



Universidad de Valladolid

Campus de Palencia

**ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR
DE INGENIERÍAS AGRARIAS**

Grado en Enología

Investigación experimental del efecto
de sonidos audibles en el
comportamiento de *Saccharomyces
cerevisiae*.

Alumna: Lucía Vázquez Bilbao

Tutoras: Dra. Josefina Vila Crespo
Dra. Violeta Ruipérez Prádanos

Cotutoras: Dra. Noemí Merayo Álvarez
Dra. Patricia Fernández del Reguero
Dra. Lara del Val Puente

Julio de 2022

Agradecimientos

Desde el inicio de la carrera, he tratado de buscar un equilibrio entre mis estudios y mi pasión por la música. Han sido muchas las veces en las que he creído que tenía que decantarme por una de las dos, pero no fue hasta el Erasmus, donde entendí que las pasiones que nos impulsan en la vida son la mejor herramienta para amar nuestro trabajo.

Gracias a Josefina, por dar forma a la idea que tanto me rondaba la cabeza, sin tu apoyo y confianza nunca hubiera podido llevar a cabo este proyecto.

Gracias a Lara, Noe y Patricia, por estar pendientes de cada paso durante este trabajo, por vuestra confianza y vuestro cariño.

Gracias a Violeta y a Raúl, por vuestra dedicación y paciencia.

Gracias a los artistas que me inspiran y me enseñan a diario que, con esfuerzo y pasión, todo es más fácil.

A todas las personas que han formado parte de este largo viaje, a los que estuvieron siempre y a quienes se quedaron por el camino.

A mi familia y sobretodo a Jesús, gracias por arrojar luz a todos mis proyectos, espero que sigas formando parte de todos y cada uno de ellos.

ÍNDICE

Resumen	3
1. Introducción	4
2. Justificación y objetivos	5
3. Materiales y métodos	6
3.1 Montaje del sistema de sonido.....	6
3.2 Mosto	7
3.3 Desarrollo experimental	8
3.4 Análisis microbiológico.....	8
3.4.1 Estimación del crecimiento microbiano: recuento de microorganismos totales	9
3.4.2 Recuento de microorganismos viables por cultivo	9
3.5 Análisis fisicoquímico de mosto y vino	9
3.5.1 Determinación del azúcar en mosto. Método refractométrico	9
3.5.2 Determinación del nitrógeno fácilmente asimilable. Método Sorensen.....	9
3.5.3 Determinación de la masa volúmica y la densidad relativa. Método aerométrico	9
3.5.4 Determinación del pH.....	10
3.5.5 Determinación de la acidez total. Método potenciométrico	10
3.5.6 Determinación de la acidez volátil. Método García-Tena.....	10
3.5.7 Determinación del grado alcohólico. Método ebuliométrico	10
3.5.8 Determinación de los azúcares reductores en vino. Método Rebelein.....	10
3.6 Análisis estadístico	10
4. Resultados y discusión	11
4.1 Comparativa del crecimiento microbiano	11
4.2 Recuento de microorganismos viables por cultivo	13
4.3 Comparativa de los análisis fisicoquímicos.....	14
5. Conclusión y futuras líneas de investigación	19
6. Bibliografía	20
7. Anejos	23

Resumen

Durante los últimos años, se han realizado diversos estudios científicos que respaldan la influencia de la música en la percepción del vino en consumidores, siempre buscando esta relación desde el punto de vista sensorial. La oenostesia, como se conoce a la sinergia entre la música y el vino, explica cómo el sentido del gusto y el de la audición pueden complementarse para dar lugar a un buen maridaje.

No obstante, la unión de la música y el vino desde un punto de vista enológico es algo muy novedoso donde existen pocas investigaciones, las cuales afirman que mediante el uso de ondas sonoras audibles se puede llegar a mejorar el desarrollo del ciclo vegetativo de la vid y por tanto la calidad de la uva. Sin embargo, no se han encontrado estudios que utilicen las ondas sonoras audibles en procesos de vinificación.

Investigaciones previas sugieren que las ondas sonoras audibles pueden afectar también al desarrollo y metabolismo microbianos, es por ello que en este trabajo se ha estudiado el uso de las ondas sonoras audibles en el desarrollo de la fermentación alcohólica, analizando la cinética fermentativa y el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae*, así como realizando análisis fisicoquímicos de los vinos resultantes de dichas fermentaciones.

Abstract

Over the last few years, several scientific studies have been carried out that support the influence of music on the perception of wine in consumers, always looking for this relationship from a sensory point of view. Oenosthesia, as the synergy between music and wine is known, explains how the sense of taste and the sense of hearing can complement each other to create a better pairing.

However, the union of music and wine from an oenological point of view is something very new and there is little research available. However, some researchers claim that the use of audible sound waves can improve the development of the vegetative cycle of the vine and, therefore, the quality of the grapes. Nevertheless, no studies have been found that use audible sound waves in the winemaking process.

Previous research suggests that audible sound waves can also affect microbial development and metabolism. This assignment has studied the use of audible sound waves in the development of alcoholic fermentation, analysing the fermentation kinetics and growth of *Saccharomyces cerevisiae* as well as performing physicochemical analyses of the wines resulting from these fermentations.

1. Introducción

Por definición, el sonido consiste en las variaciones en la presión de un medio elástico, como el aire o el agua, que se propagan a través de la materia, bien sea en estado gaseoso, líquido o sólido. Estas pequeñas fluctuaciones rápidas de presión son las llamadas ondas sonoras (Martín, 2014). La propagación del sonido cambia con relación al medio en el que se encuentre ya que tanto la densidad, como la temperatura, o la impedancia son factores dependientes de cada medio.

Existen distintos tipos de ondas sonoras que en función del rango de frecuencias que abarca, se pueden clasificar en: infrasonidos, sonidos audibles y ultrasonidos (Figura 1). Los humanos, podemos escuchar los sonidos en el rango audible entre los 20 Hz y los 20 kHz. La audición, como se conoce al proceso de percibir estas ondas, se produce cuando una onda sonora alcanza el oído, provocando vibraciones en la membrana auditiva (tímpano) y siendo estas percibidas por el nervio auditivo. En cambio, ni los infrasonidos (ondas sonoras por debajo de 20 Hz) ni los ultrasonidos (ondas sonoras por encima de los 20 kHz) pueden ser percibidos por el oído humano (Beléndez, 1992).

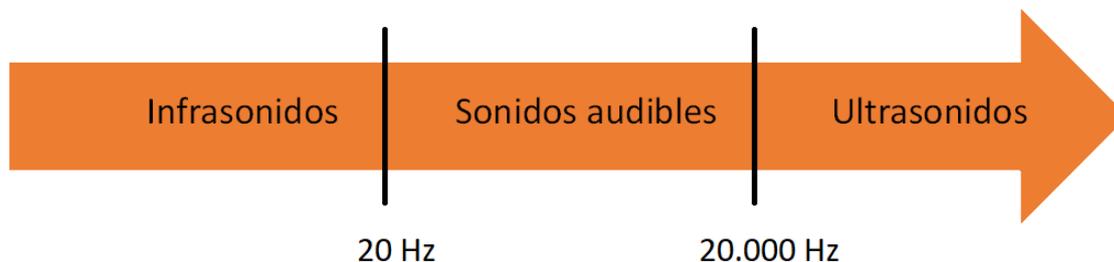


Figura 1: Clasificación de las ondas sonoras. (Elaboración propia).

El efecto biológico del sonido es un campo de investigación de gran interés donde los estudios se centran en vibraciones ultrasónicas e infrasónicas. Los estudios con ondas sonoras superiores a 20 kHz apuntan a un cambio en la membrana celular, ya que estas ondas sonoras conocidas como ultrasonidos son comúnmente usados en la industria para esterilizar. Con estas frecuencias se produce un aumento focalizado de temperatura, la producción de radicales libres y el adelgazamiento de las membranas celulares (Piyasena et al., 2003). Por otro lado, bajo la influencia de ciertos sonidos audibles se ha encontrado un cambio en la permeabilidad de la membrana de algunos microorganismos (Sarvaiya et al., 2015).

En el rango audible se ha demostrado que el uso de sonidos audibles aumenta la formación de colonias microbianas o interrumpe el crecimiento según el organismo y la frecuencia de sonido utilizada (Harris et al., 2021). Además, se ha descrito que, utilizando la influencia de distintos tonos puros, 1 kHz, 5 kHz y 15 kHz se aumenta la tasa de crecimiento en *Escherichia coli* (Cho Lee Ying et al., 2009). En otro estudio, se comprobó que aplicando sonidos audibles con frecuencias inferiores a 1 kHz este mismo microorganismo registraba un mejor crecimiento, así mismo se investigó su susceptibilidad a determinados antibióticos y se encontró que las frecuencias inferiores a 1 kHz aumentaban esta susceptibilidad (Banerjee et al., 2018).

Con respecto a *Saccharomyces cerevisiae*, los estudios realizados en medios sintéticos afirman que las ondas sonoras audibles alteran significativamente el crecimiento, aumentan la producción de alcohol y llegan a afectar al perfil de los metabolitos (Harris et al., 2021). Estudiando las ondas sonoras audibles de alta y baja frecuencia frente al silencio, se comprobó que todos los estímulos sonoros probados aumentaron la tasa de crecimiento en un 12 %. Así mismo, se observó que los perfiles de metabolitos intracelulares y extracelulares diferían significativamente según el estímulo sonoro

aplicado, lo que prueba una diferencia en el metabolismo dependiente del estímulo sonoro (Aggio et al., 2011).

En la industria enológica, los ultrasonidos cada vez están siendo más empleados en distintos procesos, ya que existen diversos estudios que respaldan como los ultrasonidos facilitan la extracción de compuestos fenólicos durante el proceso de maceración, reduciendo los tiempos de esta y observando una mejora organoléptica de los vinos finales (Pérez et al., 2021). Mas no solo se utilizan para la extracción de compuestos fenólicos puesto que, según un estudio reciente, el uso de ultrasonidos durante la crianza mejora este proceso dando una mayor capacidad de expresión al vino y longevidad durante su guarda (Kalkam et al., 2017). Sin embargo, el uso de ondas sonoras audibles en la industria enológica es algo sumamente novedoso, donde los proyectos se centran más en la viticultura, ya que se cree que las ondas sonoras audibles pueden llegar a mejorar el desarrollo del ciclo vegetativo de la vid y por tanto la calidad de la uva.

En lo referente a los procesos implicados en la elaboración del vino, no se han encontrado estudios que empleen ningún tipo de tratamiento con ondas sonoras audibles.

2. Justificación y objetivos

Tras realizar una revisión bibliográfica acerca del uso de ondas sonoras audibles en la industria enológica, no se han encontrado referencias que comprueben la eficiencia de las ondas sonoras audibles durante los procesos implicados en la elaboración.

Sin embargo, diversos estudios microbiológicos arrojan luz sobre el uso de estas técnicas en laboratorio (Harris et al., 2021; Banerjee et al., 2018; Sarvaiya et al., 2015; Aggio et al., 2011; Cho Lee Ying et al., 2009). Es por ello por lo que nos preguntamos si aplicando ondas sonoras audibles se conseguiría algún cambio en el desarrollo microbiano, así como si este estímulo puede llegar en algún punto a ser positivo para la industria enológica.

Por tanto, el objetivo del presente trabajo es estudiar la influencia de las ondas sonoras audibles en el desarrollo de *Saccharomyces cerevisiae*.

Para ello se proponen los siguientes objetivos específicos:

1. Revisión bibliográfica.
2. Diseño del sistema de sonido.
3. Optimización del mosto y condiciones de vinificación.
4. Determinación de la influencia del estímulo sonoro en el desarrollo de *Saccharomyces cerevisiae*.
5. Caracterización fisicoquímica, realizando analíticas de cada una de las vinificaciones.

3. Materiales y métodos

3.1 Montaje del sistema de sonido

Este proyecto ha sido posible gracias a la colaboración de Noemí Merayo Álvarez, Lara del Val Puente y Patricia Fernández del Reguero, profesoras de la Escuela Técnica Superior de Ingenieros de Telecomunicación de Valladolid.

En primer lugar, para diseñar los experimentos se trató de buscar el sistema de sonido más adecuado que permitiese llevar a cabo los ensayos dentro de una cámara de incubación. Se realizaron pruebas con distintos dispositivos (ordenador, tablet y diferentes teléfonos móviles), trabajando tanto de forma inalámbrica vía Bluetooth®, como por cable, contando con amplificadores externos y altavoces de diferentes rangos y resistencias. De igual manera, se probaron distintas ondas sonoras audibles en función de los hallazgos bibliográficos (Harris et al., 2021; Banerjee et al., 2018; Sarvaiya et al., 2015; Aggio et al., 2011; Cho Lee Ying et al., 2009).

Tras once semanas de pruebas experimentales, se determinó cual sería el montaje del sistema de sonido a emplear y se eligieron las frecuencias con las que se trabajaría.

El sistema de sonido empleado en el presente trabajo estaba formado por un teléfono móvil que reproducía la señal acústica pertinente que se emitía por los correspondientes altavoces. El experimento en todos los casos se realizó por duplicado, habiendo así dos ensayos con estimulación acústica y dos ensayos control sin estimular.

Los altavoces utilizados en los ensayos con estimulación acústica pertenecían al modelo *Minicube-Funtástico* (<https://www.funtastico.es/inicio/9-minicube.html>). Estos altavoces se introdujeron en bolsas de plástico con cierre hermético para evitar un contacto directo con el medio, ya que este podría dañarlos. De igual modo, se introdujo una bolsa de plástico de las mismas características con el peso equivalente al de los altavoces en los ensayos control sin estimular, para que en todos los casos la única condición diferente fuera el estímulo sonoro aplicado (Figura 2).

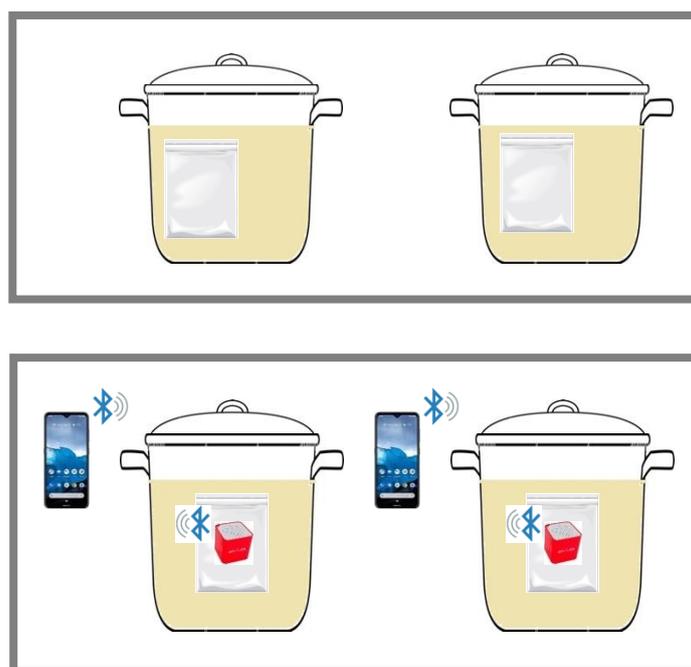


Figura 2: Diagrama del experimento. (Elaboración propia).

Los altavoces empleados durante los experimentos estaban conectados por vía Bluetooth® al teléfono móvil, además, todos los dispositivos se encontraban alimentados durante la total duración del experimento.

Para controlar que en todos los casos el volumen de emisión fuera el mismo se usó un sonómetro modelo PAA3 de Phonic (https://www.phonic.com/images/products-II/PAA3X/um_PAA3X_en_es.pdf?type=file), ajustando en todos los experimentos el volumen a 90 dBs.

Las frecuencias usadas como estimulación sonora se crearon con LabVIEW (*Laboratory Virtual Instrument Engineering Workbench*), una plataforma y entorno de desarrollo para diseñar sistemas, con un lenguaje de programación visual gráfico pensado para sistemas hardware y software de pruebas, control y diseño, simulado o real y embebido. Este programa fue creado por National Instruments en 1976. (<https://www.ni.com/es-es/shop/labview.html>).

3.2 Mosto

Para la elaboración de este estudio se han utilizado dos tipos de sustratos de partida: mosto concentrado rectificado y mosto concentrado sin rectificar.

El mosto empleado en los tres primeros experimentos estaba preparado a partir de mosto concentrado rectificado, cuya concentración inicial era de 69 °Brix. Para poder trabajar en unos parámetros similares a los de un mosto convencional, se tuvo que diluir con agua hasta llegar a 20 °Brix, el pH inicial era de 6,50 por lo que se corrigió a 3,50 con la ayuda de ácido tartárico.

Como nutriente se utilizó *VitNature-Lallemand*, un autolisado de levadura rico en nitrógeno orgánico, que cubre la deficiencia nitrogenada del mosto. La empresa biotecnológica recomienda una dosis de 30 - 40 g/hL, al trabajar con mosto concentrado rectificado el mayor problema que se podría tener era la falta de nutrición, por ello, se realizaron pruebas con distintas dosis (30 g/hL, 35 g/hL y 40 g/hL) y un control (0 g/hL). Para concluir la dosis elegida, se realizó un análisis del nitrógeno fácilmente asimilable presente en las distintas pruebas, donde el experimento con la dosis más alta, 40 g/hL, obtuvo una concentración de 174,7 mg/L. Adicionalmente, se suplementó el mosto con extracto de levadura, un concentrado rico en vitaminas, esteroides, ácidos grasos, complejos B y aminoácidos, indicado como un excelente activador de la fermentación. Tras varios ensayos con distintas dosis, se decidió que con 10 g/L de extracto de levadura se completaría la composición de este mosto.

En los siguientes experimentos se empleó mosto concentrado sin rectificar, el cual se diluyó con agua hasta llegar a una concentración de 20 °Brix y al que se le corrigió el pH con ácido tartárico. Con respecto a la nutrición, se realizaron pruebas con distintas dosis de *VitNature-Lallemand* y con extracto de levadura, decidiendo finalmente prescindir del extracto de levadura y añadir una dosis de nutriente de 35 g/hL.

Una vez ajustados los parámetros de ambos mostos, antes de inocular las levaduras y empezar así la fermentación, los mostos se esterilizaron a vapor fluyente durante 15 minutos en el autoclave Stericlav-S de Raypa® con el objetivo de eliminar cualquier microorganismo que pudiera dar lugar al inicio de una fermentación espontánea.

La levadura empleada para llevar a cabo las distintas fermentaciones fue *Saccharomyces cerevisiae* var. *Bayanus* (LALVIN EC1118™, Lallemand, Montreal Canadá). La empresa biotecnológica recomienda una adición de 20 - 40 g/hL, por lo

que, para decidir la dosis adecuada, se realizaron microvinificaciones en matraces con válvulas Müller probando distintas dosis (20 g/hL, 30 g/hL y 40 g/hL). Finalmente, una vez terminadas las microvinificaciones, se realizaron análisis fisicoquímicos de cada una de ellas. Observando los datos obtenidos se concluyó que la dosis adecuada sería la de 20 g/hL.

3.3 Desarrollo experimental

Los recipientes donde se llevaron a cabo los experimentos fueron ollas de acero inoxidable de 2 L de capacidad (Figura 3), sin embargo, para evitar problemas de desbordamientos se decidió llenar las ollas al 80 %. El acero inoxidable, es comúnmente utilizado en bodega por sus propiedades físicas ya que es un material muy resistente, con el que se controla bien la temperatura y que no aporta sabores ni olores al vino, de manera que no modifica las características organolépticas del producto final.



Figura 3: Representación de los recipientes. (Elaboración propia).

La temperatura de trabajo se controló durante todos los experimentos. Los ensayos con estimulación acústica y los ensayos control sin estimular, se encontraban en dos estufas separadas donde la temperatura se mantuvo a 26°C.

Los primeros tres experimentos (A, B y C), se realizaron con mosto concentrado rectificado, el tiempo de incubación en estufa fue de 4 días y el tiempo de estimulación sonora fue de 12 horas/día. El estímulo sonoro aplicado fue de 440 Hz.

El cuarto experimento (D), fue el primero que se llevó a cabo con mosto concentrado sin rectificar. Al igual que en los tres experimentos anteriores, el tiempo de incubación en estufa fue de 4 días, el tiempo de estimulación sonora en este caso fue de 8 horas/día y el estímulo sonoro se mantuvo, al igual que en los experimentos previos, a 440 Hz.

Se realizaron siete experimentos más con mosto concentrado sin rectificar, trabajando con frecuencias de 523 Hz y 1000 Hz, así como variando los tiempos de estimulación, pero se han tenido que descartar los resultados de estas experiencias debido a un error experimental.

3.4 Análisis microbiológico

Para el control microbiológico durante la fermentación alcohólica, se ha realizado un seguimiento del crecimiento microbiano, así como recuentos en placa de *Saccharomyces cerevisiae*.

3.4.1 Estimación del crecimiento microbiano: recuento de microorganismos totales

El crecimiento microbiano se determinó mediante turbidimetría. Su fundamento se basa en relacionar la turbidez de las muestras con una serie de patrones de sulfato de bario medidos con un espectrofotómetro (Spectronic® 20 Genesys™) a 600 nm (McFarland et al., 1999).

Mediante esta técnica, se estimaron los microorganismos totales (viables y no viables) en la muestra. Los resultados se expresan como unidades formadoras de colonias presentes en un mililitro (UFC/mL).

3.4.2 Recuento de microorganismos viables por cultivo

Para estimar la población de levaduras viables expresada en UFC/mL durante la fermentación alcohólica, se realizó un recuento en placa utilizando el medio de cultivo extracto de malta agarizado. Para la elaboración del medio de cultivo se utilizaron 13 % (p/v) de extracto de malta y 3 % (p/v) de agar. Antes de su uso el medio se esterilizó durante 15 minutos a 121°C en el autoclave.

3.5 Análisis fisicoquímico de mosto y vino

En este apartado se detallan los métodos utilizados con sus correspondientes fundamentos.

3.5.1 Determinación del azúcar en mosto. Método refractométrico

La refractometría, es un método indirecto que determina la concentración de azúcares fermentables de un mosto mediante la medida del índice de refracción (n).

La refracción, se basa en la modificación de la trayectoria de un rayo luminoso al atravesar una superficie que limita dos medios diferentes. Se puede demostrar que el rayo de luz incidente, la normal a la superficie y el rayo de luz refractado están en el mismo plano y que la relación entre el seno del ángulo de incidencia y el del ángulo de refracción siguen la ley de Snellius, cuanto mayor sea la concentración de los azúcares de un mosto, más denso será éste y menor la velocidad con que la luz lo atraviese, provocando un cambio en el índice de refracción (O.I.V, 2012).

3.5.2 Determinación del nitrógeno fácilmente asimilable. Método Sorensen

Este método se basa en añadir una solución de formaldehído a la muestra en unas condiciones de pH adecuadas. El formaldehído al reaccionar con el nitrógeno amónico y α -amino, produce protones que hacen disminuir el pH. La valoración con hidróxido de sodio hasta reestablecer el pH inicial, permite hacer un cálculo aproximado del nitrógeno fácilmente asimilable que existe en el medio (Shively et al., 2001).

3.5.3 Determinación de la masa volúmica y la densidad relativa. Método aerométrico

El método aerométrico, se basa en el principio de Arquímedes para la determinación de la masa volúmica de líquidos en función de la flotabilidad que presenta en ellos un cuerpo de peso constante. Consiste en la determinación a una temperatura de 20°C de

la masa volúmica de un mosto o vino a través de la lectura del aerómetro que flota en dicho medio (O.I.V, 2009 a).

3.5.4 Determinación del pH

Se basa en la medida de la diferencia de potencial entre el electrodo de referencia y el de medida con un error máximo de 0,05 unidades de pH (O.I.V, 2011).

3.5.5 Determinación de la acidez total. Método potenciométrico

La acidez total, es la suma de todas las acideces valorables en una muestra, cuando se lleva el pH a 7. Su fundamento se basa en la diferencia de potencial realizando una valoración con NaOH 0,1N (O.I.V, 2015).

3.5.6 Determinación de la acidez volátil. Método García-Tena

La acidez volátil está formada por la parte de los ácidos grasos que pertenecen a la serie acética en estado libre o salificado (ácido acético, acetatos, fórmico, propiónico, butírico...). La determinación de la acidez volátil, consiste en una separación del ácido acético del vino mediante una destilación simple y posterior valoración del destilado con una disolución de NaOH 0,01N (Barceló, 1990).

3.5.7 Determinación del grado alcohólico. Método ebullométrico

El método ebullométrico, se basa en la variación del punto de ebullición que experimentan los líquidos hidroalcohólicos según su proporción de alcohol.

En condiciones normales el punto de ebullición del agua es 100°C y el del alcohol 78,5°C. Una mezcla de alcohol y agua que se mantenga constante mediante un refrigerante a reflujo, hervirá a una temperatura tanto más próxima a la del agua cuanto menos alcohol contenga y viceversa. Por lo tanto, es lógico que se pueda llegar a fijar la composición alcohólica de una mezcla atendiendo a las relaciones que podamos establecer entre el porcentaje de alcohol y la temperatura de ebullición (Barceló, 1990).

3.5.8 Determinación de los azúcares reductores en vino. Método Rebelein

Se basa en las propiedades reductoras de la glucosa y la fructosa sobre las sales cúpricas. Estos azúcares, son oxidados a la temperatura de ebullición por un exceso de solución alcalina de Cu^{+2} que contiene tartrato para mantener el metal en solución. El Cu^{+2} es reducido a Cu^{+} y el Cu^{+2} en exceso se puede determinar por yodometría después de adicionar exceso de KI y acidular (O.I.V, 2009 b).

3.6 Análisis estadístico

Para la interpretación estadística de los datos obtenidos de las pruebas microbiológicas realizadas durante la fermentación alcohólica y los análisis fisicoquímicos realizados durante los distintos experimentos, se ha utilizado el programa Statgraphics Centurion XIX utilizando la comparación de los datos mediante análisis de varianza unidireccional (ANOVA) y el análisis de regresión de modelos lineales generales (Statpoint Technologies, Inc, Warrenton, USA). Los resultados obtenidos en las pruebas microbiológicas realizadas durante los distintos ensayos se transformaron logarítmicamente y se expresan como la media \pm la desviación estándar.

4. Resultados y discusión

4.1 Comparativa del crecimiento microbiano

A continuación, se presentan las gráficas de crecimiento microbiano de los cuatro experimentos A (Figura 4), B (Figura 5), C (Figura 6) y D (Figura 7).

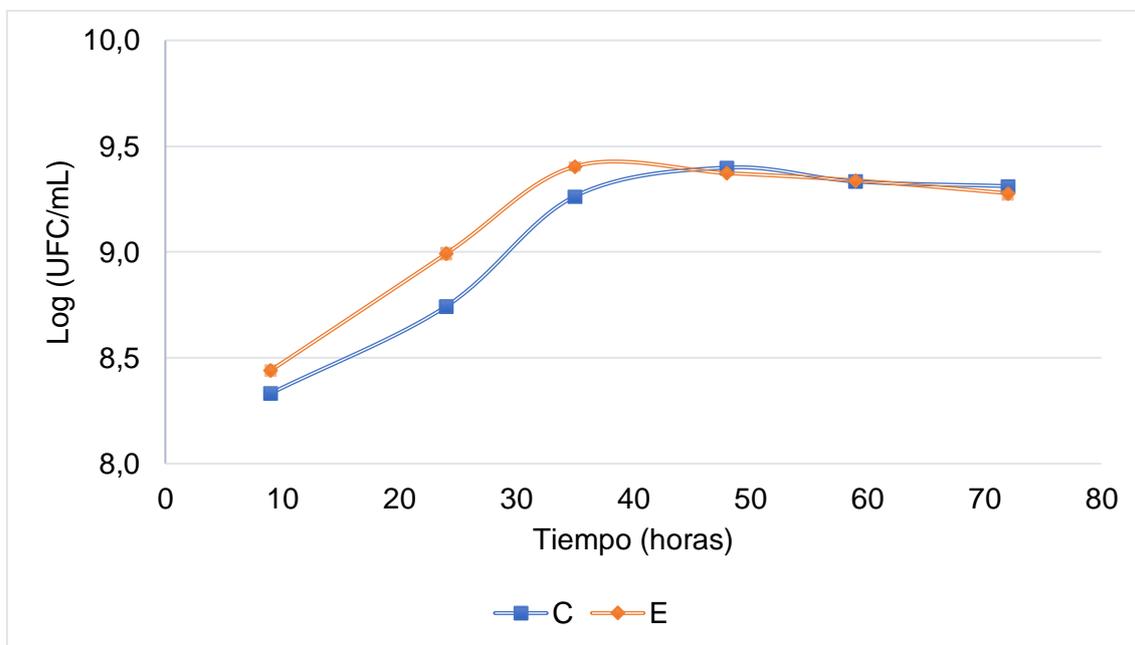


Figura 4: Comparativa de la representación del logaritmo de unidades formadoras de colonias por mililitro ($\log(\text{UFC}/\text{mL})$) entre las medias aritméticas de los ensayos con estimulación acústica (E) y los ensayos control sin estimular (C) frente al tiempo de incubación en horas, durante el experimento "A" con su desviación estándar.

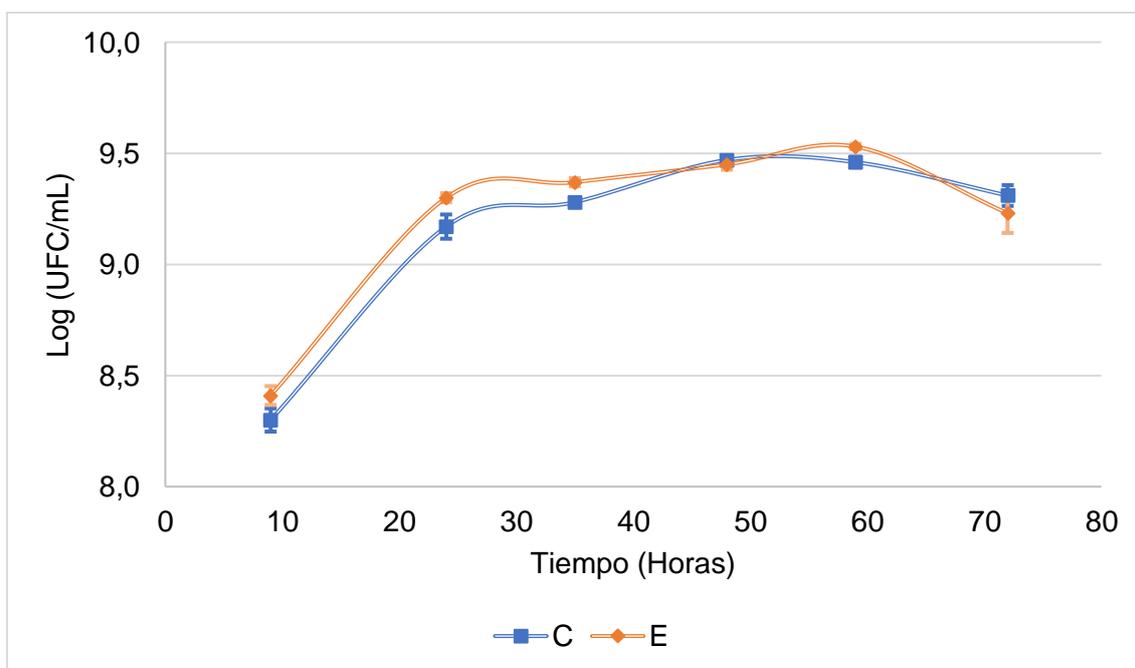


Figura 5: Comparativa de la representación del logaritmo de unidades formadoras de colonias por mililitro ($\log(\text{UFC}/\text{mL})$) entre las medias aritméticas de los ensayos con estimulación acústica (E) y los ensayos control sin estimular (C) frente al tiempo de incubación en horas, durante el experimento "B" con su desviación estándar.

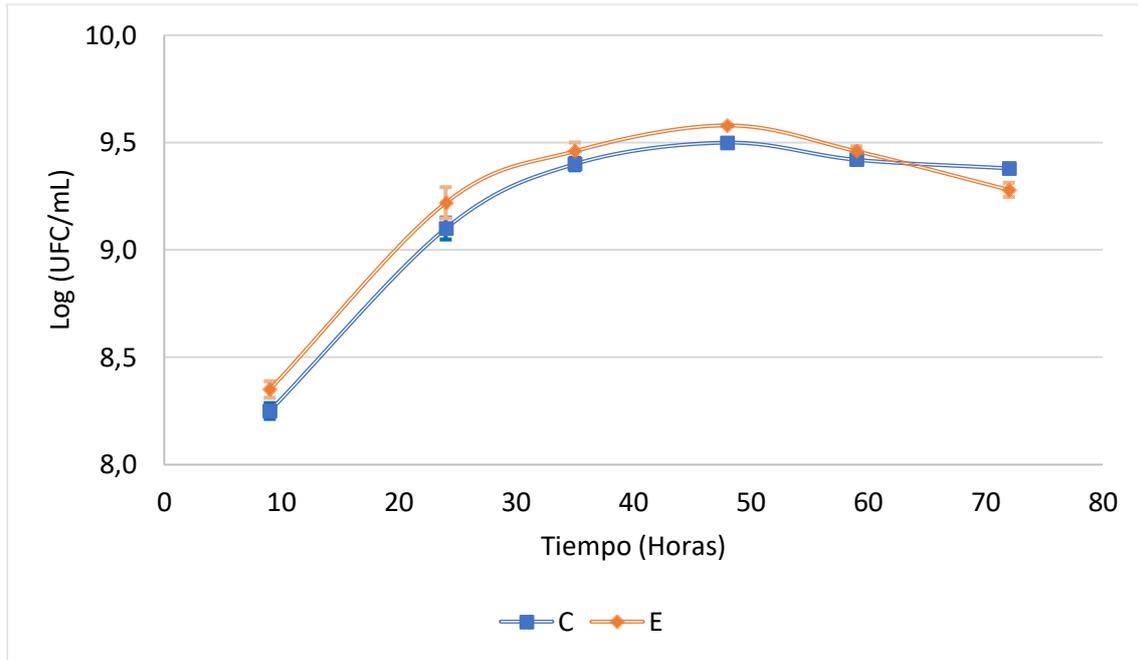


Figura 6: Comparativa de la representación del logaritmo de unidades formadoras de colonias por mililitro ($\log(\text{UFC}/\text{mL})$) entre las medias aritméticas de los ensayos con estimulación acústica (E) y los ensayos control sin estimular (C) frente al tiempo de incubación en horas, durante el experimento "C" con su desviación estándar.

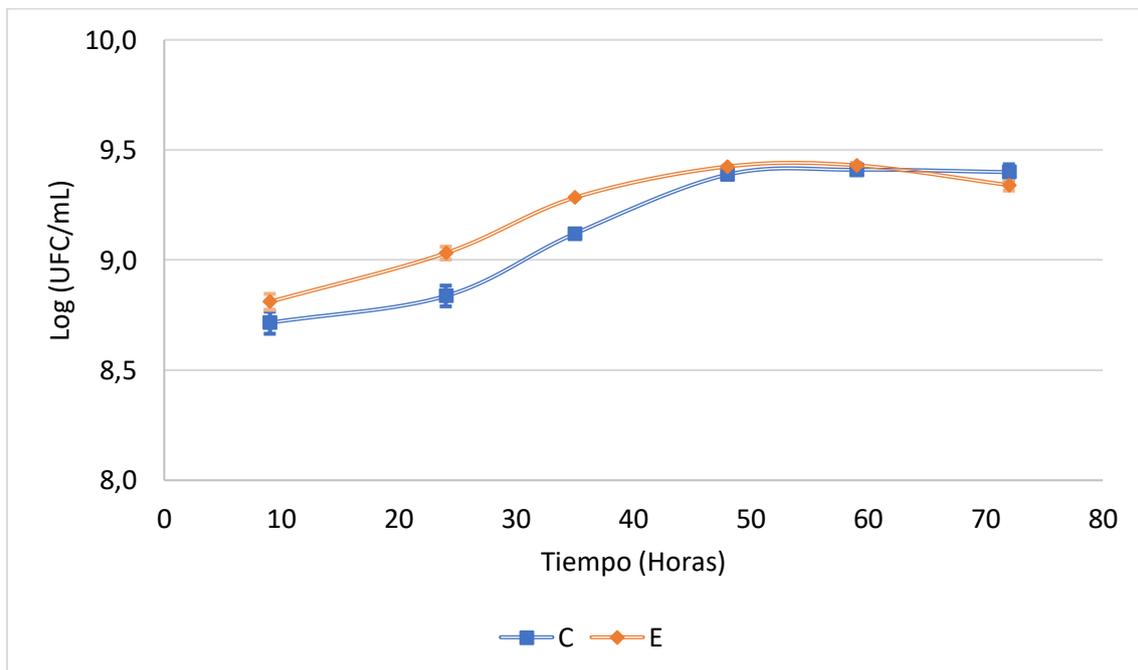


Figura 7: Comparativa de la representación del logaritmo de unidades formadoras de colonias por mililitro ($\log(\text{UFC}/\text{mL})$) entre las medias aritméticas de los ensayos con estimulación acústica (E) y los ensayos control sin estimular (C) frente al tiempo de incubación en horas, durante el experimento "D" con su desviación estándar.

Analizando las Figuras 4, 5, 6 y 7, se puede observar en primer lugar, como el número de microorganismos en la población al inicio del experimento D (Figura 7), realizado con mosto concentrado sin rectificar como sustrato de partida, es mayor en la primera toma de muestras, a las 9 horas de la siembra, en comparación con los experimentos A, B y C, realizados con mosto concentrado rectificado como sustrato inicial, manteniéndose

esta diferencia hasta las 20 horas de la siembra, lo que indica, que el medio utilizado en el experimento D ha facilitado el crecimiento microbiano en un 5 % en comparación con el medio empleado en los experimentos anteriores. Por otro lado, analizando los cuatro ensayos, se puede ver como la estimulación sonora se comporta como un activador del crecimiento, existiendo una diferencia del 3,7 % en la tasa de crecimiento microbiano.

El tratamiento estadístico de los datos demuestra que este aumento de la tasa de crecimiento es significativo. Estos resultados coinciden con los expuestos en diversos estudios (Harris et al., 2021; Banerjee et al., 2018; Sarvaiya et al., 2015; Aggio et al., 2011; Cho Lee Ying et al., 2009) en los cuales, se comprueba que el uso de ondas sonoras audibles repercute en el crecimiento microbiano. Aggio et al. (2011) afirma que utilizando estímulos sonoros audibles tanto de alta como de baja frecuencia, se produce un cambio significativo en el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae*, presentando los ensayos con estimulación acústica un crecimiento mayor en un 12,4 % en comparación con los ensayos control sin estimular.

4.2 Recuento de microorganismos viables por cultivo

A la vista de los resultados obtenidos en la estimación de la población microbiana en el experimento A, se decidió llevar a cabo un recuento de levaduras en placa de agar extracto de malta, con el fin de conocer la población de levaduras viables, así como de comprobar si se producían diferencias significativas en los dos experimentos siguientes, B y C. Los datos obtenidos se han unificado y se representan en la siguiente figura (Figura 8).

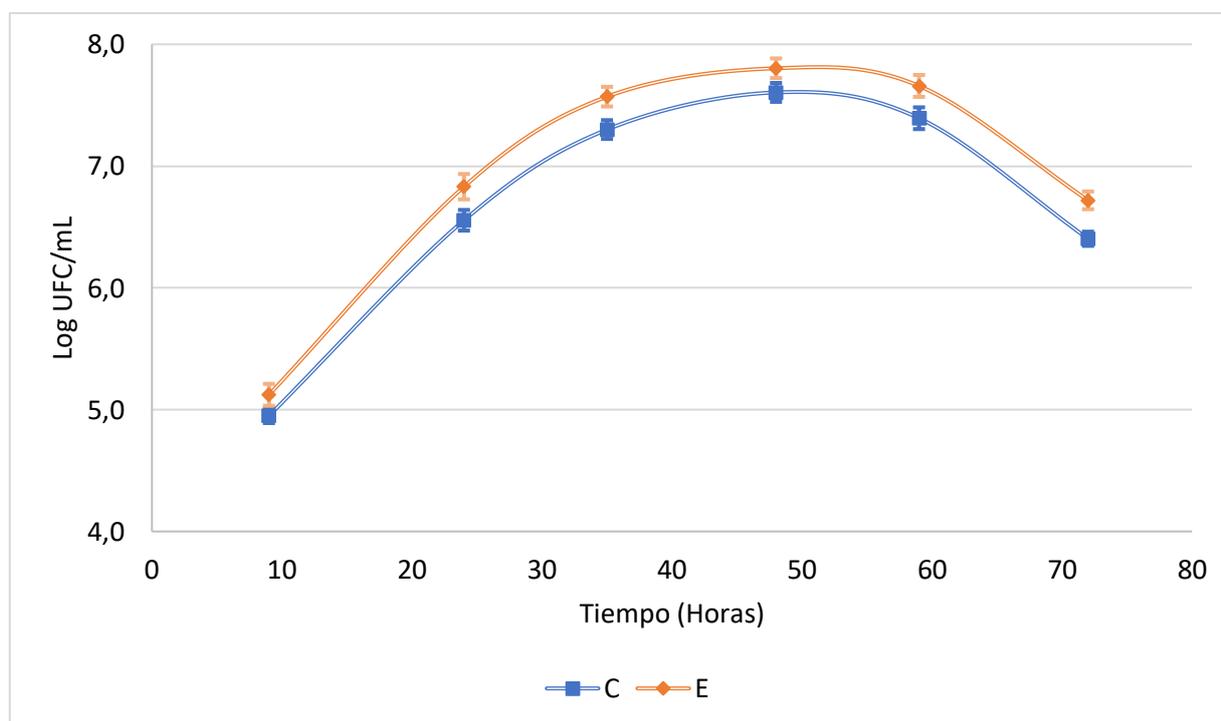


Figura 8: Comparativa de la representación del logaritmo de las células viables por mililitro ($\log(\text{UFC}/\text{mL})$) entre las medias aritméticas de los ensayos con estimulación acústica (E) y los ensayos control sin estimular (C) frente al tiempo de incubación en horas, durante los experimentos "B y C" con su desviación estándar.

Se encontraron diferencias significativas en el recuento de células viables. Como se puede observar en la Figura 8, durante los experimentos, el recuento de células viables es mayor en los ensayos con estimulación acústica durante toda la curva de crecimiento microbiano, lo cual indica, que el estímulo sonoro no solo se comporta como activador de fermentación, sino también como factor de supervivencia. De esta forma, el estímulo sonoro provoca un arranque de fermentación más rápido y confiere una mayor capacidad de asegurar el agotamiento de los azúcares.

En el estudio de Cho Lee Ying et al. (2009) se observó, que el uso de sonidos audibles con *Escherichia coli*, produce un aumento considerable de la tasa de crecimiento de este microorganismo, encontrando en todos los casos un aumento de las células viables frente al silencio. Coincidiendo con sus resultados, las levaduras de igual manera que las bacterias reaccionan positivamente al tratamiento con sonidos audibles, esto evidencia que, aun tratándose de organismos completamente diferentes, en ambos casos existen sistemas capaces de reaccionar ante los estímulos sonoros. Se cree que los estímulos sonoros pueden llegar a modificar físicamente algunos de los distintos tipos de canales de transporte a través de la membrana celular, constituidos por proteínas, que pueden facilitar o dificultar tanto la entrada de nutrientes como la liberación de metabolitos al medio, repercutiendo de manera directa en el metabolismo celular y por tanto en su desarrollo (Sarvaiya et al., 2015).

4.3 Comparativa de los análisis fisicoquímicos

A continuación, se presentan las comparaciones de los diferentes análisis fisicoquímicos realizados al concluir los experimentos A, B y C, realizados con mosto concentrado rectificado como sustrato de partida, durante estos experimentos, solamente los ensayos con estimulación acústica consiguieron terminar la fermentación.

Los análisis del experimento D, realizado con mosto concentrado sin rectificar como sustrato inicial, no se realizaron, ya que ni los ensayos con estimulación acústica ni los ensayos control sin estimular llegaron a terminar la fermentación.

- Comparativa de los valores de pH

Según Fleet et al. (1992) el valor normal de pH en vinos varía entre 3,00 y 4,20. En la Figura 9 se puede observar que los valores se encuentran dentro del rango esperado de un vino una vez terminada la fermentación alcohólica.

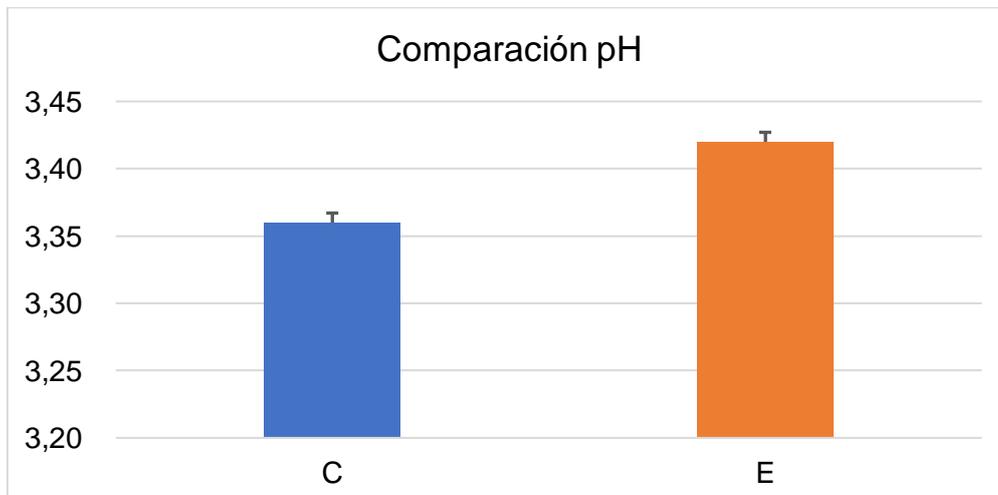


Figura 9: Medidas comparativas del valor del pH entre las medias aritméticas de los ensayos con estimulación acústica (E) y los ensayos control sin estimular (C). Las diferencias estadísticamente significativas se analizaron mediante la prueba t de Student (* $p < 0,05$).

Estudiando los datos estadísticamente, se concluye que las diferencias no son significativas, sin embargo, se puede ver como los ensayos con estimulación acústica (E) presentan un valor ligeramente más elevado que los ensayos control sin estimular (C).

- Comparativa de los valores de acidez total

En enología, el concepto de acidez es variado, ya que se pueden distinguir varias formas de acidez (acidez total, volátil, fija y real), cada una de estas desempeña una función distinta en relación con el equilibrio fisicoquímico y organoléptico del vino. En vinos, los valores normales de acidez total oscilan entre los 4,0 – 7,0 g/L de ácido tartárico (Hidalgo, 2019).

En la Figura 10 se observan los valores de la acidez total, estos se encuentran dentro del rango de valores de un vino normal. Tratando estos datos estadísticamente se concluye que las diferencias no son significativas, sin embargo, se puede observar como la acidez total en los ensayos control sin estimular (C) es ligeramente mayor que en los ensayos con estimulación acústica (E).

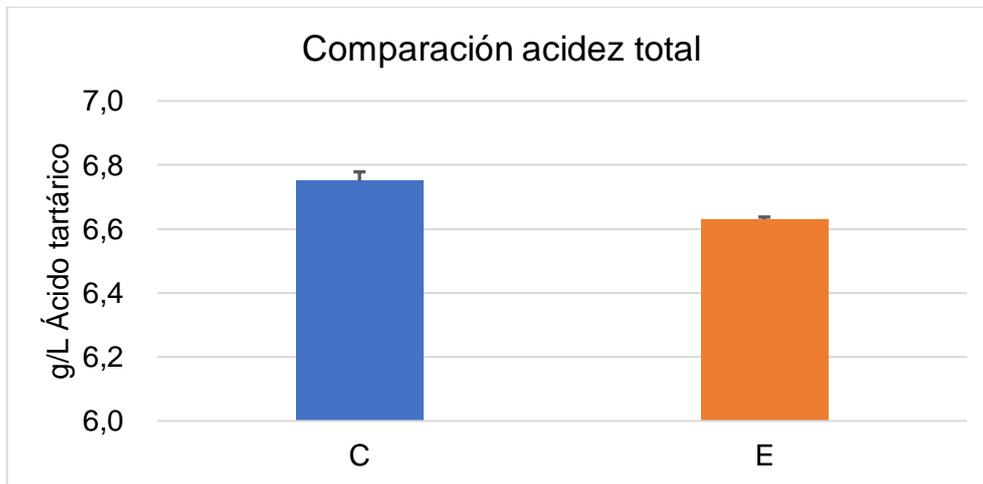


Figura 10: Medidas comparativas del valor de la acidez total (g/L ácido tartárico) entre las medias aritméticas de los ensayos con estimulación acústica (E) y los ensayos control sin estimular (C). Las diferencias estadísticamente significativas se analizaron mediante la prueba t de Student (* $p < 0,05$).

- Comparativa de los valores de grado alcohólico

El etanol o alcohol etílico es, después del agua, el constituyente cuantitativamente más importante del vino. La riqueza del vino se expresa mediante la graduación alcohólica que representa el porcentaje, en volumen, de alcohol en el vino. La riqueza alcohólica del vino normalmente es de 100 g/L (12,6 % Vol.) y excepcionalmente puede ir hasta 136 g/L (16 % Vol.) (Ribereau Gayon, 2020).

En la Figura 11 se compara el grado alcohólico final de los vinos, encontrando diferencias estadísticamente significativas entre los ensayos con estimulación acústica (E) y los ensayos control sin estimular (C). Esta diferencia es del 7,4 %, obteniendo un mayor grado alcohólico los ensayos con estimulación acústica.

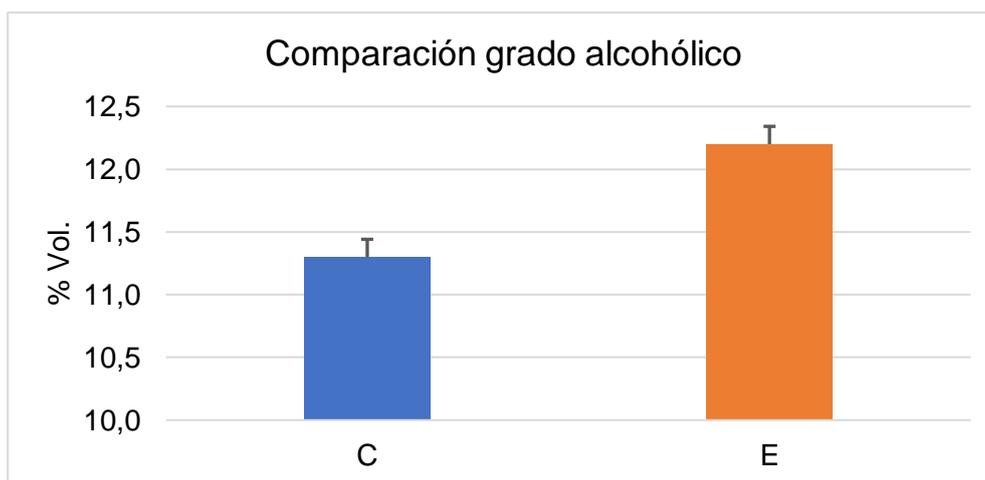


Figura 11: Medidas comparativas del valor del grado alcohólico (% Vol.) entre las medias aritméticas de los ensayos con estimulación acústica (E) y los ensayos control sin estimular (C). Las diferencias estadísticamente significativas se analizaron mediante la prueba t de Student (* $p < 0,05$).

En el trabajo de Sarvaiya et al. (2015) se estudió como aplicando ondas sonoras audibles, no solo se mejoraba la tasa de crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* si no que se producían variaciones significativas en el grado alcohólico, se comprobó que utilizando frecuencias de 10 kHz la tasa de crecimiento aumentaba en un 3,15 % mientras que el aumento de la capacidad de producción de alcohol aumentaba en un 15 % más en los ensayos con estimulación acústica.

Coincidiendo con los resultados expuestos por Sarvaiya et al. (2015), en el presente estudio se ha descrito que, aplicando ondas sonoras de 440 Hz, la tasa de crecimiento aumenta en un 3,7 % y se produce un incremento de la capacidad de producción de alcohol de un 7,4 %, evidenciando un aumento de la producción de alcohol por célula, lo que apunta a un cambio en el metabolismo celular.

- Comparativa de los valores de acidez volátil

Se sabe que, en un vino normal, la acidez volátil no suele exceder el valor de 0,90 g/L de ácido acético, siendo el intervalo más adecuado desde 0,20 - 0,60 g/L (Ribereau Gayon, 2020).

Como se puede observar en la Figura 12, los datos obtenidos están dentro del rango comentado anteriormente, además, se puede observar una diferencia estadísticamente significativa entre los valores de los ensayos con estimulación acústica (E) y los ensayos control sin estimular (C), siendo esta del 17 %.

A lo largo de los experimentos, se observó la diferencia de acidez volátil entre los ensayos con estimulación acústica (E) y los ensayos control sin estimular (C), por ello, se decidió realizar una siembra en masa de ambos ensayos en placas Petri en medio manitol añadiendo cicloheximida (100 mg/L), para comprobar si esta subida de acidez volátil se debía a una proliferación de bacterias acéticas. En base al resultado de las siembras, se determinó que esta subida de acidez volátil se debía al propio metabolismo de la levadura. Harris et al. (2021) constata que al estimular a *Saccharomyces cerevisiae* con sonidos audibles se produce un cambio metabólico significativo que se traduce en un aumento de ciertos metabolitos, de igual manera, se cree que el estrés fisiológico producido por el estímulo sonoro audible también podría desencadenar estas reacciones. Sin embargo, los mecanismos a través de los cuales el sonido produce estos efectos biológicos aún no se han determinado (Sarvaiya et al., 2015).

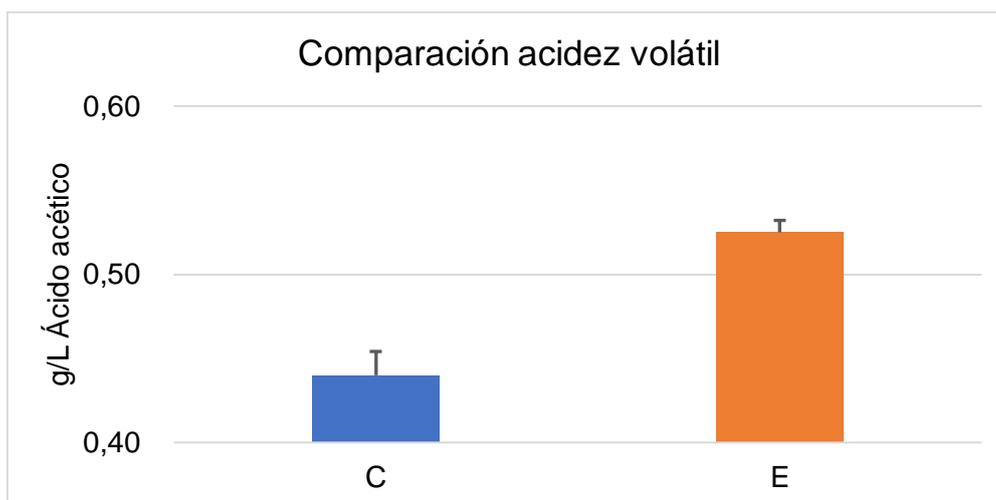


Figura 12: Medidas comparativas del valor de la acidez volátil (g/L ácido acético) entre las medias aritméticas de los ensayos con estimulación acústica (E) y los ensayos control sin estimular (C). Las diferencias estadísticamente significativas se analizaron mediante la prueba t de Student (* $p < 0,05$).

- Comparativa de los valores de azúcares reductores

Para saber si la fermentación alcohólica ha finalizado se analiza el contenido de azúcares reductores que hay al terminar el experimento, este contenido es la cantidad de azúcar que queda aún por consumir. Un contenido inferior a 5,0 g/L nos indica que la muestra ha terminado la fermentación, tratándose así de un vino seco (O.I.V, 2009 b).

En la Figura 13 se representan los valores obtenidos de azúcares reductores en los ensayos con estimulación acústica (E) y los ensayos control sin estimular (C), al tratar los datos estadísticamente se comprobó, que existe una diferencia estadísticamente significativa entre los datos expuestos, siendo esta del 64 %, concluyendo que, en los ensayos con estimulación acústica la fermentación finaliza antes en comparación con los ensayos control sin estimular donde la fermentación no llegar a terminar.

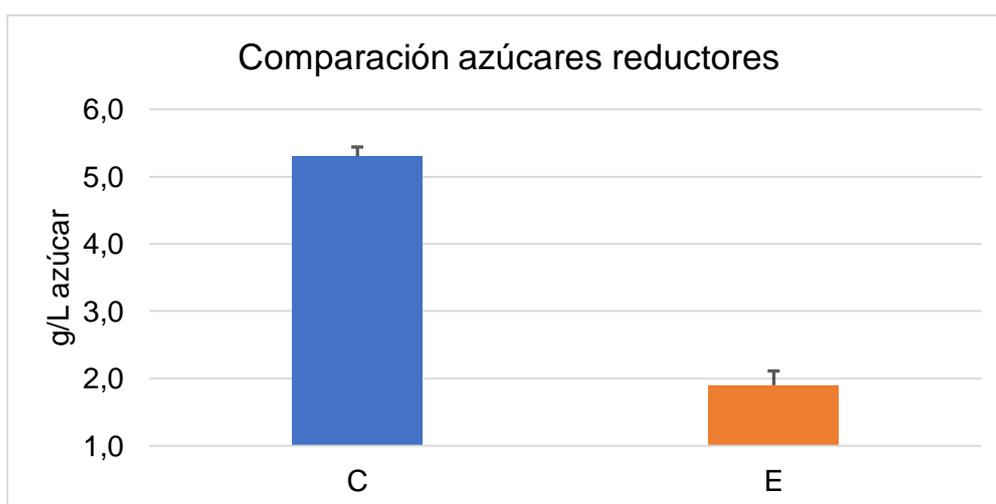


Figura 13: Medidas comparativas del valor de los azúcares reductores (g/L azúcar) entre las medias aritméticas de los ensayos con estimulación acústica (E) y los ensayos control sin estimular (C). Las diferencias estadísticamente significativas se analizaron mediante la prueba t de Student (* $p < 0,05$).

Observando todos los datos analíticos expuestos en su conjunto se evidencia un cambio en el metabolismo celular de *Saccharomyces cerevisiae* en los ensayos con estimulación acústica frente a los ensayos control sin estimular.

Diversos estudios, (Harris et al., 2021; Aggio et al., 2011) señalan una diferencia significativa entre los metabolitos encontrados en los ensayos con estimulación acústica frente a los ensayos control sin estimular. Encontrando niveles distintos en más de 50 metabolitos secundarios, siendo las concentraciones diferentes en base al estímulo sonoro aplicado, demostrando que los sonidos audibles de baja frecuencia pueden aumentar la actividad en numerosas rutas metabólicas de *Saccharomyces cerevisiae*, mientras que los sonidos audibles de alta frecuencia reducen la actividad de las rutas asociadas con la biosíntesis de aminoácidos aromáticos (Harris et al., 2021).

Coincidiendo con los anteriores estudios se afirma que, aplicando sonidos audibles de baja frecuencia, 440 Hz, se puede aumentar la tasa de crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae*, así como se produce un cambio metabólico, ya que, en el periodo de tiempo estudiado, se ha incrementado la producción de etanol en un 7,4 %, así como la acidez volátil en un 17 % en los ensayos con estimulación acústica.

5. Conclusión y futuras líneas de investigación

En el presente estudio, se ha realizado una investigación de la influencia de las ondas sonoras audibles en la curva de crecimiento microbiano y la capacidad fermentativa de *Saccharomyces cerevisiae*. Tras el estudio de los resultados obtenidos, se pueden extraer las siguientes conclusiones:

- Los resultados del presente estudio indican que la curva de crecimiento microbiano de *Saccharomyces cerevisiae* puede verse afectada por el uso de ondas sonoras audibles de baja frecuencia (440 Hz). Aumentando la tasa de crecimiento microbiano y manteniendo en los ensayos estimulados acústicamente un número superior de células viables durante toda la curva de crecimiento.
- El estímulo sonoro puede comportarse no solo como activador de la fermentación, sino también, como factor de supervivencia, este provoca un arranque de fermentación más rápido y confiere una mayor capacidad de asegurar el agotamiento de los azúcares.
- Se pudo observar una velocidad de consumo mayor del contenido en azúcares del medio por parte de *Saccharomyces cerevisiae* en los ensayos con estimulación acústica frente a los ensayos control sin estimular, así como se evidenció una diferencia en grado alcohólico en los ensayos con estimulación acústica, reflejando un aumento de la producción de alcohol por célula.
- El uso de ondas sonoras audibles produce un aumento de la acidez volátil en los ensayos con estimulación acústica frente a los ensayos control sin estimular, consecuencia de un cambio en el metabolismo celular.

En futuras investigaciones, se plantea realizar experimentos con mosto concentrado sin rectificar variando en estos las frecuencias utilizadas, así como, los tiempos de exposición al estímulo sonoro, para comprobar si *Saccharomyces cerevisiae* responde de forma distinta dependiendo del estímulo sonoro aplicado al igual que ocurre con otros microorganismos.

Finalmente, trabajar en mosto natural permitiría estudiar en profundidad el impacto real del uso de ondas sonoras audibles en la industria enológica. Esto abriría, nuevas perspectivas para la investigación científica, conectando la acústica, la biofísica, la bioquímica y la enología para estudiar si es posible manipular el metabolismo celular, así como el crecimiento de los microorganismos.

6. Bibliografía

Aggio, R., Obolonkin, V., Villas-Boas, S.G. (2011). *Sonic vibration affects the metabolism of yeast cells growing in liquid culture: a metabolomic study*. *Metabolomics* 8:670-678 DOI:[10.1007/s11306-011-0360-x](https://doi.org/10.1007/s11306-011-0360-x)

Banerjee, S., Goswami, A., Datta, A., Pyne, A., Nikhat, A., Ghosh, B. (2018). *Effect of different sound frequencies on the growth and antibiotic susceptibility of Escherichia coli*. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. ISSN: 2319-7706 Vol.7, N.3 <https://www.ijcmas.com/7-3-2018/Souvik%20Banerjee,%20et%20al.pdf>

Barceló, J.G. (1990). *Técnicas analíticas para vinos. Cap 1-6. GAB. Barcelona*. Retrieved from <https://es.scribd.com/document/515611927/Tecnicas-analiticas-para-vino-Capitulo-1-6>

Beléndez, A. (1992). *Acústica, fluidos y termodinámica. Universidad de Alicante. Departamento de Física, Ingeniería de Sistemas y Teoría de la Señal*. <http://rua.ua.es/dspace/handle/10045/14059>

Cho Lee Ying, J., Dayou, J., Khim Phim, C. (2009). *Experimental investigation on the effects of audible sound on the growth of Escherichia coli*. *Modern applied science* Vol.3, N.3. DOI:[10.5539/mas.v3n3p124](https://doi.org/10.5539/mas.v3n3p124)

Fleet, G.H., Heard, G.M. (1992). *Yeast-growth during fermentation, p: 27-54. G.H. Fleet (ed), Wine Microbiology and Biotechnology. Harwood Academic Publishers, Chur*.

Harris, A., Lindsay, M.A., Ganley, A.R.D., Jeffs, A., Villas-Boas, S.G. (2021). *Sound stimulation can affect Saccharomyces cerevisiae growth and production of volatile metabolites in liquid medium*. *Metabolites* 2021,11,605. DOI: [10.3390/metabo11090605](https://doi.org/10.3390/metabo11090605)

Hidalgo J. (2019). *Tratado de enología: tomo I. Ed. Mundi-Prensa. Madrid*.

Kalkan, H., Dündar, (2017). *New techniques for wine aging. Bio web of conferences 9:02012* DOI:[10.1051/bioconf/20170902012](https://doi.org/10.1051/bioconf/20170902012)

Martín Domingo, A. (2014). *Apuntes de acústica. ETS. Arquitectura (UPM)*. <https://oa.upm.es/23098/>

McFarland, L., Surawicz, C., Rubin, M., Fekety, R., Elmer, G., Greenberg, R. (1999) *Recurrent Clostridium Difficile Disease: Epidemiology and Clinical Characteristics*. *Infection Control and Hospital Epidemiology*. 20(01):43-50.

OIV. (2009 a). *Recueil international des methodes d'analyses – OIV Masse volumique et densité relative 20°C – Méthode Type IV* <https://www.oiv.int/public/medias/2317/oiv-ma-as2-01b.pdf>

OIV. (2009 b). *recueil international des methodes d'analyses – OIV Sucres réducteurs. Méthode OIV-MA-AS311-01A. (Résolution OIV/Oeno 377)*. <https://www.oiv.int/public/medias/2330/oiv-ma-as311-01a.pdf>

OIV. (2011). *Recueil international des methodes d'analyses – OIV Méthode OIV-MA-AS313-15 pH Résolution OIV-OENO 438*. <https://www.oiv.int/public/medias/2363/oiv-ma-as313-15.pdf>

OIV. (2012). *Evaluation by refractometry of the sugar concentration in grape musts , concentrated grape musts and rectified concentrated grape musts*. OIV Methods, 1–23. <https://www.oiv.int/public/medias/2469/oiv-ma-as2-02.pdf>

OIV. (2012). *Recueil international des methodes d'analyses – OIV Evaluation de la teneur en sucre -réfractométrie Méthode OIV-MA-AS2-02 Méthode Type I*. 1–22. <https://www.oiv.int/public/medias/7907/oiv-vol1-compendium-of-international-methods-of-analysis.pdf>

OIV. (2015). *Acidité totale. Recueil International Des Methodes D'Analyses, (Méthode OIV-MA-AS313-01)*, 5–7. Retrieved from <http://www.oiv.int/public/medias/3727/oivma-as313-01.pdf>

Pérez, P., Bautistas, A.B., Jurado, R., Gómez-Plaza, E. (2021). *Combining high-power ultrasound and enological enzymes during winemaking to improve the chromatic characteristics of red wine*. LWT Vol.156, 113032 <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.113032>

Piyasena, P., Mohared, E., Mckellar, R.C. (2003). *Inactivation of microbes using ultrasound: a review*. International Journal of Food Microbiology. Vol.87, 207-216 [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00075-8](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00075-8)

Ribèreau Gayon, P. (2020). *RIB Tratado de enología: química del vino estabilización y tratamientos/ Pascal Ribereau Gayan, Yves Glories y Alain Maujean*. - 1 a. cd. - Buenos Aires: Hemisferio Sur, 2003 v.2, 537 p.; 26 X 18 ISBN 950-504-573-5 J. Glories, Yves JI. Maujean, Alain III. Título - 1. Enología.

Sarvaiya, N., Kothari, V. (2015). *Effect of sound in form of music on microbial growth and production of certain important metabolites*. Microbiology 84, 227-235, DOI: [10.1134/S0026261715020125](https://doi.org/10.1134/S0026261715020125)

Shively, C.E., Henick-Kling, T. (2001). *Comparison of two procedures for assay of free amino nitrogen*. American Journal of Enology and Viticulture, 52(4), 400 LP – 401. Retrieved from <http://www.ajevonline.org/content/52/4/400.abstract>

7. Anejos

Tabla 1: Datos de la comparación del crecimiento microbiano durante los experimentos A, B, C y D entre los ensayos control sin estimular (C) y los ensayos con estimulación acústica (E).

Comparación del crecimiento microbiano							
Experimento	Tiempo (Horas)	Ensayos control sin estimular			Ensayos con estimulación acústica		
		C1	C2	\bar{X} C	E1	E2	\bar{X} E
A	9	8,3 ± 0,51	8,3 ± 0,52	8,3 ± 0,02	8,4 ± 0,50	8,5 ± 0,49	8,4 ± 0,02
	24	8,8 ± 0,22	8,7 ± 0,23	8,7 ± 0,02	9,0 ± 0,11	9,0 ± 0,10	9,0 ± 0,02
	35	9,3 ± 0,13	9,3 ± 0,15	9,3 ± 0,01	9,4 ± 0,19	9,4 ± 0,19	9,4 ± 0,01
	48	9,4 ± 0,23	9,4 ± 0,24	9,4 ± 0,01	9,4 ± 0,17	9,4 ± 0,16	9,4 ± 0,01
	59	9,3 ± 0,19	9,3 ± 0,19	9,3 ± 0,02	9,3 ± 0,15	9,3 ± 0,14	9,3 ± 0,01
	72	9,3 ± 0,18	9,3 ± 0,17	9,3 ± 0,02	9,3 ± 0,09	9,3 ± 0,10	9,3 ± 0,03
B	9	8,3 ± 0,65	8,4 ± 0,61	8,3 ± 0,05	8,3 ± 0,63	8,4 ± 0,60	8,4 ± 0,04
	24	9,3 ± 0,02	9,5 ± 0,06	9,2 ± 0,06	9,3 ± 0,03	9,3 ± 0,00	9,3 ± 0,02
	35	9,4 ± 0,15	9,5 ± 0,16	9,3 ± 0,02	9,5 ± 0,17	9,4 ± 0,14	9,4 ± 0,02
	48	9,5 ± 0,21	9,5 ± 0,19	9,5 ± 0,02	9,6 ± 0,22	9,5 ± 0,19	9,5 ± 0,02
	59	9,5 ± 0,20	9,5 ± 0,17	9,5 ± 0,02	9,5 ± 0,21	9,5 ± 0,18	9,5 ± 0,01
	72	9,3 ± 0,08	9,3 ± 0,02	9,3 ± 0,05	9,2 ± 0,01	9,4 ± 0,09	9,2 ± 0,09
C	9	8,2 ± 0,57	8,3 ± 0,53	8,3 ± 0,04	8,3 ± 0,56	8,3 ± 0,54	8,3 ± 0,04
	24	8,6 ± 0,33	8,5 ± 0,38	8,5 ± 0,05	8,5 ± 0,41	8,6 ± 0,36	8,5 ± 0,07
	35	9,1 ± 0,06	9,1 ± 0,03	9,1 ± 0,03	9,2 ± 0,09	9,3 ± 0,11	9,2 ± 0,04
	48	9,4 ± 0,26	9,4 ± 0,26	9,4 ± 0,01	9,5 ± 0,27	9,5 ± 0,26	9,5 ± 0,01
	59	9,5 ± 0,32	9,5 ± 0,33	9,5 ± 0,01	9,5 ± 0,32	9,5 ± 0,28	9,5 ± 0,02
	72	9,4 ± 0,27	9,4 ± 0,29	9,4 ± 0,01	9,5 ± 0,30	9,5 ± 0,25	9,5 ± 0,03
D	9	8,7 ± 0,33	8,8 ± 0,27	8,7 ± 0,05	8,8 ± 0,31	8,8 ± 0,27	8,8 ± 0,04
	24	8,9 ± 0,20	8,8 ± 0,24	8,8 ± 0,05	9,0 ± 0,15	9,1 ± 0,12	9,0 ± 0,03
	35	9,1 ± 0,01	9,1 ± 0,02	9,1 ± 0,02	9,3 ± 0,05	9,3 ± 0,04	9,3 ± 0,01
	48	9,4 ± 0,17	9,4 ± 0,17	9,4 ± 0,01	9,4 ± 0,15	9,4 ± 0,14	9,4 ± 0,01
	59	9,4 ± 0,18	9,4 ± 0,19	9,4 ± 0,01	9,4 ± 0,16	9,4 ± 0,14	9,4 ± 0,01
	72	9,4 ± 0,19	9,4 ± 0,17	9,4 ± 0,04	9,4 ± 0,10	9,3 ± 0,07	9,3 ± 0,03

*Los resultados representan la media ± desviación estándar (SD) de los ensayos con estimulación acústica (E) y los ensayos control sin estimular (C).

Tabla 2: Datos de la comparación del recuento de microorganismos viables por cultivo durante los experimentos B y C entre los ensayos control sin estimular (C) y los ensayos con estimulación acústica (E).

Recuento de microorganismos viables por cultivo								
		Ensayos control sin estimular			Ensayos con estimulación acústica			
Experimento	Tiempo (Horas)	C1	C2	\bar{X} C	E1	E2	\bar{X} E	
B	9	4,8 ± 1,68	5,9 ± 1,21	5,3 ± 1,44	5,9 ± 1,24	5,9 ± 1,38	5,9 ± 1,31	
	24	6,8 ± 0,27	7,7 ± 0,06	7,2 ± 0,10	7,4 ± 0,16	7,9 ± 0,10	7,7 ± 0,03	
	35	7,6 ± 0,30	8,3 ± 0,49	7,9 ± 0,39	8,3 ± 0,42	8,4 ± 0,41	8,3 ± 0,42	
	48	8,7 ± 1,14	8,6 ± 0,72	8,7 ± 0,93	8,8 ± 0,78	8,7 ± 0,62	8,7 ± 0,70	
	59	8,2 ± 0,78	8,1 ± 0,35	8,2 ± 0,57	8,3 ± 0,44	8,6 ± 0,54	8,4 ± 0,49	
	72	6,8 ± 0,25	7,0 ± 0,42	6,9 ± 0,34	7,3 ± 0,25	7,4 ± 0,29	7,3 ± 0,27	
C	9	4,7 ± 0,84	4,4 ± 1,23	4,6 ± 1,03	4,4 ± 1,27	4,3 ± 1,28	4,4 ± 1,28	
	24	5,9 ± 0,01	5,9 ± 0,22	5,9 ± 0,10	6,3 ± 0,05	5,7 ± 0,33	6,0 ± 0,14	
	35	6,7 ± 0,58	6,6 ± 0,32	6,7 ± 0,45	6,9 ± 0,48	6,8 ± 0,44	6,8 ± 0,46	
	48	5,6 ± 0,23	7,5 ± 0,93	6,5 ± 0,35	6,9 ± 0,50	6,9 ± 0,52	6,9 ± 0,51	
	59	6,7 ± 0,58	6,5 ± 0,24	6,6 ± 0,41	6,8 ± 0,40	7,0 ± 0,62	6,9 ± 0,51	
	72	5,7 ± 0,12	6,1 ± 0,05	5,9 ± 0,08	6,0 ± 0,15	6,2 ± 0,04	6,1 ± 0,06	
Experimento	Tiempo (Horas)	C1	C2	\bar{X} C	E1	E2	\bar{X} E	(% Diferencia)
$\Sigma \bar{X}$ (B y C)	9	4,7 ± 1,26	5,2 ± 1,22	5,0 ± 0,60	5,1 ± 1,26	5,1 ± 1,33	5,1 ± 0,90	3,7
	24	6,3 ± 0,13	6,8 ± 0,08	6,6 ± 0,80	6,9 ± 0,05	6,8 ± 0,12	6,8 ± 1,00	
	35	7,1 ± 0,44	7,5 ± 0,41	7,3 ± 0,80	7,6 ± 0,45	7,6 ± 0,43	7,6 ± 0,90	
	48	7,2 ± 0,45	8,0 ± 0,82	7,6 ± 1,50	7,8 ± 0,64	7,8 ± 0,57	7,8 ± 1,10	
	59	7,5 ± 0,68	7,3 ± 0,30	7,4 ± 0,90	7,5 ± 0,42	7,8 ± 0,58	7,7 ± 0,90	
	72	6,3 ± 0,19	6,5 ± 0,24	6,4 ± 0,60	6,6 ± 0,20	6,8 ± 0,13	6,7 ± 0,70	

*Los resultados representan la media ± desviación estándar (SD) y el % de diferencia entre los ensayos con estimulación acústica (E) y los ensayos control sin estimular (C).

Tabla 3: Datos de la comparación de los parámetros fisicoquímicos durante los experimentos A, B y C entre los ensayos control sin estimular (C) y los ensayos con estimulación acústica (E).

Comparación de los parámetros fisicoquímicos								
Experimento	Parámetro	Ensayos control sin estimular			Ensayos con estimulación acústica			
		C1	C2	\bar{X} C	E1	E2	\bar{X} E	
A	pH	3,37 ± 0,01	3,29 ± 0,002	3,33 ± 0,03	3,36 ± 0,002	3,35 ± 0,005	3,35 ± 0,003	
	A. Total (g/L TH ₂)	7,0 ± 0,01	7,1 ± 0,03	7,1 ± 0,03	7,7 ± 0,01	7,2 ± 0,02	7,5 ± 0,02	
	G, Alcohólico (% Vol.)	10,7 ± 0,09	10,8 ± 0,02	10,8 ± 0,02	9,1 ± 0,07	10 ± 0,07	9,6 ± 0,32	
	A. Volátil (g/L acético)	0,40 ± 0,007	0,46 ± 0,002	0,43 ± 0,02	0,48 ± 0,002	0,50 ± 0,002	0,49 ± 0,01	
	Azucares Reductores (g/L)	3,1 ± 0,07	2,7 ± 0,02	2,9 ± 0,13	3,1 ± 0,05	3,0 ± 0,02	3,0 ± 0,04	
B	pH	3,36 ± 0,005	3,39 ± 0,007	3,38 ± 0,01	3,35 ± 0,007	3,35 ± 0,005	3,35 ± 0,001	
	A. Total (g/L TH ₂)	7,1 ± 0,03	7,6 ± 0,01	7,4 ± 0,20	8,0 ± 0,15	7,9 ± 0,14	7,9 ± 0,002	
	G, Alcohólico (% Vol.)	10,1 ± 0,09	10 ± 0,09	10,1 ± 0,04	8,2 ± 0,04	7,2 ± 0,09	7,7 ± 0,35	
	A. Volátil (g/L acético)	0,46 ± 0,002	0,44 ± 0,009	0,45 ± 0,004	0,72 ± 0,002	0,75 ± 0,001	0,73 ± 0,012	
	Azucares Reductores (g/L)	3,1 ± 0,07	5,0 ± 0,07	4,1 ± 0,67	2,1 ± 0,03	3,5 ± 0,07	2,8 ± 0,48	
C	pH	3,43 ± 0,014	3,45 ± 0,007	3,44 ± 0,007	3,43 ± 0,002	3,40 ± 0,002	3,41 ± 0,01	
	A. Total (g/L TH ₂)	6,8 ± 0,002	6,8 ± 0,007	6,8 ± 0,002	7,3 ± 0,17	7,8 ± 0,12	7,6 ± 0,21	
	G, Alcohólico (% Vol.)	10,1 ± 0,14	10,1 ± 0,07	10,1 ± 0,001	7,8 ± 0,07	7,9 ± 0,02	7,8 ± 0,02	
	A. Volátil (g/L acético)	0,27 ± 0,007	0,22 ± 0,002	0,24 ± 0,012	0,39 ± 0,002	0,30 ± 0,002	0,35 ± 0,034	
	Azucares Reductores (g/L)	4,9 ± 0,03	4,0 ± 0,07	4,4 ± 0,31	4,0 ± 0,07	2,5 ± 0,14	3,3 ± 0,53	
Experimento	Tiempo (Horas)	C1	C2	\bar{X} C	E1	E2	\bar{X} E	(% Diferencia)
$\Sigma\bar{X}(A,B \text{ y } C)$	pH	3,37 ± 0,007	3,36 ± 0,007	3,36 ± 0,004	3,4 ± 0,007	3,39 ± 0,007	3,42 ± 0,004	1,7
	A. Total (g/L TH ₂)	6,8 ± 0,03	6,7 ± 0,03	6,7 ± 0,08	6,6 ± 0,01	6,6 ± 0,01	6,6 ± 0,08	1,8
	G, Alcohólico (% Vol.)	11,2 ± 0,14	11,4 ± 0,14	11,3 ± 0,64	12,3 ± 0,14	12,1 ± 0,14	12,2 ± 0,64	7,4
	A. Volátil (g/L acético)	0,43 ± 0,014	0,45 ± 0,014	0,44 ± 0,059	0,53 ± 0,007	0,52 ± 0,007	0,52 ± 0,059	17
	Azucares Reductores (g/L)	5,4 ± 0,14	5,2 ± 0,14	5,3 ± 2,4	1,8 ± 0,21	2,1 ± 0,21	1,9 ± 2,40	64

*Los resultados representan la media ± desviación estándar (SD) y el % de diferencia entre los ensayos con estimulación acústica (E) y los ensayos control sin estimular (C).