



---

**Universidad de Valladolid**  
**Campus de Palencia**

**ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍAS AGRARIAS**

**Grado en Enología**

**APLICACIÓN DE ALTAS PRESIONES  
HIDROSTÁTICAS Y ULTRASONIDOS PARA  
ACCELERAR LA LISIS DE LEVADURAS**

Alumno: José Luis González Pascual

Tutor/a: José Manuel Rodríguez Nogales

Cotutor/a: Encarnación Fernández Fernández

Septiembre 2023

## ÍNDICE

1. Resumen.....	2
2. Introducción .....	4
3. Objetivo.....	8
4. Materiales.....	8
5. Metodología .....	9
5.1 Preparación de la muestra. Vino modelo y levaduras.....	9
5.2 Tratamientos efectuados a las muestras.....	9
5.2.1 Tratamiento a altas presiones hidrostáticas (HHP).....	9
5.2.2 Tratamiento con ultrasonidos (US).....	10
5.3 Simulación de la crianza sobre lías.....	11
5.4 Determinación de los parámetros analíticos .....	12
5.5 Análisis estadístico de datos .....	12
6. Resultados y discusión.....	12
6.1 Efecto de las HHP sobre el contenido en ácidos nucleicos y proteínas.....	14
6.2 Efecto de las HHP sobre el contenido en polisacáridos a los 42 días.....	17
6.3 Efecto de los US sobre el contenido en ácidos nucleicos y proteínas .....	18
6.4 Efecto de los US sobre el contenido en polisacáridos a los 42 días .....	20
7. Conclusiones .....	21
8. Agradecimientos .....	22
9. Bibliografía .....	23

## 1. Resumen

Durante la fermentación alcohólica las levaduras mueren y sufren un proceso irreversible de autólisis celular llevado a cabo por acción de las propias enzimas celulares. La extracción y separación de dichos residuos celulares del vino, también conocidos como madres o lías, es un proceso habitual tras la fermentación, sin embargo, la crianza o permanencia de dichos elementos en contacto con el vino ha sido ampliamente estudiada, ya que se liberan al medio distintos compuestos, como polisacáridos, proteínas o ácidos nucleicos, con efectos positivos sobre la calidad final del vino.

Sin embargo, esta técnica de crianza requiere de ciertos esfuerzos por parte del personal de elaboración, que periódicamente ha de poner en contacto las lías con el vino, así como de un largo proceso de inmovilización del vino en la bodega que puede conllevar un alto riesgo de contaminación microbiológica y, por lo tanto, puede devaluar las propiedades de este.

En este estudio se presentan distintas técnicas alternativas que podrían acelerar dicho proceso de lisis celular y de crianza del vino sobre sus lías: el uso de Altas Presiones Hidrostáticas (HHP) a 400, 500 y 600 MPa de presión y Ultrasonidos (US) a 30 %, 60 % y 90 % de amplitud, aplicados en diferentes intervalos de tiempo (3, 5 y 10 min) sobre levaduras *Saccharomyces cerevisiae* suspendidas en un vino modelo. Además, se estudió el efecto de la aplicación de la enzima  $\beta$ -glucanasa sobre las lías tras la aplicación de los tratamientos.

Los resultados obtenidos para las diferentes muestras, después de 42 días de crianza sobre lías en agitación constante y temperatura controlada, muestran la existencia de diferencias significativas en la concentración de ácidos nucleicos, proteínas y polisacáridos analizados. El tratamiento de HHP redujo la concentración de los compuestos frente a la muestra no tratada o control, tanto para las diversas presiones como para los distintos tiempos de aplicación. Sin embargo, el tratamiento de US mejoró significativamente la extracción de dichos compuestos, alcanzándose valores muy superiores a los de la muestra control al cabo de 28 días para ácidos nucleicos y proteínas, y al cabo de 42 días para polisacáridos. Finalmente, el uso de  $\beta$ -glucanasa no supuso una mejora en la extracción de estos compuestos frente a la muestra control.

**Palabras clave:** lías, lisis celular, Altas Presiones Hidrostáticas, Ultrasonidos, polisacáridos, proteínas, ácidos nucleicos,  $\beta$ -glucanasa.

## **Abstract**

During the alcoholic fermentation, the yeasts die and suffer an irreversible process of cellular autolysis carried out by the action of their own cellular enzymes.

The extraction and separation of those cellular residues from the wine, also known as mothers or lees, may be the most logical act after fermentation, however, the aging or permanence of lees in contact with the wine has been widely studied, since different compounds are released into the environment, such as polysaccharides, proteins, or nucleic acids, with positive effects on the final quality of the wine.

However, this aging technique requires certain effort by the production staff, who periodically have to put the lees in contact with the wine, as well as a long process of wine immobilization in the cellar that could be a high risk of microbiological contamination and, therefore, can devalue the wine properties.

In this study different alternative techniques are presented that allow accelerating this process of cell lysis and aging of the wine on its lees: the use of High Hydrostatic Pressures (HHP) at 400, 500 and 600 MPa pressure and Ultrasound (US) at (30 %, 60 % and 90 % amplitude, applied at different time intervals (3, 5 and 10 min) on *Saccharomyces cerevisiae* yeasts suspended in a model wine. In addition, the effect of the application of the  $\beta$ -glucanase enzyme on the lees after the application of the treatments was presented.

The results obtained for the different samples, after 6 weeks or 42 days of aging on lees in constant stirring and controlled temperature, show the existence of significant differences in the concentration of nucleic acids, proteins, and polysaccharides.

The HHP treatment reduced the concentration of the compounds compared to the untreated or control sample, both for the different pressures and for the different application times.

However, the US treatment significantly improved the extraction of said compounds, reaching values much higher than those of the control sample after 28 days for nucleic acids and proteins, and after 42 days for polysaccharides. Finally, the use of  $\beta$ -glucanase did not give a better extraction of those analyzed compounds compare to the compounds of the control sample.

**Keywords:** lees, cell lysis, High Hydrostatic Pressure, Ultrasound, polysaccharides, proteins, nucleic acids,  $\beta$ -glucanase.

## 2. Introducción

La crianza del vino sobre sus lías (CSL) es una técnica que se ha utilizado durante siglos tanto para mejorar el perfil organoléptico del mismo, como para mejorar sus propiedades de estabilización y longevidad (Escot et al., 2001). Durante la CSL tiene lugar un proceso denominado autólisis de las levaduras que se inicia tras la muerte de las levaduras, mayoritariamente después de la fermentación alcohólica de los vinos, y que supone la degradación de la pared celular por la actividad de sus propias enzimas celulares (autoenzimática) y tiene como consecuencia la liberación al vino del contenido citoplasmático y elementos de la propia pared (Morata et al., 2018).

La pared celular de *Saccharomyces cerevisiae* está formada por una red de polisacáridos fibrilares, mayoritariamente  $\beta$ -glucanos (60 % aproximadamente) y quitina (2 % aproximadamente) formando unidades de N-acetilglucosamina. La cantidad de polisacáridos que se puede liberar al medio puede alcanzar los 100 mg/L, aunque depende de cada cepa de levadura. Unidos a estos polisacáridos podemos encontrar también otros compuestos como manoproteínas globulares (40 % aproximadamente) (Magnelli et al., 2002).

Las manoproteínas liberadas pueden mejorar varias características sensoriales de los vinos tintos, como su volumen y estructura, así como también disminuir su astringencia y amargor (Barrio-Galán et al., 2019). La astringencia en los vinos se considera una sensación táctil y algunos autores como Escot et al. (2001) la relacionan con una falta de lubricación en la cavidad bucal. Esta falta de lubricación se asocia al efecto de ciertos compuestos fenólicos del vino como, por ejemplo, los taninos sobre las proteínas de la saliva.

Polisacáridos y manoproteínas pueden interactuar con estos compuestos vínicos reduciendo o suavizando esa sensación de astringencia (Escot et al., 2001). Este efecto se debe principalmente a la interacción de las manoproteínas con ciertos compuestos fenólicos del vino. Por ejemplo, las manoproteínas limitan la autoagregación de los taninos (Li et al., 2018), lo que resulta en estructuras poliméricas más estables que no interactúan con las proteínas de la saliva de la boca y, por tanto, mejoran las características sensoriales del vino. A mayores, las manoproteínas limitan la precipitación del ácido tartárico y las proteínas en los vinos. Esta precipitación podría suponer una pérdida de acidez de los vinos, por lo que, en consecuencia, las manoproteínas ayudan a estabilizar la acidez en los vinos (Fernández et al., 2011). También, los polisacáridos liberados, al igual que las manoproteínas, pueden reaccionar con compuestos fenólicos del vino ayudando a formar co-

## APLICACIÓN DE ALTAS PRESIONES HIDROSTÁTICAS Y ULTRASONIDOS PARA ACELERAR LA LISIS DE LEVADURAS

pigmentos de mayor tamaño que ayudan a la estabilización del color de este y evitan su oxidación (Barrio-Galán et al., 2019).

Las lías del vino poseen múltiples propiedades beneficiosas para su uso en la crianza con el vino. Los compuestos lisados han sido descritos como unos buenos agentes de unión a ciertos compuestos volátiles del vino como ésteres etílicos y acetatos de alcoholes de fusel, reduciendo así sus aportaciones negativas en el conjunto organoléptico del vino (Rodríguez-Bencomo et al., 2010). Aunque esta unión puede ser transitoria y pueden volver a aparecer estos aromas desagradables.

Son también capaces de unirse a moléculas aromáticas del vino como ciertos tioles y evitar su degradación durante el envejecimiento del vino. Poseen un carácter reductivo, evitando la oxidación del vino, no solo con las moléculas de manoproteínas o polisacáridos mencionados anteriormente, sino también, con otras moléculas liberadas de la pared celular durante la lisis celular, como el glutatión, que permiten preservar la frescura y fruta de los vinos debido a esta capacidad antioxidante (Morata et al., 2018).

Durante la elaboración de los vinos espumosos, y gracias a esta CSL, se produce una transición de atributos de aroma relativamente simples como floral y afrutado, a más complejos y maduros. Aparecen descriptores como tostado, panadería y levadura (Vannier et al., 1999). Esto parece ser debido a la degradación de algunos compuestos aromáticos durante la autólisis celular (por ejemplo, ésteres de etilo y acetatos de etilo) y al incremento de compuestos asociados con sabores oxidativos (por ejemplo, aldehídos) responsables de dar a los vinos espumosos sus aromas típicos de miel y caramelo (Kemp et al., 2017). Sin embargo, hay ciertos inconvenientes asociados a la CSL del vino. La autólisis de las levaduras es un proceso lento que requiere entre 7 y 9 meses antes de que haya repercusiones en el perfil sensorial del vino. Además, no todas las levaduras se comportan de la misma manera en cuanto a su autólisis, aunque es posible seleccionar cepas óptimas de *S. cerevisiae* con períodos de autólisis cortos o con una mayor liberación de componentes de la pared celular (Palomero et al., 2007).

En el caso de los vinos espumosos, tal y como se ha comentado anteriormente, una larga crianza sobre sus lías puede suponer una pérdida de ciertos compuestos aromáticos interesantes del vino, sobre todo aquellos con carácter frutal. Por ejemplo, al cabo de 9 meses, la concentración de acetatos aromáticos del vino puede llegar a decrecer hasta un 40 % (Riu-Aumatell et al., 2006).

Otro inconveniente típico que surge cuando se realiza una CSL tradicional para vinos tintos es la inestabilidad microbiológica que se puede producir en el medio. Existe, tras la fermentación

## APLICACIÓN DE ALTAS PRESIONES HIDROSTÁTICAS Y ULTRASONIDOS PARA ACELERAR LA LISIS DE LEVADURAS

alcohólica del vino tinto, un medio que contiene no solo las células de las levaduras muertas sino también material sólido (hollejos y pepitas), así como partículas coloidales procedentes de la maceración y una población microbiana formada por diferentes especies de levaduras y bacterias (Morata et al., 2018).

Por eso, esta crianza con lías gruesas es propensa a producir desarrollos microbianos y desviaciones sensoriales con sabores desagradables. Los malos olores reductores pueden asociarse a moléculas como el sulfuro de dietilo (ajo) o el sulfuro de dimetilo (col guisada). Para controlar la concentración de estas moléculas asociadas a descriptores aromáticos negativos, es aconsejable una rápida decantación o clarificación del vino. Sin embargo, esta solución no es del todo adecuada, ya que no se eliminan todos los componentes indeseables del vino, es una solución parcial y, por otra parte, se puede llegar a eliminar una gran fracción de compuestos aromáticamente positivos o de los propios compuestos de lisis de levaduras (Morata et al., 2018).

Por lo tanto, para evitar estos inconvenientes asociados a una CSL tradicional, la industria enológica ha propuesto la utilización de compuestos lisados. Estos derivados lisados poseen múltiples ventajas frente a los propios lisados del vino. Se emplean cepas seleccionadas de *S. cerevisiae* con un alto grado de autólisis y con un importante aporte sensorial positivo. Además, se pueden utilizar cepas de levaduras no-*Saccharomyces*. Los compuestos lisados son biomasa de alto grado de pureza que evita la presencia de contaminantes colaterales en el vino y, por lo tanto, este vino puede ser sometido a procesos de filtración o clarificación previa para obtener un medio más limpio y seguro sin el riesgo de perder compuestos de la lisis celular (Morata et al., 2018).

La utilización de preparados lisados, por lo tanto, evita el uso de un largo proceso de crianza del vino, de su stock en las bodegas, de la pérdida de aromas en vinos espumosos o de posibles desviaciones microbianas o contaminaciones en el medio.

A la hora de mejorar este proceso de autólisis celular, la industria enológica también ha desarrollado distintos preparados enzimáticos que aceleran este proceso. El uso de  $\beta$ -glucanasas incrementa la destrucción de la pared celular y, por lo tanto, aumenta la extracción de compuestos lisados como polisacáridos y manoproteínas al medio. Sin embargo, el uso de esta enzima directamente sobre el vino puede causar un aumento significativo de glucosa en el medio que, por lo tanto, estimule el crecimiento indeseado de microorganismos alterantes como *Brettanomyces* (Fernández et al., 2011).

## APLICACIÓN DE ALTAS PRESIONES HIDROSTÁTICAS Y ULTRASONIDOS PARA ACELERAR LA LISIS DE LEVADURAS

En general, los derivados lisados de levadura se clasifican en cinco grupos según el proceso utilizado en la fabricación, la composición y el grado de purificación: levaduras secas inactivadas (LSI), autolisados de levadura (AL), paredes celulares de levadura (PCL), extractos de levadura y manoproteínas purificadas. Sin embargo, en la actualidad, existen pocas preparaciones comerciales a base de derivados de levadura con un alto grado de pureza, principalmente porque es un proceso bastante laborioso y costoso. Por esta razón, la mayoría de los preparados comerciales disponibles en el mercado para uso enológico se componen de LSI, AL o PCL (Barrio-Galán et al., 2019).

Estos compuestos lisados pueden ser producidos en fermentadores bajo condiciones aeróbicas para obtener una gran concentración de los mismos, y pueden purificarse con rehidratación y centrifugación (Suárez-Lepe & Morata, 2006). A mayores, otra ventaja del uso de estos compuestos de lisis celular es su cómoda capacidad de almacenamiento y dosificación en las bodegas. También existe un gran interés en encontrar nuevas estrategias tecnológicas que aceleren la autólisis de las levaduras y disminuyan el tiempo de envejecimiento de los vinos en contacto con las lías, como pueden ser la utilización de los Ultrasonidos (US) y las Altas Presiones Hidrostáticas (HHP).

La técnica de US consiste en el uso de una onda de presión de alta frecuencia, superior al oído humano, que causa sobre el cuerpo de la muestra un fenómeno de cavitación, dando lugar a un aumento de temperatura y a una modificación de su estructura interna (Del Fresno et al., 2019). Se ha descrito que este proceso provoca la liberación y la disolución de compuestos fenólicos de la matriz contenida en los tejidos epidérmicos de la uva (Ferraretto et al., 2013). Algunos autores como Ferraretto et al., (2013) y Del Fresno et al. (2019) arrojan en sus estudios resultados prometedores con respecto a la aplicación de US como un método de sonicación sobre biomasa de levaduras muertas (lías) para tal fin.

La técnica de HHP es un método no térmico, que no afecta al color, sabor y aroma de la muestra, por lo tanto, ideal para el trabajo de extracción de compuestos celulares sobre nuestros vinos. Esta técnica está basada en el principio isostático de “Le Chatelier” donde la muestra se somete a presiones en ambas direcciones espaciales afectando a la estructura de los microorganismos y causando su inactivación enzimática (Dimopoulos et al., 2020).

Esta técnica ya ha sido estudiada anteriormente por otros autores como Brul et al. (2000), Hartmann & Delgado (2004), Buzrul, (2012) para la esterilización e inactivación de microorganismos indeseables del vino, así como método de extracción y mejora de compuestos organolépticos del vino. También, se ha observado que las HHP causan un daño en la capa externa de la pared celular

# APLICACIÓN DE ALTAS PRESIONES HIDROSTÁTICAS Y ULTRASONIDOS PARA ACELERAR LA LISIS DE LEVADURAS

de *S. cerevisiae*, lo que provoca una abertura y una falta de pared celular en la superficie de la levadura (Marx et al., 2011).

Sin embargo, no se han encontrado trabajos que se centren en la capacidad de esta técnica como método extractor de los elementos de lisis celular, en concreto, polisacáridos, proteínas y ácidos nucleicos, con el objetivo de acelerar el proceso de lisis y la CSL del vino.

En este trabajo se evaluaron estas dos técnicas, HHP y US, con el objetivo de mejorar la extracción de algunos de los compuestos marcadores de la lisis celular (polisacáridos, proteínas y ácidos nucleicos). Dichos compuestos pueden mejorar la calidad final de los vinos tras su crianza sobre lías (Rodríguez-Bencomo et al., 2010; del Fresno et al., 2019 ).

### 3. Objetivo

El objetivo de este estudio es evaluar el impacto de distintos tratamientos de HHP y de US sobre la lisis de levaduras *S. cerevisiae* suspendidas en un vino modelo. Asimismo, se estudió el efecto de la aplicación de la enzima  $\beta$ -glucanasa sobre las lías previamente tratadas por HHP y US. En concreto, se evaluó el impacto de distintas condiciones de tratamiento HHP a 400, 500 y 600 MPa de presión y de US a 30 %, 60 % y 90 % de amplitud, en ambos casos aplicados a intervalos de tiempos de 3, 5 y 10 min, sobre la lisis de levaduras *S. cerevisiae* en un vino modelo.

### 4. Materiales

**Reactivos químicos:** Etanol absoluto (99,99 %, v/v), hidróxido sódico 1M, fenol (88,0 %, p/p), ácido sulfúrico (96,0 %, v/v) y glucosa suministrados por la casa comercial Panreac S.A (Castellar del Valles, Barcelona, España). Ácido tartárico y metabisulfito potásico adquiridos a la casa comercial Agrovin (Alcázar de San Juan, Ciudad Real, España).

**Levadura:** Se empleó una cepa de levadura activa deshidratada *S. cerevisiae* de uso comercial de la casa comercial Lallemand S.A. (Montreal, Quebec, Canadá).

## 5. Metodología

### 5.1 Preparación de la muestra. Vino modelo y levaduras

En primer lugar, se preparó la solución de vino modelo sin las levaduras con agua destilada y etanol al 14,0 % (v/v) junto con ácido tartárico (5 g/L) ajustando su pH a 3,8 con hidróxido sódico 1M. A esta disolución se añadió metabisulfito potásico para obtener una concentración total final de 90 mg/L de sulfuroso total. Posteriormente, en esta disolución hidroalcohólica se procedió a hidratar la levadura seca activa en una concentración del 1,0 % (p/v) 24 horas antes de la realización de los tratamientos y a temperatura ambiente (Del Fresno et al., 2018).

### 5.2 Tratamientos efectuados a las muestras

#### 5.2.1 Tratamiento a altas presiones hidrostáticas (HHP)

El vino modelo con las levaduras hidratadas se sometió al tratamiento de HHP en un equipo discontinuo (Hiperbaric 55, Hiperbaric S.A., Burgos, España) equipado con un cilindro de 0,20 m de diámetro y 2,0 m de longitud y un cilindro contenedor de la muestra de 55 L. Para llevar a cabo este proceso fue necesario introducir el vino modelo con las levaduras en un recipiente adecuado para el equipo.

Se determinó utilizar varias botellas de tereftalato de polietileno (PET) de 330 mL de capacidad. El fluido utilizado para alcanzar las presiones del tratamiento fue agua. El tiempo hasta alcanzar las presiones requeridas por parte del equipo fue menor de 180 segundos y el tiempo de despresurización de la cámara para la obtención de la muestra fue inferior a 3 segundos. La temperatura inicial del tratamiento fue 21 °C. Sin embargo, se produjo un incremento de 3 °C al alcanzar los 100 MPa de presión debido a un calentamiento adiabático. Se realizaron tres tratamientos a tres diferentes presiones (400, 500 y 600 MPa). Cada una de las presiones tuvieron lugar a tres tiempos distintos, 3, 5 y 10 minutos (Tabla 1).

APLICACIÓN DE ALTAS PRESIONES HIDROSTÁTICAS Y ULTRASONIDOS PARA ACELERAR  
LA LISIS DE LEVADURAS

*Tabla 1-Muestras obtenidas tras el tratamiento del vino modelo con la técnica de HHP y la muestra control.*

<b>CÓDIGO</b>	<b>TRATAMIENTO (Presión en MPa)</b>	<b>TIEMPO APLICADO DEL TRATAMIENTO (Minutos)</b>
C (control)	-	-
H4-3	400	3
H4-5	400	5
H4-10	400	10
H5-3	500	3
H5-5	500	5
H5-10	500	10
H6-3	600	3
H6-5	600	5
H6-10	600	10

### **5.2.2 Tratamiento con ultrasonidos (US)**

El vino modelo con las levaduras hidratadas se sometió al correspondiente tratamiento de US en un equipo de sonicación UP400S (400W y 24 KHz) (Hielscher Ultrasonics, Teltow, Alemania) equipado con una sonda de 22 mm de diámetro que se introdujo sumergida en la muestra a una profundidad de 30 mm. El pulso de la sonicación utilizado fue discontinuo y del 80,0 %. La disolución modelo se introdujo en un recipiente de cristal encamisado y refrigerado por una corriente de agua fría externa para mantener una temperatura constante de la muestra de 25 °C (Ferraretto & Celotti, 2013). Se utilizaron tres niveles de amplitud diferentes (30 %, 60 % y 90 %) y tres tiempos de procesamiento (3, 5 y 10 minutos) (Tabla 2).

APLICACIÓN DE ALTAS PRESIONES HIDROSTÁTICAS Y ULTRASONIDOS PARA ACELERAR  
LA LISIS DE LEVADURAS

*Tabla 2-Muestras obtenidas tras el tratamiento del vino modelo con la técnica de US y la muestra control.*

<b>CÓDIGO</b>	<b>TRATAMIENTO (Amplitud, %)</b>	<b>TIEMPO APLICADO DEL TRATAMIENTO (Minutos)</b>
C (control)	-	-
U3-3	30	3
U3-5	30	5
U3-10	30	10
U6-3	60	3
U6-5	60	5
U6-10	60	10
U9-3	90	3
U9-5	90	5
U9-10	90	10

### **5.3 Simulación de la crianza sobre lías**

Después del procesamiento de US y HHP, cada una de las muestras (9 tratamientos y un control) se dividieron en 6 tubos Falcon de 50 mL. A tres de los tubos se les añadió  $\beta$ -glucanasa D(+) glucosa anhydrous BioChemica (Lallemand S.A. Montreal, Quebec, Canadá) a la dosis de 3 g/HL y a los otros tres no se les añadió la enzima, obteniéndose un total de 60 muestras para cada tratamiento.

El envejecimiento simulado sobre lías se llevó a cabo durante 42 días en una estufa (Raypa Espinar S. L., Terrassa, España) a 33 °C. Durante todo este proceso las lías estuvieron sometidas a agitación constante a 150 rpm en un agitador orbital SO1 (Stuart Scientific, Stone, Reino Unido). También se incubaron las muestras control (vino modelo y levaduras) a las que no se realizó ninguno tratamiento. El análisis de proteínas y ácidos nucleicos en el vino modelo se realizó al cabo de 0, 14, 28 y 42 días, mientras que el análisis de los polisacáridos totales se realizó a los 0 y 42 días. Previo a cada determinación analítica, las muestras se centrifugaron a 4.000 rpm durante 5 minutos (Sorvall ST

8R Centrífuga, Osterode am Harz, Alemania). Sobre el sobrenadante (vino modelo) obtenido tras la centrifugación se realizaron las distintas medidas analíticas

#### **5.4 Determinación de los parámetros analíticos**

Para la determinación de las concentraciones de proteínas y ácidos nucleicos se tuvo en cuenta la relación indirecta de estos parámetros con respecto a sus máximos de absorbancia a 280 y 260 nm, respectivamente (Martínez et al., 2018) y se utilizó una cubeta de cuarzo de 1 cm.

La concentración total de polisacáridos en las muestras se cuantificó mediante el método analítico de Fenol-Ácido Sulfúrico o método de Dubois (1956). Previamente se precipitaron los polisacáridos de la muestra con etanol en medio ácido. El método se fundamenta en que los carbohidratos en presencia de ácido sulfúrico y a altas temperaturas producen varios derivados del furano que se condensan con el fenol, dando origen a compuestos coloreados con una máxima absorbancia a 485 nm. La forma en que procede la reacción no es estequiométrica, y depende de la estructura del azúcar; por lo tanto, se realizó una recta patrón (Lindner & Shomer, 1984) con glucosa como estándar a diferentes concentraciones (0-45 mg/L).

El equipo utilizado para las medidas espectrofotométricas fue un espectrofotómetro Genesys 150 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.).

#### **5.5 Análisis estadístico de datos**

Los datos obtenidos tras las mediciones analíticas se analizaron estadísticamente mediante un Análisis de Varianza (ANOVA). Los resultados obtenidos se expresaron en función de sus medias y con sus respectivos errores estándares. Las diferencias entre tratamientos se llevaron a cabo mediante el test de Tukey a un nivel de confianza del 95,0 %. Para ello se utilizó el programa estadístico IBM SPSS Statistical versión 26.0 (IBM Corp. en Armonk, NY).

### **6. Resultados y discusión**

El grado de eficacia de los tratamientos sobre las muestras se evaluó de manera cuantitativa mediante el análisis de las concentraciones de polisacáridos, proteínas y ácidos nucleicos. Estas concentraciones determinan el grado de lisis de la pared celular de las levaduras tras los tratamientos. A mayor concentración de estas sustancias en la muestra, mayor efectividad del tratamiento sobre la muestra.

APLICACIÓN DE ALTAS PRESIONES HIDROSTÁTICAS Y ULTRASONIDOS PARA ACELERAR  
LA LISIS DE LEVADURAS

En primer lugar, el ANOVA realizado para el tratamiento HHP al cabo de 42 días de crianza sobre lías con el uso de la enzima  $\beta$ -glucanasa descartó un efecto estadísticamente significativo de dicha enzima en el contenido de polisacáridos, proteínas y ácidos nucleicos ya que los valores p-valor obtenidos para el tratamiento con enzima son todos superiores a 0,05. Resultados similares se observaron para el tratamiento con US y  $\beta$ -glucanasa, excepto para la concentración de polisacáridos (Tabla 3).

Se ha observado una reducción de la actividad de esta enzima tras el tratamiento con HHP, aunque con diferente materia prima (malta molida en vez de vino) (Burzrul, 2012). Este hecho puede ser debido a una posible desnaturalización parcial de las enzimas implicadas en el proceso de autólisis celular durante el tratamiento con HHP (Aganovic et al., 2021). Por otra parte, Brul et al. (2000) concluyen que tras la aplicación de altas presiones hidrostáticas no se produce una separación significativa de las manoproteínas de la pared celular que permitan que la enzima pueda llegar a romper efectivamente los glucanos de la pared.

A continuación, se detalla el análisis de las muestras tratadas por HHP y US con y sin la aplicación de enzimas (Tabla 3 y Tabla 4, respectivamente).

*Tabla 3-Resultados del p-valor del ANOVA HHP y US con dos factores a los 42 días de estudio.*

		<b>p-valor</b>			
		<b>EFFECTOS</b>	<b>ÁCIDOS NUCLEICOS</b>	<b>PROTEÍNAS</b>	<b>POLISACÁRIDOS</b>
<b>HHP</b>	Tratamiento		0,000	0,000	0,000
	Enzima		0,978	0,992	0,611
<b>US</b>	Tratamiento		0,000	0,000	0,000
	Enzima		0,986	0,931	0,006

p-valor < 0,001 Significativo al 99,9 % , p-valor < 0,01 Significativo al 99,0 % ,

p-valor < 0,05 Significativo al 95,0 % , p-valor  $\geq$  0,05 No significativo

APLICACIÓN DE ALTAS PRESIONES HIDROSTÁTICAS Y ULTRASONIDOS PARA ACELERAR  
LA LISIS DE LEVADURAS

*Tabla 4-Resultados del p-valor del ANOVA HHP y US con un solo factor tratamiento a los 42 días de estudio*

		<b>p-valor</b>		
<b>EFFECTOS</b>		<b>ÁCIDOS NUCLEICOS</b>	<b>PROTEÍNAS</b>	<b>POLISACÁRIDOS</b>
<b>HHP</b>	Tratamiento Sin enzima	0,000	0,000	0,019
<b>US</b>	Tratamiento Sin enzima	0,000	0,000	0,008

p-valor < 0,001 Significativo al 99,9 % , p-valor < 0,01 Significativo al 99,0 % ,

p-valor < 0,05 Significativo al 95,0 % , p-valor ≥ 0,05 No significativo

Como se puede observar en la Tabla 4, se realizó un segundo análisis estadístico ANOVA al cabo de 42 días para estudiar el efecto de los tratamientos de HHP y US sobre los parámetros analizados. Para este análisis se descartaron los datos obtenidos de las muestras tratadas con enzima al no observarse un efecto significativo de la misma (Tabla 3). Se puede observar que sí existen diferencias estadísticamente significativas en los resultados obtenidos para cada uno de los tratamientos y cada una de las muestras.

### **6.1 Efecto de las HHP sobre el contenido en ácidos nucleicos y proteínas**

Tal y como se ha mencionado anteriormente, tanto los ácidos nucleicos como las proteínas son biomarcadores del proceso de degradación celular. Por lo tanto, una mayor o menor concentración de dichos compuestos en el medio permite valorar el nivel de lisis de la levadura, del estado del proceso de crianza sobre lías y de la efectividad de los tratamientos.

Tras los 42 días de tratamiento las concentraciones de los ácidos nucleicos y de las proteínas obtenidas en las muestras aplicadas el tratamiento de HHP se encuentran significativamente por debajo de la concentración de la muestra control (Figura 1). Además, los valores de concentraciones obtenidos para cada uno de los compuestos estudiados a las distintas presiones y tiempos de actuación, por lo general, no presentan diferencias significativas en ambos casos. Hecho que puede verse reflejado en la Figura 1, donde generalmente las muestras comparten las mismas letras de los subconjuntos obtenidos

## APLICACIÓN DE ALTAS PRESIONES HIDROSTÁTICAS Y ULTRASONIDOS PARA ACELERAR LA LISIS DE LEVADURAS

por medio del análisis HSD de Tukey. A distintas letras, diferencias estadísticamente significativas entre las muestras.

Los valores obtenidos mediante el análisis ANOVA (Tabla 4), concuerdan con estos resultados y nos permiten reflejar la veracidad y exactitud de los resultados ya que los valores obtenidos tanto para ácidos nucleicos, proteínas tienen todos un p-valor inferior a 0,001 y por lo tanto un grado de significación superior al 99,9 %.

Las absorbancias de los ácidos nucleicos obtenidas tras el tratamiento con HHP son entre un 40,0 % y un 60,0 % inferiores a la concentración de la muestra control a los 42 días. Siendo un 40,5 % inferior en el tratamiento a 400 MPa y 3 minutos, y un 60,2 % inferior en el tratamiento a 600 MPa y 10 minutos.

En el caso de las proteínas, las absorbancias obtenidas tras el tratamiento se situaron entre un 39,0 % y un 66,0 % inferiores a la absorbancia obtenida de la muestra control a los 42 días. Siendo la muestra a 400 MPa y 3 minutos la que mayor concentración obtuvo, con un 39,9 % inferior a la muestra control, y la que menor concentración de proteínas que presentó fue la muestra a 600 MPa y 10 minutos con un 66,0 % menos de compuestos.

Por lo tanto, como se puede observar en la Figura 1, se obtuvieron mayores absorbancias y, por ende, mayores concentraciones de ácidos nucleicos y proteínas a una menor presión aplicada (400 MPa) y a menores tiempos de actuación del tratamiento (3 minutos), respecto a sus respectivas muestras control.

Otros autores obtuvieron resultados similares que reflejan una posible desnaturalización parcial de las enzimas responsables de la lisis celular durante el tratamiento con HHP (Aganovic et al., 2021).

Brul et al. (2000) sugieren que la técnica de HHP no provoca una separación efectiva de las manoproteínas de la pared celular, mientras que Hartmann & Delgado (2004) demostraron que, a 400 MPa y a temperatura ambiente, la estructura exterior de la pared celular no sufre cambios.

Fischer et al., (2006) realizaron un estudio comparativo entre la técnica de HHP y un calentamiento de la muestra, en este caso de mosto, y se obtuvieron mejores resultados de extracción de compuestos proteínicos para el tratamiento de calentamiento que para HHP, por lo que no resulta una técnica extractora efectiva. Sin embargo, según estos estudios, sí es una buena técnica esterilizante.

APLICACIÓN DE ALTAS PRESIONES HIDROSTÁTICAS Y ULTRASONIDOS PARA ACELERAR  
LA LISIS DE LEVADURAS

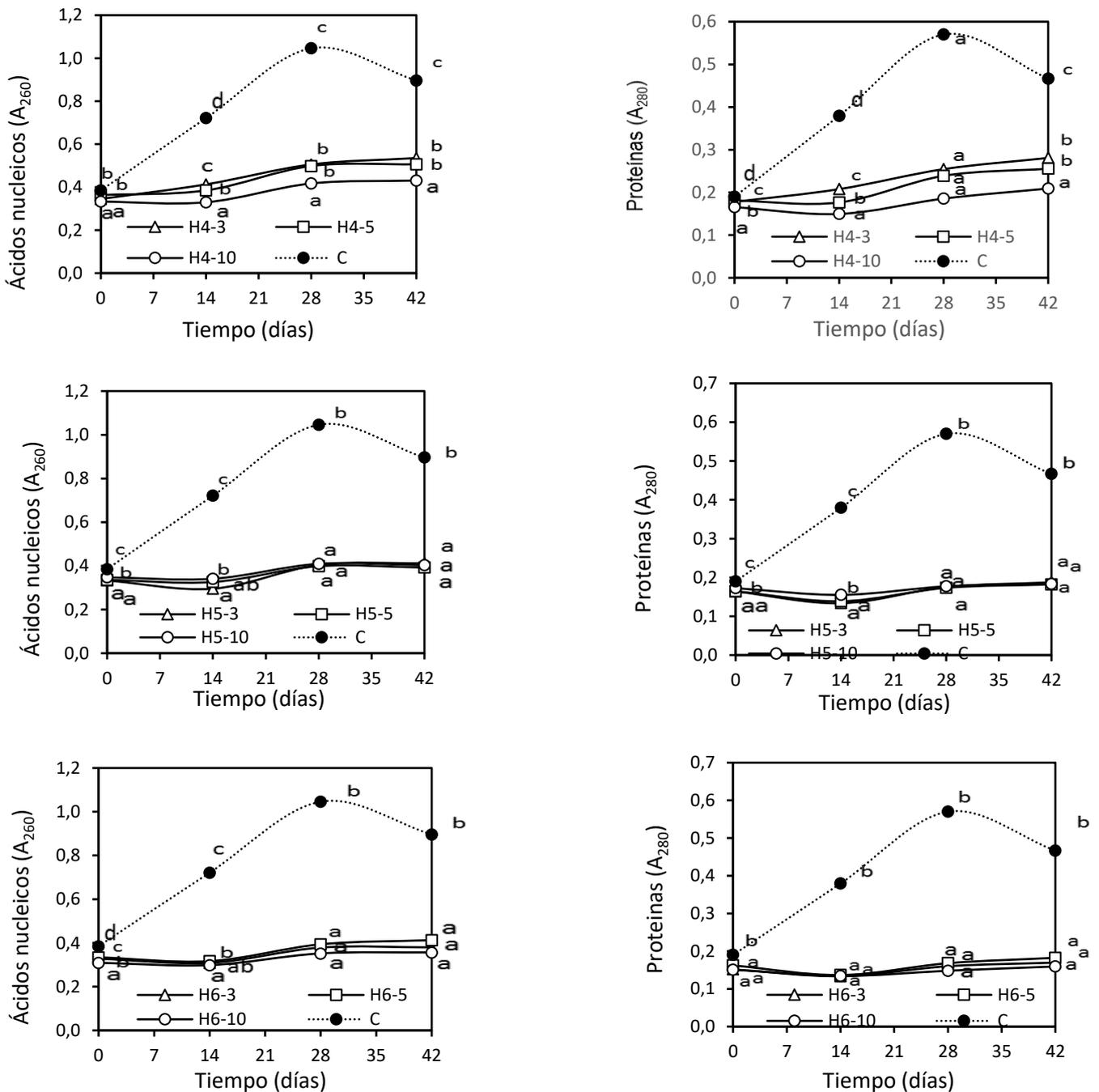


Figura 1 - Evolución de ácidos nucleicos y proteínas en el vino modelo durante su crianza sobre lías tras el tratamiento con altas presiones hidrostáticas C (control), H4-3 (400 MPa para 3 minutos), H4-5 (400 MPa para 5 minutos), H4-10 (400 MPa para 10 minutos), H5-3 (500 MPa para 3 minutos) H5-5 (500 MPa para 5 minutos) H5-10 (500 MPa para 10 minutos) H6-3 (600 MPa para 3 minutos) H6-5 (600 MPa para 5 minutos) H6-10 (600 MPa para 10 minutos). Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas entre las muestras para un mismo tiempo.

Por lo tanto, la utilización de este procedimiento con fines de extracción de ácidos nucleicos y proteínas no presenta diferencias significativas sustanciales para ser tenido en cuenta.

### 6.2 Efecto de las HHP sobre el contenido en polisacáridos a los 42 días

Los resultados son bastante heterogéneos y con diferencias significativas en cada una de las muestras. Tal y como se puede observar en la Figura 2 todas las muestras tratadas con HHP dieron valores inferiores a la concentración de la muestra control (sin tratamiento), con unos porcentajes entre el 40,0 % y el 14,0 % inferiores en concentración.

Las máximas concentraciones de polisacáridos se obtuvieron para el tratamiento a 400 MPa y a 10 minutos, aun así, siendo un 17,0 % inferiores a la muestra control y para la muestra a 500 MPa y a 10 minutos, con un 13,8 % de concentración inferior. Sin embargo, para 600 MPa el máximo de extracción se produjo al cabo de 3 minutos con un 15,5 % inferior.

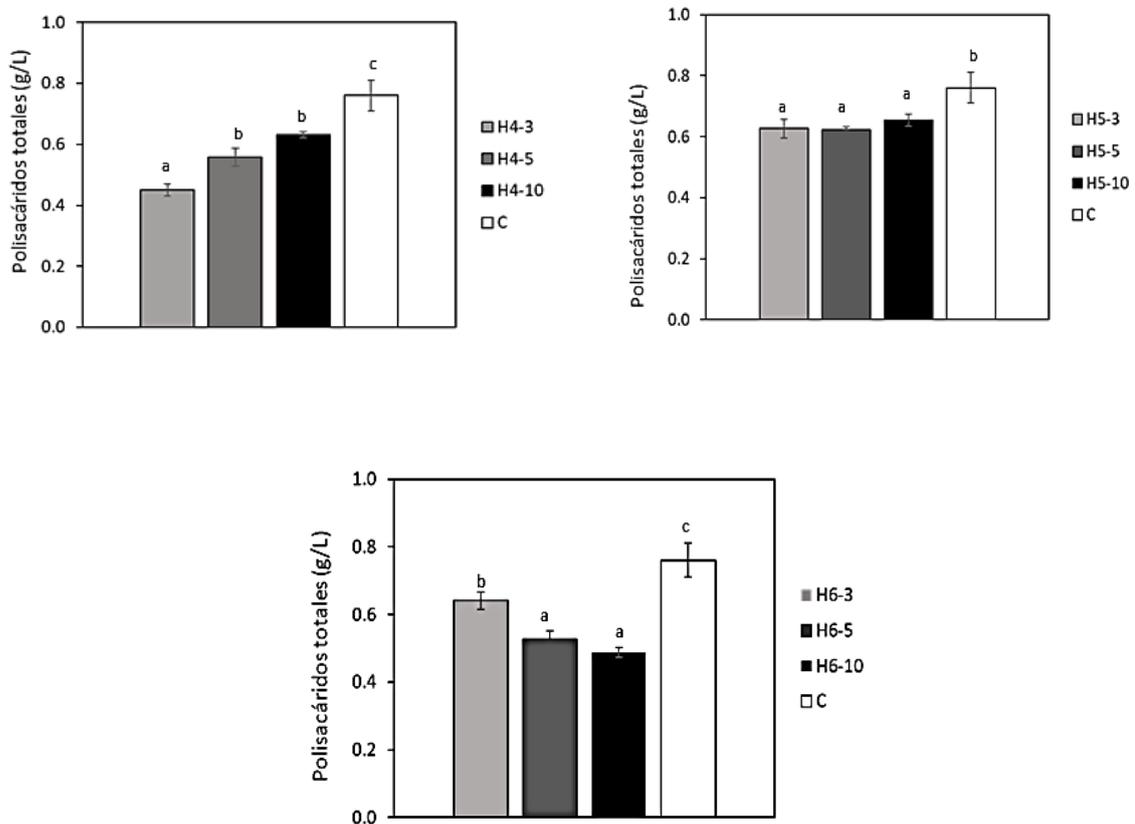


Figura 2 - Concentración de polisacáridos en el vino modelo posterior a su tratamiento con altas presiones hidrostáticas tras un periodo de crianza sobre lías de 42 días: C (Control), H4-3(400 MPa 3 minutos), H4-5 (400 MPa 5 minutos), H4-10 (400MPa 10 minutos), H5-3 (500 MPa 3 minutos), H5-5 (500 MPa 5 minutos) H5-10 (500 MPa 10 minutos) H6-3 (600 MPa 3 minutos) H6-5 (600 MPa 5 minutos) H6-10 (600 MPa 10 minutos). Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas entre las muestras.

## APLICACIÓN DE ALTAS PRESIONES HIDROSTÁTICAS Y ULTRASONIDOS PARA ACELERAR LA LISIS DE LEVADURAS

Estos resultados están en consonancia con los observados para las proteínas y los ácidos nucleicos, y corroboran que la técnica de HHP bajo las condiciones ensayadas no es eficaz para intensificar la lisis celular de las levaduras.

### **6.3 Efecto de los US sobre el contenido en ácidos nucleicos y proteínas**

En el tratamiento de US del vino modelo, todas las condiciones estudiadas han presentado mayores valores en la concentración de proteínas y ácidos nucleicos que la muestra control, lo que indica una mayor rapidez en la liberación de los compuestos lisados frente a una crianza sin tratamiento o tradicional. Los valores máximos para los ácidos nucleicos y proteínas tuvieron lugar al cabo de 28 días con valores similares para las distintas amplitudes (30 %, 60 % y 90 %), como se puede apreciar en la Figura 3.

Para el tratamiento a 30 % de amplitud no existen diferencias significativas entre los distintos tiempos de actuación. Esto se puede ver reflejado en las distintas letras del gráfico. La muestra control C, sí presenta diferencia significativa según el HSD de Tukey (letra "a"). Sin embargo, para las muestras tratadas a 3 minutos (U3-3), 5 minutos (U3-5) y 10 minutos (U3-10), las letras correspondientes son en la mayoría de los casos iguales (letra "b") y, por lo tanto, esto indica que no hay diferencias significativas en la concentración obtenida de ácidos nucleicos y proteínas para los distintos tiempos de tratamiento a esta amplitud.

Sin embargo, para una amplitud de 60 %, fueron los tratamientos a menores tiempos (3 y 5 minutos, letras "b") los que obtuvieron valores similares y sin embargo a tiempos mayores de actuación (10 minutos, letra "ab") fue menor la extracción de compuestos.

Al cabo de 42 días de crianza, se produjo una disminución de las absorbancias, presumiblemente relacionada por una degradación enzimática de los ácidos nucleicos y las proteínas en el medio. Por lo tanto, el rango favorable de estudio es al cabo de 28 días, resultados que concuerdan con lo observado por Ferraretto et al. (2013).

Con respecto a los ácidos nucleicos, todas las absorbancias obtenidas se situaron en un rango entre el 17,0 % y el 32,0 % superior al valor de la muestra control. La muestra al 60 % de amplitud y 10 minutos de tratamiento al cabo de 42 días fue la que obtuvo un 17,0 % de extracción superior al control, y la muestra al 30 % de amplitud y 10 minutos la que obtuvo un 31,6 % de extracción superior al control al cabo de 42 días.

APLICACIÓN DE ALTAS PRESIONES HIDROSTÁTICAS Y ULTRASONIDOS PARA ACELERAR  
LA LISIS DE LEVADURAS

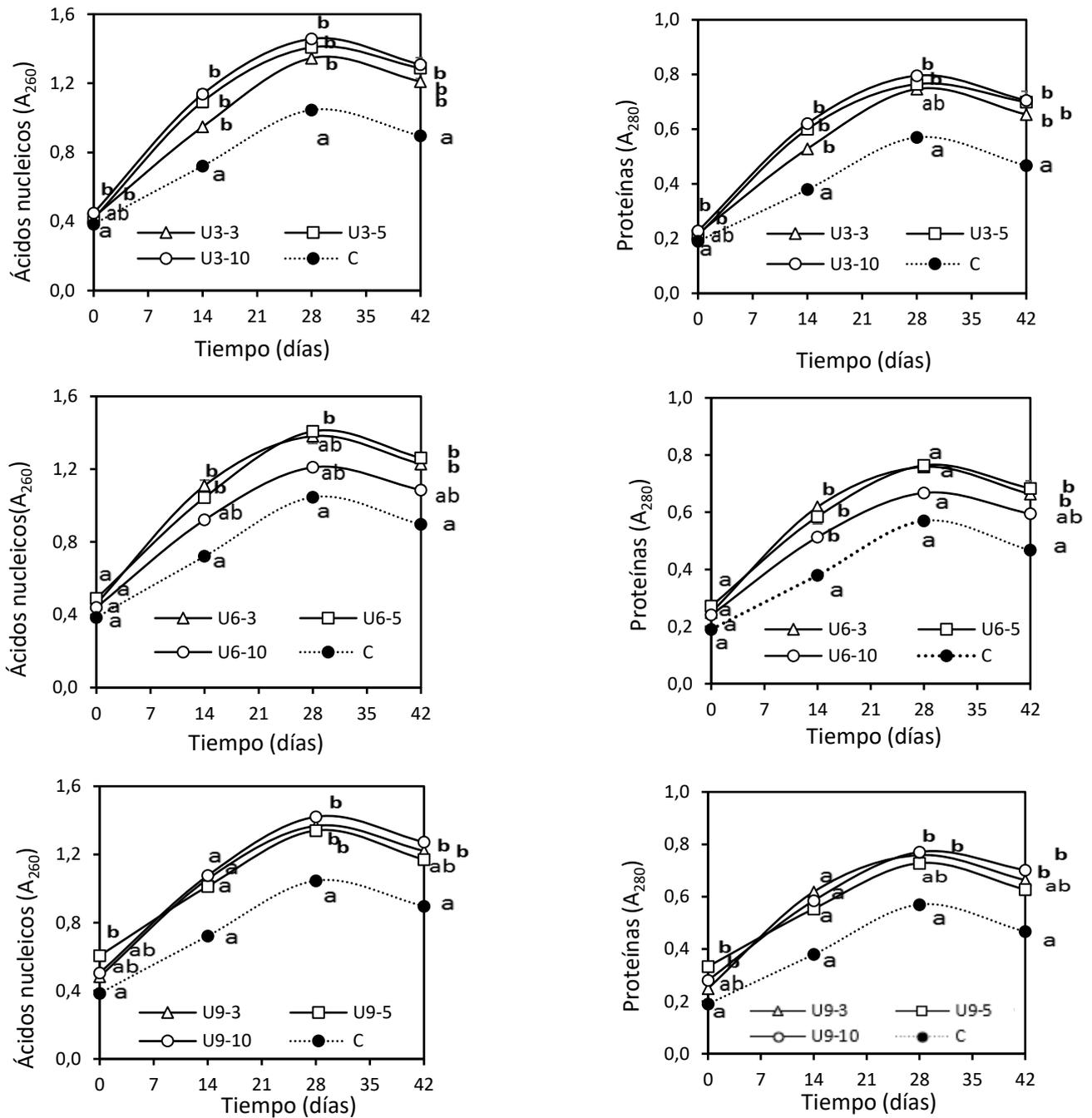


Figura 3-Evolución de ácidos nucleicos y proteínas en el vino modelo durante su crianza sobre lías tras el tratamiento con ultrasonido: C (control), U3-3 (30 % para 3 minutos), U3-5 (30 % para 5 minutos), U3-10 (30 % para 10 minutos), U6-3 (60 % para 3 minutos) U6-5 (60 % para 5 minutos) U6-10 (60 % para 10 minutos) U9-3 (90 % para 3 minutos) U9-5 (90 % para 5 minutos) U9-10 (90 % para 10 minutos). Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas entre las muestras para un mismo tiempo.

## APLICACIÓN DE ALTAS PRESIONES HIDROSTÁTICAS Y ULTRASONIDOS PARA ACELERAR LA LISIS DE LEVADURAS

Para las proteínas, el rango de medidas de absorbancia y por lo tanto de concentración se situaron entre un 26,0 % y un 34,0 % superior a la muestra control. La muestra de US con una amplitud del 90 % y 5 minutos de tratamiento fue la que alcanzó un 25,5 % superior de extracción, y la muestra con una amplitud de tratamiento del 30 % y 10 minutos de tiempo la que alcanzó el máximo con un 33,8 % de absorbancia superior con respecto a la muestra control, al cabo de 42 días de tratamiento.

### 6.4 Efecto de los US sobre el contenido en polisacáridos a los 42 días

La liberación de polisacáridos por medio de la técnica de US, al igual que el tratamiento por HHP, presentó resultados dispares para las distintas amplitudes y tiempos de actuación, tal y como se puede ver en la Figura 4.

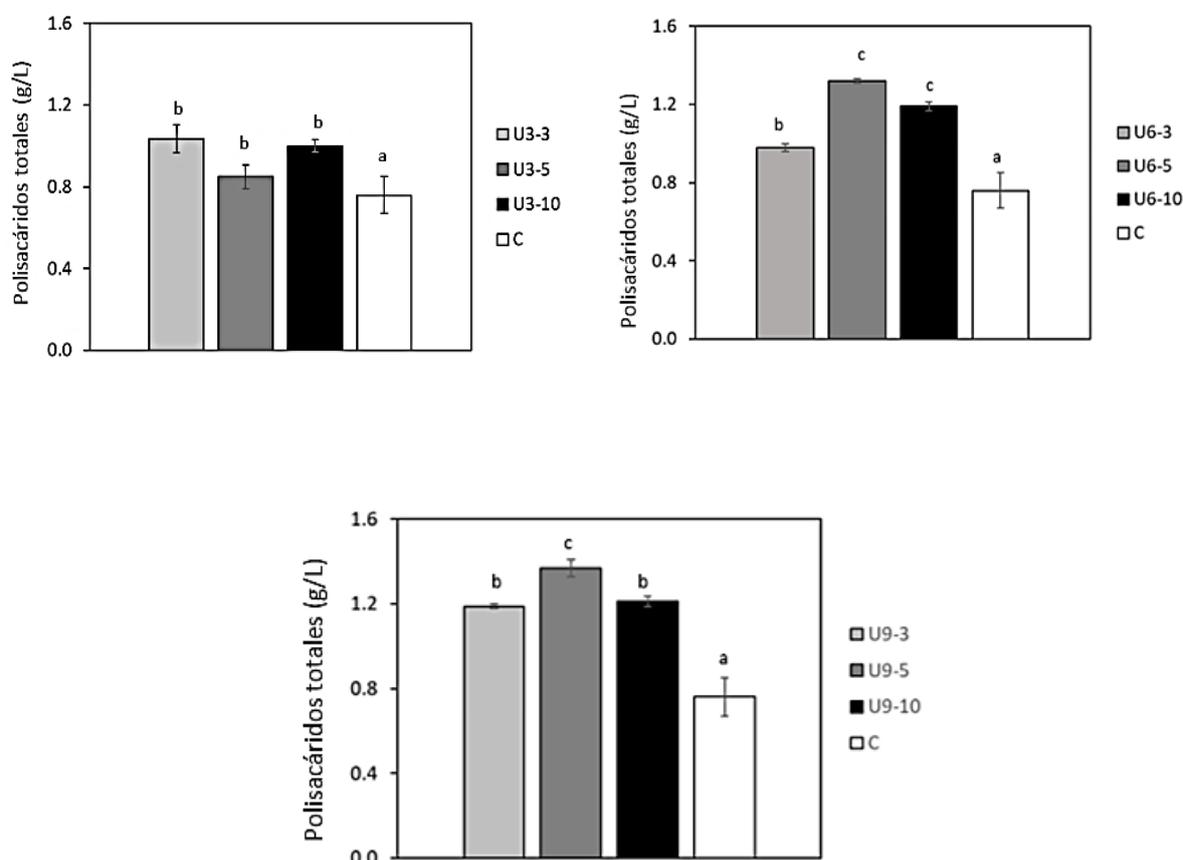


Figura 4 -Concentración de polisacáridos en el vino modelo posterior a su tratamiento con ultrasonidos tras un periodo de crianza sobre lías de 42 días: C (Control), U3-3(30 % a 3 minutos), U3-5 (30 % a 5 minutos), U3-10 (30 % a 10 minutos), U6-3 (60 % 3 minutos), U6-5 (60 % a 5 minutos) U6-10 (60 % a 10 minutos) U9-3 (90 % a 3 minutos) U9-5 (90 % a 5 minutos) U9-10 (90 % a 10 minutos). Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas entre las muestras.

# APLICACIÓN DE ALTAS PRESIONES HIDROSTÁTICAS Y ULTRASONIDOS PARA ACELERAR LA LISIS DE LEVADURAS

Sin embargo, hay que reconocer que, aunque no exista una tendencia u homeogeneidad con respecto a amplitudes o tiempos de aplicación, todos los valores obtenidos al cabo de los 42 días fueron superiores, con un rango entre el 10,0 % y el 44,0 % por encima del valor de concentración de la muestra control.

Como se puede apreciar en la Figura 4, no se identificaron diferencias de relevancia en ningún tiempo de sonicación a un nivel de amplitud del 30 %. No obstante, se constataron diferencias significativas en relación con los distintos tiempos de aplicación a niveles de amplitud del 60 % y 90 %. En nuestro análisis, los valores correspondientes a los polisacáridos totales de las muestras sometidas a un tratamiento de 5 minutos a niveles del 60 % y 90 % de amplitud prácticamente se duplicaron: un 86,8 % superior para una amplitud del 60 % y un 89,5 % más para la amplitud del 90%, en comparación con la muestra de control. No obstante, en el caso de las muestras expuestas a 10 minutos a niveles de amplitud del 60 % y 90 %, aunque se registraron valores significativamente superiores en comparación con el control, no alcanzaron a duplicarlos: 78,3 % para 60 % amplitud y un 79,6 % para 90 % de amplitud.

Del Fresno et al. (2018) encontraron un comportamiento similar, donde las muestras sometidas a ultrasonidos en un medio modelo generaron mayores cantidades de polisacáridos con el tiempo.

## 7. Conclusiones

Tras valorar los resultados ofrecidos por ambas técnicas se puede resaltar lo siguiente:

El uso de la enzima  $\beta$ -glucanasa tras la aplicación de los tratamientos, con el objetivo de facilitar el proceso de lisis celular, no supuso una ventaja significativa con respecto a las muestras tratadas sin enzima.

En cuanto a la extracción de ácidos nucleicos y proteínas, la técnica con la que se obtuvieron mayores valores de concentración de estos compuestos frente a la muestra control sin tratar, al cabo de 42 días de crianza sobre sus lías, fue la técnica de US, siendo las condiciones a baja y media amplitud (30 % y 60 %) e intervalos cortos y medios de tiempo (3 y 5 minutos) las que presentaron valores superiores de concentración de los compuestos en el medio. Por otra parte, las muestras analizadas tras la aplicación de la técnica de HHP no presentaron valores superiores de concentración de ácidos nucleicos y proteínas que frente a la muestra control. Por contrario, presentaron valores cercanos a un 50,0 % inferior a las concentraciones obtenidas en la muestra control.

# APLICACIÓN DE ALTAS PRESIONES HIDROSTÁTICAS Y ULTRASONIDOS PARA ACELERAR LA LISIS DE LEVADURAS

Con relación a los polisacáridos totales, las muestras tratadas con US al cabo de 42 días presentaron concentraciones superiores a los de la muestra control en todos los casos, siendo el tratamiento con amplitudes a 60 % y 90 % y 5 minutos, el que mayores concentraciones presentó de extracción de polisacáridos con valores cercanos al doble de los obtenidos en la crianza de la muestra control. Por lo que la aplicación de dicha técnica resulta efectiva, en las condiciones descritas, a la hora de obtener mayores concentraciones de polisacáridos en el medio control durante su crianza.

Sin embargo, todos los valores de concentración de polisacáridos obtenidos tras el análisis de muestras tratadas con HHP fueron inferiores a la muestra control sin tratar, por lo que no resultó ser una técnica adecuada con vistas a una posible extracción de dichos compuestos de lisis celular,

Por lo tanto, se puede afirmar que la técnica de US es efectiva como método para acelerar la lisis celular de *S. cerevisiae* e incrementar la concentración de ácidos nucleicos, proteínas y polisacáridos en el vino frente a una crianza sobre lías tradicional. Sin embargo, ni la técnica de HHP ni el uso de  $\beta$ -glucanasa resultó eficiente para este mismo fin.

Tras el estudio realizado se puede concluir que la técnica de US puede ser en un futuro una técnica prometedora en el ámbito de extracción de compuestos de lisis celular. Se ha demostrado que sí se produjo un incremento en la concentración de proteínas, ácidos nucleicos y polisacáridos en un medio hidroalcohólico modelo. Aunque es necesaria una futura revisión y experimentación para dirimir los tiempos necesarios de actuación y de tratamiento de la técnica, así como se ha de tener en cuenta que para nuestro caso se trataba de una matriz relativamente poco compleja en comparación con la matriz de un vino, que posee diversas variables y compuestos que podrían modificar los resultados aquí obtenidos.

Aunque requiere de una maquinaria especializada, US es una técnica relativamente económica y que no requiere de preparativos previos de la muestra ni de largos tiempos de actuación, por lo que su aplicación en el vino es prometedora en un futuro cercano.

## **8. Agradecimientos**

Agradecer a la Universidad de Valladolid, a los laboratorios del campus de la Escuela Técnica Superior de Ingenierías Agrarias de Palencia, a las instalaciones del Parque Científico de la UVA del Grupo PROCEREALtech y a las instalaciones del grupo Hiperbaric en Burgos.

También agradecer a mis tutores José Manuel Rodríguez Nogales, Encarnación Fernández Fernández, a la coordinadora de la Sección Departamental de Microbiología Josefina Vila Crespo, y a mi compañera de tesis y laboratorio Coro Blanco Huerta por su paciencia y tesón en este estudio.

## 9. Bibliografía

- Aganovic, K., Hertel, C., Vogel, Rudi. F., Johne, R., Schlüter, O., Schwarzenbolz, U., Jäger, H., Holzhauser, T., Bergmair, J., Roth, A., Sevenich, R., Bandick, N., Kulling, S. E., Knorr, D., Engel, K.-H., & Heinz, V. (2021). Aspects of high hydrostatic pressure food processing: Perspectives on technology and food safety. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 20(4), pp.3225–3266.
- Barrio-Galán, R. Del, Úbeda, C., Gil, M., Medel-Marabolí, M., Siczkowski, N., & Peña-Neira, Á. (2019). Evaluation of yeast derivative products developed as an alternative to lees: The effect on the polysaccharide, phenolic and volatile content, and colour and astringency of red wines. *Molecules*, pp.24(8), pp.2-3,6,10.
- Brul, S., Rommens, A. J. M., & Verrips, C. T. (2000). Mechanistic studies on the inactivation of *Saccharomyces cerevisiae* by high pressure. The Netherlands, Swammerdam Institute for Life Sciences, University of Amsterdam, 1098 SM Amsterdam, In *Innovative Food Science & Emerging Technologies* (Vol. 1), pp 2-3,8.
- Buzrul, S. (2012). High hydrostatic pressure treatment of beer and wine: A review. In *Innovative Food Science and Emerging Technologies* (Vol. 13), Issue January, pp. 1–12.
- Del Fresno, J. M., Loira, I., Morata, A., González, C., Suárez-Lepe, J. A., & Cuerda, R. (2018). Application of ultrasound to improve lees ageing processes in red wines. *Food Chemistry*. 261, pp.157-163.
- Del Fresno, J. M., Morata, A., Escott, C., Loira, I., Cuerda, R., & Suárez-Lepe, J. A. (2019). Sonication of yeast biomasses to improve the ageing on lees technique in red wines. *Molecules*, 24(3), pp 2-3,11.
- Dimopoulos, G., Tsantes, M., & Taoukis, P. (2020). Effect of high-pressure homogenization on the production of yeast extract via autolysis and beta-glucan recovery. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, pp.62, 102.
- Escot, S., Feuillat, M., Dulau, L., Charpentier, C. (2001). Release of polysaccharides by yeasts and the influence of released polysaccharides on colour stability and wine astringency. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 7(3), pp. 153–159.
- Fernández, O., Martínez, O., Hernández, Z., Guadalupe, Z., & Ayestarán, B. (2011). Effect of the presence of lysated lees on polysaccharides, colour and main phenolic compounds of red wine during barrel ageing. *Food Research International*, 44(1), pp.84–91.

APLICACIÓN DE ALTAS PRESIONES HIDROSTÁTICAS Y ULTRASONIDOS PARA ACELERAR  
LA LISIS DE LEVADURAS

- Ferraretto, P., Cacciola, V., Batllo, I. F., & Celotti, E. (2013). Ultrasounds application in winemaking: grape maceration and yeast lysis. *Italian Journal of Food Science*, 25, pp 160-186.
- Fischer, S., Ruß, W., Buckow, R., Heinz, V., Ulmer, H. M., Behr, J., Meyer-Pittroff, R. P. D., Knorr, D., & Vogel, R. F. (2006). Effects of hydrostatic high pressure on microbiological and technological characteristics of beer. *Monatsschrift für Brauwissenschaft*. Vol. 59(7-8), pp.90-9.
- Hartmann, C., & Delgado, A. (2004). Numerical simulation of the mechanics of a yeast cell under high hydrostatic pressure. *Journal of Biomechanics*, 37(7), pp.977–987.
- Kemp, B., Hogan, C., Xu, S., Dowling, L., & Inglis, D. (2017). The impact of wine style and sugar addition in liqueur d'expedition (dosage). Solutions on traditional method sparkling wine Composition. *Beverages*, pp.3(1).
- Li, K., McKeith, A. G., Shen, C., & McKeith, R. (2018). A comparison study of quality attributes of ground beef and veal patties and thermal inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 after double pan-broiling under dynamic conditions. *Foods*, 7(1), pp. 2-3.
- Lindner, P., & Shomer, I. (1984). Interference of azide in assays of carbohydrates. *Food Chemistry*, 14(2), pp.141–153.
- Magnelli, P., Cipollo, J. F., & Abeijon, C. (2002). A refined method for the determination of *Saccharomyces cerevisiae* cell wall composition and  $\beta$ -1,6-glucan fine structure. *Analytical Biochemistry*, 301(1), pp. 2-4.
- Martínez, J. M., Delso, C., Aguilar, D., Cebrián, G., Álvarez, I., & Raso, J. (2018). Factors influencing autolysis of *Saccharomyces cerevisiae* cells induced by pulsed electric fields. *Food Microbiology*, pp.73, 67–72.
- Marx, G., Moody, A., & Bermúdez-Aguirre, D. (2011). A comparative study on the structure of *Saccharomyces cerevisiae* under nonthermal technologies: High hydrostatic pressure, pulsed electric fields and thermo-sonication. *International Journal of Food Microbiology*, 151(3), pp. 327–337.
- Morata, A., Palomero, F., Loira, I., & Suárez-Lepe, J. A. (2018). New Trends in Aging on Lees. Department of Chemistry and Food Technology, Technical University of Madrid, Madrid, Spain. In *Red Wine Technology*. pp. 163–176.
- Palomero, F., Morata, A., Benito, S., González, M. C., & Suárez-Lepe, J. A. (2007). Conventional and enzyme-assisted autolysis during ageing over lees in red wines: Influence on the release of polysaccharides from yeast cell walls and on wine monomeric anthocyanin content. *Food Chemistry*, 105(2), pp.838–846.
- Riu-Aumatell, M., Bosch-Fusté, J., López-Tamames, E., & Buxaderas, S. (2006). Development of volatile compounds of cava (Spanish sparkling wine) during long ageing time in contact with lees. *Food Chemistry*, 95(2), pp. 237–242.
- Rodríguez-Bencomo, J. J., Ortega-Heras, M., & Pérez-Magariño, S. (2010). Effect of alternative techniques to ageing on lees and use of non-toasted oak chips in alcoholic fermentation on the

APLICACIÓN DE ALTAS PRESIONES HIDROSTÁTICAS Y ULTRASONIDOS PARA ACELERAR  
LA LISIS DE LEVADURAS

aromatic composition of red wine. *European Food Research and Technology*, 230(3), pp.485-496.

Suárez-Lepe, J. A., & Morata, A. (2006). Nuevo método de crianza sobre lías. *Patente P200602423*, 25.

Vannier, A., Brun, O. X., & Feinberg, M. H. (1999). Application of sensory analysis to champagne wine characterization and discrimination. *Food Quality and Preference.*, 10(2), pp.101-107.