



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza



Trabajo Fin de Máster en

Calidad, Seguridad y Tecnología de los Alimentos

Aplicación de la tecnología de los Pulsos Eléctricos de Alto Voltaje (PEF) en la extracción de componentes de interés en distintas cepas de levadura cervecera

Application of high voltage electrical pulse (PEF) technology in the extraction of components of interest from different strains of brewing yeast

Autor/es

Katherine Marchán Urquiza

Director/es

Javier Raso Pueyo

Javier Marín Sánchez

Facultad de Veterinaria

2025

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 La Tecnología De Los Pulsos Eléctricos De Alto Voltaje (PEF).....	1
1.1.1 Concepto y Principios Básicos de los Pulsos Eléctricos de Alto Voltaje.....	1
1.1.2 Principales parámetros en el tratamiento PEF	2
1.2 La electroporación para la extracción de compuestos de microorganismos.....	4
1.3 Evaluación de la electroporación.....	5
1.3.1 Yoduro de propidio como marcador de electroporación	6
1.4 Las Levaduras y su interés en los procesos industriales.....	7
1.4.1 Levaduras de la industria cervecera	8
1.5 Extracción de compuestos de levaduras	10
1.5.1 Extracción de compuestos de levaduras mediante el tratamiento PEF	10
1.5.2 Factores que influyen la resistencia de las levaduras a la electroporación por tratamientos PEF	11
2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	13
3. METODOLOGÍA	15
3.1 Microorganismos y condiciones de crecimiento	15
3.2 Tratamiento de Pulsos Eléctricos de Alto Voltaje.....	15
3.3 Análisis de la electroporación mediante citometría de flujo.....	17
3.4 Monitorización de la liberación de compuestos de levaduras.....	18
3.5 Métodos analíticos.....	18
3.5.1 Glutatión reducido	18
3.5.2 Aminoácidos.....	19
3.5.3 Proteínas	20
3.5.4 Péptidos	20
3.5.5 Solubilidad de proteínas	20
3.6 Tratamiento estadístico de los resultados.....	21
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	22
4.1 Electroporación de distintas cepas de levadura	22
4.2 Composición de las cepas de levadura	25
4.3 Extracción de compuestos intracelulares de levadura tras el tratamiento PEF	26
4.3.1 Glutatión.....	27

4.3.2 Aminoácidos	29
4.3.3 Proteínas.....	30
5. CONCLUSIONES.....	36
6. REFERENCIAS	37

RESUMEN

El crecimiento de la población impulsa la búsqueda de fuentes sostenibles de proteínas. La biomasa de levadura cervecera, rica en proteínas, aminoácidos y glutatión, podría ser una de estas fuentes. La tecnología de pulsos eléctricos de alto voltaje (PEF) induce la electroporación celular, aumentando la permeabilidad de la membrana y facilitando la extracción de estos compuestos de forma más eficiente y selectiva que los métodos tradicionales de extracción.

Este estudio comparó la resistencia de cuatro cepas de levadura a los tratamientos PEF y evaluó la extracción de compuestos intracelulares. Se aplicaron intensidades de 10-20 kV/cm y energías de 19,1-105,7 kJ/kg, analizándose la electroporación por citometría de flujo con yoduro de propidio. Se determinaron las condiciones óptimas del tratamiento y se monitorizó la extracción de aminoácidos, glutatión y proteínas a 25 °C.

Se observaron diferencias en la resistencia de las cepas a los tratamientos PEF, tanto en la electroporación reversible como irreversible. *Saccharomyces cerevisiae* S-04 se electroporó completamente en todas las condiciones y no mostró recuperación celular. *S. cerevisiae* S-23 presentó una resistencia similar, pero hasta un 70 % de sus células cerraron los poros tras 24 horas. *S. cerevisiae* HA-18 fue más resistente, mientras que *Kluyveromyces lactis* mostró la mayor resistencia y no revirtió la electroporación.

En cuanto a la extracción de compuestos intracelulares, ni la intensidad del tratamiento ni el tiempo de incubación afectaron significativamente la liberación de glutatión y aminoácidos. Sin embargo, la extracción de proteínas fue menor en las cepas con alta electroporación reversible tras tratamientos de menor intensidad. Además, intensidades de campo elevadas redujeron la solubilidad de las proteínas, afectando negativamente su extracción.

En conclusión, la eficiencia de extracción depende de la cepa y las condiciones de PEF. Optimizar estos parámetros es clave para mejorar la recuperación de biomoléculas y valorizar subproductos de la industria cervecera.

ABSTRACT

Population growth is driving the search for sustainable protein sources. Brewer's yeast biomass, rich in proteins, amino acids, and glutathione, could be one such source. Pulsed electric field (PEF) technology induces cell electroporation, increasing membrane permeability and enabling a more efficient and selective extraction of these compounds compared to traditional methods.

This study compared the resistance of four yeast strains to PEF treatments and evaluated the extraction of intracellular compounds. Electric field intensities of 10–20 kV/cm and total specific energy of 19.1–105.7 kJ/kg were applied, and electroporation was analyzed by flow cytometry with propidium iodide staining. Optimal treatment conditions were determined, and the extraction of amino acids, glutathione, and proteins at 25 °C was monitored.

Differences in strain resistance to PEF were observed, both in reversible and irreversible electroporation. *Saccharomyces cerevisiae* S-04 was fully electroporated under all conditions and showed no cell recovery. *S. cerevisiae* S-23 had similar resistance but recovered up to 70% of cells after 24 h. *S. cerevisiae* HA-18 was more resistant, while *K. lactis* showed the highest resistance with no electroporation reversal.

Regarding intracellular compound extraction, neither treatment intensity nor incubation time significantly affected glutathione or amino acid release. However, protein extraction was lower in strains with high reversible electroporation under mild treatments. Moreover, higher electric field intensities reduced protein solubility, negatively impacting extraction.

In conclusion, extraction efficiency depends on the yeast strain and PEF conditions. Optimizing these parameters is key to enhancing biomolecule recovery and valorizing brewing industry byproducts.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 La Tecnología De Los Pulsos Eléctricos De Alto Voltaje (PEF)

1.1.1 Concepto y Principios Básicos de los Pulsos Eléctricos de Alto Voltaje

El tratamiento con pulsos eléctricos de alto voltaje (PEF) es una tecnología innovadora que se propone como alternativa a los métodos tradicionales utilizados para facilitar la extracción de componentes intracelulares mediante la ruptura de las células. Consiste en aplicar intermitentemente pulsos de corriente continua de miles de voltios y una duración muy corta (de microsegundos a milisegundos) entre dos electrodos. Este proceso genera un campo eléctrico cuya intensidad depende tanto del voltaje aplicado como de la distancia entre los electrodos (Martínez et al., 2020).

La membrana citoplasmática de la célula, desde una perspectiva eléctrica, puede considerarse como una fina capa aislante, rodeada por soluciones electrolíticas acuosas en ambos lados. Cuando se somete a un campo eléctrico lo suficientemente intenso, la membrana experimenta un incremento de su permeabilidad que permite que moléculas que normalmente no podrían atravesarla lo hagan. Este fenómeno, en el que la membrana se vuelve permeable, se conoce como electroporación (Kotnik et al., 2012).

La hipótesis más reciente que explica el fenómeno de la electroporación se centra en la formación de poros acuosos en la membrana celular, inducidos por el campo eléctrico. Este fenómeno da lugar a formación de poros temporales o permanentes en la membrana. Debido a su diminuto tamaño, estos poros no pueden ser observados directamente ni con microscopía óptica ni con microscopía electrónica. No obstante, las simulaciones de dinámica molecular han demostrado ser herramientas valiosas para estudiar tanto la formación como el comportamiento de dichos poros (Figura 1). A pesar de los avances en este campo, aún existen aspectos que requieren una mayor investigación, especialmente en lo que respecta a los mecanismos exactos de formación y estabilización de los poros en la membrana celular (Martínez et al., 2020).

Si la membrana celular no está expuesta a un campo eléctrico de suficiente intensidad, puede recuperar su estado original al cesar el tratamiento; este fenómeno se denomina electroporación reversible. La electroporación es irreversible cuando la intensidad del campo eléctrico es lo suficientemente alta como para causar daños permanentes en las membranas celulares. Este fenómeno conduce a una permeabilización permanente de la membrana citoplasmática, a la pérdida de la homeostasis celular y, eventualmente, a la muerte. Cuando el tratamiento PEF persigue facilitar la extracción de compuestos intracelulares se busca que la electroporación sea irreversible. Sin embargo, en ocasiones es difícil conseguir separar en una población microbiana las células electroporadas exclusivamente de manera reversible o irreversible debido a las variaciones en la

geometría de los electrodos y las propiedades del material, que generan una distribución no uniforme del campo eléctrico (Teissie et al., 2005).

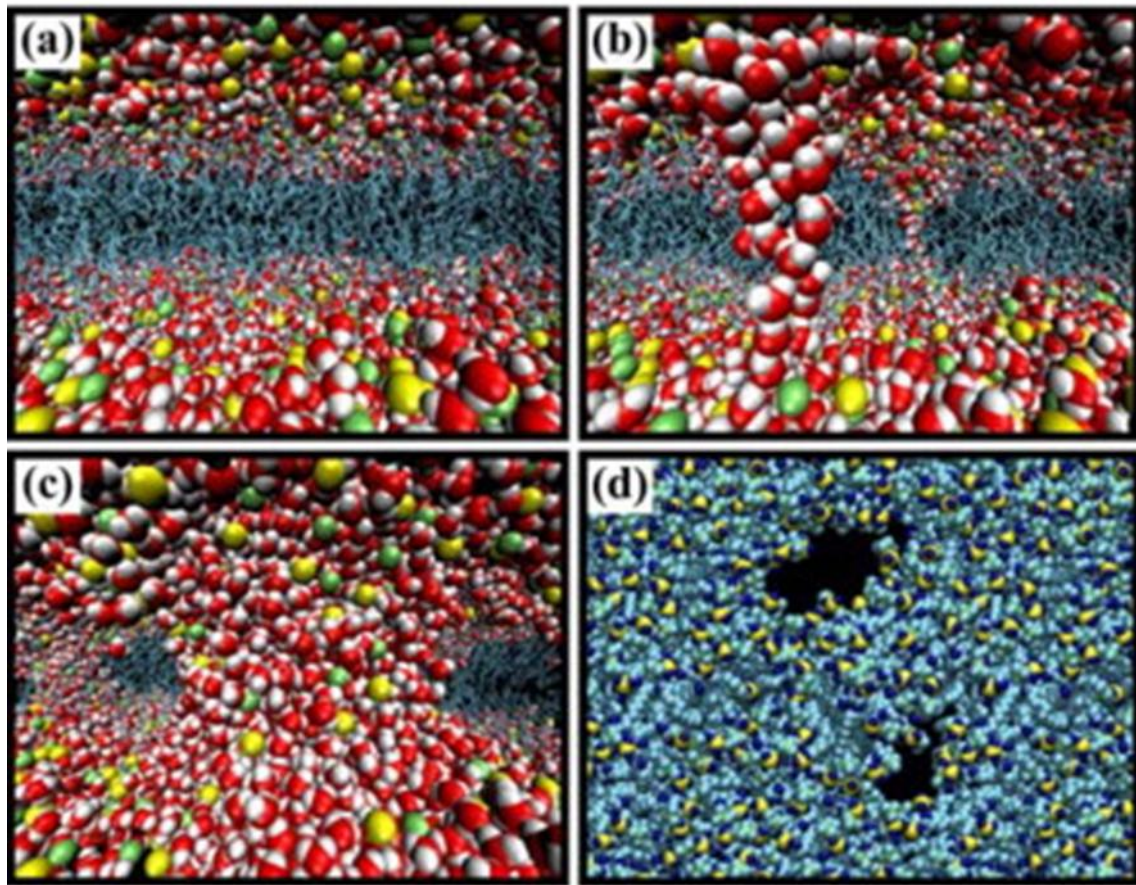


Figura 1: Representaciones gráficas obtenidas mediante técnicas de dinámica molecular donde se muestra la formación de poros acuosos en una bicapa lipídica sometida a la acción de un campo eléctrico de alta intensidad (Tarek, 2005).

La electroporación de la membrana citoplasmática de las células para favorecer la liberación de compuestos depende de distintos parámetros que se describen a continuación.

1.1.2 Principales parámetros en el tratamiento PEF

1.1.2.1. Intensidad del campo eléctrico (kV/cm)

La intensidad del campo eléctrico se define como el cociente entre el voltaje aplicado entre los electrodos y la distancia entre ellos. Este parámetro es clave en el tratamiento con pulsos eléctricos de alto voltaje, ya que determina la magnitud de la fuerza ejercida sobre las membranas celulares y su permeabilización. Se expresa en kilovoltios por centímetro (kV/cm) y se calcula dividiendo el voltaje aplicado entre la distancia entre los electrodos (Raso et al., 2014).

Para que se produzca la electroporación, es necesario alcanzar un campo eléctrico mínimo conocido como campo eléctrico crítico, cuyo valor depende del tamaño de las células. El umbral mínimo necesario para inducir la electroporación varía según el tipo celular: en células vegetales,

generalmente se encuentra en el rango de 1–2 kV/cm, mientras que en células microbianas se requieren valores más elevados, entre 10 y 15 kV/cm (Donsì et al., 2010). Intensidades más bajas pueden generar efectos subletales, mientras que valores más altos pueden inducir una permeabilización irreversible, favoreciendo procesos como la inactivación microbiana o la extracción de compuestos intracelulares. La distribución del campo eléctrico no siempre es uniforme, ya que depende de la geometría de los electrodos y de la conductividad del medio tratado (Raso et al., 2022).

1.1.2.2. Forma y polaridad de los pulsos eléctricos

Los pulsos eléctricos son señales breves que se caracterizan por un aumento rápido seguido de una disminución igualmente rápida de la intensidad del voltaje o corriente en un circuito eléctrico, repitiéndose de manera periódica. Los pulsos pueden variar en forma, dependiendo de la configuración del circuito y el tipo de interruptor utilizado. Entre las formas de pulso más comunes se encuentran los pulsos de caída exponencial y los pulsos rectangulares (Figura 2). Los pulsos rectangulares son más eficientes energéticamente, ya que mantienen un nivel constante de energía durante su duración, permitiendo un mejor control del tratamiento. En contraste, en los pulsos de caída exponencial la energía aplicada cae rápidamente tras alcanzar el valor máximo presentando menor eficiencia energética. (Raso et al., 2022).

Además, estos pulsos pueden ser unipolares cuando tienen una sola dirección de flujo de corriente o bipolares con corriente que cambia de dirección (Figura 2). Los pulsos monopolares, con una única fase positiva o negativa, son más simples de generar. Por otro lado, los pulsos bipolares alternan entre fases positiva y negativa, lo que puede reducir la erosión de los electrodos, aunque requieren mayores costes de los equipos (Raso et al., 2022).

1.1.2.3 Frecuencia y número de pulsos

La frecuencia se refiere al número de pulsos eléctricos aplicados por unidad de tiempo y se expresa en hercios (Hz). Las frecuencias utilizadas suelen situarse entre 1 y 500 Hz, dependiendo de la aplicación y del sistema empleado. Una frecuencia adecuada es fundamental para garantizar que el material procesado reciba un número suficiente de pulsos al pasar por la zona de tratamiento, asegurando una distribución homogénea de la energía aplicada. Además, la frecuencia influye en la energía total suministrada al sistema, ya que, al aumentar la frecuencia, se incrementa la cantidad de pulsos aplicados en un tiempo determinado. Esto afecta la eficiencia del proceso y puede influir en la temperatura del sistema si no se controla adecuadamente (Raso et al., 2022).

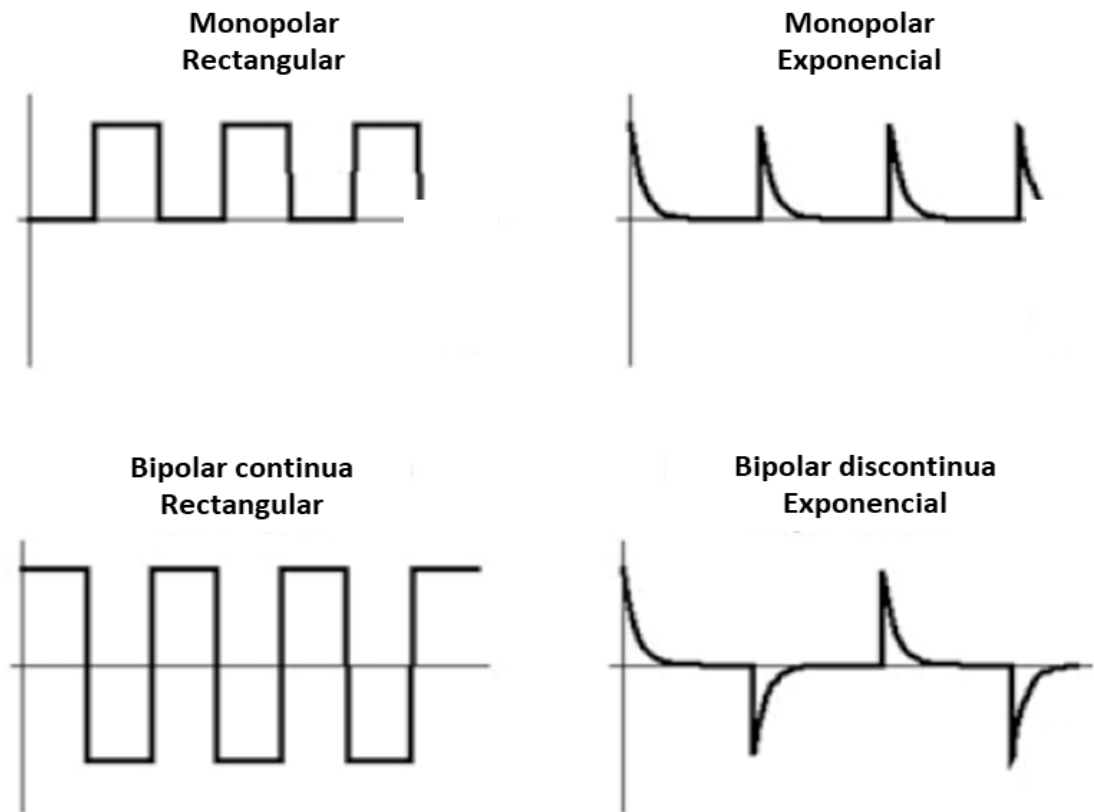


Figura 2: Forma y polaridad típicas de los pulsos eléctricos (Raso et al., 2022)

1.1.2.4 Conductividad del medio y temperatura

La conductividad mide la capacidad del medio para transmitir la corriente eléctrica. Este parámetro depende de la temperatura, lo que significa que los aumentos de temperatura inducen cambios en la conductividad durante el tratamiento. La conductividad eléctrica se mide en siemens por metro (S/m) (Municio & Raso, 2018).

Aunque el tratamiento con pulsos eléctricos de alto voltaje se considera una tecnología no térmica, está asociado con un cierto aumento de la temperatura de la muestra debido a la conducción de corriente eléctrica a través del material con propiedades conductoras, un fenómeno conocido como efecto Joule (Astráin-Redín et al., 2023). Este calentamiento depende de la conductividad del medio, la intensidad del campo eléctrico y el número de pulsos aplicados. Una combinación adecuada de estos factores permite electroporar las células sin que se produzcan incrementos de temperatura que afecten a las propiedades del producto.

1.2 La electroporación para la extracción de compuestos de microorganismos

El tratamiento PEF es una alternativa prometedora a los métodos convencionales de extracción de compuestos intracelulares en microorganismos como bacterias, levaduras y microalgas.

A diferencia de los tratamientos térmicos o químicos, la tecnología PEF es un proceso no térmico que actúa de manera precisa y selectiva sobre la membrana citoplasmática, facilitando la liberación de los compuestos sin afectar su integridad ni modificar su estructura (Gautério et al., 2023; Vorobiev & Lebovka, 2022).

Entre las principales ventajas de PEF se encuentra su capacidad de mejorar la extracción selectiva de metabolitos de interés, reduciendo la contaminación con otros componentes celulares no deseados y por lo tanto mejorando la pureza del extracto (Vorobiev & Lebovka, 2022). Además, al ser una técnica no térmica, el tratamiento PEF es especialmente respetuoso con los compuestos sensibles al calor, como vitaminas y antioxidantes, que pueden degradarse con los métodos térmicos tradicionales (Martínez et al., 2020).

Otro aspecto innovador de PEF es su capacidad para activar ciertas enzimas intracelulares de los microorganismos durante la incubación posterior a la electroporación, lo que abre nuevas posibilidades para la recuperación de compuestos que normalmente están unidos o ensamblados en estructuras celulares complejas. Asimismo, la tecnología es adaptable a procesos en flujo continuo y escalable a nivel industrial, lo que permite su integración en sistemas de producción a gran escala sin afectar la eficiencia del proceso (Martínez et al., 2020).

1.3 Evaluación de la electroporación

La electroporación es un fenómeno que puede evaluarse mediante diversas metodologías que permiten determinar la eficiencia del tratamiento. Dado que la permeabilización de la membrana es un proceso dinámico influenciado por múltiples factores, como la intensidad del campo eléctrico, el número de pulsos y la composición del medio, es fundamental emplear técnicas adecuadas para su detección y cuantificación (Batista Napotnik & Miklavčič, 2018; Djuzenova et al., 1996). Los procedimientos para evaluar la electroporación pueden agruparse en tres estrategias: (i) Determinación de la entrada de moléculas a través de la membrana citoplasmática, (ii) Medición de la salida de compuestos intracelulares, (iii) Procedimientos físicos y electroquímicos

Una de las metodologías más empleadas para detectar la electroporación es la determinación de la **entrada de moléculas** como colorantes fluorescentes u otras moléculas que, en condiciones normales, no pueden atravesar la membrana celular. Entre estos, los fluoróforos como el yoduro de propidio (YP) y el bromuro de etidio (BrEt) han sido ampliamente utilizados para detectar la permeabilización de la membrana celular en tiempo real mediante microscopía de fluorescencia, espectrofluorimetría o citometría de flujo (Batista Napotnik & Miklavčič, 2018; Raso et al., 2022). Además, las nanopartículas magnéticas y otras moléculas funcionales, como la bleomicina, pueden

utilizarse para evaluar la electroporación mediante la observación de sus efectos biológicos tras la permeabilización celular (Batista Napotnik & Miklavčič, 2018).

La electroporación no solo facilita la entrada de moléculas exógenas, sino que también provoca la **salida de componentes intracelulares** como iones, ATP y proteínas. La detección de estos biomarcadores en el medio extracelular permite evaluar la estabilidad celular y diferenciar entre electroporación reversible e irreversible (Teissié et al., 1999).

Métodos **físicos y electroquímicos** como la medición de impedancia y la espectroscopia dieléctrica ofrecen una evaluación indirecta pero cuantificable de la permeabilización de la membrana, permitiendo analizar cambios en la conductividad celular tras la aplicación de pulsos eléctricos (Batista Napotnik & Miklavčič, 2018).

Las técnicas de impedancia y espectroscopia dieléctrica ofrecen una medición no invasiva y versátil de las propiedades generales de las células, siendo adecuadas tanto para estudios in vitro como in vivo. Sin embargo, carecen de la especificidad necesaria para estudios moleculares detallados y no proporcionan información directa sobre la permeabilidad celular para moléculas de gran tamaño.

La microscopía electrónica y de fuerza atómica han sido exploradas para visualizar poros en la membrana, aunque los resultados pueden verse afectados por errores en la preparación de las muestras (Golzio et al., 1998).

La elección del método de evaluación de electroporación, dependerá de los objetivos específicos de la investigación y de las características experimentales requeridas (Batista Napotnik & Miklavčič, 2018).

Debido a que la tinción con YP es la técnica más utilizada para detectar la pérdida de integridad de la membrana celular tras la electroporación, a continuación, se describe esta técnica con más detalle.

1.3.1 Yoduro de propidio como marcador de electroporación

El YP es una molécula hidrofílica con carga positiva que, en condiciones normales, no puede atravesar la membrana citoplasmática de las células. Sin embargo, cuando la membrana se vuelve permeable debido a la aplicación de un campo eléctrico de alta intensidad, el YP penetra en la célula, se une a los ácidos nucleicos y aumenta significativamente su fluorescencia (Batista Napotnik & Miklavčič, 2018)

El YP ha sido ampliamente empleado para analizar la cinética de cierre de los poros tras la electroporación. Dependiendo de cuándo se añade el colorante a la muestra, es posible diferenciar entre electroporación reversible e irreversible. Si se incorpora antes del tratamiento, se puede detectar la electroporación tanto en las células electroporadas reversiblemente como

irreversiblemente. En cambio, si se añade después del tratamiento, solo se detectarán aquellas células cuya membrana se mantiene electroporada (electroporación irreversible) ya que las células electroporadas reversiblemente cierran los poros siendo impermeables al YP tras el tratamiento (Vaessen et al., 2018).

Dado su mecanismo de acción y facilidad de uso, el YP se ha convertido en un estándar para evaluar la electroporación en numerosos estudios in vitro, incluyendo aquellos que la técnica PEF se ha utilizado para el tratamiento de tumores (electroquimioterapia) o para la transferencia de genes. Además, ha sido utilizado en combinación con otros fluoróforos, como SYTOX® Green y YO-PRO®-1, para mejorar la sensibilidad y especificidad en la detección de permeabilización celular (Batista Napotnik & Miklavčič, 2018).

La citometría de flujo es una de las técnicas más utilizadas para la detección y cuantificación de electroporación celular, especialmente cuando se emplean colorantes fluorescentes como el yoduro de propidio (PI). Se basa en el análisis individual de células en suspensión, permitiendo obtener información cuantitativa sobre la intensidad de la fluorescencia en la población celular (Bartoletti et al., 1989; Kotnik et al., 2000).

En comparación con otros métodos, la citometría de flujo presenta múltiples ventajas. Permite el análisis rápido de miles de células por segundo, proporcionando una evaluación estadísticamente robusta del efecto del tratamiento eléctrico y superando la limitación de la microscopía de fluorescencia, que solo estudia un número reducido de células (Kotnik et al., 2000). Además, ofrece una cuantificación precisa de la permeabilización al medir la intensidad de fluorescencia en cada célula individualmente, permitiendo diferenciar distintos niveles de permeabilización y subpoblaciones con respuestas heterogéneas, algo que la espectrofluorimetría no puede lograr al proporcionar solo una señal promedio de la muestra (Bartoletti et al., 1989). Su alta velocidad de adquisición de datos facilita el procesamiento eficiente de múltiples muestras, reduciendo el tiempo de análisis respecto a la microscopía. Otra ventaja clave es su capacidad para emplear simultáneamente varios fluoróforos, lo que permite evaluar no solo la permeabilización celular, sino también otros parámetros como viabilidad en un solo experimento (Beebe et al., 2002). Finalmente, al analizar cada célula individualmente, la citometría de flujo minimiza la interferencia de fondo generada por el medio de cultivo, asegurando una detección más específica en comparación con otras técnicas para la evaluación de la electroporación como la espectrofluorimetría (Batista Napotnik & Miklavčič, 2018).

1.4 Las Levaduras y su interés en los procesos industriales

Las levaduras han sido utilizadas durante milenios como agentes clave en la producción de pan, cerveza y vino debido a su capacidad de fermentación. En tiempos más recientes, su aplicación

se ha extendido a la producción de biocombustibles, productos químicos, ingredientes alimentarios y fármacos. Además, han sido organismos modelo fundamentales en el estudio de la biología eucariota, proporcionando información crucial sobre procesos celulares en organismos superiores y contribuyendo a importantes avances en biomedicina (Nielsen, 2019).

Las levaduras también desempeñan un papel relevante en la industria biotecnológica como plataformas celulares para la síntesis de proteínas recombinantes, enzimas y metabolitos de interés industrial. Algunas especies se emplean en procesos de biorremediación y en la producción de compuestos bioactivos con aplicaciones en la salud humana y la industria alimentaria. Su versatilidad como fábricas celulares se debe a su rápida tasa de crecimiento, facilidad de manipulación genética y capacidad para adaptarse a distintos sustratos (Nielsen, 2019).

Saccharomyces cerevisiae es el microorganismo eucariota más estudiado y un modelo clave en biología celular gracias a su genoma secuenciado y herramientas genéticas avanzadas. Se emplea en el estudio de procesos esenciales como el ciclo celular, la transcripción génica y la señalización intracelular (Nandy & Srivastava, 2018).

1.4.1 Levaduras de la industria cervecera

Durante la producción de cerveza, la levadura fermenta los azúcares del mosto, generando etanol y compuestos volátiles que determinan el perfil sensorial del producto final. Existen dos principales tipos de levaduras cerveceras según su comportamiento fermentativo: las de fermentación alta y las de fermentación baja (Ferreira et al., 2010).

Las levaduras de fermentación alta (*Saccharomyces cerevisiae*), utilizadas en cervezas tipo ale, trabajan a temperaturas de 15–24°C, lo que acelera la fermentación y favorece la síntesis de compuestos aromáticos como ésteres y fenoles, responsables de notas frutales y especiadas. Estas cervezas suelen requerir menos tiempo de maduración y pueden consumirse rápidamente (Pinho et al., 2006).

Por otro lado, las levaduras de fermentación baja (*Saccharomyces pastorianus* y *Saccharomyces carlsbergensis*), empleadas en la producción de cerveza tipo lager, fermentan a temperaturas de 7–13°C. Este proceso más lento genera cervezas con perfiles suaves y mayor estabilidad sensorial, aunque requieren un periodo adicional de maduración en frío (Puligundla et al., 2020).

Una vez finalizado el proceso de fermentación la biomasa de levadura se separa y, aunque una fracción se reutiliza en nuevos lotes de producción, la mayor parte es descartada. Este exceso no puede eliminarse en las aguas residuales, ya que su descomposición consume grandes cantidades de oxígeno, lo que podría generar un impacto medioambiental significativo. Actualmente, este

subproducto se destina principalmente a la alimentación animal como fuente de proteínas de bajo costo, desaprovechándose su potencial para aplicaciones de mayor valor añadido (Jaeger et al., 2020).

El aprovechamiento de los grandes volúmenes de biomasa generados en la industria cervecera representa un reto. La creciente presión sobre los recursos naturales ha impulsado el interés en estrategias de economía circular que permitan reducir la cantidad de desechos y revalorizar los subproductos generados en el proceso de producción cervecera (Pasquet et al., 2024).

Más allá de su uso convencional en alimentación animal, se han propuesto nuevas aplicaciones innovadoras para este subproducto. Su capacidad para acumular compuestos bioactivos como el glutatión, un péptido con propiedades antioxidantes y metabólicas, lo hace valioso en la industria vinícola, donde puede ser una alternativa al dióxido de azufre. Además, los β -glucanos y manoproteínas de su pared celular pueden emplearse como estabilizantes y emulsionantes en la industria alimentaria (Silva Araújo et al., 2014; Tao et al., 2022). Otra alternativa prometedora es el uso de las levaduras deshidratadas para la encapsulación de compuestos bioactivos, como carotenoides y curcumina, mejorando su estabilidad y bioaccesibilidad durante la digestión (Rubio et al., 2022).

Asimismo, se ha explorado la posibilidad de emplear la biomasa de levadura cervecera en la producción de proteínas alternativas mediante su uso como sustrato en la alimentación de insectos, como las larvas de la mosca soldado negra. Este enfoque permite transformar un subproducto de la industria cervecera en una fuente de proteínas de alta calidad para alimentación animal y humana, alineándose con estrategias sostenibles de producción de alimentos (Rubio et al., 2022).

El extracto de levadura, que contiene entre un 35% y 60% de proteínas de alta calidad en base seca y todos los aminoácidos esenciales, se utiliza en procesos de estabilización y clarificación. A pesar de estos beneficios, el alto contenido de ácidos nucleicos en la levadura cervecera limita su uso directo en la alimentación humana, ya que un exceso de RNA puede elevar los niveles de ácido úrico en sangre y provocar problemas como la gota. No obstante, su valorización en la industria alimentaria y nutracéutica ha despertado un creciente interés, explorándose su aplicación en la producción de extractos de levadura, ingredientes funcionales y compuestos bioactivos con propiedades beneficiosas para la salud (Podpora et al., 2016).

La revalorización de la biomasa de levadura cervecera no solo contribuye a la sostenibilidad de la industria cervecera, sino que también representa una oportunidad para desarrollar productos innovadores con alto valor añadido. Debido a su bajo costo y alto contenido en nutrientes, la levadura cervecera usada es una materia prima valiosa con aplicaciones en diversas industrias. Puede emplearse en la producción de suplementos nutricionales, ingredientes funcionales y otros productos de valor añadido.

1.5 Extracción de compuestos de levaduras

La recuperación de compuestos de interés a partir de la biomasa de levadura requiere el uso de métodos de extracción adecuados, ya que la técnica seleccionada influye directamente en la eficiencia del proceso, el grado de ruptura celular y la posible liberación de impurezas. Estos factores determinan la viabilidad de los procedimientos posteriores y los costos asociados a la purificación de los compuestos extraídos (Balasundaram et al., 2009).

En términos generales, las estrategias de extracción pueden clasificarse en dos grandes grupos: los métodos destructivos, que rompen completamente la estructura celular, y los métodos no destructivos, que incrementan la permeabilidad de la membrana sin comprometer su integridad (Gautério et al., 2023).

Los métodos destructivos incluyen técnicas mecánicas, térmicas, químicas y enzimáticas. La homogenización a alta presión es una de las más utilizadas, ya que fragmenta la pared celular y permite la liberación eficiente de proteínas y metabolitos intracelulares. Sin embargo, este método consume una gran cantidad de energía y puede degradar compuestos sensibles. Alternativamente, la autólisis y la hidrólisis enzimática aprovechan las propias enzimas celulares o exógenas para romper la pared celular y liberar biomoléculas específicas, siendo estrategias ampliamente empleadas en la producción de extractos de levadura (Marson et al., 2020). Por otro lado, los métodos no destructivos buscan modificar la permeabilidad de la membrana celular para facilitar la liberación controlada de compuestos sin comprometer la viabilidad de la célula. La principal técnica basada en esta estrategia son los tratamientos PEF que permiten una extracción más selectiva y preservan la funcionalidad biológica de los compuestos recuperados (de Pádua Alves et al., s.f; Dimopoulos et al., 2021).

La elección del método de extracción dependerá del tipo de compuesto a recuperar y de su aplicación industrial. Mientras que los métodos destructivos permiten una liberación rápida y completa del contenido celular, los métodos no destructivos ofrecen ventajas en términos de selectividad y conservación de la estructura celular (Gautério et al., 2023).

1.5.1 Extracción de compuestos de levaduras mediante el tratamiento PEF

La electroporación inducida por el tratamiento PEF permite incrementar la permeabilidad de la membrana celular sin afectar su integridad. Esta característica posibilita la extracción selectiva de compuestos intracelulares sin provocar una ruptura total de la estructura celular, facilitando la recuperación de biomoléculas específicas sin contaminantes derivados de la pared celular (Gautério et al., 2023).

Varios estudios han demostrado que el tratamiento con PEF favorece la extracción de diversos compuestos de *S. cerevisiae*, como proteínas, aminoácidos y glutatión (Ganeva et al., 2020; Okamoto

et al., 2022). A diferencia de los métodos mecánicos de ruptura celular, que liberan indiscriminadamente todos los compuestos intracelulares, la tecnología PEF permite una extracción progresiva y controlada (Dimopoulos et al., 2018). La eficiencia del proceso depende principalmente del porcentaje de células electroporadas dentro de la población total más que de la intensidad del tratamiento aplicado. Por ejemplo, un tratamiento que afecta al 90 % de la biomasa de levadura ha demostrado ser más eficiente en la extracción de estos compuestos que uno que afecta solo al 50 %, mientras que aumentar la intensidad más allá del 90% no mejora significativamente el rendimiento del proceso (Berzosa et al., 2023).

Una de las principales ventajas del uso de la tecnología PEF en la extracción de compuestos de levadura es su capacidad para preservar la estructura y funcionalidad de las biomoléculas extraídas. A diferencia de los métodos térmicos o químicos, PEF permite la recuperación de proteínas y otros compuestos bioactivos sin someterlos a condiciones agresivas que puedan degradarlos. Además, esta tecnología minimiza el uso de disolventes haciendo el proceso más sostenible desde el punto de vista ambiental y económico (Gautério et al., 2023).

Otra ventaja relevante de PEF es su compatibilidad con estrategias de extracción en cascada, donde los compuestos citoplasmáticos pueden recuperarse en una primera fase y, posteriormente, la biomasa restante puede someterse a otros tratamientos para la extracción de fracciones ricas en β -glucanos y manoproteínas localizados en la pared celular. Este enfoque optimiza la valorización de la biomasa de levadura y reduce la generación de residuos, alineándose con los principios de la economía circular (Berzosa et al., 2024b)

Además, se están desarrollando aplicaciones combinadas y secuenciales que integran PEF con otras tecnologías de extracción, ampliando su potencial para la recuperación eficiente de proteínas y metabolitos de interés industrial. Estos enfoques híbridos buscan mejorar los rendimientos de extracción y la selectividad del proceso, abriendo nuevas oportunidades en la industria biotecnológica y alimentaria (Aadil et al., 2018; Carullo et al., 2018).

1.5.2 Factores que influyen la resistencia de las levaduras a la electroporación por tratamientos PEF

Las especies de levadura presentan una notable diversidad en tamaño, forma y composición celular, características que pueden variar incluso dentro de una misma especie en función de la cepa. A pesar de estas diferencias, la estructura celular de *S. cerevisiae* comparte una organización común que incluye la membrana citoplasmática, el espacio periplásmico y la pared celular. En particular, esta última es una capa gruesa (100–200 nm) que actúa como barrera protectora proporcionando resistencia mecánica y estabilidad celular (Moran et al., 2010). Como se puede observar en la Figura

3, la pared celular está constituida por polisacáridos estructurales como β -glucanos y manoproteínas, cuya proporción varía entre cepas y puede verse influenciada por factores como la fase de crecimiento y las condiciones del medio de cultivo (Gautério et al., 2023).

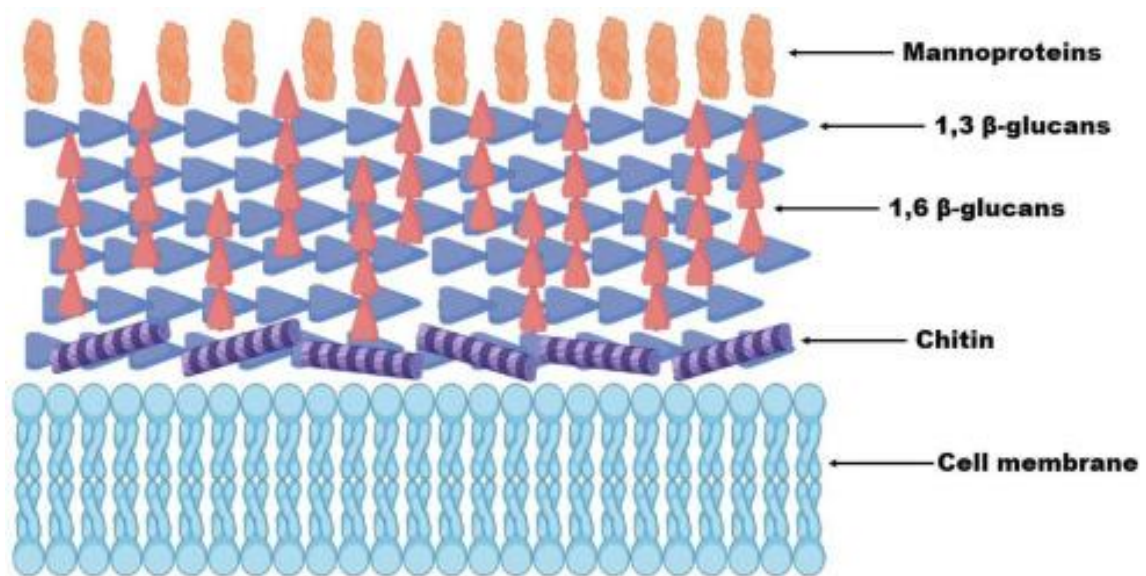


Figura 3: Esquema representativo de la estructura de la pared celular (Gautério et al., 2023)

En el contexto del tratamiento con PEF, la pared celular juega un papel clave en la resistencia de las levaduras a la electroporación. Su grosor y porosidad determinan el grado de permeabilización de la membrana plasmática y, en consecuencia, la eficiencia en la liberación de compuestos intracelulares. Cepas con una mayor proporción de β -glucanos suelen presentar una mayor resistencia a la electroporación, ya que estos polisacáridos confieren rigidez y dificultan la formación de poros en la membrana plasmática (Stirke et al., 2019). Por el contrario, una menor densidad de polisacáridos estructurales puede favorecer una permeabilización más eficiente, facilitando la extracción de biomoléculas sin requerir intensidades de campo eléctrico elevadas (Pillet et al., 2016).

Además, factores ambientales como el pH, la temperatura y la fase de crecimiento de la levadura pueden modificar la estructura de la pared celular y afectar su susceptibilidad a la electroporación (Ganeva et al., 2014). El conocimiento de estas diferencias es crucial para optimizar el tratamiento PEF y ajustar sus parámetros en función de las características específicas de cada cepa, maximizando la eficiencia de extracción sin comprometer la estabilidad celular.

2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

La industria cervecera genera grandes cantidades de biomasa de levadura como subproducto del proceso de fermentación. En la actualidad, este material se destina principalmente a la alimentación animal o se desecha, lo que representa una oportunidad desaprovechada, dado su alto contenido en compuestos de interés con aplicaciones potenciales en sectores como el alimentario, químico y farmacéutico. La revalorización de esta biomasa mediante la extracción selectiva de sus componentes podría representar una estrategia sostenible dentro de un modelo de economía circular, reduciendo desperdicios y aumentando el aprovechamiento de los recursos.

Un enfoque prometedor para mejorar la extracción de compuestos de interés es el tratamiento con pulsos eléctricos de alto voltaje (PEF), una técnica que aumenta la permeabilidad celular mediante la formación de poros en la membrana citoplasmática, un proceso conocido como electroporación. Esta tecnología facilita la liberación de compuestos de interés sin necesidad de métodos más agresivos que comprometan la integridad de los productos extraídos. A diferencia de técnicas convencionales como la ruptura mecánica o química, el tratamiento con PEF permite una extracción más selectiva, mejorando la calidad y pureza de los compuestos recuperados.

A pesar de los avances en la aplicación del tratamiento PEF para la extracción de compuestos de interés en diversas matrices, la respuesta específica de las distintas cepas de levadura a este tratamiento no ha sido suficientemente caracterizada. Dado que cada cepa presenta diferencias estructurales y bioquímicas que pueden influir en la eficiencia del proceso, es fundamental comprender cómo estas variaciones afectan la electroporación y, en consecuencia, la recuperación de compuestos de interés. Además, es necesario optimizar correctamente las condiciones de tratamiento con PEF para maximizar la extracción de estos compuestos intracelulares con un menor coste energético.

Este vacío en el conocimiento representa una barrera para la optimización del uso de la biomasa de levadura en aplicaciones industriales. Por lo tanto, resulta imprescindible evaluar las condiciones óptimas de tratamiento con PEF para lograr una electroporación eficiente en distintas cepas de levadura y determinar su impacto en la extracción y composición química de los extractos. Los hallazgos de esta investigación no solo permitirán mejorar el aprovechamiento de este subproducto industrial, sino que también contribuirán al desarrollo de estrategias más sostenibles para la valorización de la biomasa en el contexto de una producción más eficiente.

El objetivo principal de este trabajo fue comparar la resistencia de distintas cepas de levadura cervecera a los tratamientos con pulsos eléctricos de alto voltaje y evaluar la extracción de compuestos de interés a partir de la biomasa tras su electroporación.

Para alcanzar este objetivo general, se establecieron los siguientes objetivos específicos:

- Analizar la resistencia a la electroporación de diferentes cepas de levadura sometidas a tratamientos PEF con distintos valores de campo eléctrico y energía específica.
- Comparar el contenido total de compuestos de interés en las distintas cepas de levadura estudiadas.
- Determinar las condiciones óptimas de tratamiento con PEF para facilitar la extracción de compuestos de interés.
- Caracterizar la extracción de compuestos de interés en las cepas de levadura tras la aplicación de tratamientos PEF de diferente intensidad.

3. METODOLOGÍA

3.1 Microorganismos y condiciones de crecimiento

Se utilizaron cuatro cepas de levadura en este estudio. Las cepas *Saccharomyces cerevisiae* SafAle S-04, SafLager S-23 y SafBrew HA-18 fueron suministradas por Fermentis (Lesaffre, Marcq-en-Barœul, Francia). La cepa *S. cerevisiae* SafAle S-04 es una levadura comercial utilizada en la producción de cerveza, mientras que la *S. cerevisiae* SafLager S-23 se caracteriza por su fermentación a baja temperatura, y la *S. cerevisiae* SafBrew HA-18 está diseñada para la fermentación de cervezas de alta densidad. Adicionalmente, se empleó la cepa *Kluyveromyces lactis* CECT 1931, obtenida de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT, Paterna, España).

Los pre-cultivos se prepararon inoculando el microorganismo en tubos de ensayo que contenían 10 mL de medio Sabouraud Dextrosa Líquido (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido) y se incubaron durante 24 h a 25 °C. A continuación, matraces con 650 mL del mismo medio fueron inoculados con el pre-cultivo hasta alcanzar una concentración inicial de 10^4 UFC/mL y se incubaron a 25 °C bajo agitación orbital hasta alcanzar la fase estacionaria de crecimiento tras 48 h.

Las células de levadura en fase estacionaria se lavaron dos veces con agua destilada mediante centrifugación ($3000 \times g$, 5 min, 20 °C) y se resuspendieron en un tampón citrato-fosfato McIlvaine con una conductividad de 2 mS/cm y un pH de 7.0. Para los estudios de evaluación de la electroporación mediante citometría de flujo tras los tratamientos con pulsos eléctricos de alto voltaje, la concentración celular se ajustó a 2×10^6 UFC/mL. Para la evaluación de la extracción de compuestos de levadura tras la aplicación de los tratamientos, la concentración se ajustó a 10^8 UFC/mL, correspondiente a una biomasa de 9,96 – 11,90 g de peso seco por litro.

3.2 Tratamiento de Pulsos Eléctricos de Alto Voltaje

Los tratamientos se realizaron utilizando un dispositivo comercial (Vitave, Praga, República Checa). El voltaje aplicado se monitorizó mediante una sonda de alto voltaje (P6015A, Tektronik, Wilsonville, Oregón, EE. UU.), mientras que la intensidad de corriente fue registrada con una sonda de corriente (HCT5514, Meatrol® Electrical, Shanghái, China), ambas conectadas a un osciloscopio (TDS 220, Tektronik). El experimento se llevó a cabo en una cámara de electrodos paralelos de titanio con una separación de 0,56 cm entre los electrodos, una longitud de 4,0 cm y un ancho de 0,5 cm. La suspensión de levadura se introdujo en la cámara mediante una bomba peristáltica (BVP, Ismatec, Wertheim, Alemania) con un caudal de $5,01 \pm 0,02$ L/h, que correspondió a un tiempo de residencia en la cámara de tratamiento de 0,81 s. La Figura 4 muestra un esquema del sistema experimental y el flujo del proceso.

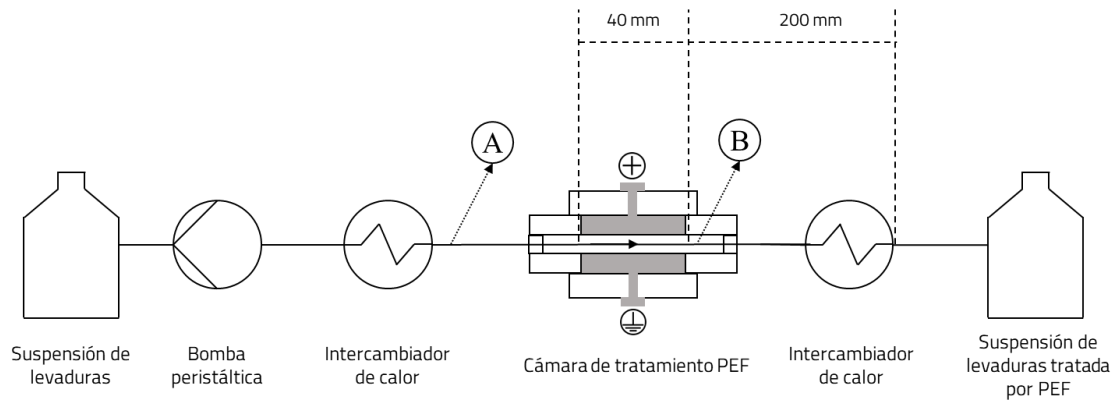


Figura 4: Representación esquemática del sistema de tratamiento con Pulsos Eléctricos de Alto Voltaje (PEF). Los puntos A y B indican la ubicación de termopares tipo K. Tiempo de residencia en la zona de tratamiento PEF: 0,81 segundos. Tiempo de residencia en la tubería desde la salida de la cámara de tratamiento hasta la salida del serpentín de enfriamiento: 1,26 segundos.

Para garantizar condiciones iniciales homogéneas, la suspensión de levadura se atemperó a una temperatura de $20,5 \pm 0,5$ °C mediante un serpentín sumergido en un baño termostático con agua a 20 °C, ubicado antes de la cámara de tratamiento. Tras la aplicación de los pulsos eléctricos de alto voltaje, la suspensión de levadura fue enfriada inmediatamente en un tiempo de 1,56 segundos, asegurando que la temperatura permaneciera por debajo de 25 °C. Este enfriamiento se llevó a cabo utilizando un segundo serpentín sumergido en un baño termostático con agua a $1,0 \pm 0,5$ °C. La temperatura se monitorizó en dos zonas del sistema: inmediatamente antes de la cámara de tratamiento y a 0,5 cm después de la misma, registrando la temperatura de salida tras la aplicación de PEF mediante termopares tipo K.

Para evaluar el efecto del tratamiento con PEF en la electroporación, se aplicaron campos eléctricos en un rango de 10 a 20 kV/cm. La frecuencia de aplicación de los pulsos de onda cuadrada, con una anchura de 5 μ s, se ajustó para alcanzar una energía total específica comprendida entre $19,1 \pm 3,1$ y $105,9 \pm 1,7$ kJ/kg, correspondiente a una temperatura de salida, medida con una sonda termopar K ubicada en la salida de la cámara, de entre $24,6 \pm 0,7$ y $45,3 \pm 0,4$ °C. Los parámetros del proceso utilizados en la evaluación del grado de electroporación tras los tratamientos con PEF se detallan en la Tabla 1.

Tabla 1: Condiciones de tratamiento aplicadas en los tratamientos PEF.

Intensidad del Campo Eléctrico (kV/cm)	Frecuencia (Hz)	Número de Pulsos	Tiempo de Tratamiento (μ s)	Energía Específica Total (kJ/kg)	Temperatura de Salida ($^{\circ}$ C)
10	28	21	105	19,1 \pm 3,1	24,6 \pm 0,7
	52	42	210	43,1 \pm 1,4	30,3 \pm 0,3
	70	63	315	63,1 \pm 1,8	35,1 \pm 0,5
	90	84	420	83,7 \pm 1,3	40,0 \pm 0,3
	108	105	525	105,7 \pm 2,7	45,3 \pm 0,64
15	13	10	50	20,9 \pm 0,7	25,0 \pm 0,2
	24	19	95	41,8 \pm 0,7	30,1 \pm 0,2
	34	28	140	62,8 \pm 1,0	35,0 \pm 0,2
	43	38	190	84,0 \pm 1,6	40,1 \pm 0,4
	54	47	235	105,4 \pm 3,5	45,2 \pm 0,8
20	8	6	30	20,7 \pm 1,4	25,0 \pm 0,3
	15	11	55	42,9 \pm 1,1	30,3 \pm 0,3
	20	16	80	63,1 \pm 2,2	35,1 \pm 0,5
	26	21	105	84,8 \pm 1,3	40,3 \pm 0,3
	32	27	135	105,9 \pm 1,7	45,3 \pm 0,4

3.3 Análisis de la electroporación mediante citometría de flujo

La citometría de flujo se utilizó para evaluar el grado de permeabilización de las células de *S. cerevisiae* después del tratamiento con PEF, midiendo la captación del fluorocromo yoduro de propidio (PI) (Sigma-Aldrich, Barcelona, España).

Tras la aplicación de PEF, se tomaron 450 μ L de la suspensión de levadura ajustada a una concentración de 2×10^6 UFC/mL. Para la tinción, se añadieron 50 μ L de una solución de PI (0,01 mg/mL), incubando la mezcla en oscuridad durante 10 minutos. Esta concentración y tiempo de incubación fueron seleccionados con base en estudios preliminares, asegurando una tinción adecuada sin saturación.

A continuación, la suspensión se centrifugó a $6000 \times g$ durante 2 minutos y el pellet obtenido se resuspendió en 500 μ L de tampón fosfato-salino (PBS, pH 7.4, Sigma-Aldrich, Barcelona, España) previamente filtrado (0,1 μ m). La muestra fue homogenizada mediante vórtex durante 6 segundos y, posteriormente, 300 μ L de la suspensión fueron transferidos a una placa de 96 pocillos para su análisis en citometría de flujo.

Para cada análisis, se incluyeron tanto blancos como controles con el objetivo de garantizar la correcta interpretación de los resultados. Como blancos de muestra, se utilizó una suspensión de levadura sin teñir, lo que permitió establecer el nivel basal de fluorescencia de las células no teñidas con PI. Por otro lado, el control consistió en una suspensión de levadura teñida con PI, pero no sometida al tratamiento con pulsos eléctricos de alto voltaje. Este control permitió definir el umbral de fluorescencia correspondiente a las células permeabilizadas en ausencia del tratamiento PEF.

El análisis se llevó a cabo en un citómetro de flujo Guava® easyCyte™ (Luminex®, Tokio, Japón), utilizando un láser de excitación a 488 nm y detectando la fluorescencia de PI mediante un filtro RED-B (695/50 nm). La adquisición y procesamiento de datos se realizó con el software guavaSoft, versión 4.5.25.

Para cada muestra, se registraron 5000 eventos por réplica, realizando dos réplicas por muestra. El flujo de adquisición se fijó en 0,59 $\mu\text{L/s}$. Se estableció un umbral de fluorescencia para el canal RED-B, basado en el control negativo, permitiendo diferenciar entre células teñidas y no teñidas. Finalmente, el porcentaje de células PI-positivas, indicativo de permeabilización de membrana, se calculó dividiendo el número de eventos PI-positivos entre el total de eventos registrados.

3.4 Monitorización de la liberación de compuestos de levaduras

Para evaluar la extracción de compuestos de levadura tras la aplicación de los tratamientos PEF, las suspensiones tratadas se incubaron a 25 ° C, y la liberación de compuestos se analizó tras 1, 6 y 24 horas de incubación. En cada punto temporal, las muestras fueron centrifugadas a 6000 $\times g$ durante 10 minutos, y en los sobrenadantes obtenidos se cuantificaron las concentraciones de glutatión, aminoácidos, péptidos y proteínas.

La concentración total de estos compuestos en las diferentes cepas de levadura se determinó mediante un proceso de disrupción celular utilizando un molino de perlas (BioSpec Products; Bartlesville, EE. UU.), siguiendo el protocolo descrito por Berzosa et al. (2023). Para ello, se mezclaron 1,5 mL de la suspensión de levadura con perlas de vidrio de 0,5 mm de diámetro, en una proporción 1:5 en peso. La eficiencia del proceso de disrupción mecánica se monitoreó mediante observaciones microscópicas (Eclipse E400; Nikon, Tokio, Japón) y recuentos con cámara de Thoma.

Dependiendo de la cepa, se aplicó un número determinado de ciclos de 70 segundos, con el objetivo de alcanzar un 90% de destrucción de la población celular y permitir la liberación completa de compuestos intracelulares. Entre ciclos, las muestras fueron enfriadas en un baño de agua con hielo para minimizar el calentamiento por fricción. Finalmente, las suspensiones se centrifugaron a 6000 $\times g$ durante 10 minutos para recuperar los sobrenadantes, en los cuales se determinó la concentración total de los compuestos liberados.

3.5 Métodos analíticos

3.5.1 Glutatión reducido

La cuantificación del glutatión reducido (GSH) se realizó mediante un ensayo colorimétrico basado en el método de Rahman et al. (2007), con modificaciones. La reacción se llevó a cabo utilizando ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzoico) (DTNB) (Thermo Fisher Scientific™), el cual forma un complejo coloreado con los grupos tiol del glutatión, permitiendo su detección espectrofotométrica.

Para la preparación del reactivo, se disolvió una pastilla de tampón fosfato-salino (PBS) en 200 mL de agua destilada, añadiendo posteriormente 0,327 g de ácido etilendiaminotetracético (EDTA) (Sigma-Aldrich) para prevenir la oxidación del glutatión. De manera independiente, se preparó la solución de DTNB al 0,4% en el tampón PBS previamente elaborado.

El ensayo se llevó a cabo en cubetas de 1 cm de paso óptico, mezclando 960 μ L de tampón PBS-EDTA, 20 μ L de muestra sin diluir y 20 μ L de DTNB al 0,4%. La absorbancia de la reacción se midió a 412 nm en un espectrofotómetro tras 2, 6 y 10 minutos de incubación.

Las concentraciones de glutatión en las muestras se calcularon a partir de una curva estándar construida con L-glutatión reducido (Sigma-Aldrich), en un rango de concentración de 3,9 a 2000 μ g/mL. Los resultados se expresaron como g de glutatión reducido por 100 g de peso seco.

3.5.2 Aminoácidos

La concentración de aminoácidos se determinó mediante el método de la ninhidrina, siguiendo un procedimiento basado en Dimopoulos et al. (2018) con algunas modificaciones. Este método se fundamenta en la reacción de la ninhidrina con los grupos amino libres, generando un complejo coloreado cuya intensidad es proporcional a la cantidad de aminoácidos presentes en la muestra.

Para la preparación del reactivo, se siguió el protocolo descrito por Sun et al. (2006). Se disolvieron 2 g de ninhidrina (Sigma-Aldrich; Missouri, EE. UU.) y 0,3 g de hidrantina (Sigma-Aldrich) en 75 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich). Posteriormente, se añadieron 25 mL de tampón acetato de litio (4 M, pH 5,2) para completar la solución. Este reactivo se preparó el mismo día del análisis y se mantuvo refrigerado y protegido de la luz hasta su uso.

El ensayo se realizó mezclando 500 μ L del extracto de levadura diluido con 250 μ L de la solución de ninhidrina, incubando la mezcla a 100 °C durante 15 minutos en un termobloque (Serie Mixer, HeraScience; Madrid, España). Tras la incubación, la reacción se detuvo enfriando rápidamente la muestra en un baño de agua helada durante 5 minutos. Posteriormente, se añadieron 1,25 mL de una solución de parada, compuesta por 0,2% de KIO₃ (Sigma-Aldrich) en etanol al 40%, para estabilizar el color de la reacción.

La absorbancia se midió a 570 nm utilizando un espectrofotómetro, empleando como blanco una muestra preparada con agua destilada en lugar del extracto de levadura. Para la cuantificación, se construyó una curva de calibración utilizando glicina (Sigma-Aldrich) en un rango de concentración de 0 a 0,04 mg/mL. Los resultados se expresaron como g de equivalentes de glicina por 100 g de peso seco.

3.5.3 Proteínas

La concentración de proteínas en las muestras se cuantificó utilizando el kit comercial Pierce™ BCA Protein Assay (Thermo Fisher Scientific™, Rockford, EE. UU.), basado en la reacción del ácido bicinconírico (BCA) con los grupos funcionales de las proteínas, formando un complejo coloreado cuya intensidad es proporcional a la concentración proteica.

Para la preparación del reactivo de trabajo (WR), se mezclaron los reactivos A y B del kit en una proporción de 50:1, siguiendo las indicaciones del fabricante. Esta solución se mantuvo protegida de la luz hasta su uso.

El análisis se llevó a cabo en una placa de 96 pocillos, añadiendo 25 μ L de muestra diluida y 200 μ L del reactivo de trabajo en cada pocillo. Posteriormente, la placa se incubó a 37 °C durante 30 minutos para permitir el desarrollo de la reacción. La absorbancia se midió a 562 nm utilizando un lector de placas CLARIOstar (BMG LABTECH; Ortenberg, Alemania).

Para la cuantificación, se construyó una curva estándar empleando albúmina de suero bovino (BSA, Sigma-Aldrich) en un rango de concentración de 0,06 a 2 mg/mL. Los resultados se expresaron como g de equivalentes de albúmina por 100 g de peso seco.

3.5.4 Péptidos

Para la cuantificación de péptidos (proteínas con un peso molecular inferior a 3 kDa), los sobrenadantes previamente obtenidos fueron sometidos a un proceso de ultrafiltración. Este procedimiento se llevó a cabo utilizando filtros centrífugos Amicon® Ultra, 3 kDa MWCO (Merck, Darmstadt, Alemania), con el objetivo de separar los fragmentos peptídicos de mayor tamaño.

La ultrafiltración se realizó mediante centrifugación a 12.000 $\times g$ durante 30 minutos a 4 °C, permitiendo la obtención de filtrados que contenían los péptidos con un peso molecular inferior a 3 kDa. La fracción retenida en el filtro fue descartada, mientras que los filtrados fueron recogidos y analizados para determinar su contenido peptídico.

La cuantificación de los péptidos en los filtrados se llevó a cabo utilizando el kit Pierce™ BCA Protein Assay, siguiendo el procedimiento descrito en la sección 3.5.3. Los resultados se expresaron como gramos de péptidos por cada 100 gramos de peso seco.

3.5.5 Solubilidad de proteínas

Para evaluar el efecto de los tratamientos PEF en la solubilidad de las proteínas, las suspensiones de levadura fueron sometidas a un proceso de disrupción completa utilizando un molino de perlas, asegurando la liberación total del contenido intracelular.

Tras el tratamiento con el molino de perlas, las muestras fueron centrifugadas a 6000 $\times g$ durante 10 minutos, y la concentración de proteínas en los sobrenadantes fue determinada mediante el método BCA, siguiendo el procedimiento descrito en la sección 3.5.3.

La diferencia en la concentración de proteínas entre las células tratadas con PEF y las células control (no expuestas al tratamiento PEF, pero procesadas con el molino de perlas) se atribuyó a fenómenos de desnaturalización proteica inducidos por el tratamiento con pulsos eléctricos de alto voltaje.

3.6 Tratamiento estadístico de los resultados

Los datos obtenidos se expresaron como media \pm desviación estándar, calculada a partir de al menos tres determinaciones independientes realizadas en dos experimentos distintos.

Para evaluar la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre los grupos, se aplicó un análisis de varianza de una vía (ANOVA), seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey. El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando el software GraphPad Prism 9.3.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, California, EE. UU.), considerando un nivel de significancia de $p < 0.05$.

Las figuras fueron generadas con GraphPad Prism 9.3.0, mientras que la construcción de histogramas se realizó utilizando la herramienta en línea Floreada.io (<https://floreada.io/>, accedido en enero de 2025).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Electroporación de distintas cepas de levadura

La respuesta de las diferentes cepas al tratamiento con pulsos eléctricos se observa en la Figura 5. Se evaluó el porcentaje de electroporación de las levaduras tras someterlas a tratamientos PEF de distinta intensidad de campo eléctrico y energía específicas. La electroporación se analizó mediante citometría de flujo tras la tinción de la suspensión de levaduras con yoduro de propidio después de 1 y 24 h.

Se observaron diferencias claras en la susceptibilidad de las cepas al tratamiento con pulsos eléctricos. *S. cerevisiae* S-04 mostró una alta sensibilidad a la electroporación, alcanzando niveles de permeabilización superiores al 90% incluso a las intensidades de campo y energías específicas más bajas de las estudiadas (10 kV/cm y 19,09 kJ/kg, respectivamente). Esto indica una alta susceptibilidad de su membrana citoplasmática a la electroporación. Sin embargo, 24 horas después de los tratamientos, se observó que un 17% de la población de levaduras cerraban los poros, lo que indica cierto grado de electroporación reversible para esta cepa tras aplicar el tratamiento.

Por su parte, *S. cerevisiae* S-23 presentó un comportamiento similar, con una alta permeabilización inicial, aunque con una mayor capacidad de recuperación de la electroporación tras 24 h en comparación con la cepa *S. cerevisiae* S-04. Esto sugiere diferencias en los mecanismos de reparación celular entre ambas cepas, posiblemente relacionadas con variaciones en la composición de la membrana (Stanley et al., 2010).

Por otro lado, *S. cerevisiae* HA-18 mostró una mayor resistencia a los tratamientos PEF. Fue necesario llegar a niveles de 63,12 kJ/kg para electroporar el 90% de la población de levaduras con campos eléctricos de 15 y 20 kV/cm, o de 83,74 kJ/kg para conseguir el mismo efecto a 10 kV/cm. Además, esta cepa presentó un grado de recuperación de la electroporación similar a la cepa *S. cerevisiae* S-23. Esta menor sensibilidad podría estar asociada a una estructura de la pared más robusta, posiblemente relacionada con su uso en la producción de cervezas de alto contenido alcohólico, donde las células deben ser capaces de seguir fermentado el mosto a concentraciones elevadas de etanol (Saini et al., 2018).

Finalmente, *Kluyveromyces lactis*, una levadura que no se utiliza para la producción de cerveza pero que se incluyó en el estudio a efectos comparativos resultó ser la cepa más resistente a la electroporación, mostrando una baja permeabilización en todas las condiciones evaluadas. Además, no se observó ninguna recuperación de la electroporación a las 24 horas, independientemente de las condiciones de tratamiento estudiadas. Esta mayor resistencia al tratamiento podría ser debido a su tamaño celular, dado que *K. lactis* (3-5 μm) (Kämpfer, 2014) es significativamente más pequeña que las cepas de *S. cerevisiae* (5-10 μm) (Chavez et al., 2024). Es bien conocido que cuanto menor es el

tamaño de las células mayor es la intensidad del campo eléctrico crítico que se requiere para que se manifieste la electroporación (Agarwal et al., 2007). En este caso, la falta de recuperación celular observada podría estar asociada a una menor grosor de la pared celular, lo que impediría que la membrana citoplasmática recupere su integridad y revierta la formación de poros tras la aplicación del tratamiento (Ganeva et al., 2014).

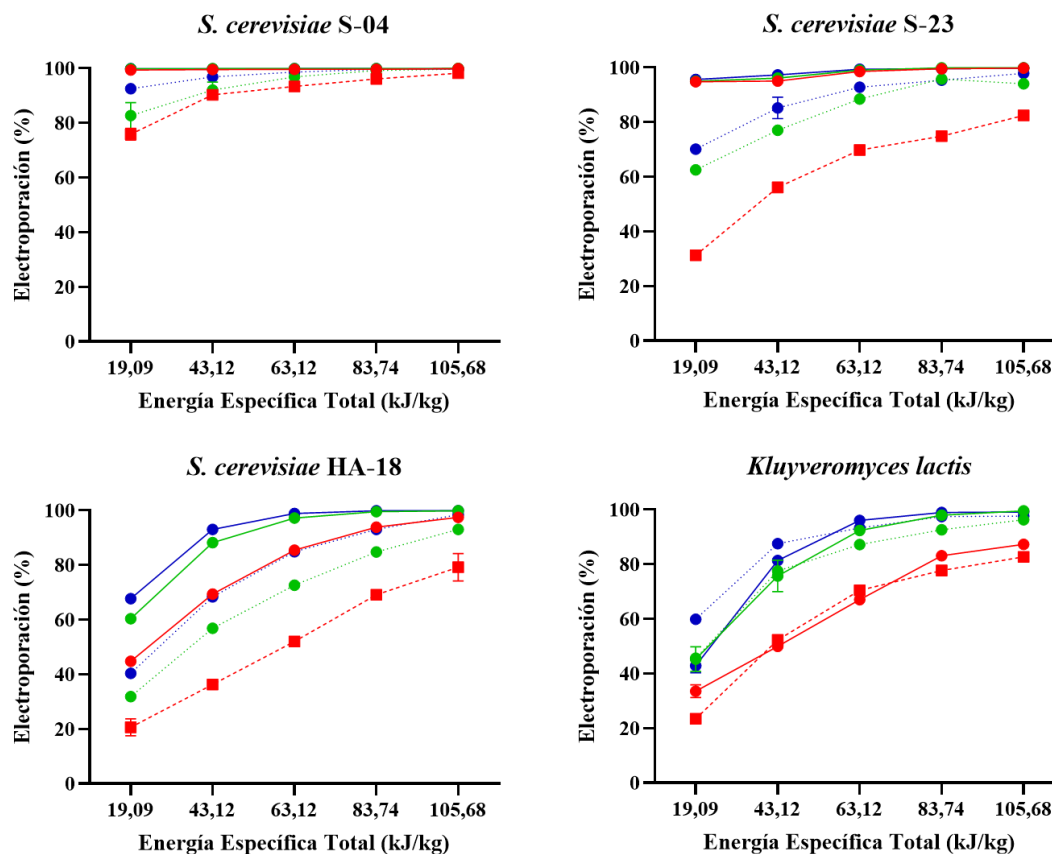


Figura 5: Porcentaje de electroporación de las células de levadura tras el tratamiento con pulsos eléctricos a diferentes intensidades de campo eléctrico (●) 10 kV/cm, (●) 15 kV/cm, (●) 20 kV/cm en función de la energía específica total. La permeabilización celular se determinó por tinción con yoduro de propidio tras 1 hora (línea continua) y 24 horas (línea discontinua) del tratamiento.

El campo eléctrico afectó el nivel de electroporación en todas las cepas estudiadas, observándose un mayor porcentaje de permeabilización cuando se aplicaban campos eléctricos más intensos para una misma energía específica. Con objeto de evaluar la influencia de la intensidad de los tratamientos PEF (campo eléctrico y energía específica) en el grado de electroporación se analizaron los histogramas que muestran como se distribuye la intensidad de la fluorescencia emitida por las células electroporadas. A modo de ejemplo, la Figura 6 muestra el histograma de fluorescencia correspondiente a la cepa *S. cerevisiae* S-04. El comportamiento de esta cepa es similar al del observado en el resto de las cepas estudiadas por lo que se obvia su presentación.

Valores de fluorescencia mayores a los de la población control, es decir, un desplazamiento de la población celular hacia la derecha, indica que las levaduras han sido teñidas con YP y, por lo tanto, están electroporadas. Para una misma intensidad de campo eléctrico, se observó que los histogramas se desplazaban hacia la derecha al aumentar la energía específica. Esta observación indica que la intensidad de fluorescencia emitida era mayor como consecuencia de un mayor grado de permeabilización debido un mayor número o tamaño de los poros en la membrana.

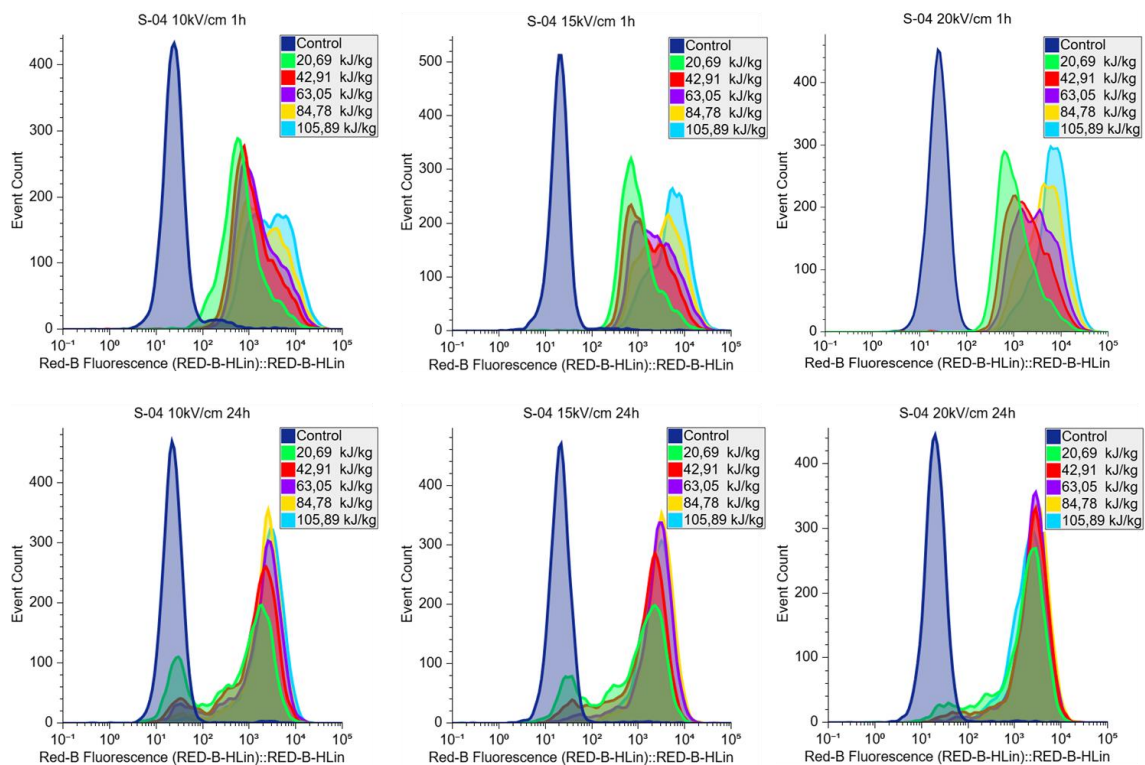


Figura 6: Histograma de intensidad de fluorescencia de células de *S. cerevisiae* S-04 tratadas con PEF a diferentes intensidades de campo eléctrico y distintas energías específicas, tras la tinción con yoduro de propidio 1 y 24 horas después del tratamiento.

La Figura 6 muestra que, tras 1 hora de aplicar el tratamiento, el campo eléctrico influyó en el grado de electroporación. A igualdad de energía específica total, una mayor intensidad del campo eléctrico provocó que los histogramas se fueran desplazando hacia la derecha lo que indicaba una mayor intensidad de fluorescencia.

Tras 24 horas de incubación, se observó que la mayoría de la población permaneció electroporada emitiendo una la fluorescencia más elevada independientemente del tratamiento aplicado. Sin embargo, una fracción de la población celular, cuya proporción variaba según la cepa, presentó niveles de fluorescencia similares a los de la población control, lo que indica que estas células revirtieron el efecto de la electroporación y recuperaron la integridad de su membrana.

La resistencia a la electroporación está determinada, en gran medida, por la cepa de levadura utilizada y sus características estructurales, incluyendo la morfología celular y la composición de la

pared celular. En general, cepas con células más pequeñas y estructuras celulares más resistentes, como *K. lactis*, presentan una menor susceptibilidad a la electroporación, mientras que cepas con células de mayor tamaño y paredes más permeables, como *S. cerevisiae* S-04, son más fácilmente electroporadas. Sin embargo, estas últimas también muestran una mayor capacidad de recuperación tras el tratamiento. Estos resultados tienen implicaciones relevantes en aplicaciones industriales, donde la resistencia y la reversibilidad de la electroporación pueden influir en la eficiencia y el rendimiento de procesos como la extracción de compuestos intracelulares.

4.2 Composición de las cepas de levadura

Una vez evaluada la electroporación de las distintas cepas de levadura, se determinó la concentración de los principales compuestos intracelulares de interés en las distintas cepas de levadura. La Tabla 2 muestra la cantidad total de glutatión, aminoácidos y proteínas presentes en cada una de las cuatro cepas analizadas tras completa liberación mediante la ruptura con un molino de perlas.

Tabla 2: Contenido total de glutatión, aminoácidos y proteínas (g/100 g de materia seca) en las distintas cepas de levadura tras su completa disrupción con el molino de perlas. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas en los valores de extracción ($p < 0,05$).

Cepa	Glutatión (g/100g materia seca)	Aminoácidos (g/100g materia seca)	Proteínas (g/100g materia seca)
<i>S. cerevisiae</i> S-04	1,04 ± 0,01 ^b	7,64 ± 0,79 ^b	51,77 ± 1,96 ^{ab}
<i>S. cerevisiae</i> S-23	0,26 ± 0,21 ^a	4,85 ± 0,26 ^a	43,99 ± 9,69 ^a
<i>S. cerevisiae</i> HA-18	1,18 ± 0,02 ^b	6,84 ± 0,03 ^b	58,91 ± 1,42 ^b
<i>K. lactis</i>	0,51 ± 0,02 ^b	7,40 ± 0,53 ^b	47,09 ± 2,45 ^{ab}

El glutatión es un tripéptido compuesto por L-glutamato, L-cisteína y glicina, sintetizado en el citoplasma, donde desempeña un papel clave en la defensa celular frente al estrés oxidativo, la detoxificación y el mantenimiento del equilibrio redox (S. C. Lu, 2009). Su forma reducida posee una elevada capacidad antioxidante, considerándose uno de los principales antioxidantes celulares (Schmacht et al., 2017). En este estudio, *S. cerevisiae* S-04 y *S. cerevisiae* HA-18 presentaron los valores más elevados de glutatión, lo que sugiere que los extractos obtenidos a partir de estas cepas podrían tener una mayor capacidad antioxidante (Bahut et al., 2020). En contraste, *S. cerevisiae*

S-23 mostró la menor concentración de este compuesto, mientras que *K. lactis* presentó un contenido intermedio.

En cuanto al contenido de aminoácidos, *S. cerevisiae* S-04 fue la cepa más rica en estos compuestos, seguida de *K. lactis*, lo que podría indicar diferencias en su metabolismo y en la acumulación de precursores nitrogenados. *S. cerevisiae* HA-18 mostró niveles ligeramente inferiores, mientras que *S. cerevisiae* S-23 se caracterizó por presentar la menor concentración de aminoácidos, lo que sugiere un perfil metabólico menos orientado a la síntesis o acumulación de estos compuestos.

Respecto al contenido total de proteínas, *S. cerevisiae* HA-18 destacó con la concentración más alta, lo que podría estar relacionado con una mayor actividad biosintética o un metabolismo más orientado a la producción de macromoléculas. *S. cerevisiae* S-04 presentó el segundo valor más elevado, mientras que *K. lactis* mostró un contenido intermedio. Nuevamente, *S. cerevisiae* S-23 se posicionó como la cepa con la menor concentración de proteínas, reflejando un perfil de composición menos enriquecido en comparación con las demás cepas analizadas.

En conjunto, estos resultados evidencian la diversidad bioquímica entre las cepas de levadura estudiadas. *S. cerevisiae* S-04 se distingue por su alto contenido de aminoácidos y glutatión, lo que sugiere un perfil metabólico enriquecido en compuestos nitrogenados y antioxidantes. *S. cerevisiae* HA-18, por su parte, presenta la mayor cantidad de proteínas, lo que podría estar relacionado con una mayor producción de enzimas u otras macromoléculas. *K. lactis* muestra una composición equilibrada, con valores intermedios en todas las categorías analizadas. Finalmente, *S. cerevisiae* S-23 es la cepa con los niveles más bajos de los compuestos evaluados, lo que sugiere una menor acumulación de estos metabolitos intracelulares.

Estas diferencias en la composición intracelular podrían influir en la eficiencia de la extracción de compuestos mediante PEF y en la aplicación de los extractos obtenidos de cada cepa.

4.3 Extracción de compuestos intracelulares de levadura tras el tratamiento PEF

A partir de los resultados de electroporación obtenidos para las cuatro cepas de levadura tras los tratamientos PEF (Figura 5), se establecieron tres criterios para seleccionar las condiciones óptimas que facilitarían la extracción de compuestos intracelulares. Como umbral, se consideró un 90% de electroporación, ya que representa la electroporación de prácticamente la totalidad de la población. Estudios previos muestran que a por encima de este umbral no se observa mejoras significativas en la extracción (Berzosa et al., 2023).

El primer criterio de selección fue identificar el tratamiento menos intenso capaz de alcanzar un 90% de electroporación tras 1 hora de incubación. El segundo criterio correspondió al tratamiento menos intenso que lograra mantener irreversiblemente electroporada al 90% de la población tras 24

horas. Como último criterio, se seleccionó el tratamiento más intenso dentro de los estudiados, con el objetivo de analizar si un mayor grado de electroporación (Figura 6) se traduce en una mayor extracción de compuestos intracelulares (Saulis & Saule, 2012).

En el caso de *S. cerevisiae* HA-18, únicamente se seleccionaron dos tratamientos, ya que dos de los criterios definidos coincidieron en esta cepa.

Las condiciones de tratamiento seleccionadas para cada cepa en función de estos criterios se presentan en la Tabla 3.

Tabla 3: Condiciones de tratamiento PEF seleccionadas para la extracción de compuestos intracelulares en cada cepa de levadura. Se establecieron tres criterios de selección: (i) el tratamiento menos intenso que alcanzara un 90% de electroporación tras 1 hora, (ii) el tratamiento menos intenso que mantuviera irreversiblemente electroporada al 90% de la población tras 24 horas, y (iii) el tratamiento más intenso evaluado.

Cepa	Campo eléctrico (kV/cm)	Energía total específica (kJ/kg)
<i>S. cerevisiae</i> S-04	10	19,1 ± 3,1
	20	63,1 ± 2,2
	20	105,6 ± 1,7
<i>S. cerevisiae</i> S-23	10	19,1 ± 3,1
	20	63,5 ± 2,2
	20	105,9 ± 1,7
<i>S. cerevisiae</i> HA-18	15	62,8 ± 1,0
	20	105,9 ± 1,7
<i>K. lactis</i>	15	62,8 ± 1,0
	20	63,1 ± 2,2
	20	105,9 ± 1,7

4.3.1 Glutación

La extracción de glutatión de las distintas cepas de levadura tras la aplicación de los tratamientos PEF se muestra en la Figura 7, siguiendo los criterios de selección descritos en la Tabla 3. Como referencia, también se incluye la extracción total obtenida tras la ruptura completa de las células con el molino de perlas.

En cuanto a las cepas *S. cerevisiae* S-04, *S. cerevisiae* S-23 y *K. lactis*, la liberación de glutatión fue rápida y alcanzó niveles estables desde los primeros tiempos de incubación, sin variaciones significativas al prolongarlo. Esto indica que el proceso de recuperación celular posterior a la

electroporación no influye en la liberación de este compuesto, lo que sugiere que, una vez generados los poros en la membrana citoplasmática, el glutatión se libera de manera inmediata.

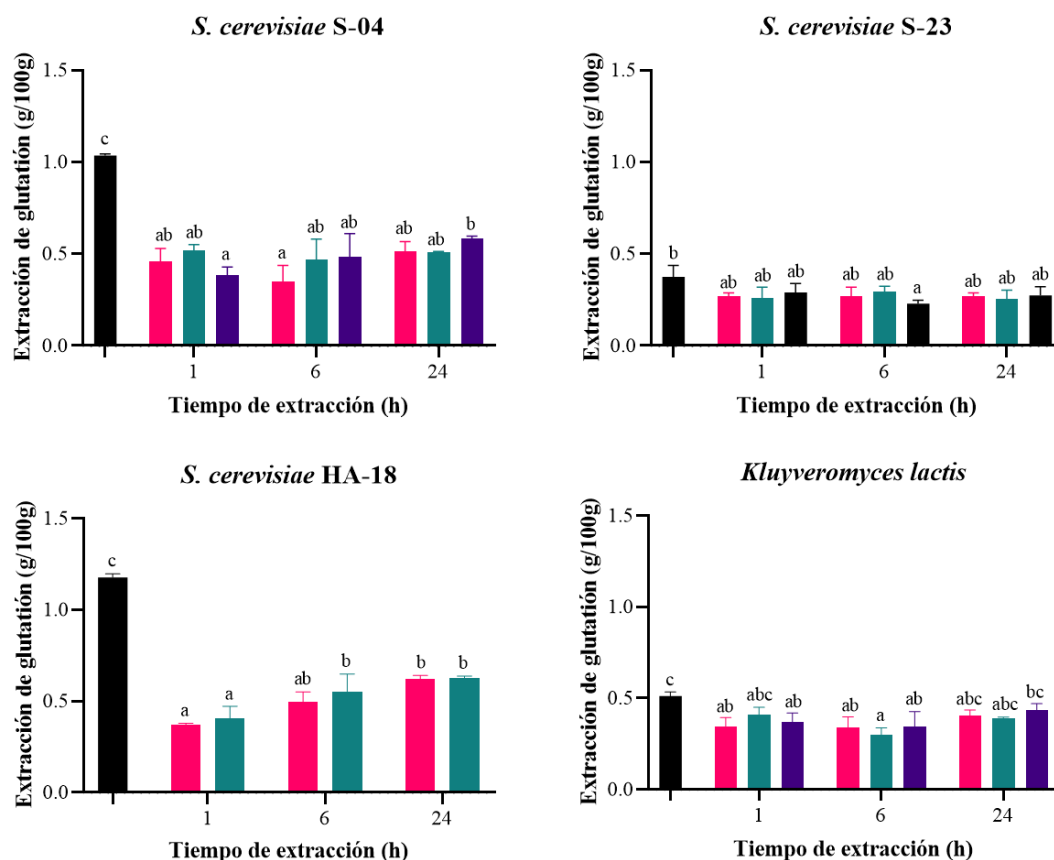


Figura 7: Extracción de glutatión de las células de levadura tratadas con PEF a lo largo del tiempo de incubación a 25 °C. (●) Tratamiento menos intenso que alcanzó un 90% de electroporación tras 1 hora, (●) tratamiento menos intenso que mantuvo irreversiblemente electroporado al 90% de la población tras 24 horas, (●) tratamiento más intenso evaluado. (●) Extracción total obtenida tras la ruptura con molino de perlas. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas en los valores de extracción ($p < 0,05$).

Dado su pequeño peso molecular (~0,3 kDa), el glutatión debería difundirse fácilmente a través de los poros formados en la membrana celular tras la electroporación. Sin embargo, los resultados muestran que no se alcanza una liberación completa del glutatión intracelular. Esto sugiere que este compuesto no se encuentra exclusivamente en el citosol, sino que podría estar almacenado en compartimentos subcelulares o formando asociaciones con otras biomoléculas, lo que dificultaría su total extracción. Estudios previos han mostrado que el glutatión puede localizarse en vacuolas y mitocondrias o estar conjugado con otros compuestos intracelulares, lo que explicaría su retención en estas estructuras tras la aplicación del tratamiento PEF (Marín-Sánchez et al., 2024)

Por otro lado, la cepa *S. cerevisiae* HA-18 presentó un comportamiento diferente, con una liberación progresiva de glutatión hasta las 6 horas de incubación. Este patrón sugiere que en la cepa *S. cerevisiae* HA-18, el glutatión podría encontrarse en compartimentos celulares, como vacuolas, de liberación más lenta en comparación con el resto de cepas lo que retrasaría su salida al exterior celular.

Los resultados también indican que los tratamientos menos intensos fueron suficientes para la extracción de glutatión, lo que sugiere que, siempre que se logre la electroporación de la mayor parte de la población celular, el aumento de la intensidad del tratamiento no mejora la eficiencia de extracción. Además, prolongar el tiempo de incubación tras la aplicación del tratamiento PEF no produjo un incremento significativo en la cantidad de glutatión liberado.

4.3.2 Aminoácidos

La Figura 8 muestra la extracción de aminoácidos a lo largo del tiempo de incubación tras la aplicación de los tratamientos PEF en las distintas cepas de levadura.

Tras 6 horas de incubación, en *S. cerevisiae* S-04 y *S. cerevisiae* S-23 la concentración de aminoácidos alcanzó niveles comparables a los obtenidos tras la completa ruptura de las células con el molino de perlas. Sin embargo, después de 24 horas, se observó un incremento adicional en la concentración de aminoácidos, superando incluso los valores obtenidos en la extracción total. Este fenómeno se atribuye a la hidrólisis proteica mediada por proteasas endógenas liberadas desde las vacuolas de la levadura, que hidrolizan proteínas intracelulares y generan aminoácidos adicionales en el medio de extracción (Canelli et al., 2022; Maza et al., 2020). Esto sugiere que, con el paso del tiempo, las células electroporadas no solo liberan su contenido intracelular, sino que también pueden sufrir procesos de degradación proteica que aumentan la concentración de aminoácidos en el medio.

Por otro lado, en *S. cerevisiae* HA-18 y *K. lactis*, este aumento en la concentración de aminoácidos fue menos pronunciado. De hecho, bajo ninguna de las condiciones de tratamiento con PEF se superó la cantidad de aminoácidos totales determinado con el molino de perlas.

Al igual que en el caso del glutatión, los aminoácidos no fueron completamente liberados al inicio del proceso de extracción tras el tratamiento PEF. A pesar de tratarse de moléculas pequeñas que deberían difundirse rápidamente al medio extracelular una vez electroporadas las células, parte de estos compuestos de bajo peso molecular podrían encontrarse almacenados en compartimentos celulares, como las vacuolas, lo que retrasaría su liberación inmediata (Kawano-Kawada et al., 2018).

En las cepas de *S. cerevisiae*, se observó tras 24 horas de incubación que el tratamiento más intenso resultó ser menos eficaz para la extracción de aminoácidos. Es posible que en cierta medida las proteasas responsables de la hidrólisis de las proteínas se hubieran visto afectadas por los tratamientos PEF de mayor intensidad (Bendicho et al., 2003; Vega-Mercado et al., 2019). Diferentes autores han indicado que los tratamientos PEF pueden inducir cambios conformacionales en las proteínas, lo que podrían afectar a la actividad de las enzimas implicadas en la proteólisis (Li et al., 2022; C. Lu et al., 2022).

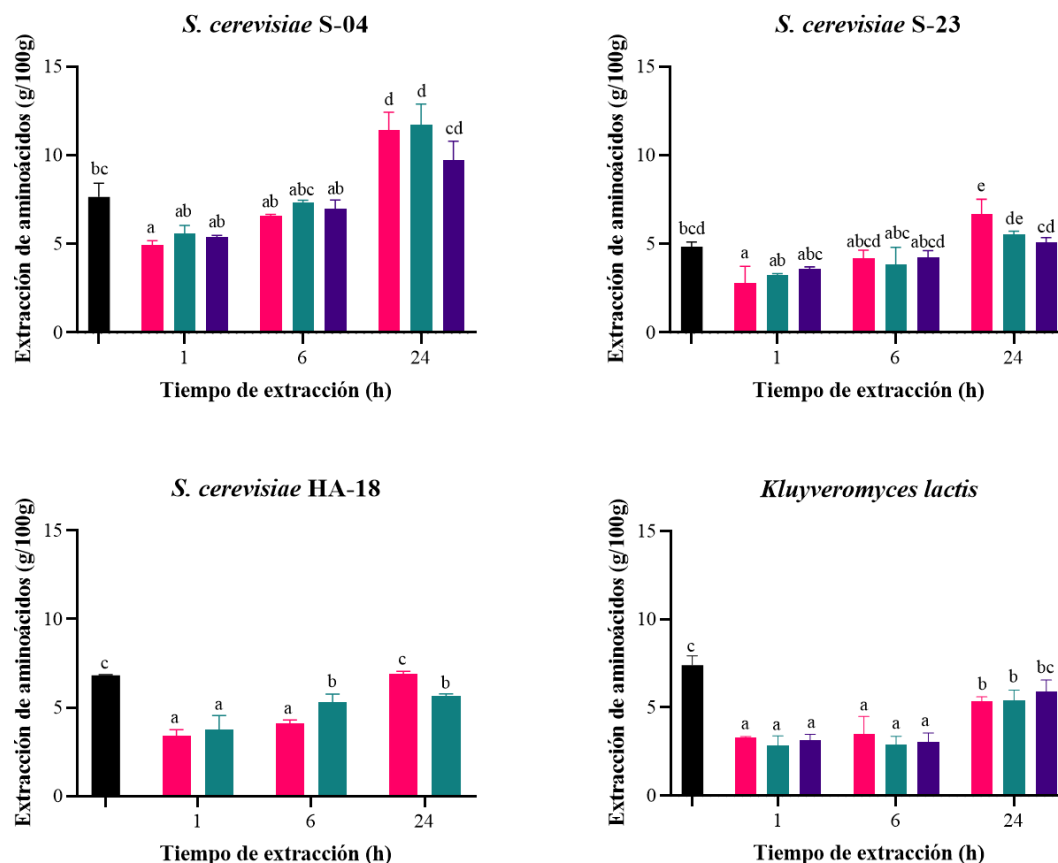


Figura 8: Extracción de aminoácidos de las células de levadura tratadas con PEF a lo largo del tiempo de incubación a 25 °C. (●) Tratamiento menos intenso que alcanzó un 90% de electroporación tras 1 hora, (●) tratamiento menos intenso que mantuvo irreversiblemente electroporado al 90% de la población tras 24 horas, (●) tratamiento más intenso evaluado. (●) Extracción total obtenida tras la ruptura con molino de perlas. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas en los valores de extracción ($p < 0,05$).

Estos resultados indican que un aumento en la intensidad del tratamiento no mejora la extracción de aminoácidos y, una vez superado un cierto umbral, puede incluso reducir su liberación, probablemente debido a la desnaturalización de proteasas endógenas responsables de la hidrólisis de proteínas. Además, tanto la cantidad inicial de aminoácidos como la actividad proteolítica dependen de cada cepa.

4.3.3 Proteínas

La Figura 9 muestra la extracción de proteínas totales y de proteínas con un peso molecular inferior a 3 kDa en las distintas cepas de levadura tras la aplicación de los tratamientos PEF.

En todas las cepas analizadas, la extracción inicial de proteínas fue baja durante la primera hora de incubación tras la aplicación del tratamiento. De hecho, en este periodo únicamente se liberaron las proteínas de menor tamaño (<3 kDa), lo que indica que, en los primeros momentos, solo las proteínas citoplasmáticas más pequeñas lograron atravesar la membrana celular electroporada. Además, en esta fase inicial no se encontraron diferencias significativas entre los distintos tratamientos.

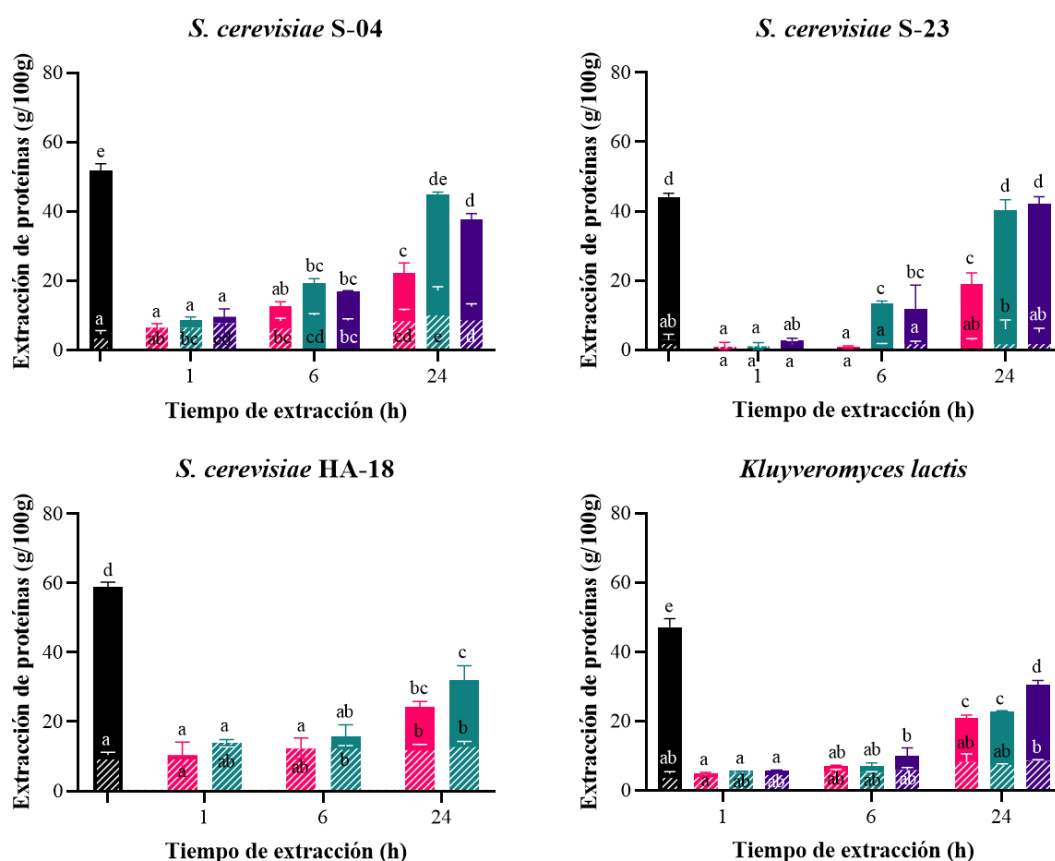


Figura 9: Extracción de proteínas de las células de levadura tratadas con PEF a lo largo del tiempo de incubación a 25 °C. (●) Tratamiento menos intenso que alcanzó un 90% de electroporación tras 1 hora, (●) tratamiento menos intenso que mantuvo irreversiblemente electroporado al 90% de la población tras 24 horas, (●) tratamiento más intenso evaluado. (●) Extracción total obtenida tras la ruptura con molino de perlas. El área rayada en las barras representa las proteínas con un peso molecular inferior a 3 kDa. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas en los valores de extracción ($p < 0,05$).

A medida que se prolongó la incubación, se observó un incremento progresivo en la extracción de proteínas, lo que sugiere que, debido a su mayor peso molecular, las proteínas requieren tiempos más largos para atravesar la membrana citoplasmática. Este retraso en la liberación podría estar relacionado con la necesidad de que los poros aumenten su tamaño con el tiempo, permitiendo la salida de macromoléculas de mayor tamaño como las proteínas.

En el caso de *S. cerevisiae* S-04 y *S. cerevisiae* S-23, se encontraron diferencias notorias en la extracción de proteínas entre los distintos tratamientos. En ambas cepas, con el tratamiento menos intenso que mantuvo la membrana electroporada únicamente tras 1 hora se consiguió una extracción significativamente menor en comparación con los tratamientos de mayor intensidad. Esto sugiere que el proceso de recuperación de la membrana citoplasmática impidió la liberación de proteínas intracelulares de mayor tamaño, ya que estas requieren más tiempo para difundirse al medio extracelular. En cambio, en los tratamientos más intensos, donde la membrana permaneció

permeabilizada de manera irreversible tras 24 horas, el mayor grado de permeabilización observado en los histogramas (Figura 6) podría indicar un aumento progresivo en el tamaño de los poros, favoreciendo la liberación de proteínas a lo largo del tiempo.

Por otro lado, en *S. cerevisiae* HA-18, la extracción de proteínas fue notablemente inferior en comparación con las otras cepas de *S. cerevisiae*. En particular, en las primeras 6 horas de incubación apenas se liberaron proteínas con un peso molecular superior a 3 kDa, independientemente del tratamiento aplicado. Esto podría estar relacionado con la mayor resistencia de esta cepa, diseñada para la producción de cervezas de alto contenido alcohólico. El mayor grosor de la pared celular podría actuar como una barrera adicional que protege la membrana citoplasmática e impide la extracción de proteínas intracelulares. Además, en esta cepa apenas observaron diferencias en la liberación de proteínas entre los distintos tratamientos evaluados.

En el caso de *K. lactis*, donde no se observaba electroporación reversible, tras 24 h de incubación, el incremento de la intensidad de tratamiento apenas mejoró la extracción de proteínas (Figura 6).

En definitiva, tras 1 hora de incubación, la intensidad del tratamiento no tuvo un impacto significativo en la extracción de proteínas. No obstante, los rendimientos de extracción observados en este estudio son consistentes con los obtenidos por otros autores en estudios sobre la extracción de proteínas en levaduras y microalgas tratadas con PEF cuando se prolonga el tiempo de incubación. Por ejemplo, Scherer et al. (2019) observaron hasta un 50% de extracción de proteínas de *Chlorella vulgaris* tras 24 horas de incubación tras el tratamiento PEF, mientras que en *S. cerevisiae*, Ganeva et al., (2020) lograron hasta un 90% de extracción de proteínas tras 16 horas de incubación, asimismo en el estudio de Marín-Sánchez et al. (2024) después de 48 h de incubación, el 72 % del contenido total de proteínas se liberó al medio extracelular.

Estos estudios indican que la extracción de proteínas no ocurre de manera inmediata tras la aplicación del tratamiento PEF, sino que requiere un periodo prolongado de incubación para que las proteínas intracelulares puedan liberarse al medio.

Se ha descrito que la aplicación de un campo eléctrico puede inducir cambios conformacionales en la estructura de las proteínas, lo que puede provocar una disminución de su solubilidad y, en consecuencia, afectar su extracción (Taha et al., 2022). Para evaluar si el tratamiento PEF alteró la estructura de las proteínas intracelulares de levadura y afectó su solubilidad, se determinó la concentración de proteínas solubles tras romper con el molino de perlas de la biomasa de levaduras inmediatamente después de aplicar los distintos tratamientos PEF. La Figura 10 compara la cantidad total de proteínas solubles en células sin tratar con la detectada en células sometidas a los distintos tratamientos PEF.

Los resultados mostraron variabilidad en la resistencia de las proteínas de las distintas cepas de levadura a la pérdida de solubilidad tras el tratamiento PEF. En *S. cerevisiae* S-04, el tratamiento menos intenso aplicado (10 kV/cm, 19,09 ±3,06 kJ/kg) no afectó la solubilidad de las proteínas en comparación con las células control. Sin embargo, los tratamientos más intensos a 15 y 20 kV/cm sí provocaron una disminución en la concentración de proteínas solubles de alrededor de un 30%, lo que sugiere que, a partir de cierta intensidad de campo eléctrico, las proteínas intracelulares pueden sufrir modificaciones estructurales que afectan su estabilidad.

La imposibilidad de alcanzar una extracción completa de las proteínas intracelulares tras 24 horas de incubación podría atribuirse a dos factores principales: la hidrólisis de proteínas, que da lugar a la formación de aminoácidos libres, y la pérdida de solubilidad de las proteínas debido a su desnaturalización y posterior precipitación. En particular, la solubilidad de las proteínas de la cepa *S. cerevisiae* S-23 fue la menos afectada por los tratamientos PEF. Además, el incremento en la concentración de aminoácidos en esta cepa no fue tan pronunciado como en otras, lo que permitió recuperar cerca del 90% del total de proteínas citoplasmáticas.

Por otro lado, en *S. cerevisiae* HA-18 y *K. lactis*, al tratarse de cepas más resistentes al tratamiento PEF, fue necesario aplicar intensidades de campo más elevadas para lograr la electroporación del 90% de la población celular. Esta mayor intensidad en las condiciones de tratamiento para electroporar la membrana de la levadura pudo tener un efecto colateral sobre la estructura proteica, favoreciendo la desnaturalización y la consecuente pérdida de solubilidad.

Se ha publicado que los tratamientos PEF pueden reducir la solubilidad de las proteínas debido a alteraciones en su estructura conformacional, promoviendo su agregación cuando los residuos hidrofóbicos quedan expuestos e interactúan entre sí (Taha et al., 2022; Wu et al., 2015). Varios estudios han documentado este efecto tanto en proteínas purificadas como en mezclas proteicas, señalando que generalmente se requieren intensidades superiores a 10 kV/cm para inducir modificaciones estructurales significativas (De Gol et al., 2024; Wu et al., 2014). En el presente estudio, se confirman estas observaciones debido a que los tratamientos más intensos correspondieron a una temperatura de salida de 45°C, un valor que, por sí solo, es poco probable que cause desnaturalización en las proteínas de levadura (Huang & Dong, 2003; Otero et al., 2002)

Los resultados obtenidos en este estudio evidencian que la eficiencia de la extracción de compuestos intracelulares tras el tratamiento PEF depende tanto de la intensidad del tratamiento aplicado como de las características de cada cepa de levadura. En el caso de moléculas de bajo peso molecular, como los aminoácidos y el glutatión, los tratamientos menos intensos, capaces de electroporar al 90% de la población celular, fueron suficientes para lograr su liberación, sin que

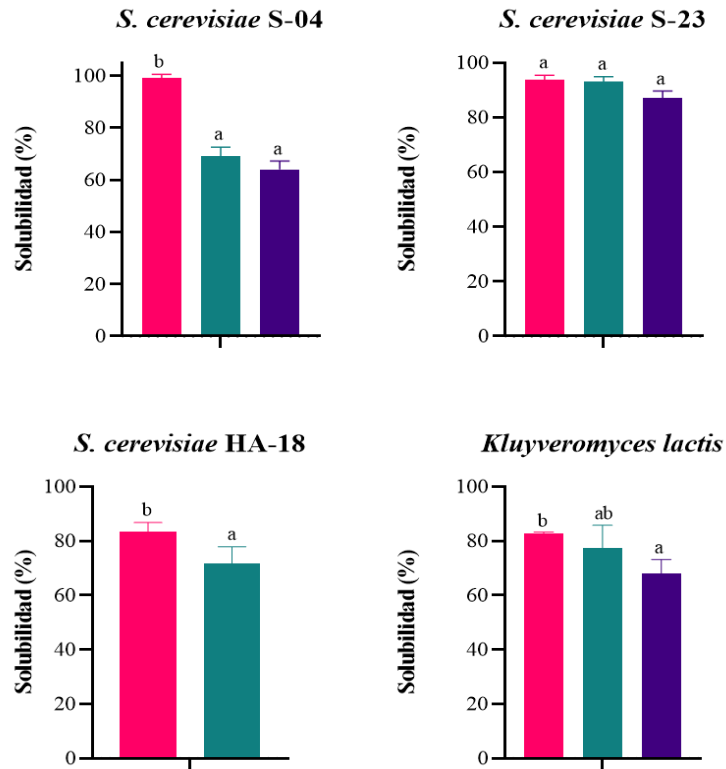


Figura 10. Efecto de los tratamientos PEF en la solubilidad de las proteínas de las células de levadura. (●) Tratamiento menos intenso que alcanzó un 90% de electroporación tras 1 hora, (●) tratamiento menos intenso que mantuvo irreversiblemente electroporado al 90% de la población tras 24 horas, (●) tratamiento más intenso evaluado. La solubilidad de las proteínas en células de *S. cerevisiae* tras los tratamientos PEF se comparó con la solubilidad de las proteínas en células sin tratar tras la disrupción con molino de perlas. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas en los valores de solubilidad proteica ($p < 0,05$).

afectara a la eficacia de la extracción que un porcentaje de las células fuera capaz de cerrar los poros a largo del periodo de incubación.

Sin embargo, el proceso de extracción de proteínas fue más complejo. Para maximizar su liberación, el tratamiento debe ser lo suficientemente intenso como para mantener a más del 90% de la población irreversiblemente electroporada a lo largo de todo el periodo de incubación. Sin embargo, tratamientos muy intenso para obtener este objetivo pueden afectar la solubilidad de las proteínas, disminuyendo la eficacia de su extracción. En este sentido, los resultados indican la necesidad de optimizar la intensidad de los tratamientos conseguir la máxima electroporación afectando lo menos posible a la estructura proteica.

Además, la elección de la cepa es un factor clave en la optimización del proceso en función de la aplicación para la cual se quiere extraer las proteínas. Si el objetivo es maximizar la extracción de proteínas sin comprometer su estructura terciaria y por lo tanto sus propiedades funcionales, *S. cerevisiae* S-23 se presenta como la cepa más adecuada, ya que sus proteínas mostraron una mayor resistencia a la pérdida de solubilidad. Por otro lado, si la prioridad es obtener una mayor cantidad de proteínas totales y aminoácidos, *S. cerevisiae* S-04 sería la cepa de elección. Además, ambas cepas

fueron las más sensibles a los tratamientos PEF, lo que permitió reducir los requerimientos energéticos del proceso, ya que se alcanzaron altos niveles de permeabilización con intensidades de campo más bajas en comparación con las otras cepas más resistentes.

Por otro lado, el menor tamaño celular de *K. lactis* y el mayor grosor de la pared celular de *S. cerevisiae* HA-18, cepa diseñada para resistir condiciones de alto contenido alcohólico, probablemente es la razón por la cual esas cepas son más resistentes a los PEF. Como consecuencia, los tratamientos necesarios para alcanzar una electroporación eficiente en estas levaduras fueron más intensos, lo que afectó notablemente la solubilidad de las proteínas y, en consecuencia, su extracción. Además, estas cepas mostraron un bajo potencial proteolítico tras el tratamiento PEF, lo que explica la menor liberación de aminoácidos en comparación con *S. cerevisiae* S-04 y S-23, donde se produjo una mayor hidrólisis proteica. Por tanto, estas dos cepas no serían las más adecuadas para la obtención de proteínas intracelulares de las levaduras.

En definitiva, la elección de la cepa de levadura y las condiciones del tratamiento PEF deben ajustarse en función del objetivo final. Si se prioriza una mayor cantidad de proteína extraída, es fundamental aplicar un tratamiento que garantice una electroporación irreversible minimizando la solubilidad proteica. En cambio, si el objetivo es preservar las propiedades funcionales de las proteínas, sería interesante seleccionar una cepa con menor potencial proteolítico. Estos resultados ponen de manifiesto la importancia de diseñar estrategias de extracción específicas para cada aplicación.

5. CONCLUSIONES

1. La electroporación de las células de levadura por los tratamientos PEF depende de la cepa de levadura investigada. Mientras que en algunas cepas un porcentaje importante de la población es capaz de revertir el fenómeno de electroporación cuando se aplican tratamientos de baja intensidad en otras este fenómeno es menos manifiesto o no se observa independientemente de la intensidad del campo eléctrico aplicado.
2. Ni la intensidad del tratamiento ni el tiempo de incubación afectaron significativamente la extracción de glutatión y aminoácidos.
3. En todas las cepas estudiadas la extracción de proteínas fue más eficiente al prolongar el tiempo de incubación. Sin embargo, tratamientos PEF muy intensos pueden disminuir la solubilidad de las proteínas disminuyendo la eficacia de la extracción.
4. Las condiciones óptimas de tratamiento PEF para conseguir la máxima extracción de proteínas dependen de la cepa de levadura estudiada y no siempre coinciden con los tratamientos más intensos aplicados. La definición de estas condiciones es clave para conseguir extraer la mayor cantidad posible de proteína sin que se vean afectadas sus propiedades funcionales

6. REFERENCIAS

- Aadil, R. M., Zeng, X. A., Han, Z., Sahar, A., Khalil, A. A., Rahman, U. U., Khan, M., & Mehmood, T. (2018). Combined effects of pulsed electric field and ultrasound on bioactive compounds and microbial quality of grapefruit juice. *Journal of Food Processing and Preservation*, *42*(2), e13507. <https://doi.org/10.1111/JFPP.13507>
- Agarwal, A., Zudans, I., Weber, E. A., Olofsson, J., Orwar, O., & Weber, S. G. (2007). Effect of cell size and shape on single-cell electroporation. *Analytical Chemistry*, *79*(10), 3589-3596. https://doi.org/10.1021/AC062049E/SUPPL_FILE/AC062049ESI20070302_055644.PDF
- Astráin-Redín, L., Raso, J., Álvarez, I., Kirkhus, B., Meisland, A., Borge, G. I. A., & Cebrián, G. (2023). New pulsed electric fields approach to improve the blanching of carrots. *LWT*, *189*, 115468. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2023.115468>
- Bahut, F., Romanet, R., Sieczkowski, N., Schmitt-Kopplin, P., Nikolantonaki, M., & Gougeon, R. D. (2020). Antioxidant activity from inactivated yeast: Expanding knowledge beyond the glutathione-related oxidative stability of wine. *Food Chemistry*, *325*, 126941. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2020.126941>
- Balasundaram, B., Harrison, S., & Bracewell, D. G. (2009). Advances in product release strategies and impact on bioprocess design. *Trends in Biotechnology*, *27*(8), 477-485. <https://doi.org/10.1016/J.TIBTECH.2009.04.004>
- Bartoletti, D. C., Harrison, G. I., & Weaver, J. C. (1989). The number of molecules taken up by electroporated cells: quantitative determination. *FEBS Letters*, *256*(1-2), 4-10. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(89\)81707-7](https://doi.org/10.1016/0014-5793(89)81707-7)
- Batista Napotnik, T., & Miklavčič, D. (2018). In vitro electroporation detection methods – An overview. *Bioelectrochemistry*, *120*, 166-182. <https://doi.org/10.1016/J.BIOELECHEM.2017.12.005>
- Beebe, S. J., Fox, P. M., Rec, L. J., Somers, K., Stark, R. H., & Schoenbach, K. H. (2002). Nanosecond pulsed electric field (nsPEF) effects on cells and tissues: Apoptosis induction and tumor growth inhibition. *IEEE Transactions on Plasma Science*, *30*(1 II), 286-292. <https://doi.org/10.1109/TPS.2002.1003872>
- Bendicho, S., Barrosa-Cánovas, G. V., & Martín, O. (2003). Reduction of Protease Activity in Simulated Milk Ultrafiltrate by Continuous Flow High Intensity Pulsed Electric Field Treatments. *Journal of Food Science*, *68*(3), 952-957. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2621.2003.TB08270.X>
- Berzosa, A., Delso, C., Sanz, J., Sánchez-Gimeno, C., & Raso, J. (2023). Sequential extraction of compounds of interest from yeast biomass assisted by pulsed electric fields. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, *11*. <https://doi.org/10.3389/FBIOE.2023.1197710>

- Berzosa, A., Marín-Sánchez, J., Álvarez, I., Sánchez-Gimeno, C., & Raso, J. (2024). Pulsed Electric Field Technology for the Extraction of Glutathione from *Saccharomyces cerevisiae*. *Foods*, *13*(12), 1916. <https://doi.org/10.3390/FOODS13121916/S1>
- Canelli, G., Kuster, I., Jaquenod, L., Buchmann, L., Murciano Martínez, P., Rohfritsch, Z., Dionisi, F., Bolten, C. J., Nanni, P., & Mathys, A. (2022). Pulsed electric field treatment enhances lipid bioaccessibility while preserving oxidative stability in *Chlorella vulgaris*. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, *75*, 102897. <https://doi.org/10.1016/J.IFSET.2021.102897>
- Carullo, D., Abera, B. D., Casazza, A. A., Donsì, F., Perego, P., Ferrari, G., & Pataro, G. (2018). Effect of pulsed electric fields and high pressure homogenization on the aqueous extraction of intracellular compounds from the microalgae *Chlorella vulgaris*. *Algal Research*, *31*, 60-69. <https://doi.org/10.1016/J.ALGAL.2018.01.017>
- Chavez, C. M., Groenewald, M., Hulfachor, A. B., Kpurubu, G., Huerta, R., Hittinger, C. T., & Rokas, A. (2024). The cell morphological diversity of Saccharomycotina yeasts. *FEMS Yeast Research*, *24*. <https://doi.org/10.1093/FEMSYR/FOAD055>
- De Gol, C., Etschmann, N., Zwietering, M. H., den Besten, H. M. W., & Beyrer, M. (2024). Pulsed electric field combined with preheating to preserve mildly extracted pea protein. *LWT*, *214*, 117100. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2024.117100>
- de Pádua Alves, É., Bosso, A., Rodrigo Ito Morioka, L., & Hiroshi Suguimoto, H. (2022). Cell permeabilization of *Kluyveromyces* and *Saccharomyces* species to obtain potential biocatalysts for lactose hydrolysis. *BIOTECHNOLOGY Acta Scientiarum. Biological Sciences*, *44*, 2022. <https://doi.org/10.4025/actascibiolsci.v44i1.60336>
- Dimopoulos, G., Katsimichas, A., Tsimogiannis, D., Oreopoulou, V., & Taoukis, P. (2021). Cell permeabilization processes for improved encapsulation of oregano essential oil in yeast cells. *Journal of Food Engineering*, *294*, 110408. <https://doi.org/10.1016/J.JFOODENG.2020.110408>
- Dimopoulos, G., Stefanou, N., Andreou, V., & Taoukis, P. (2018). Effect of pulsed electric fields on the production of yeast extract by autolysis. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, *48*, 287-295. <https://doi.org/10.1016/J.IFSET.2018.07.005>
- Djuzenova, C. S., Zimmermann, U., Frank, H., Sukhorukov, V. L., Richter, E., & Fuhr, G. (1996). Effect of medium conductivity and composition on the uptake of propidium iodide into electropermeabilized myeloma cells. *Biochimica et biophysica acta*, *1284*(2), 143-152. [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(96\)00119-8](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(96)00119-8)
- Donsì, F., Ferrari, G., & Pataro, G. (2010). Applications of pulsed electric field treatments for the enhancement of mass transfer from vegetable tissue. *Food Engineering Reviews*, *2*(2), 109-130. <https://doi.org/10.1007/S12393-010-9015-3/METRICS>

- Ferreira, I. M. P. L. V. O., Pinho, O., Vieira, E., & Tavarela, J. G. (2010). Brewer's *Saccharomyces* yeast biomass: characteristics and potential applications. En *Trends in Food Science and Technology* (Vol. 21, Número 2, pp. 77-84). <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2009.10.008>
- Ganeva, V., Angelova, B., Galutzov, B., Goltsev, V., & Zhiponova, M. (2020). Extraction of Proteins and Other Intracellular Bioactive Compounds From Baker's Yeasts by Pulsed Electric Field Treatment. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.552335>
- Ganeva, V., Galutzov, B., & Teissie, J. (2014). Evidence that pulsed electric field treatment enhances the cell wall porosity of yeast cells. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 172(3), 1540-1552. <https://doi.org/10.1007/S12010-013-0628-X/METRICS>
- Gautério, G. V., Maciel Da Silva, R., Karraz, C., Alice, M., Coelho, Z., Dias Ribeiro, B., & Lemes, A. C. (2023). Cell disruption and permeabilization methods for obtaining yeast bioproducts. *Cleaner Chemical Engineering*, 6, 100112. <https://doi.org/10.1016/j.clce.2023.100112>
- Golzio, M., Mora, M. P., Raynaud, C., Delteil, C., Teissié, J., & Rols, M. P. (1998). Control by osmotic pressure of voltage-induced permeabilization and gene transfer in mammalian cells. *Biophysical Journal*, 74(6), 3015-3022. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(98\)78009-9](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(98)78009-9)
- Huang, P., & Dong, A. (2003). Thermal, chemical and chemothermal denaturation of yeast enolase. *Spectroscopy*, 17(2-3), 453-467.
- Jaeger, A., Arendt, E. K., Zannini, E., & Sahin, A. W. (2020). Brewer's Spent Yeast (BSY), an Underutilized Brewing By-Product. *Fermentation* 2020, Vol. 6, Page 123, 6(4), 123. <https://doi.org/10.3390/FERMENTATION6040123>
- Kämpfer, P. (2014). Acinetobacter. *Encyclopedia of Food Microbiology: Second Edition*, 11-17. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00002-1>
- Kawano-Kawada, M., Kakinuma, Y., & Sekito, T. (2018). Transport of Amino Acids across the Vacuolar Membrane of Yeast: Its Mechanism and Physiological Role. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 41(10), 1496-1501. <https://doi.org/10.1248/BPB.B18-00165>
- Kotnik, T., Kramar, P., Pucihar, G., Miklavčič, D., & Tarek, M. (2012, octubre). *Cell Membrane Electroporation-Part 1: The Phenomenon*. 28. <https://doi.org/10.1109/MEI.2012.6268438>
- Kotnik, T., Maček-Lebar, A., Miklavčič, D., & Mir, L. M. (2000). Evaluation of Cell Membrane Electropermeabilization by Means of a Nonpermeant Cytotoxic Agent. *BioTechniques*, 28(5), 921-926. <https://doi.org/10.2144/00285ST05>
- Li, Y., Zhang, S., Bao, Z., Sun, N., & Lin, S. (2022). Exploring the activation mechanism of alcalase activity with pulsed electric field treatment: Effects on enzyme activity, spatial conformation, molecular dynamics simulation and molecular docking parameters. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 76, 102918. <https://doi.org/10.1016/J.IFSET.2022.102918>

- Lu, C., Li, F., Yan, X., Mao, S., & Zhang, T. (2022). Effect of pulsed electric field on soybean isoflavone glycosides hydrolysis by β -glucosidase: Investigation on enzyme characteristics and assisted reaction. *Food Chemistry*, 378, 132032. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2021.132032>
- Lu, S. C. (2009). REGULATION OF GLUTATHIONE SYNTHESIS. *Molecular aspects of medicine*, 30(1-2), 42. <https://doi.org/10.1016/J.MAM.2008.05.005>
- Marín-Sánchez, J., Berzosa, A., Álvarez, I., Sánchez-Gimeno, C., & Raso, J. (2024). Selective extraction of biomolecules from *Saccharomyces cerevisiae* assisted by high-pressure homogenization, pulsed electric fields, and heat treatment: Exploring the effect of endogenous enzymes. *LWT*, 207, 116614. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2024.116614>
- Marson, G. V., de Castro, R. J. S., Belleville, M. P., & Hubinger, M. D. (2020). Spent brewer's yeast as a source of high added value molecules: a systematic review on its characteristics, processing and potential applications. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 36(7). <https://doi.org/10.1007/S11274-020-02866-7>
- Martínez, J. M., Delso, C., Álvarez, I., & Raso, J. (2020). Pulsed electric field-assisted extraction of valuable compounds from microorganisms. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 19(2), 530-552. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12512>
- Maza, M. A., Delso, C., Álvarez, I., Raso, J., & Martínez, J. M. (2020). Effect of pulsed electric fields on mannoproteins release from *Saccharomyces cerevisiae* during the aging on lees of Caladoc red wine. *LWT*, 118. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108788>
- Moran, A., Holst, O., Brennan, P. J., & von Itzstein, M. (2010). Microbial Glycobiology. *Microbial Glycobiology*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374546-0.X0001-6>
- Municio, E. M., & Raso, J. P. (2018). *Trabajo Fin de Grado en Veterinaria*. Universidad de Zaragoza.
- Nandy, S. K., & Srivastava, R. K. (2018). A review on sustainable yeast biotechnological processes and applications. *Microbiological Research*, 207, 83-90. <https://doi.org/10.1016/J.MICRES.2017.11.013>
- Nielsen, J. (2019). Yeast Systems Biology: Model Organism and Cell Factory. *Biotechnology Journal*, 14(9), 1800421. <https://doi.org/10.1002/BIOT.201800421>
- Okamoto, S., Murakami, Y., Urabe, G., & Katsuki, S. (2022). Nondistractive extraction of intracellular molecules from yeast using PEF-assisted autolysis. *Electrical Engineering in Japan (English translation of Denki Gakkai Ronbunshi)*, 215(1). <https://doi.org/10.1002/eej.23372>
- Otero, M. A., Wagner, J. R., Vasallo, M. C., Añón, M. C., García, L., Jiménez, J. C., & López, J. C. (2002). Thermal Denaturation Kinetics of Yeast Proteins in Whole Cells of *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces fragilis*. <http://dx.doi.org/10.1106/108201302026258>, 8(3), 163-167. <https://doi.org/10.1106/108201302026258>

- Pasquet, P. L., Villain-Gambier, M., & Trébouet, D. (2024). By-Product Valorization as a Means for the Brewing Industry to Move toward a Circular Bioeconomy. *Sustainability* 2024, Vol. 16, Page 3472, 16(8), 3472. <https://doi.org/10.3390/SU16083472>
- Pillet, F., Formosa-Dague, C., Baaziz, H., Dague, E., & Rols, M. P. (2016). Cell wall as a target for bacteria inactivation by pulsed electric fields. *Scientific Reports* 2016 6:1, 6(1), 1-8. <https://doi.org/10.1038/srep19778>
- Pinho, O., Ferreira, I. M. P. L. V. O., & Santos, L. H. M. L. M. (2006). Method optimization by solid-phase microextraction in combination with gas chromatography with mass spectrometry for analysis of beer volatile fraction. *Journal of Chromatography A*, 1121(2), 145-153. <https://doi.org/10.1016/J.CHROMA.2006.04.013>
- Podpora, B., Swiderski, F., Sadowska, A., Rakowska, R., & Wasiak-Zys, G. (2016). Spent brewer's yeast extracts as a new component of functional food. <https://cifs.agriculturejournals.cz/doi/10.17221/419/2015-CJFS.html>, 34(6), 554-563. <https://doi.org/10.17221/419/2015-CJFS>
- Puligundla, P., Mok, C., & Park, S. (2020). Advances in the valorization of spent brewer's yeast. En *Innovative Food Science and Emerging Technologies* (Vol. 62). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2020.102350>
- Rahman, I., Kode, A., & Biswas, S. K. (2007). Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. *Nature Protocols* 2007 1:6, 1(6), 3159-3165. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.378>
- Raso, J., Condón, S., & Álvarez, I. (2014). Non-Thermal Processing: Pulsed Electric Field. *Encyclopedia of Food Microbiology: Second Edition*, 966-973. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00397-9>
- Raso, J., Condón Usón, S., Álvarez Lanzarote, I., & Sánchez Gimeno, A. C. (2022). Pulsed electric fields technology for the food industry: fundamental and applications. *Food Engineering Series*, 385-397. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/libro?codigo=963419>
- Rubio, F. T. V., Haminiuk, C. W. I., Santos, P. D. de F., Martelli-Tosi, M., Thomazini, M., Balieiro, J. C. de C., Makimori, G. Y. F., & Fávaro-Trindade, C. S. (2022). Investigation on brewer's spent yeast as a bio-vehicle for encapsulation of natural colorants from pumpkin (*Cucurbita moschata*) peels. *Food & Function*, 13(19), 10096-10109. <https://doi.org/10.1039/D2FO00759B>
- Saini, P., Beniwal, A., Kokkilgadda, A., & Vij, S. (2018). Response and tolerance of yeast to changing environmental stress during ethanol fermentation. *Process Biochemistry*, 72, 1-12. <https://doi.org/10.1016/J.PROCBIO.2018.07.001>

- Saulis, G., & Saule, R. (2012). Size of the pores created by an electric pulse: Microsecond vs millisecond pulses. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1818(12), 3032-3039. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2012.06.018>
- Scherer, D., Krust, D., Frey, W., Mueller, G., Nick, P., & Gusbeth, C. (2019). Pulsed electric field (PEF)-assisted protein recovery from *Chlorella vulgaris* is mediated by an enzymatic process after cell death. *Algal Research*, 41. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101536>
- Schmacht, M., Lorenz, E., & Senz, M. (2017). Microbial production of glutathione. En *World Journal of Microbiology and Biotechnology* (Vol. 33, Número 6). Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/s11274-017-2277-7>
- Silva Araújo, V. B. Da, Melo, A. N. F. De, Costa, A. G., Castro-Gomez, R. H., Madruga, M. S., Souza, E. L. De, & Magnani, M. (2014). Followed extraction of β -glucan and mannoprotein from spent brewer's yeast (*Saccharomyces uvarum*) and application of the obtained mannoprotein as a stabilizer in mayonnaise. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 23, 164-170. <https://doi.org/10.1016/J.IFSET.2013.12.013>
- Stanley, D., Bandara, A., Fraser, S., Chambers, P. J., & Stanley, G. A. (2010). The ethanol stress response and ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Applied Microbiology*, 109(1), 13-24. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2672.2009.04657.X>
- Stirke, A., Celiesiute-Germaniene, R., Zimkus, A., Zurauskiene, N., Simonis, P., Dervinis, A., Ramanavicius, A., & Balevicius, S. (2019). The link between yeast cell wall porosity and plasma membrane permeability after PEF treatment. *Scientific reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/S41598-019-51184-Y>
- Sun, S. W., Lin, Y. C., Weng, Y. M., & Chen, M. J. (2006). Efficiency improvements on ninhydrin method for amino acid quantification. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19(2-3), 112-117. <https://doi.org/10.1016/J.JFCA.2005.04.006>
- Taha, A., Casanova, F., Šimonis, P., Stankevič, V., Gomaa, M. A. E., & Stirkè, A. (2022). Pulsed Electric Field: Fundamentals and Effects on the Structural and Techno-Functional Properties of Dairy and Plant Proteins. *Foods* 2022, Vol. 11, Page 1556, 11(11), 1556. <https://doi.org/10.3390/FOODS11111556>
- Tao, Z., Yuan, H., Liu, M., Liu, Q., Zhang, S., Liu, H., Jiang, Y., Huang, D., & Wang, T. (2022). Yeast Extract: Characteristics, Production, Applications and Future Perspectives. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33(2), 151. <https://doi.org/10.4014/JMB.2207.07057>
- Tarek, M. (2005). Membrane electroporation: A molecular dynamics simulation. *Biophysical Journal*, 88(6), 4045-4053. <https://doi.org/10.1529/BIOPHYSJ.104.050617/ASSET/DD8E30C9-0279-4AE1-9B48-6C5AFE67COA5/MAIN.ASSETS/GR5.JPG>

- Teissié, J., Eynard, N., Gabriel, B., & Rols, M. P. (1999). Electropermeabilization of cell membranes. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 35(1), 3-19. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(98\)00060-X](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(98)00060-X)
- Teissie, J., Golzio, M., & Rols, M. P. (2005). Mechanisms of cell membrane electropermeabilization: A minireview of our present (lack of ?) knowledge. En *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects* (Vol. 1724, Número 3, pp. 270-280). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2005.05.006>
- Vaessen, E. M. J., den Besten, H. M. W., Patra, T., van Mossevelde, N. T. M., Boom, R. M., & Schutyser, M. A. I. (2018). Pulsed electric field for increasing intracellular trehalose content in *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 47, 256-261. <https://doi.org/10.1016/J.IFSET.2018.03.007>
- Vega-Mercado, H., Powers, J. R., Barbosa-Cánovas, G. V., & Swanson, B. G. (2019). Effect of Added Calcium and EDTA on the Inactivation of a Protease from *Pseudomonas fluorescens* M3/6 When Exposed to Pulsed Electric Fields. *Pulsed Electric Fields in Food Processing*, 121-134. <https://doi.org/10.1201/9780429133459-8>
- Vorobiev, E., & Lebovka, N. I. (2022). Cell Membrane Permeabilization by Pulsed Electric Fields for Efficient Extraction of Intercellular Components from Foods. *Food Engineering Series*, 209-269. https://doi.org/10.1007/978-3-030-70586-2_6
- Wu, L., Zhao, W., Yang, R., & Chen, X. (2014). Effects of pulsed electric fields processing on stability of egg white proteins. *Journal of Food Engineering*, 139, 13-18. <https://doi.org/10.1016/J.JFOODENG.2014.04.008>
- Wu, L., Zhao, W., Yang, R., & Yan, W. (2015). Pulsed electric field (PEF)-induced aggregation between lysozyme, ovalbumin and ovotransferrin in multi-protein system. *Food Chemistry*, 175, 115-120. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2014.11.136>