ar/contenido/revista/pdfs/56/56_08_Uva.pdf] [Consulta enero de 2015].
- Ablin, A. (2012). El mercado del jugo concentrado de uva. [en línea]. Alimentos Argentinos. [http://www.alimentosargentinos.gov.ar/contenido/sectores/bebidas/productos/JugoConcentradoUva_2012_11Nov.pdf] [Consulta enero de 2015].
- Albo Davio, G. y col. (2011). Buenas Prácticas aplicadas a los Alimentos. [en línea]. ANMAT, (Ed.). Portafolio educativo en temas clave en Control de la Inocuidad de los Alimentos. [http://www.anmat.gov.ar/portafolio_educativo/pdf/cap4.pdf] [Consulta enero de 2015].
- Aran Packaging. (2015). Embalajes para transporte de líquidos con método I.B.C. [en línea] Aran Packaging web site [<http://www.aran.co.il/es/frutas-y-verduras.html>] [Consulta enero de 2015].
- Arias, C., Burns, J., Friedrich, L., Goodrich, R., y Parish, M. (2002). Yeast Species Associated with Orange Juice: Evaluation of Different Identification Methods. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 68 (4), pág. 1955-1961.
- Barata, A., Seborro, F., Belloch, C., Malfeito Ferreira, M., y Loureiro, V. (2007). Ascomycetous yeast species recovered from grapes damaged by honeydew and sour rot. *Journal of Applied Microbiology*, vol. (104), pág. 1182-1191.
- Bruzzone, A. (1998). Cadenas alimentarias: Jugo de uva concentrado. *Alimentos Argentinos*, vol. (8), pág. 42-45.
- Bubnová, M., Zemančíková, J., & Sychrová, H. (2014). Osmotolerant yeast species differ in basic physiological parameters and in tolerance of non-osmotic stresses. *Yeast*, vol. (31), pág. 309-321.
- Combina, M., Daguerre, C., Massera, A., Mercado, L., Sturm, M., Ganga, A., y Martinez, C. (2008). Yeast identification in grape juice concentrates from Argentina. *Letters in Applied Microbiology*, vol. (46), pág. 192-197.
- Comisión Nacional de Alimentos (CONAL) (Ed.). (2010). Capítulo X - Alimentos Azucarados. Código Alimentario Argentino.
- Davenport, R. R. (1996). Forensic microbiology for soft drinks business. *Soft Drinks Manage Int.*, vol. April, pág. 26-30.
- Davenport, R. R. (1997). Forensic microbiology II. Case book investigations. *Soft Drinks Int.*, vol. April, pág. 26-30.
- Deák, T. (2008). *Handbook of food spoilage yeasts*. Ed. CRC Press. New York, USA.

Deák, T. y Beuchat, L. (1993). Yeast associated with fruit juice concentrates. *Food Protect*, vol. (56), pág. 777-782.

Deák, T., y Beuchat, L. R. (1996). *Handbook of Food Spoilage Yeast*. Ed. CRC Press. Florida, USA.

Encinas, J. P., López Díaz, T. M., García Lopez, M. L., Otero, A., y Benito, M. (2000). Yeast populations on Spanish fermented sausages. *Meat Science*, vol. (54), pág. 203-208.

Esteve Zarzoso, B., Belloch, C., Uruburu, F., y Querol, A. (1999). Identification of yeast by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *International Journal of Systematic Bacteriology*, vol. 49, pág. 329-337.

Feldmann, H. (Ed.). (2012). *Yeast: Molecular and Cell Biology*. Ed. Wiley-Blackwell. 2da ed. Weinheim, Alemania.

Fleet, G. (2011). Yeast Spoilage of Foods and Beverages. In Kurtzman C., Fell J. y Boekhout T. (Eds.). *The Yeasts*. Ed. Elsevier. Vol. 1. 5ta. ed.

Gervais, P. y Marechal, P. (1994). Yeast resistance to high levels of osmotic pressure: influence of kinetics. *J. Food Eng.*, vol. (22), pág. 399-407.

Gobbi, M., Comitini, F., Domizio, P., Romani, C., Lencioni, L., Mannazzu, L. y Ciani, M. (2013). *Lachancea thermotolerans* and *Saccharomyces cerevisiae* in simultaneous and sequential co-fermentation: a strategy to enhance acidity and improve the overall quality of wine. *Food Microbiology*, vol. (33), pág. 271-281.

Gonzalez, M. S. (2014). Mosto: 2014 terminaría con 120 mil tn vendidas, pero el precio cayó 21%. *Diario Los Andes*, pág. E5. (21 de Diciembre de 2014).

Hee Yu, J., Hee Lee, D., Joo Oh, Y., Cheol Han, K., Woo Ryu, Y. y Ho Seo, J. (2006). Selective Utilization of Fructose to Glucose by *Candida magnoliae*, an Erythritol Producer. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, vol. (129), pág. 870-879.

Hoffman, C. S. y Winston, F. A. (1987). A ten minute preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene*, vol. (57), pág. 267-272.

Hulin, M. y Wheals, A. (2014). Rapid identification of *Zygosaccharomyces* whit genus-specific primers. *International Journal of Food Microbiology*, vol. (173), pág. 9-13.

Infocampo. (2009). Avanza el plan estratégico para el mosto. [en línea]. [<http://infocampo.com.ar/nota/campo/18601/avanza-el-plan-estrategico-para-el-mosto>] [Consulta junio de 2014].

Ingram, M. (1958). Yeast in food spoilage. In Cook A. (Ed.). *The chemistry and biology of yeast*. Ed. Academic Press. pág. 603-633. New York, USA.

International Commission on Microbiological Specifications of Food (ICMSF). (1980). Bebidas no alcohólicas, zumos de frutas naturales, concentrados y mermeladas. En *Ecología Microbiana de los Alimentos*. Ed. Acribia. Vol. II. Zaragoza, España.

James, S., y Stratford, M. (2003). Chapter 6: Spoilage yeasts with emphasis on the genus *Zygosaccharomyces*. In Boekhout T. and Robert V. (Eds). *Yeast in Food*. Ed. Woodhead Publishing. pág. 171-186.

Jay, J., Loessner, M. y Golden, D. (2005). *Modern Food Microbiology*. Ed. Springer. 7ma ed. New York, USA.

Kurtzman, C. (1998). Chapter 22: *Citeromyces* Santa María. In Kurtzman, C. y Fell J. (Eds.). *The Yeast, A Taxonomic Study*. Ed. Elsevier. 4ta ed., pág. 146-147. Amsterdam, Alemania.

Kurtzman, C. y Fell J. (Eds.). (1998). Definition, classification and nomenclature of the yeast. In *The Yeast, A Taxonomic Study*. Ed. Elsevier. 4ta ed., pág. 3-5. Amsterdam, Alemania.

Kurtzman, C., & Fell, J. (2004). Chap 16: Yeast. In *Biodiversity of Fungi, Inventory and Monitoring Methods*. Ed. Academic Press. Amsterdam, Alemania.

Kurtzman, C., Fell, J. W., y Boekhout, T. (Eds.). (2011). *The Yeast a taxonomic study*. Ed. Elsevier. Vol. 1. 5ta ed.

Lattif, A. y col. (2010). Characterization of biofilms formed by *Candida parapsilosis*, *C. metapsilosis*, and *C. orthopsilosis*. *International Journal of Medical Microbiology*, vol. (300), pág. 265-270.

Ley 25.849. (2004). Plan Estratégico Vitivinícola Argentino 2020.

Martorell, P., Stratford, M., Steels, H., Fernandez-Espinar, M. y Querol, A. (2007). Physiological characterization of spoilage strains of *Zygosaccharomyces bailli* and *Zygosaccharomyces rouxii* isolated from high sugar environments. *Food Microbiology* vol. (114), pág. 234-242.

Martorell, P., Fernández Espinar, M. T. y Querol, A. (2005). Molecular monitoring of spoilage yeasts during the production of candied fruits nougats to determine food contamination sources. *International Journal of Food Microbiology*, vol. (101), pág. 293-302.

Mercado, L., Dalcero, A., Masuelli, R. y Combina, M. (2007). Diversity of *Saccharomyces* strains on grapes and winery surfaces: Analysis of their contribution to fermentative flora of Malbec wine from Mendoza (Argentina) during two consecutive years. *Food Microbiology*, vol. (24), pág. 403-412.

Moreno Arribas, M. V. y Polo, C. (Eds.). (2008). *Wine Chemistry and Biochemistry*. Ed. Springer.

- Observatorio Vitivícola Argentino. (2014). Panorama mundial del mercado de jugo concentrado de uva. [en línea] [<http://www.observatoriova.com/2014/10/panorama-mundial-del-mercado-de-jugo-concentrado-de-uva/>] [Consulta enero de 2014].
- Observatorio Vitivinícola Argentino. (2024). Principales destinos de las exportaciones de mosto concentrado argentino. [en línea]. [<http://observatoriova.bolsamza.com.ar/BOE/OpenDocument/1203201241/OpenDocument/pendoc/openDocument.jsp>] [Consulta enero de 2014].
- Ok, T. y Hashinaga, F. (1997). Identification of sugar-tolerant yeasts isolated from high-sugar fermented vegetable extracts. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, vol. (43), pág. 39-47.
- Overmeer Logistics. (2015). Flexitank. [en línea] [<http://www.overmeer-logistics.com/services-overview/flexitanks/>] [Consulta enero de 2015].
- Passoth, V., Fredlund, E., Druvefors, U. A. y Schnürer, J. (2006). Biotechnology, physiology and genetics of the yeast *Pichia anomala*. *FEMS Yeast research*, vol. (6), pág. 3-13.
- Pitt, J. I. y Richardson, K. C. (1973). Spoilage by preservative-resistant yeast. *CSIRO Food Res Q* vol. (33), pág. 80-85.
- Pitt, J., & Hocking, A. (2009). Chapter 10: Yeast. In *Fungi and Food Spoilage*. Ed. Springer. 3ra ed., pág. 375-376.
- Querol, A. y Fleet, G. (Eds.). (2006). *Yeast in Food and Beverages*. Ed. Springer. Vol. 2.
- Robl, D., Thimoteo, S. S., De souza, G. C., Beux, M. R., Dalzoto, P. R., Pinheiro, R. L. y Pimentel, I. C. (2014). Occurrence of *Candida orthopsilosis* in Brazilian tomato fruits (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Brazilian Journal of Microbiology*, vol. (45), pág. 105-109.
- Rocco, A. (2008). Cadenas productivas: Vid y sus derivados. *Alimentos Argentinos*, vol. (40), pág 28-31.
- Rojo, M. C. (2014). Determinación de parámetros críticos y herramientas tecnológicas para la prevención y el control de la contaminación microbiológica de levaduras osmófilas en jugos de uva concentrados. Universidad Nacional de Rio Cuarto. Córdoba, Argentina.
- Rojo, M. C., Arroyo López, F. N., Lerena, M. C., Mercado, L., Torres, A. y Combina, M. (2014 a). Effects of pH and sugar concentration in *Zygosaccharomyces rouxii* growth and time for spoilage in concentrated grape juice at isothermal and non-isothermal conditions. *Food Microbiology*, vol. (38), pág. 143-153.
- Rojo, M. C., Lerena, M. C., Torres, A., & Combina, M. (2014 b). Evaluación de diferentes conservantes químicos para inhibir el desarrollo de *Zygosaccharomyces rouxii*, levadura alteradora de jugos de uva concentrados. En Libro de resúmenes del II Simposio Argentino de Enología y Viticultura. San Juan, Argentina.

Rojo, M. C., Sturm, M. E., Lerena, M. C., Falconi, P. L., Torres, A. y Combina, M. (2012). Cálculo de la termoresistencia de distintas cepas de *Zygosaccharomyces rouxii* aisladas de jugos de uva concentrados de Argentina. En Libro de Resúmenes XI Congreso Latinoamericano de Microbiología e Higiene de los Alimentos. Buenos Aires, Argentina.

Ruiz, A. y Vitale, J. (2011). Prospectiva y estrategia: el caso del Plan Vitivinícola 2020 (PEVI). INTA. En Estudios Socioeconómicos de los Sistemas Agroalimentarios y Agroindustriales. Informe técnico nro. 7. Argentina.

Samson, R., Hoekstra, S. y van Oorschot, C. (1981). Introduction to food-borne fungi. Ed. Centraalbureau voor Schimmelcultures. Delft, Holanda.

Sand, F. y van Grinsven, A. (1976). Comparison between the yeast flora of Middle Eastern and Western European soft drinks. *Antonie van Leeuwenhoek*, vol. (42), pág. 523-532.

Scharf, J. M. (1960). The evolution of microbial standards for bottled carbonated beverages in the US. *Ann Inst Pasteur Lille*, vol. (11), pág. 117-132.

Schmidt, H. J. (1995). Modern microbiology in soft drinks operations. *Brauwelt Int*, vol. (13), pág. 220-222.

Schoch, C., Seifert, K., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J., Levesque, C. A. y Fungal Barcoding Consortium. (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *PNAS Early Edition*, vol. 109 (16), pág. 6241–6246.

Solieri, L., Cassanelli, S. y Giudici, P. (2007). A new putative *Zygosaccharomyces* yeast species isolated from traditional balsamic vinegar. *Yeast*, vol. (27), pág. 403-417.

Spencer, J. y Spencer, D. (1978). Production of polyhydroxy alcohols by osmotolerant yeast. In A. Rose (Ed.), *Economic Microbiology*. Ed. Academic Press. Vol. 2. pág. 393-425. London, England.

Sperber, W. y Doyle, M. (Eds.). (2009). *Compendium of the Microbiological Spoilage of Foods and Beverages*. Ed. Springer. New York, USA.

Splittstoesser, D. F. (1987). Fruits and fruit products. In L. R. Beuchat (Ed.), *Food and Beverage Mycology*. Ed. AVI Book. 2da ed., pág. 101-122. New York, USA.

Steels, H., James, S. A., Bond, C. J., Roberts, I. N. y Stratford, M. (2002). *Zygosaccharomyces kombuchaensis*: the physiology of a new species related to the spoilage yeasts *Zygosaccharomyces lentus* and *Zygosaccharomyces bailii*. *FEMS Yeast*, vol (2), pág. 113-121.

Stratford, M. y James, S. A. (2003). Non-alcoholic beverages and yeast. In T. Boekhout y V. Robert (Eds.), *Yeast in food. Beneficial and detrimental aspects*. Ed. Woodhead Publishing. pág. 309-346. Behr, Hamburg.

Tilbury, R. H. (1976). The microbial stability of intermediate moisture foods with respect to yeast. In R. Davies, G. G. Birch y K. J. Parker (Eds.), *Intermediate moisture foods*. Ed. Applied Science. pág. 138-165. London, England.

Tudor, E. A. y Board, R. G. (1993). Food spoilage yeasts. In A. H. Rose y J. S. Harrison (Eds.), *The Yeasts*. Ed. Academic Press. Vol. 5. 2da ed. pág. 435-516. London, England.

van Esch, F. (1987). Yeast in soft drinks and fruit juice concentrates. *De Ware(n) Chemicus*, vol. (17), pág. 20-31.

Wu, V. (2008). A review of microbial injury and recovery methods in food. *Food Microbiology*, vol. (25), pág. 735-744.

Anexo A

Tabla 9. Especies identificadas en cada una de las muestras tomadas en la planta A.

Muestra	Nº pb (amplificado PCR ITS)	%Homología	Cepa identificada
JUPC antes de almacenar	750	99	<i>Citeromyces matritensis</i>
	750	99	<i>Citeromyces matritensis</i>
	700	97	<i>Citeromyces matritensis</i>
Placa de filtro para JUPC	700	99	<i>Citeromyces matritensis</i>
	700	100	<i>Lachancea thermotolerans</i>
	600	99	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>
Agua de lavado de filtros	750	99	<i>Citeromyces matritensis</i>
	800	99	<i>Torulaspora delbrueckii</i>
	800	100	<i>Torulaspora delbrueckii</i>
	800	99	<i>Torulaspora delbrueckii</i>
JUPC filtrado	700	99	<i>Citeromyces matritensis</i>
	750	99	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>
	700	99	<i>Citeromyces matritensis</i>
	750	99	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>
Tanque de JUC a la salida del concentrador	400	97	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>
	400	98	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>
	400	98	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>
	400	99	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>
Caño de la envasadora	600	99	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>
	600	99	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>
	600	98	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>
	600	99	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>

Nº pb: número de pares de base. JUC: jugo de uva concentrado. JUPC: jugo de uva pre-concentrado.

Tabla 10. Especies identificadas en cada una de las muestras tomadas en la planta B.

Muestra	Nº pb (amplificado PCR ITS)	%Homología	Cepa identificada
Paredes	500	99	<i>Candida orthopsilosis</i>
	620	99	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>
	620	99	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>
	620	99	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>
Piso	620	99	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>
	850	98	<i>Torulaspota delbrueckii</i>
	650	99	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>
	850	99	<i>Torulaspota delbrueckii</i>
Agua de lavado de filtros	650	99	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>
	650	99	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>
	480	100	<i>Candida apicola</i>
JUC antes de filtrar	800	99	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>
	800	99	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>
	800	99	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>
	800	99	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>
JUC almacenado	800	99	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>
	750	99	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>
	750	99	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>
	750	99	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>
JUC homogeneizado con aire filtrado	800	99	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>
	800	99	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>
	800	99	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>
	800	99	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>

Manguera de aire filtrado para homogenización de JUC	750	98	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>
	750	98	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>
	750	99	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>
	750	99	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>
JUC antes de pasteurizar	800	99	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>
	800	99	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>
	800	99	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>
JUC a la salida del pasteurizador	800	98	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>
	800	99	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>
	800	99	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>
JUC pasteurizado almacenado	800	99	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>
	800	99	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>
	800	99	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>
	800	99	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>
JUC para envasar	800	99	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>
	800	99	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>
	800	99	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>
	800	99	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>

Nº pb: número de pares de base. JUC: jugo de uva concentrado. JUPC: jugo de uva pre-concentrado. JUS: jugo de uva sulfitado.

Tabla 11. Especies identificadas en cada una de las muestras tomadas en la planta C.

Muestra	Nº pb (amplificado PCR ITS)	%Homología	Cepa identificada
Tanque de JUPC	800	99	<i>Torulaspota delbrueckii</i>
	700	99	<i>Citeromyces matritensis</i>
	800	99	<i>Torulaspota delbrueckii</i>
Piso	700	99	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>
	750	99	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>
	750	99	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>
	700	99	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>
JUPC antes de filtrado grueso	700	99	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>
	800	99	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>
	800	99	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>
JUPC después de filtrado grueso	800	99	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>
	800	99	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>
	800	99	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>
	800	99	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>
JUPC antes de filtrado fino	400	97	<i>Candida magnoliae</i>
	400	97	<i>Candida magnoliae</i>
	750	99	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>
	400	97	<i>Candida magnoliae</i>
JUPC después de filtrado fino	400	95	<i>Candida magnoliae</i>
	750	100	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>
	750	99	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>
	750	99	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>
Pileta de JUPC filtrado fino	750	99	<i>Citeromyces matritensis</i>
	800	99	<i>Citeromyces matritensis</i>
	800	99	<i>Citeromyces matritensis</i>

JUPC en pileta antes de concentrar	700	99	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>
	700	100	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>
	700	99	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>
	700	99	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>
JUPC en tanque pulmón (alimentación de circuito ZIP)	800	98	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>
	800	99	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>
	800	99	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>
	800	99	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>
JUPC a la entrada del filtro de placas	800	98	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>
	800	99	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>
	800	98	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>
	800	99	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>

Nº pb: número de pares de base. JUPC: jugo de uva pre-concentrado.



Torres Palazzolo, Carolina

TESIS DE LICENCIATURA EN BROMATOLOGÍA

Universidad Nacional de Cuyo

Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria

