



INFLUENCIA DE SONIDOS AUDIBLES EN LA ACTIVIDAD METABÓLICA DE *Saccharomyces cerevisiae*

TRABAJO FIN DE MÁSTER

Curso: 2022/23

Alumno: Lucía Vázquez Bilbao
Tutoras: Dra. Josefina Vila Crespo
Dra. Violeta Ruipérez Prádanos

Máster en Calidad, Desarrollo e Innovación de Alimentos
E.T.S. Ingenierías Agrarias, Campus de la Yutera (Palencia)
Universidad de Valladolid

ÍNDICE

RESUMEN	3
1. INTRODUCCIÓN	5
2. OBJETIVOS.....	6
3. MATERIALES Y MÉTODOS	7
3.1 MONTAJE DEL SISTEMA DE SONIDO.....	7
3.2 MOSTO	8
3.3 DESARROLLO EXPERIMENTAL.....	9
3.4 ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO.....	10
3.4.1 <i>Estimación del crecimiento microbiano.</i>	10
3.5 ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICO DE MOSTO Y VINO.....	10
3.5.1 <i>Determinación del grado alcohólico probable en mostos por refractometría. Método refractométrico</i>	10
3.5.2 <i>Determinación de la masa volúmica y la densidad relativa. Método aerométrico.</i>	11
3.5.3 <i>Determinación del pH.</i>	11
3.5.4 <i>Determinación de la acidez total. Método potenciométrico.</i>	11
3.5.5 <i>Determinación de la acidez volátil. Método García-Tena.</i>	11
3.5.6 <i>Determinación del grado alcohólico. Método ebulométrico.</i>	12
3.5.7 <i>Determinación de los azúcares reductores en vino. Método Rebelein.</i>	12
3.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	12
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	12
4.1 CRECIMIENTO MICROBIANO.....	12
4.2 EFECTO SOBRE LAS CARACTERÍSTICAS FÍSICOQUÍMICAS	18
4.3 ESTUDIO DE LA ESTIMULACIÓN ACÚSTICA EN LA FASE EXPONENCIAL DE CRECIMIENTO MICROBIANO	22
5. CONCLUSIÓN Y FUTURAS LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN	24
6. BIBLIOGRAFÍA	25

Resumen

La unión de la música y el vino desde un punto de vista enológico es algo sumamente novedoso. Estudios recientes arrojan luz sobre el uso de las ondas sonoras audibles en procesos de vinificación, afirmando que las ondas sonoras audibles pueden afectar al desarrollo y metabolismo microbianos.

Es por ello por lo que en este proyecto se ha estudiado la influencia de sonidos audibles en la actividad metabólica de *Saccharomyces cerevisiae*, mediante el estudio de la cinética de crecimiento microbiano y su efecto sobre las propiedades fisicoquímicas de las vinificaciones experimentales. Se han aplicado ondas sonoras audibles de baja frecuencia (440 Hz) en periodos de cinco horas al día durante los cuatro primeros días de fermentación. Los diferentes ensayos se realizaron a temperatura ambiente en diferentes momentos del año, demostrando también la influencia directa de la temperatura en la repercusión de ensayo.

Debido a que las diferencias en crecimiento microbiano, según se muestra en las cinéticas de las vinificaciones realizadas, se producen en la fase exponencial, se realizó un ensayo aplicando este sonido solamente en esta fase de crecimiento. Los resultados obtenidos confirman que el uso de las ondas sonoras audibles en las primeras 24-48 horas, influye significativamente en el desarrollo de la fermentación y por tanto en el metabolismo de *Saccharomyces cerevisiae*.

En conjunto, los resultados obtenidos sugieren que las ondas sonoras audibles de baja frecuencia afectan significativamente al desarrollo del crecimiento microbiano, observándose cambios en el comportamiento metabólico de *Saccharomyces cerevisiae* en las distintas condiciones experimentales probadas.

Abstract

The combination of music and wine from an oenological point of view is something very new. Recent studies shed light on the use of audible sound waves in winemaking processes, stating that audible sound waves can affect microbial development and metabolism.

For this reason, this project has studied the influence of audible sounds on the metabolic activity of *Saccharomyces cerevisiae* by studying the kinetics of microbial growth and its effect on the physicochemical properties of the experimental vinifications. Low-frequency (440 Hz) audible sound waves were applied for five hours a day during the first four days of fermentation. The different tests were conducted at room temperature at different times of the year, also demonstrating the direct influence of temperature on the test repercussion.

Since the differences in microbial growth, as shown in the kinetics of the vinifications conducted, occur in the exponential phase, a test was conducted by applying this sound only in this growth phase. The results obtained confirm that the use of audible sound waves in the first 24-48 hours significantly influences the development of fermentation and thus the metabolism of *Saccharomyces cerevisiae*.

Overall, the results obtained suggest that low-frequency audible sound waves significantly affect the development of microbial growth, with changes in the metabolic behaviour of *Saccharomyces cerevisiae* being observed in the different experimental conditions evaluated.

1. Introducción

El sonido se define como la propagación de vibraciones mecánicas a través de un medio elástico, como el aire o el agua, en forma de pequeñas variaciones de presión (Grigione, 2014). Estas pequeñas variaciones de presión, son las llamadas ondas sonoras. 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 (Martín, 2014).

La diversidad de ondas sonoras se categoriza en función del espectro de frecuencias que abarcan, dando origen a los infrasonidos, sonidos audibles y ultrasonidos (véase Figura 1). En el contexto humano, la capacidad auditiva se restringe a los sonidos audibles, los cuales ocupan un rango de frecuencia entre 20 Hz y 20 kHz (Beléndez, 1992).

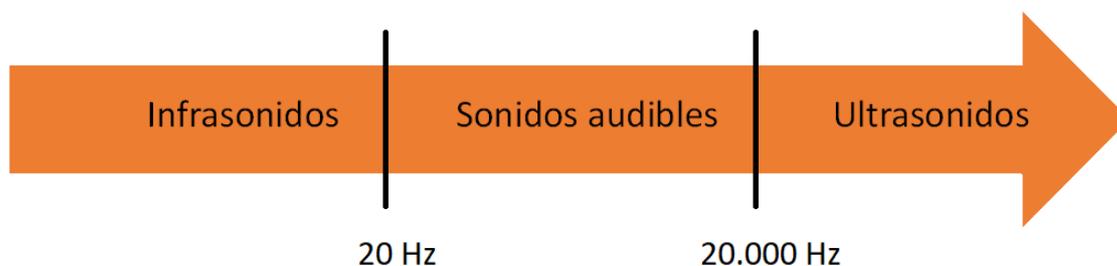


Figura 1: Clasificación de las ondas sonoras. (Vázquez-Bilbao, 2022).

Se ha demostrado que las vibraciones por debajo y por encima del rango audible, los infrasonidos y los ultrasonidos, respectivamente, afectan significativamente al crecimiento y desarrollo de microorganismos (Chisti et al., 2003). Los ultrasonidos, se pueden utilizar para el control de procesos, así como para la intensificación de estos en muchas áreas, incluidas las industrias alimentaria, química, médica, biotecnológica y farmacéutica (Ojha et al., 2016). Las investigaciones con ultrasonidos, apuntan a un cambio en la membrana celular; en la industria estas ondas son comúnmente usadas para esterilizar, produciendo un aumento focalizado de temperatura, la producción de radicales libres y el adelgazamiento de las membranas celulares (Piyasena et al., 2003). Dependiendo de la intensidad de los ultrasonidos, se producen daños reparables o irreparables en las células microbianas y su entorno (Huang et al., 2017).

Con respecto al 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). Las ondas sonoras

audibles de alta y baja frecuencia afectan significativamente al metabolismo de *Saccharomyces cerevisiae*. Estudios previos demostraron que los estímulos sonoros aumentaban 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 (Aggio et al., 2011). De igual manera, los estudios realizados con *Saccharomyces cerevisiae* 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).

En el ámbito enológico, las investigaciones y mejoras tecnológicas se centran en el uso de ultrasonidos. Diversos estudios respaldan que su uso puede facilitar 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). El uso de ultrasonidos, también refleja mejoras en los procesos de crianza, puesto que aporta 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. Investigaciones recientes sobre la influencia de las ondas sonoras audibles en la curva de crecimiento microbiano y la capacidad fermentativa de *Saccharomyces cerevisiae* afirman que aplicando ondas sonoras de baja frecuencia se puede llegar a alterar la curva de crecimiento microbiano, 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. De este estudio se concluye que el estímulo sonoro puede comportarse no solo como activador de la fermentación, si no también, como un factor de supervivencia, provocando un arranque de fermentación más rápido y proporcionando una mayor capacidad de asegurar el agotamiento de los azúcares (Vázquez-Bilbao, 2022).

2. Objetivos

El objetivo principal del presente trabajo es estudiar la influencia de sonidos audibles en el metabolismo de *Saccharomyces cerevisiae*.

Para ello se proponen los siguientes objetivos específicos:

1. Consulta bibliográfica para conocer las últimas actualizaciones acerca del uso de ondas sonoras audibles en el sector enológico.

2. Establecimiento del sistema de sonido añadiendo mejoras al planteado en estudios previos en nuestro laboratorio (Vázquez-Bilbao, 2022).
3. Estudio de la influencia de la estimulación sonora en la cinética microbiana.
4. Caracterización fisicoquímica de los vinos obtenidos de las distintas 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. Su colaboración ha sido clave para buscar el sistema de sonido más adecuado, que permitiese trabajar tanto a temperatura ambiente como en cámara de incubación.

El sistema de sonido estaba formado por dos altavoces estándar (8Ω , 8W), introducidos dentro del mosto y aislados de este por una bolsa de plástico estanca. Los altavoces se conectaban a un amplificador externo, y este último a un teléfono móvil, desde el cual se reproducía el estímulo sonoro elegido (Figura 2). Tanto el amplificador externo como el teléfono móvil se encontraban conectados a la red para asegurar el correcto funcionamiento del sistema. Durante este trabajo, la frecuencia de sonido utilizada fue de 440 Hz, en función de los hallazgos obtenidos en (Vázquez-Bilbao, 2022).

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), midiendo a una distancia de 15 cm y ajustando en todos los experimentos el volumen a 80 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>).



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

3.2 Mosto

Para la elaboración de este proyecto se ha utilizado mosto concentrado, el cual se diluyó con agua hasta llegar a una concentración de 20 °Brix. Para poder trabajar en unos parámetros similares a los de un mosto convencional, también se corrigió el pH a 3,50 con ayuda de ácido tartárico.

Como nutriente se empleó 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. Según estudios previos la dosis elegida fue de 35 g/hL (Vázquez-Bilbao, 2022).

Con el objetivo de eliminar cualquier microorganismo que pueda dar lugar al inicio de una fermentación espontánea, el mosto, antes de ser inoculado, se esterilizó a vapor fluyente durante 15 minutos en el autoclave Stericlav-S de Raypa®.

La levadura empleada para llevar a cabo las distintas fermentaciones fue *Saccharomyces cerevisiae* var. *Bayanus* (LALVIN EC1118™, Lallemand, Montreal

Influencia de sonidos audibles en la actividad metabólica de *Saccharomyces cerevisiae*.

Canadá). La empresa biotecnológica recomienda una adición de 20-40 g/hL. Según estudios previos la dosis elegida fue de 20 g/hL (Vázquez-Bilbao, 2022).

3.3 Desarrollo experimental

La influencia de los sonidos audibles en la cinética y metabolismo de *Saccharomyces cerevisiae* se estudió en vinificaciones con y sin estimulación acústica a partir de mosto concentrado, proceso detallado en el apartado 3.2 *Mosto*. Las vinificaciones se llevaron a cabo en ollas de acero inoxidable, de 2 L de capacidad (Figura 3), estas no fueron llenadas en su totalidad, si no al 80 % para evitar problemas de desbordamientos. 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 (Vázquez-Bilbao, 2022).

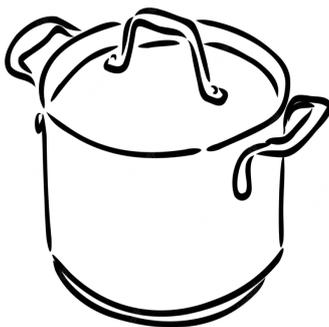


Figura 3: Representación de los recipientes. (Vázquez-Bilbao, 2022).

Todos los experimentos se realizaron por duplicado. En todos ellos, el tiempo de estimulación sonora fue de cinco horas al día durante los cuatro primeros días de fermentación. Las vinificaciones con y sin estimular, se encontraban separadas y sometidas a los mismos rangos de temperatura durante toda la fermentación. En este proyecto se decidió trabajar a temperatura ambiente en los meses de octubre y de mayo, donde las temperaturas varían significativamente, asemejando el proceso a una bodega real.

Basándonos en los resultados obtenidos en las vinificaciones, se planteó un ensayo a temperatura controlada en estufa para comprobar el efecto de la estimulación sonora aplicada sólo en la fase exponencial de crecimiento microbiano. Se realizaron vinificaciones en matraces con 400 mL de mosto estéril, pero en esta ocasión a 26 °C

en cámara de incubación, para asegurar una temperatura óptima que permitiese un adecuado comportamiento de las células. Estos matraces se inocularon con 10^6 UFC/mL de *Saccharomyces cerevisiae* obtenido de vinificaciones con y sin estimulación acústica, siendo esta aplicada en periodos de cinco horas al día durante dos días. De esta forma se pudo estudiar el efecto de la estimulación acústica sobre la curva de crecimiento microbiano, estimulando solamente la fase exponencial de crecimiento y observando si se producen cambios significativos al final de la fermentación.

3.4 Análisis microbiológico

Para el control microbiológico durante la fermentación alcohólica, se ha realizado un seguimiento del crecimiento microbiano.

3.4.1 Estimación del crecimiento microbiano.

La estimación del crecimiento microbiano se realizó mediante turbidimetría (Vázquez-Bilbao, 2022). Su fundamento se basa en relacionar la turbidez de las muestras en este caso, mosto previamente inoculado con *S. cerevisiae* 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).

3.5 Análisis fisicoquímico de mosto y vino

En este apartado, se detallan los métodos de análisis utilizados durante el proyecto con sus correspondientes fundamentos.

3.5.1 Determinación del grado alcohólico probable en mostos por refractometría. 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

Influencia de sonidos audibles en la actividad metabólica de *Saccharomyces cerevisiae*.

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

La aerometría 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).

3.5.3 Determinación del pH.

La estabilidad de un vino, el color, el potencial redox y la relación del SO₂ libre y total están estrechamente relacionados con el pH del vino. La determinación del pH en el mosto y el vino es una medida complementaria de la acidez total, porque nos permite medir la fuerza de los ácidos que contienen.

El pH por definición, es el logaritmo negativo de la concentración de iones hidrógeno:

$$\text{pH} = - \text{Log} [\text{H}^+]$$

Su fundamento consiste en la diferencia de potencial entre el electrodo de referencia y el de lectura de pH propiamente sumergidos en el vino con un error máximo de 0,05 unidades de pH (O.I.V, 2011).

3.5.4 Determinación de la acidez total. Método potenciométrico.

La acidez total es la suma de los ácidos del vino y mostos cuando se lleva el pH a 7 añadiendo una solución de NaOH, los ácidos más frecuentes del vino son el tartárico, el málico y el láctico, todos ellos desempeñan un papel importante en las características organolépticas del vino (O.I.V, 2015).

3.5.5 Determinación de la acidez volátil. Método García-Tena.

La acidez volátil es el conjunto de ácidos grasos de la serie acética que se hallan en el vino libres o combinados formando sales (ácido acético, acetatos, fórmico, propiónico, butírico...). El más importante es el ácido acético.

Influencia de sonidos audibles en la actividad metabólica de *Saccharomyces cerevisiae*.

Su fundamento se basa en una destilación fraccionada del vino una vez eliminado el dióxido de carbono y una posterior valoración ácido-base de la segunda porción del destilado (Barceló, 1990).

3.5.6 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).

3.5.7 Determinación de los azúcares reductores en vino. Método Rebelein.

El 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 en 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 Crecimiento microbiano

El mosto utilizado en este proyecto contiene los nutrientes necesarios para permitir el crecimiento de las levaduras, constituyendo un medio fácilmente fermentable. Tras un corto período de latencia se inicia el ciclo de crecimiento típico de *Saccharomyces*

cerevisiae, que consta de tres etapas. La primera de ellas es una fase de crecimiento limitado que dura entre 2 y 5 días y produce un aumento de la población hasta 10^8 UFC/mL, en esta fase la velocidad de fermentación es máxima y constante y suele consumirse entre 1/3 o 1/2 de la cantidad de azúcares iniciales (Ribereau-Gayon, 2021). A continuación, el crecimiento entra en una fase cuasi estacionaria que dura alrededor de 8 días y durante la cual no se produce un aumento del número de células de la población, sin embargo, las células son metabólicamente activas y la velocidad de fermentación sigue manteniéndose en su valor máximo. Finalmente, el proceso termina en una fase de muerte, de hasta varias semanas, durante la cual el número de células viables decrece progresivamente (Carrascosa, 2005).

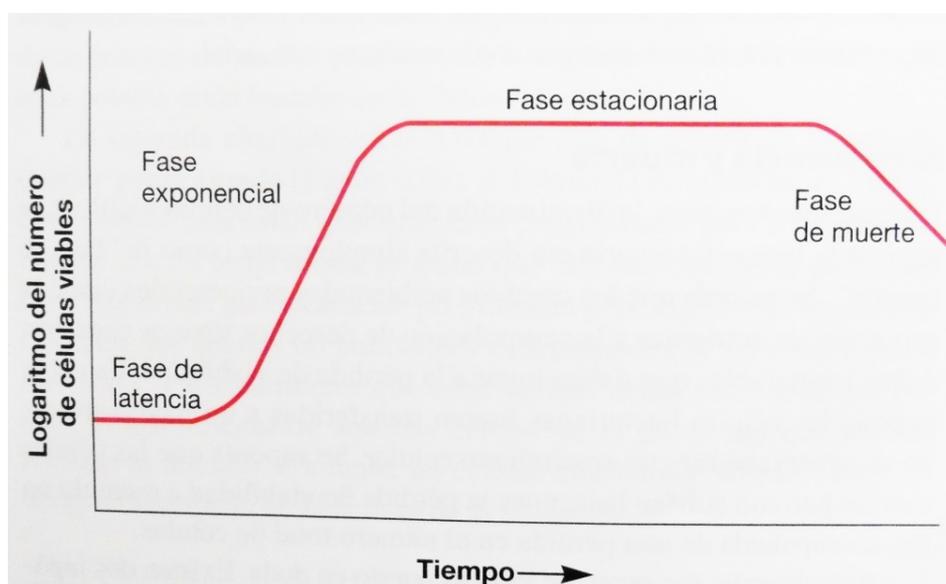


Figura 4. Representación de las fases de crecimiento microbiano (Willey et al., 2009).

La temperatura es uno de los parámetros más importantes a tener en cuenta en enología, porque influye en la cinética de la fermentación y en la composición química del vino (Ribereau-Gayon et al., 2021). Este parámetro influye en la velocidad de crecimiento de la levadura (Watson, 1987), lo que se refleja en el seguimiento de la fermentación mediante la producción de CO_2 (Figura 5). En la Figura 5 se observa el efecto de la temperatura en el desarrollo de la fermentación de la levadura empleada, observándose que a $15\text{ }^\circ\text{C}$ esta tiene lugar significativamente más lenta que a $20\text{ }^\circ\text{C}$ o $25\text{ }^\circ\text{C}$.

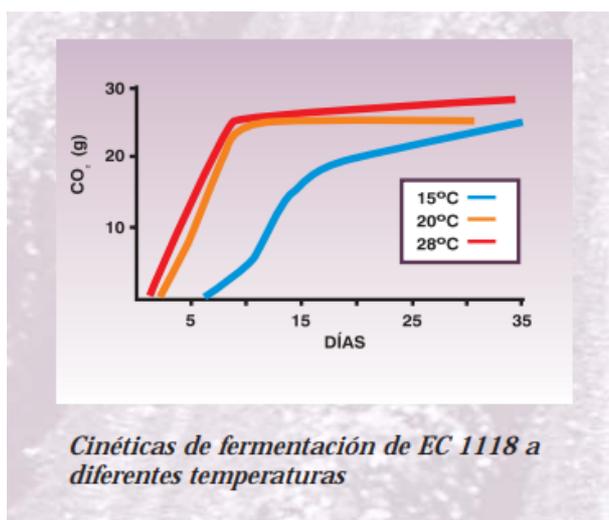


Figura 5. Cinéticas de fermentación de EC 1118 a diferentes temperaturas. (LALVIN EC1118™, Lallemand).

La temperatura también afecta a la viabilidad celular en los últimos pasos de la fermentación (Watson, 1987; Sablayrolles & Barre, 1993^a, b) al disminuir la actividad de la membrana plasmática (Alexander et al., 1993; Piper, 1995) y cambiando la composición de los ácidos grasos (Torija et al., 2003; Coleman et al., 2007; Beltran et al., 2008) y esteroides (Larue et al., 1980; Beltran et al., 2008) de las membranas celulares. Además, la temperatura interactúa fuertemente con varios parámetros del mosto en fermentación como el pH, el contenido de azúcar, la concentración de etanol y la composición de nitrógeno (Ough, 1996^a; D'Amore & Stewart, 1987; Sablayrolles & Barre, 1993^a).

Durante este proyecto se decidió trabajar a temperatura ambiente en los meses de octubre y de mayo, donde las temperaturas varían significativamente, asemejando el proceso a una bodega real. Inicialmente, se realizaron las vinificaciones durante 120 horas, ya que en estudios previos realizados a temperatura controlada (Vázquez-Bilbao, 2022) en ese periodo de tiempo se llegaba al final de la fermentación.

Sin embargo, en el presente proyecto, al trabajar a temperatura ambiente en octubre se observó que 120 horas era tiempo insuficiente para llegar al final de fermentación. Hay que tener en cuenta que las temperaturas durante este mes rondaron entre 21 °C de máxima y 6 °C de mínima, por lo tanto, se decidió hacer un segundo ensayo con 168 horas de duración.

En las siguientes gráficas, se representa el crecimiento microbiano de las vinificaciones control sin estimulación sonora (C) y con estimulación sonora (E),

durante un periodo de 120 horas, realizadas a temperaturas ambiente en el mes de octubre (Figura 6) y en el mes de mayo (Figura 7).

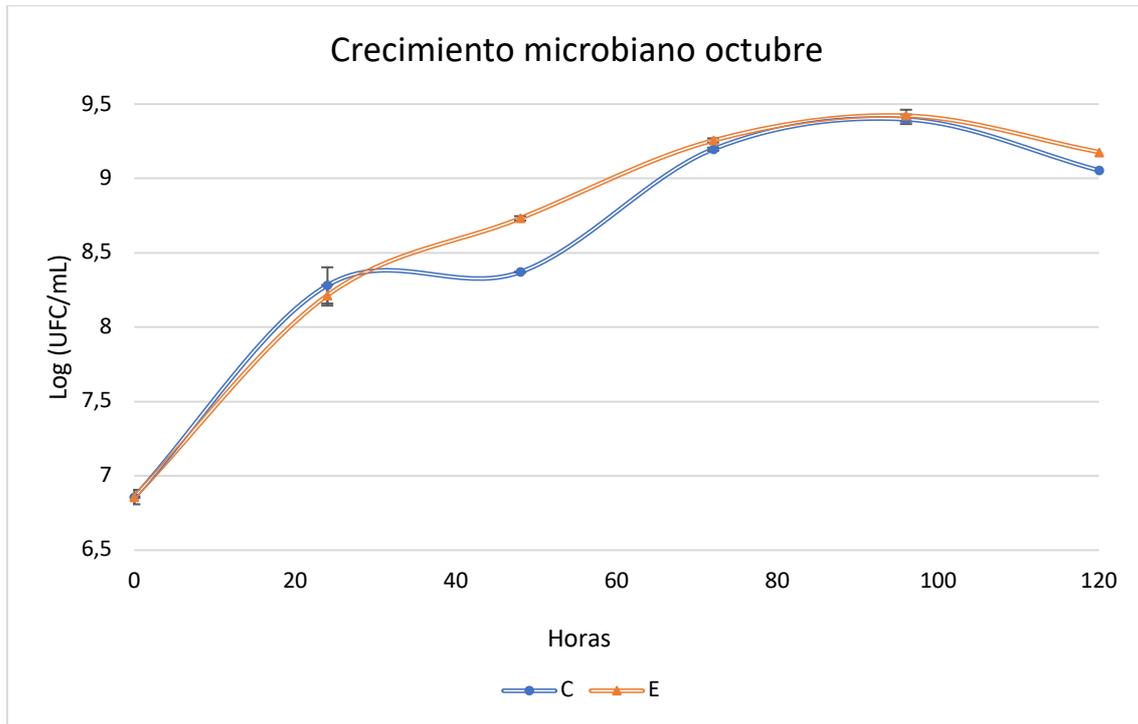


Figura 6: Comparativa de la representación del logaritmo de unidades formadoras de colonias por mililitro ($\log(\text{UFC}/\text{mL})$) entre las medias aritméticas de las vinificaciones con estimulación acústica (E) y las vinificaciones control sin estimular (C) frente al tiempo de incubación en horas, durante el experimento llevado a cabo a temperatura ambiente en el mes de octubre, 120 horas de duración, con su desviación estándar.

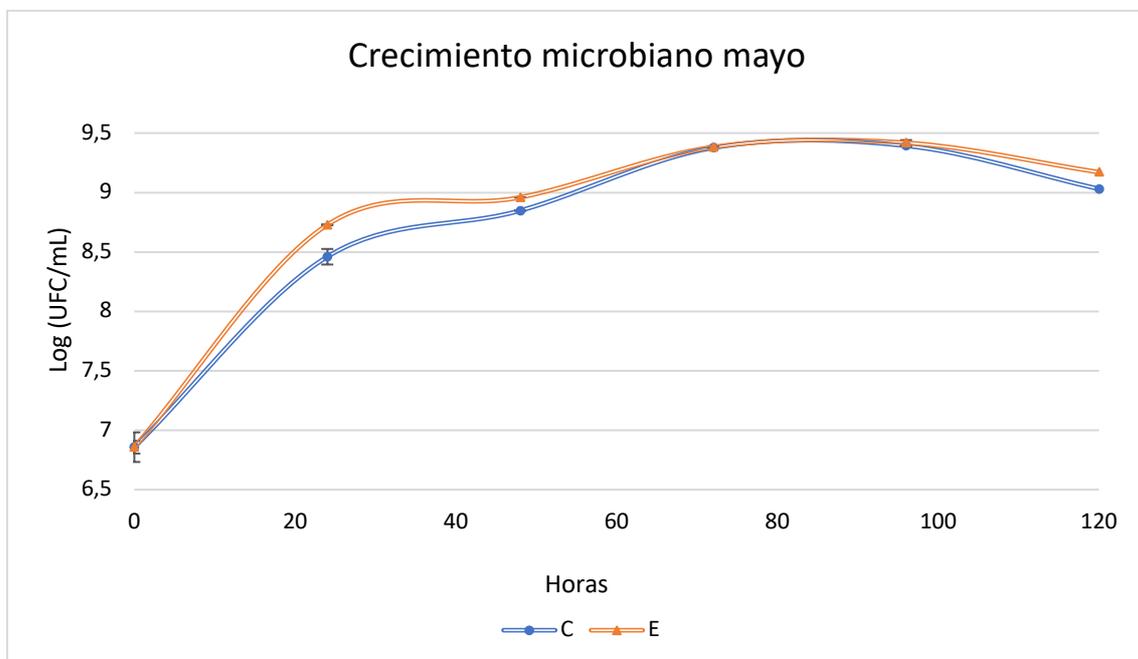


Figura 7: Comparativa de la representación del logaritmo de unidades formadoras de colonias por mililitro ($\log(\text{UFC}/\text{mL})$) entre las medias aritméticas de las vinificaciones con estimulación acústica (E) y las vinificaciones control sin estimular (C) frente al tiempo de incubación en horas, durante el experimento llevado a cabo a temperatura ambiente en el mes de mayo, 120 horas de duración, con su desviación estándar.

Se puede observar como la temperatura afecta significativamente a la cinética microbiana y por tanto al número de UFC/mL, sobre todo durante las primeras 48 horas. En la Figura 7, vemos además que el número de UFC/mL de las vinificaciones estimuladas a las 24 horas es significativamente mayor que en las vinificaciones control siendo esta diferencia del 3 %.

De igual forma, comparando ambas gráficas, se puede observar una tasa mayor de crecimiento microbiano de las vinificaciones estimuladas frente a las control sin estimular durante todo el proceso, llegando en 48 horas de la Figura 6 a una diferencia del 4 %. Por lo tanto, en las vinificaciones de 120 horas de duración, la estimulación acústica ayuda a mantener la tasa de crecimiento elevada durante todo el proceso afectando en mayor medida a las vinificaciones llevadas a cabo en el mes de mayo.

En las siguientes figuras, se representa el crecimiento microbiano de las vinificaciones con y sin estimulación sonora (C y E) de 168 horas de duración. En la Figura 8, se representa el crecimiento microbiano de las vinificaciones de 168 horas de duración llevadas a cabo a temperatura ambiente en el mes de octubre. En la Figura 9 se representa el crecimiento microbiano de las vinificaciones de 168 horas de duración llevadas a cabo a temperatura ambiente en el mes de mayo.

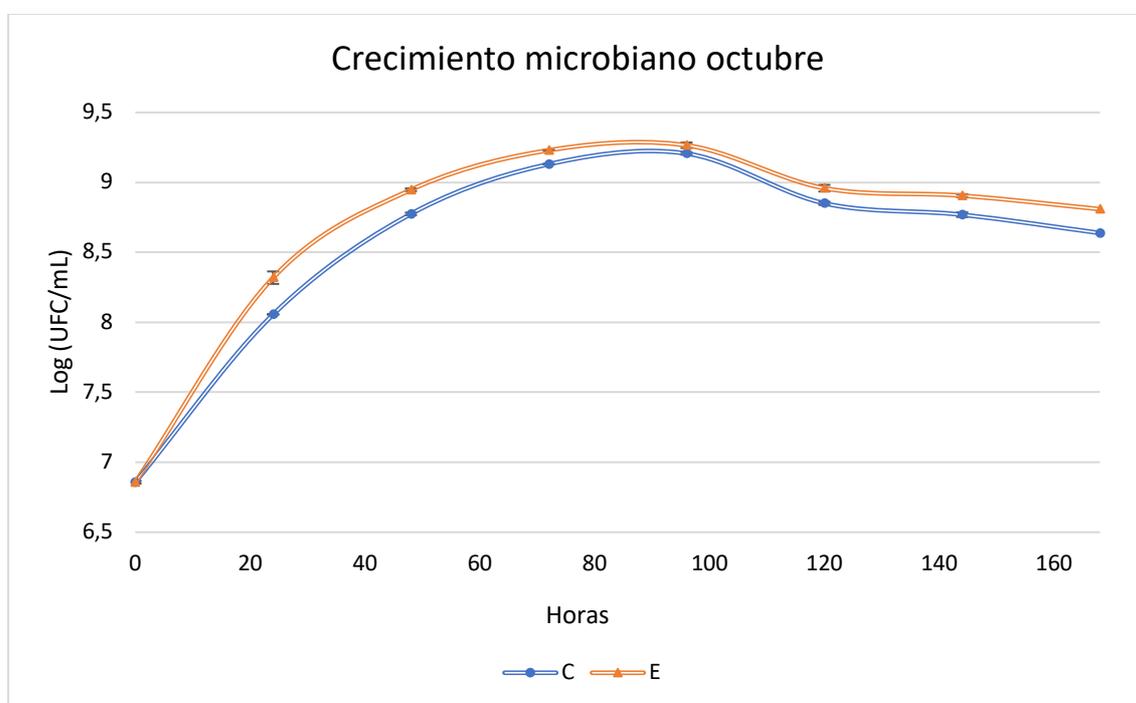


Figura 8: Comparativa de la representación del logaritmo de unidades formadoras de colonias por mililitro ($\log(\text{UFC}/\text{mL})$) entre las medias aritméticas de las vinificaciones con estimulación acústica (E) y las vinificaciones control sin estimular (C) frente al tiempo de incubación en horas, durante el experimento llevado a cabo a temperatura ambiente en el mes de octubre, de 168 horas de duración, con su desviación estándar.

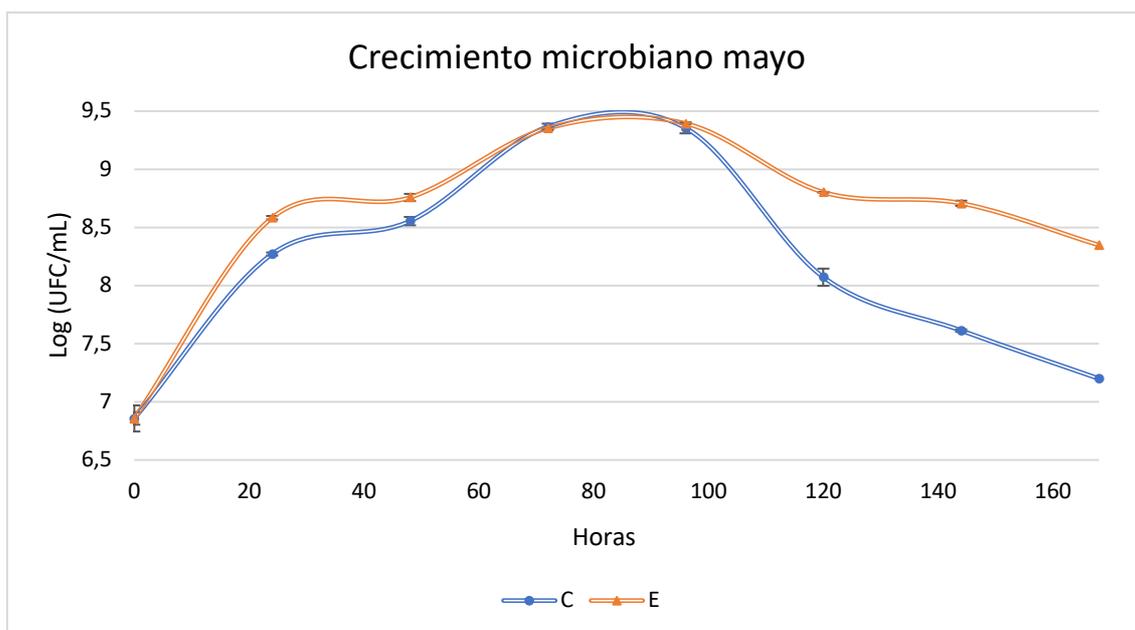


Figura 9: Comparativa de la representación del logaritmo de unidades formadoras de colonias por mililitro (log(UFC/mL)) entre las medias aritméticas de las vinificaciones con estimulación acústica (E) y las vinificaciones control sin estimular (C) frente al tiempo de incubación en horas, durante el experimento llevado a cabo a temperatura ambiente durante el mes de mayo, de 168 horas de duración, con su desviación estándar.

En la Figura 9 se observa como el número de UFC/mL en la fase de crecimiento exponencial (24-48 horas) de las vinificaciones estimuladas realizadas en el mes de mayo es mayor en comparación con las vinificaciones control realizadas en dicho mes, existiendo una diferencia significativa del 3,6 %. Esta diferencia entre las vinificaciones estimuladas y control se mantiene en ambas gráficas (Figura 8 y Figura 9) independientemente de la temperatura. Se observan diferencias que alcanzan el 13,8 % en algunos momentos de las vinificaciones llevadas a cabo en el mes de mayo.

En octubre, debido a las bajas temperaturas, la evolución de la población de levaduras es mucho más lenta, por lo cual la fermentación tarda más en iniciarse y transcurre más lentamente. Sin embargo, en mayo la población creció más rápidamente, actuando el sonido como activador de fermentación y a las 160 horas ya se puede observar claramente como la población de levaduras (en fase de declive) es muy superior a la del ensayo control, poniendo en relieve el efecto de factor de supervivencia que ejerce el sonido sobre la población de levaduras facilitando la finalización de la fermentación.

Analizando los resultados se puede concluir que la estimulación sonora se comporta en todos los casos no solo como un activador de fermentación sino también como factor de supervivencia. Estos resultados coinciden con los expuestos en diversos

estudios (Harris et al., 2021; Aggio et al., 2011; Vázquez-Bilbao, 2022) en los cuales, se comprueba que el uso de ondas sonoras audibles repercute en el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae*. Aggio et al. (2011) describe 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 superior en un 12,4 % en comparación con los ensayos control sin estimular. En concordancia con este estudio (Vázquez-Bilbao, 2022) expone que las ondas sonoras audibles se comportan como un activador del crecimiento, constatando un aumento del 3,7 % en la tasa de crecimiento microbiano de los ensayos con estimulación acústica.

4.2 Efecto sobre las características fisicoquímicas

Al concluir las distintas vinificaciones se llevaron a cabo análisis fisicoquímicos de los vinos resultantes, analizando: azúcares reductores, acidez volátil, acidez total, pH, grado alcohólico y densidad.

Tabla 1: Datos de la comparación de los parámetros fisicoquímicos durante las vinificaciones llevadas a cabo en el mes de octubre, entre los ensayos control sin estimular (Control) y los ensayos con estimulación acústica (Estimulado)

	Vinificación 120 h		Vinificación 168 h	
	Control	Estimulado	Control	Estimulado
Azúcares reductores	12,1 ± 1,55	10,25 ± 0,35	7 ± 0,71	6,25 ± 0,35
Grado alcohólico	10,2 ± 0,14	10,55 ± 0,07	11,1 ± 0,14	11,25 ± 0,07
Densidad	1004 ± 1,41	1001 ± 0,35	999 ± 1,41	998 ± 1,06
Acidez volátil	0,32 ± 0,03	0,30 ± 0,007	0,36 ± 0,007	0,32 ± 0,02
Acidez total	5,12 ± 0,08	5,28 ± 0,10	6,25 ± 0,014	6,34 ± 0,014
pH	3,44 ± 0,014	3,45 ± 0,014	3,41 ± 0,014	3,39 ± 0,07

*Los datos corresponden a la media aritmética ± la desviación estándar de dos vinificaciones realizadas por duplicado.

*En negrita se destacan los datos estadísticamente significativos ($p < 0,05$).

Tabla 2: Datos de la comparación de los parámetros fisicoquímicos durante las vinificaciones llevadas a cabo en el mes de mayo, entre los ensayos control sin estimular (Control) y los ensayos con estimulación acústica (Estimulado)

	Vinificación 120 h		Vinificación 168 h	
	Control	Estimulado	Control	Estimulado
Azúcares reductores	6,25 ± 0,35	4,8 ± 0,28	5,25 ± 0,21	3,4 ± 0,42
Grado alcohólico	10,9 ± 0,07	11,4 ± 0,07	11,2 ± 0,07	11,7 ± 0,14
Densidad	997 ± 0,35	994 ± 0,14	994 ± 0,35	992 ± 0,35
Acidez volátil	0,27 ± 0,01	0,36 ± 0,008	0,27 ± 0,009	0,32 ± 0,004

Acidez Total	6,02 ± 0,19	6,48 ± 0,014	5,71 ± 0,13	6,36 ± 0,035
pH	3,25 ± 0,049	3,18 ± 0,007	3,24 ± 0,028	3,15 ± 0,028

*Los datos corresponden a la media aritmética ± la desviación estándar de dos vinificaciones realizadas por duplicado.

*En negrita se destacan los datos estadísticamente significativos ($p < 0,05$).

Las vinificaciones llevadas a cabo en octubre a temperatura ambiente no llegaron a terminar la fermentación en ninguno de los casos, ya que las temperaturas nocturnas bajaban considerablemente, repercutiendo de manera notable sobre las vinificaciones. Sin embargo, las vinificaciones que se llevaron a cabo en mayo llegaron a finalizar la fermentación, durante este mes las temperaturas oscilaron entre 30 °C máximo y 15 °C de mínima, lo que favoreció notablemente el desarrollo de la fermentación. *Saccharomyces cerevisiae* muestra una temperatura óptima de crecimiento alrededor de los 30°C aunque puede adaptarse a un amplio abanico de temperaturas con un máximo de 40°C a partir de la cual se observa una caída de la viabilidad (Watson, 1987). La velocidad de fermentación de *Saccharomyces cerevisiae* aumenta linealmente duplicándose cada 10 °C entre los 10 °C y los 32 °C (Carrascosa, 2005). Por ello a temperaturas más bajas de fermentación la multiplicación de levaduras es más lenta y su metabolismo también, dando como resultado fermentaciones más largas en el tiempo.

Para saber con certeza que la fermentación ha finalizado, se analizan los azúcares reductores que quedan en el medio, este contenido es la cantidad de azúcar que queda aún por consumir (Vázquez-Bilbao, 2022). 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).

Como se ha indicado previamente, en las vinificaciones realizadas en el mes de octubre todos los datos de azúcares reductores obtenidos se encontraban por encima de 5 g/L, evidenciándose que la fermentación no había terminado. En lo referente a las vinificaciones realizadas en mayo, los ensayos sometidos a estimulación acústica llegaron a terminar la fermentación. Tanto en las vinificaciones de 120 horas como en las de 168 horas de duración, las realizadas con estimulación acústica (E) llegaron antes a consumir estos azúcares que las vinificaciones control (C), alcanzando diferencias del 30 % en el contenido de azúcares con respecto al control en las de 120 horas y del 50 % en las de 168 horas.

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 se sitúa en torno a 100 g/L (12,6 % Vol.) y puede ir hasta 136 g/L (16 % Vol.) (Ribereau Gayon, 2020).

Los datos obtenidos de los análisis de grado alcohólico muestran que en las vinificaciones realizadas en el mes de octubre no se han encontrado diferencias estadísticamente significativas entre los valores obtenidos (Tabla 1). Sin embargo, en las vinificaciones llevadas a cabo en mayo se han encontrado diferencias estadísticamente significativas entre las vinificaciones con estimulación acústica (E) y las vinificaciones control sin estimular (C). En las vinificaciones de 120 horas de duración esta diferencia fue del 4,4 %, obteniendo un mayor grado alcohólico los ensayos con estimulación acústica. En las vinificaciones de 168 horas de duración esta fue del 3,8 %, obteniendo de igual forma un mayor grado alcohólico los ensayos con estimulación acústica (Tabla 2).

Diversos estudios señalan que aplicando ondas sonoras audibles no solo se mejora la tasa de crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae*, si no que se producen variaciones significativas en el grado alcohólico. En el trabajo de Sarvaiya et al. (2015), 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 % en los ensayos con estimulación acústica. De igual forma, se describe en estudios previos en nuestro grupo (Vázquez-Bilbao, 2022) 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.

Observando los datos obtenidos en el análisis de la densidad en las distintas vinificaciones, no se encuentran diferencias estadísticamente significativas en los valores de densidad de las vinificaciones llevadas a cabo en el mes de octubre. Durante las vinificaciones llevadas a cabo en este mes no se llegó a terminar ninguna fermentación, obteniendo valores de densidad finales de en torno a los 1000 g/cm³. Esto es debido a que los azúcares son los principales responsables de la elevada densidad de los mostos y la paulatina metabolización de estos a cargo de las levaduras da lugar mayoritariamente a etanol originando un progresivo descenso de la densidad. Con respecto a las vinificaciones llevadas a cabo en el mes de mayo, los

datos obtenidos si son estadísticamente significativos al igual que los resultados obtenidos de azúcares reductores y grado alcohólico.

Otro parámetro fisicoquímico donde se han encontrado diferencias estadísticamente significativas es la acidez volátil. La acidez volátil en los vinos no suele exceder el valor de 0,90 g/L de ácido acético, siendo el rango habitual desde 0,20 - 0,60 g/L (Ribereau Gayon, 2020). Sin embargo, lo deseable es que este valor sea lo más bajo posible para no interferir en la calidad organoléptica del producto.

Analizando los datos de acidez volátil recogidos en la Tabla 1 y la Tabla 2, se observan diferencias estadísticamente significativas entre los valores de las vinificaciones llevadas a cabo en el mes de mayo, evidenciando una subida de la acidez volátil entre las vinificaciones con estimulación acústica (E) y las vinificaciones control sin estimular (C), siendo esta del 25 % en el caso de las vinificaciones de 120 horas de duración y del 17 % en las de 168 horas de duración. También se encuentran diferencias estadísticamente significativas entre los valores de acidez volátil de las vinificaciones de 168 horas de duración llevadas a cabo en el mes de octubre, siendo esta diferencia del 13%. Esta subida de la acidez volátil en las vinificaciones estimuladas acústicamente podría acontecer por un cambio en el metabolismo de *Saccharomyces cerevisiae* ya que la acidez volátil está formada por metabolitos secundarios de la fermentación alcohólica, por lo tanto, es lógico que evolucione paralelamente al grado alcohólico e inversamente a los azúcares reductores y la densidad. Sin embargo, las evoluciones porcentuales de estos parámetros no son similares, esto podría indicar que la estimulación sonora no solo acelera la tasa de crecimiento microbiano, sino que también modifica el comportamiento metabólico. 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, lo que podría desencadenar una subida de la acidez volátil. 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).

Finalmente, en los parámetros fisicoquímicos de pH y acidez total se encuentran diferencias estadísticamente significativas en las vinificaciones de 168 horas de duración llevadas a cabo en mayo, como consecuencia del metabolismo secundario que produce una bajada de pH y un incremento en la acidez total.

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

Diversos estudios realizados en medios sintéticos, (Harris et al., 2021; Aggio et al., 2011) señalan una diferencia significativa entre los metabolitos encontrados en los ensayos con estimulación acústica y los que carecen de ella. Se obtuvieron diferencias en más de cincuenta metabolitos secundarios, variando las concentraciones de estos dependiendo del estímulo aplicado, lo que demuestra que los sonidos audibles de baja frecuencia pueden aumentar la actividad en numerosas rutas metabólicas de *Saccharomyces cerevisiae* (Harris et al., 2021). Investigaciones recientes en mosto de uva exponen que aplicando sonidos audibles de baja frecuencia, 440 Hz, se puede aumentar la tasa de crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae*, además de inducirse cambios en el comportamiento metabólico, ya que en el periodo de tiempo estudiado, se incrementó la producción de etanol en un 7,4 %, así como la acidez volátil en un 17 % en los ensayos con estimulación acústica (Vázquez-Bilbao, 2022).

4.3 Estudio de la estimulación acústica en la fase exponencial de crecimiento microbiano.

Observando las gráficas de cinética de crecimiento microbiano, se evidencia que el crecimiento aumenta principalmente en la fase exponencial. Es por lo que se decide realizar un estudio de la estimulación acústica en este momento del crecimiento microbiano. Durante esta fase la reproducción celular alcanza una actividad máxima, el tiempo de generación es constante y las células alcanzan mayor actividad metabólica. Los microorganismos son más sensibles a las condiciones adversas en esta fase (Tortora, 2017).

Para ejecutar este estudio se realizaron vinificaciones con y sin estimulación acústica, a 26 °C mediante la inoculación de *Saccharomyces cerevisiae* en matraces con 400 mL de mosto estéril sometidas a estímulo previo según lo descrito en materiales y métodos.

Analizando los parámetros fisicoquímicos al final de la fermentación, se observó una diferencia estadísticamente significativa en el grado alcohólico entre los ensayos con

Influencia de sonidos audibles en la actividad metabólica de *Saccharomyces cerevisiae*.

estimulación acústica (E) y los ensayos control sin estimular (C) siendo esta diferencia del 10%, obteniendo un mayor grado alcohólico los ensayos con estimulación acústica. Sin embargo, no se encuentran diferencias estadísticamente significativas en los datos de azúcares reductores recogidos en la Tabla 3.

Tabla 3: Datos de la comparación de los parámetros fisicoquímicos durante las pruebas llevadas a cabo en matraces de 400 mL, entre los ensayos control sin estimular (Control) y los ensayos con estimulación acústica (Estimulado).

	Matraces 400 mL	
	Control	Estimulado
Azúcares reductores	2,7 ± 0,94	1,6 ± 0,49
Grado alcohólico	11,225 ± 0,21	12,475 ± 0,095

*Los datos corresponden a la media aritmética ± la desviación estándar de dos pruebas realizadas por duplicado.

*En negrita se destacan los datos estadísticamente significativos ($p < 0.05$).

Por lo tanto, esto confirma que la estimulación acústica en de la primera fase de crecimiento microbiano llega a ser determinante a lo largo del proceso fermentativo, evidenciado un cambio en el comportamiento metabólico de *Saccharomyces cerevisiae*.

5. Conclusión y futuras líneas de investigación

En el presente estudio se ha realizado una investigación sobre la influencia de sonidos audibles en la actividad metabólica de *Saccharomyces cerevisiae*, mediante el estudio de la cinética de crecimiento microbiano y su efecto sobre las propiedades fisicoquímicas de las vinificaciones experimentales. Tras el estudio de los resultados obtenidos, se pueden extraer las siguientes conclusiones:

- Los resultados del presente estudio indican que la cinética de crecimiento microbiano de *Saccharomyces cerevisiae* se ve afectada por el uso de ondas sonoras audibles de baja frecuencia (440 Hz), aumentando la tasa de crecimiento microbiano y manteniendo 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, provocando un arranque de fermentación más rápido y confiriendo una mayor capacidad de asegurar el agotamiento de los azúcares.
- El estímulo sonoro aumenta la velocidad de consumo de azúcares, dando lugar a un aumento en el grado alcohólico y la acidez volátil, reflejando un cambio significativo en el metabolismo de *Saccharomyces cerevisiae*.
- La aplicación de ondas sonoras audibles de baja frecuencia (440 Hz) únicamente en la fase de crecimiento exponencial, conlleva un cambio significativo en el metabolismo de *Saccharomyces cerevisiae*.

En futuras investigaciones se plantea continuar con esta línea de trabajo, variando 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.

Controlar e investigar la influencia de sonidos audibles en el comportamiento de *Saccharomyces cerevisiae* permitiría estudiar en profundidad el impacto real del uso de ondas sonoras audibles en la industria enológica, abriendo nuevas perspectivas prometedoras para la investigación científica, conectando la acústica, la biofísica, la

Influencia de sonidos audibles en la actividad metabólica de *Saccharomyces cerevisiae*.

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)

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>*

Beltran, G; Matthieu, J. & François, J. (2008). *New insights into trehalose metabolism by Saccharomyces cerevisiae: NTH2 encodes a functional cytosolic trehalase, and deletion of TPS1 reveals ATH1P depend trehalose mobilization. Applied and Environmental microbiology*, Research article. <https://doi.org/10.1128/AEM.00557-07>

Carrascosa, A., Muñoz, R. & González Garcías, R. (2005) *Microbiología del vino. AMV Ediciones. Madrid (España). <http://hdl.handle.net/10261/90214>*

Chisti, Y. (2003). *Sonobioreactors: using ultrasound for enhanced microbial productivity. Trends Biotechnol.* 21(2):89-93. doi: 10.1016/s0167-7799(02)00033-1. PMID: 12573858.

D'Amore, T & Stewart, G. (1987). *Definizione dell' indice di moltiplicazione della CO₂ nella valutazione per via ponderale della capacità alcoligena di un lievito. Annali della Facoltà di Agraria, Università di Perugia*, 61: 753-762.

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.*

Grigione, L. (2014). *Trabajo y energía. Cap.V. Instituto politécnico. Universidad Nacional de Rosario. Departamento de Física. <https://rephip.unr.edu.ar/handle/2133/3516>*

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.*

Huang, G. (2017) *Effects of ultrasound on microbial growth and enzymatic activity. Ultrasound.Sonochem.*2017,37, 144–149.

Influencia de sonidos audibles en la actividad metabólica de *Saccharomyces cerevisiae*.

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)*

Lafon-Lafourcade, S. (1983). *Wine and brandy. In: Rehm, H.J., Reed, G. (Eds.), Food and Feed Production with Microorganisms. Biotechnology, vol. 5. Verlag Chemie, Weinheim, pp. 81– 163.*

Lallemand, ficha técnica de producto LALVIN EC1118™, Montreal Canadá. <https://www.lallemandwine.com/es/chile/productos/catalogo/levaduras/20/lalvin-ec1118--prise-de-mousse/>

Larue, F., Lafon-Lafourcade, S. (1984). *Relation entre les difficultés de fermentation et certaines activités enzymatiques de la levure. Comm. Vigne Vin. (18-4), 219 -224.*

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>

Ojha, KS., Tiwari, BK. (2016). *New food fermentation technologies; Springer International Publishing: Cham, Suiza.*

Ough, C. (1996^a). *Influence of nitrogen compound and ethyl carbamate formation in wines. Proceedings of the international symposium on nitrogen in grapes and wines. Seattle, WA., 165-171.*

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>

Piper, R. (1995). *VPS27 controls vacuolar and endocytic traffic through a prevacuolar compartment in Saccharomyces cerevisiae*. National library of Medicine. J Cell Biol. 1995 Nov;131(3):603-17. doi: 10.1083/jcb.131.3.603.

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)

Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B., & Lounvaud, A (2021). *Handbook of Enology, Volume 1 (3rd ed.)*

Sablayrolles, J. & Barre, P. (1993^a). *Kinetics of alcoholic fermentation under anisothermal enological conditions. I. Influence of temperature evolution on the instantaneous rate of fermentation* Am J Enol Vitic. 1993 44: 127-133 ; DOI: 10.5344/ajev.1993.44.2.127

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

Torija, M.J. (2003) *Effects of fermentation temperature and Saccharomyces species on the cell fatty acid composition and presence of volatile compounds in wine*. Int J Food Microbiol 85(1-2):127-36

Tortora, GJ. (2017) *Introducción a la microbiología*. Editorial médica Panamericana 9^o Edición.

Vázquez-Bilbao, L. (2022). *Investigación experimental del efecto de sonidos audibles en el comportamiento de Saccharomyces cerevisiae*. Universidad de Valladolid, TFG Grado en Enología.

Watson, S. (1987) *Structure and Composition*. In: Watson, S.A. and Ramstad, P.E., Eds., *Corn: Chemistry and Technology*, American Association of Cereal Chemists, Inc., St. Paul, 53-82.

Willey, Joanne M. (2009) *Microbiología de Prescott, Harley y Klein*. 7^a edición. S.A. McGraw-Hill-Interamericana de España.

Agradecimientos

Quiero dedicar y agradecer este trabajo a Josefina Vila Crespo quien en estos años me ha enseñado innumerables lecciones. Gracias por ser una mujer tan maravillosa como eres, te admiro profundamente.

“Lo importante no es lo que haces, sino el equipo de trabajo que te acompaña.”

También quiero agradecer al equipo ENOBIOTEC y a todo el personal de la universidad, así como a mi familia y a mi pareja, por su tiempo, cariño y profesionalidad. Os llevo siempre conmigo a donde quiera que la vida me lleve.