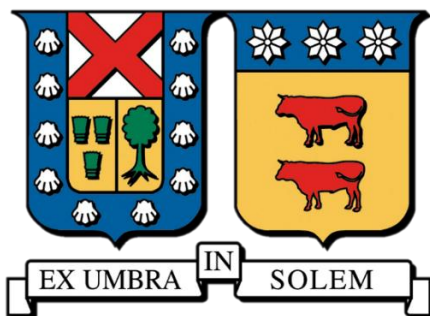


UNIVERSIDAD TÉCNICA FEDERICO SANTA MARÍA
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA Y AMBIENTAL
VALPARAÍSO – CHILE



**“BIOPROTECCIÓN CON LEVADURAS NO SACCHAROMYCES DE
LAS ESPECIES *CÁNDIDA BOIDINII* Y *CÁNDIDA OLEOPHILA* EN
VINIFICACIÓN”**

Tesis presentada por
CAMILA LESLIE VELOSO CAMPOS

Como requisito para optar al título de
INGENIERA CIVIL QUÍMICA

Y al grado académico de
MAGÍSTER EN CIENCIAS DE LA INGENIERÍA QUÍMICA

COMISIÓN DE TESIS

Dr. Cristian Ramírez

Profesor Guía 1

Dra. Camila Mery Araya

Profesor Co-Referente

Dra. Wendy Franco Melazzini

Profesor Co-Referente Externo

Valparaíso, Marzo 2024

Título de la tesis

**BIOPROTECCIÓN CON LEVADURAS *NO SACCHAROMYCES* DE LAS ESPECIES
CÁNDIDA BOIDINII Y *CÁNDIDA OLEOPHILA* EN VINIFICACIÓN**

Trabajo de tesis presentado como requisito parcial para optar al título de Ingeniera Civil Química
y para el grado de Magíster en Ciencias de la Ingeniería Química de la Universidad Técnica
Federico Santa María.

Dr. Cristian Ramírez

Dr. Camila Mery - Araya

Dra. Wendy Franco

Agradecimientos

Quisiera expresar mi sincero agradecimiento a todas las personas que contribuyeron de manera significativa a la realización de esta tesis. En primer lugar, estoy profundamente agradecida con mi profesora guía, Alejandra Urtubia por su orientación, y valiosos aportes que permitieron dar forma a este trabajo y a mi profesora correferente Camila Mery, cuyo apoyo ha sido fundamental en lo referente a esta investigación.

Mi gratitud se extiende a Angelica Durán por sus valiosas sugerencias y comentarios que enriquecieron considerablemente mi investigación.

También, agradezco a mis compañeros de laboratorio, por generar un grato ambiente de trabajo y apoyarnos entre todos durante el desarrollo de nuestros trabajos de título.

Quisiera incluir a amigas del colegio; Javiera Aguirre, Javiera Bernal, Valeria Sandoval, Teresa Fuenzalida, Francisca Vega, Valentina Toledo y Jessica Parada, quienes fueron parte fundamental de este largo proceso y que me apoyaron en los momentos donde necesitaba despejarme. Además de mis compañeros de carrera y amigos miembros de placeresfam: Javiera Bascuñán, Sofía Llanos, Camila Guajardo, Fernanda Hernández, Carlos Villalobos y Valentina Berndt por su estímulo, comprensión y colaboración durante todo el proceso.

No puedo pasar por alto el apoyo inquebrantable de mi familia. A mis padres, Verónica y Sergio por su amor, aliento y sacrificios que hicieron posible mi educación superior. A mi abuela, gracias por su paciencia, respaldo constante y básicamente por criarme y volverme lo que soy hoy en día. Y a mi amiga y mascota Moka, quien me subía el ánimo y me daba la tranquilidad que necesitaba cuando volvía de la universidad.

Finalmente, agradezco a todas las personas que de alguna manera contribuyeron a este proyecto. Este logro no habría sido posible sin su generosidad y apoyo.

Resumen Ejecutivo

Las levaduras *no Saccharomyces* (LVNS), como *Cándida boidinii* y *Cándida oleophila*, son utilizadas en vinificación para mejorar las características del vino y reducir la graduación alcohólica en fermentaciones mixtas con *Saccharomyces cerevisiae*. Recientemente, se ha explorado el potencial de las LVNS como bioprotectores, añadiéndolas tempranamente al mosto o la uva para limitar el desarrollo de microorganismos contaminantes y evitar alteraciones microbiológicas en las primeras fases del proceso de vinificación. Este enfoque podría reemplazar al SO₂, aditivo químico tradicional utilizado como antimicrobiano y antioxidante en el vino, haciendo el proceso más sustentable y libre de aditivos químicos.

En este estudio, se evaluó el impacto de *Cándida boidinii* y *Cándida oleophila* como bioprotectores en el perfil químico, microbiológico y volátil del vino, como reemplazo al SO₂. Se realizaron experimentos con diferentes concentraciones de bioprotector, tanto en inóculos simples como mixtos, y se monitoreó la fermentación en términos de consumo de sustrato, crecimiento celular, desarrollo microbiológico y concentración final de metabolitos y compuestos volátiles.

La adición de bioprotectores limitó el crecimiento de bacterias ácidolácticas, bacterias ácidoacéticas y *Brettanomyces bruxellensis* con eficacia similar o superior a los sulfitos, dependiendo del patógeno. Las estrategias con *Cándida oleophila* ofrecieron protección contra bacterias ácidolácticas, mientras que *Cándida boidinii* protegió contra bacterias ácidoacéticas y *B. bruxellensis*, al igual que la estrategia mixta. En términos de compuestos químicos, *Cándida boidinii* produjo un mayor porcentaje de etanol, mientras que *Cándida oleophila* aumentó la concentración de ácido acético.

La composición volátil al final de la fermentación estuvo caracterizada por la presencia de ésteres con aromas frutales-florales. En conclusión, las levaduras *no Saccharomyces*, *Cándida boidinii* y *Cándida oleophila* pueden sustituir parcialmente al SO₂, siendo su eficacia antimicrobiana selectiva dependiendo del patógeno y la concentración inicial añadida. Las fermentaciones con un inóculo inicial de 1×10^7 cell/mL presentaron resultados igual o mejor que aquellas con 1×10^6 cell/mL, lo que sugiere una dependencia del inóculo inicial, pero variable según el patógeno.

Abstract

Non-Saccharomyces yeasts (NSY), such as *Candida boidinii* and *Candida oleophila*, are used in winemaking to enhance wine characteristics and reduce alcohol content in mixed fermentations with *Saccharomyces cerevisiae*. Recently, the potential of NSY as bioprotectors has been explored by adding them early to the must or grapes to limit the growth of contaminating microorganisms and prevent microbiological alterations in the early stages of winemaking. This approach could replace SO₂, the traditional chemical additive used as an antimicrobial and antioxidant in wine, making the process more sustainable and freer of chemical additives.

In this study, the impact of *Candida boidinii* and *Candida oleophila* as bioprotectors on the chemical, microbiological, and volatile profile of wine was evaluated as a replacement for SO₂. Experiments with different concentrations of bioprotector, both in simple and mixed inoculum, were conducted, and fermentation was monitored in terms of substrate consumption, cell growth, microbiological development, and final concentration of metabolites and volatile compounds.

The addition of bioprotectors limited the growth of lactic acid bacteria, acetic acid bacteria, and *Brettanomyces bruxellensis* with similar or superior efficacy to sulfites, depending on the pathogen. Strategies with *Candida oleophila* provided protection against lactic acid bacteria, while *Candida boidinii* protected against acetic acid bacteria and *B. bruxellensis*, similar to the mixed strategy. In terms of chemical compounds, *Candida boidinii* produced a higher percentage of ethanol, while *Candida oleophila* increased the concentration of acetic acid.

The volatile composition at the end of fermentation was characterized by the presence of esters with fruity-floral aromas. In conclusion, *non-Saccharomyces* yeasts, *Candida boidinii*, and *Candida oleophila* can partially replace SO₂, with their antimicrobial efficacy being selective depending on the pathogen and initial added concentration. Fermentations with an initial inoculum of 1×10^7 cfu/mL showed equal or better results than those with 1×10^6 cfu/mL, suggesting a dependency on the initial inoculum, but variable depending on the pathogen.

Índice de Contenidos

CAPITULO 1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	17
1.1. Introducción	17
1.2. Hipótesis.....	19
1.3. Objetivos	19
1.3.1. Objetivo General	19
1.3.2. Objetivos Específicos	19
CAPITULO 2. ANTECEDENTES GENERALES	20
2.1. Vino.....	20
2.2. 1. Definición.....	20
2.2.2. Industria Vitivinícola en Chile.....	21
2.3. Proceso de Vinificación.....	23
2.4. Fermentación Alcohólica del vino.....	25
2.4.1. Bioquímica de la fermentación alcohólica.....	25
2.4.2. Crecimiento celular y consumo de sustrato durante la fermentación alcohólica	27
2.4.3. Factores que afectan el desarrollo de la fermentación alcohólica	29
2.5. Microorganismos que intervienen en la producción del vino.....	32
2.5.1. Levaduras	32
2.5.1.1. Levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (LVSC).....	33
2.5.1.2. Levaduras <i>no Saccharomyces</i> (LVNS).....	34
2.5.1.2.1. Levadura <i>Cándida oleophila</i> y <i>Cándida boidinii</i>	36
2.5.2. Microorganismos de deterioro en la producción del vino	37
2.5.2.1. Bacterias ácidoacéticas (AAB)	37
2.5.2.2. Bacterias ácidolácticas (LAB)	39
2.5.2.3. <i>Brettanomyces bruxellensis</i>	40
2.6. SO ₂ en Vinificación.....	41
2.6.1. Uso de los sulfitos en el vino	41
2.6.2. Problemática: Efectos adversos del SO ₂	43
2.6.3. Equilibrio Ácido-Base de los sulfitos en el vino.....	44
2.6.4. Efecto antioxidante del SO ₂	45
2.6.4.1. Oxidación o Pardeamiento del Vino	45
2.6.5. Mecanismos de acción antioxidante del SO ₂	49
2.6.6. Acción antimicrobiana del SO ₂	50
2.7. Alternativas al SO ₂ para la estabilización del vino	52

2.7.1.	Aditivos Químicos.....	52
2.7.1.1.	Dicarbonato de dimetilo (DMDC).....	53
2.7.1.2.	Lisozima.....	53
2.7.1.3.	Quitano.....	53
2.7.1.4.	Complejo de Plata Coloidal (CSC).....	54
2.7.1.5.	Bacteriocinas.....	54
2.7.2.	Tecnologías o métodos de sustitución físicos.....	55
2.7.2.1.	HHP.....	57
2.7.2.2.	Ultrasonido de alta potencia (HPU).....	57
2.7.2.3.	Irradiación Ultravioleta (UV).....	58
2.7.2.4.	Tecnología de campo eléctrico pulsado (PEF).....	58
2.7.3.	Enfoque biológico en el reemplazo del SO ₂	59
2.8.	Bioprotección.....	60
2.8.1.	Mecanismos de biocontrol.....	60
2.8.2.	Competencia de Explotación o Pasiva.....	60
2.8.3.	Competencia de interferencia o Activa.....	61
2.8.4.	Levaduras <i>no Saccharomyces</i> con propiedades bioprotectoras.....	61
2.8.4.1.	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	61
2.8.4.2.	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	63
2.8.4.3.	<i>Lachancea thermotolerans</i>	66
2.9.	Caracterización del producto terminado.....	67
2.9.1.	Compuestos volátiles en la fermentación.....	67
2.9.2.	Alcoholes Superiores o Fusel.....	67
2.9.3.	Ácidos.....	68
2.9.4.	Ésteres.....	69
CAPITULO 3. MATERIALES Y MÉTODOS.....		71
3.1.	Metodología Experimental General.....	71
3.2.	Materiales, Reactivos y Equipos.....	74
3.2.1.	Microorganismos.....	74
3.2.2.	Uva.....	74
3.2.3.	Reactivos.....	74
3.2.4.	Equipos.....	76
3.2.4.1.	Autoclave.....	77
3.2.4.2.	Incubadora con agitación.....	77
3.2.4.3.	Refractómetro digital.....	78

3.2.4.4.	Microscopio Óptico	78
3.2.4.5.	Estufa.....	79
3.2.4.6.	Agitador Vortex.....	79
3.2.4.7.	Placa calefactora y agitador magnético.....	80
3.2.4.8.	Espectrofotómetro UV/VIS	80
3.2.4.9.	Balanza Analítica.....	81
3.2.4.10.	Centrífuga.....	81
3.2.4.11.	Sistema de aireación	82
3.2.4.12.	pH-metro	82
3.2.4.13.	Cromatógrafo líquido de alta eficacia (HPLC)	83
3.2.4.14.	Biosystem Y15/c	83
3.2.4.15.	Cromatógrafo de gases con espectrometría de masas	84
3.2.4.16.	Otros materiales y equipos.....	85
3.3.	Diseño Experimental	85
3.3.1.	Parámetros operacionales	86
3.4.	Desarrollo de Fermentaciones	87
3.4.1.	Esterilización de materiales	87
3.4.2.	Preparación del mosto y acondicionamiento.....	87
3.4.3.	Montaje	87
3.4.4.	Preparación del inóculo	88
3.4.5.	Análisis microbiológico.....	89
3.4.6.	Monitoreo de la cinética de fermentación.....	90
3.5.	Análisis de composición química: Biosystem y HPLC.....	90
3.6.	Análisis de compuestos volátiles	91
3.7.	Análisis Estadístico	91
3.7.1.	Análisis ANOVA para compuestos químicos.....	91
3.7.2.	Análisis PCA y ANOVA de compuestos volátiles	91
CAPITULO 4. RESULTADOS		93
4.1.	Consumo de Sustrato.....	93
4.2.	Crecimiento celular de levaduras totales	97
4.3.	Abundancias relativas de la población de levaduras totales.....	101
4.4.	Dinámica de poblaciones de microorganismos.....	109
4.4.1.	Evolución de las bacterias ácidolácticas durante la fermentación.....	109
4.4.2.	Evolución de las bacterias ácidoacéticas durante la fermentación.	113
4.4.3.	Evolución de las levaduras <i>Brettanomyces /Dekkera</i>	118

4.5. Final del proceso de fermentación	122
4.5.1. Análisis de Compuestos químicos	123
4.5.1.2 Análisis de producción de etanol	123
4.5.1.3 Análisis de Producción de Ácido acético.....	125
4.5.1.4. Análisis de Producción de Glicerol	126
4.5.1.5. Análisis de Producción de L-ácido láctico.....	127
4.5.1.6. Análisis de consumo de Ácido Tartárico	127
4.5.1.7 Análisis de concentración de azúcar residual.....	128
4.5.1.8. Rendimiento de la fermentación	129
4.6. Análisis de Compuestos Volátiles	130
CAPITULO 5. DISCUSIÓN	138
5.1. Las levaduras <i>no Saccharomyces</i> utilizadas como bioprotectoras intervienen en el perfil microbiológico del vino.....	139
CAPITULO 6. CONCLUSIONES	147
CAPÍTULO 7. RECOMENDACIONES	149
CAPITULO 8. REFERENCIAS.....	150
CAPITULO 9. ANEXOS	171
9.1. Anexo A. Reactivación de Cepas de Stock Congelado	171
9.2. Anexo B. Procedimiento para determinación de células totales.....	171
9.3. Anexo C. Activación de levadura <i>S. cerevisiae</i> para fermentación.....	172
9.4. Anexo D. Método de preparación de diluciones decimales	173
9.5. Anexo E. Procedimiento para determinación de la densidad	174
9.6. Anexo F. Procedimiento determinación de solidos solubles mediante °brix.....	175
9.7. Anexo G . Procedimiento determinación densidad óptica- Espectrofotómetro.....	175
9.8. Anexo H. Procedimiento de medición de compuestos volátiles	175
9.9. Anexo I. Ajuste de SO ₂	176
9.10. Anexo J: Cálculos de velocidad específica de crecimiento	177
9.11. Anexo K: Placas de Agar con poblaciones de microorganismos.	179
9.11.1. Medio CGA para Levaduras Totales	179
5.11.1. Medio Agar Lisina para Levaduras <i>no Saccharomyces</i>	180
9.11.2. Medio MRS Agar para Bacterias del ácido láctico	180
9.11.3. Medio WLD Agar para Bacterias ácidoacéticas	181
9.11.4. Medio WLC Agar para <i>Brettanomyces bruxellensis</i>	181
9.12. Anexo L: Resultados análisis de componentes principales PCA	181
9.13. Anexo M: Activación e inoculación de levaduras NS bioprotectoras	185

Índice de figuras

Figura 1. Producción de vinos con denominación de origen por variedades durante el año 2022. Elaboración propia en base a datos obtenidos del SAG (SAG, 2022)	22
Figura 2. Producción de vino en Chile. Elaborado por ODEPA con información del SAG.	22
Figura 3. Etapas del Proceso de Vinificación (Jackson, 2008)	24
Figura 4. Metabolismo típico de levaduras: Respiratorio (-) y respirofermentativo (-). 1: Transporte de piruvato a la mitocondria, 2: Complejo piruvato deshidrogenasa, 3: Piruvato descarboxilasa, 4: Alcohol deshidrogenasa, 5: Acetaldehído deshidrogenasa, 6: Acetil CoA sintetasa (citoplasmático), 7: Acetil CoA sintetasa (mitocondrial), 8: Transporte de acetil CoA mediado por la vía carnitina. Formación de ésteres, 9: Acetiltransferasa, 10: éster sintasa. Obtenido de (Fredlund et al., 2004).	26
Figura 5. Representación esquemática de la formación de compuestos aromáticos por la levadura (Lambrechts & Pretorius, 2019)	27
Figura 6. Evolución de la densidad (A) y población de levaduras (B) durante la fermentación alcohólica (Santamaría et al., 2020).....	28
Figura 7. Modelo de formación de biopelículas y depósitos en el cuello de la botella para producir deterioro del vino por bacterias ácidoacéticas (AAB) en botellas de vino verticales. A: ingreso insuficiente de oxígeno para permitir el crecimiento de una pequeña población residente de AAB; B: ingreso de suficiente oxígeno a través del cierre hacia el espacio de cabeza para permitir el crecimiento de AAB e iniciar la formación de un depósito visible en la interfaz vino-espacio de cabeza. Obtenido de (Bartowsky & Henschke, 2008).	38
Figura 8. Diagrama de flujo de la elaboración del vino. El punto naranja indica las principales fases en las que generalmente se utiliza SO ₂	42
Figura 9. Ecuaciones de Equilibrio del SO ₂ . A. Solubilización (Ley de Henry) B. Ionización Ácido-base C. Formación de aductos de hidrogenosulfito (HSO ₃ ⁻) con compuestos carbonílicos y antocianinas. Obtenido de (Giacosa et al., 2019)	44
Figura 10. Acción catalítica de los iones de hierro y cobre en la oxidación de catecoles para producir quinonas y peróxido de hidrogeno.....	47
Figura 11. Reacción de Fenton provocada por la formación de peróxido de hidrogeno	48
Figura 12. Mecanismos de oxidación enzimática (Oliveira et al., 2011b)	48
Figura 13. Punto de ramificación del peróxido de hidrógeno en la vía de oxidación del vino: enfriamiento por bisulfito (izquierda) o la oxidación Fenton del etanol (derecha) en presencia y ausencia de oxígeno (Nguyen & Waterhouse, 2022).....	50
Figura 14. Reacciones competitivas de o-quinona con sulfito, formando catecol y sulfonato	50

Figura 15. Metodología Experimental. Elaboración propia.	72
Figura 16. Resumen de los procesos fermentativos para fermentaciones bioprotegidas. Elaboración propia	73
Figura 17. Autoclave Amilab	77
Figura 18. A. Incubadora modelo JSSI-100C B. Incubadora modelo TU-400 MRC.....	77
Figura 19. Refractómetro digital Hanna Instruments.....	78
Figura 20. Microscopio óptico BA310 de Motic	78
Figura 21. Estufa modelo UN30.....	79
Figura 22. Agitador Vortex	79
Figura 23. Placa calefactora y agitador magnético Cimarec	80
Figura 24. Espectrofotómetro UV/VIS.....	80
Figura 25. Balanza analítica	81
Figura 26. Centrífuga	81
Figura 27. Diagrama del sistema de aireación	82
Figura 28. pH-metro.....	82
Figura 29. Cromatografo líquido HPLC de alta eficiencia	83
Figura 30. Analizador automático Biosystem.....	84
Figura 31. Cromatografo de gases modelo Triplus 1310 con un detector de masas ISQ LT	84
Figura 32. a. Frasco Schott modificado con su toma muestra durante la etapa de aireación. b. Fermentadores durante la etapa de maceración prefermentativa, día de montaje. c. Fermentadores en el shaker durante etapa de fermentación alcohólica.	88
Figura 33. Diagrama de bloques que resume los filtros y los criterios previos al análisis PCA.....	92
Figura 34. Seguimiento del consumo de sustrato para fermentaciones bioprotegidas con <i>Cándida oleophila</i> mediante densidad. La línea vertical naranja representa el momento en que la levadura <i>S. cerevisiae</i> es inoculada, dando termino a la maceración prefermentativa e inicio a la fase fermentativa.	95
Figura 35. Seguimiento del consumo de sustrato para fermentaciones bioprotegidas con <i>Cándida boidinii</i> mediante densidad. La línea vertical naranja representa el momento en que la levadura <i>S.cerevisiae</i> es inoculada, dando termino a la maceración prefermentativa e inicio a la fase fermentativa.	95
Figura 36. Seguimiento del consumo de sustrato para fermentaciones bioprotegidas con inóculo mixto <i>Cándida boidinii</i> / <i>Cándida oleophila</i> (50/50) mediante densidad. La línea vertical naranja representa el momento en que la levadura <i>S.cerevisiae</i> es inoculada, dando termino a la maceración prefermentativa e inicio a la fase fermentativa.	96

Figura 37. Gráfica de escala logarítmica de crecimiento celular en el tiempo de fermentaciones realizadas con el bioprotector <i>Cándida oleophila</i>	99
Figura 38. Gráfica de escala logarítmica de crecimiento celular en el tiempo de fermentaciones realizadas con el bioprotector <i>Cándida boidinii</i>	99
Figura 39. Gráfica de escala logarítmica de crecimiento celular en el tiempo de fermentaciones realizadas con el bioprotector <i>Cándida oleophila</i> / <i>Cándida boidinii</i>	100
Figura 40. Proporción entre levaduras no <i>Saccharomyces</i> (color azul) y Levaduras <i>Saccharomyces</i> (color gris) a lo largo de la fermentación para la modalidad con <i>Cándida oleophila</i> 10^6 ufc/mL.	102
Figura 41. Proporción entre levaduras no <i>Saccharomyces</i> (color azul) y Levaduras <i>Saccharomyces</i> (color gris) a lo largo de la fermentación para la modalidad con <i>Cándida oleophila</i> 10^7 ufc/mL.	102
Figura 42. Proporción entre levaduras no <i>Saccharomyces</i> (color azul) y Levaduras <i>Saccharomyces</i> (color gris) a lo largo de la fermentación para la modalidad con <i>Cándida boidinii</i> 10^6 ufc/mL.....	104
Figura 43. Proporción entre levaduras no <i>Saccharomyces</i> (color azul) y Levaduras <i>Saccharomyces</i> (color gris) a lo largo de la fermentación para la modalidad con <i>Cándida boidinii</i> 10^7 ufc/mL.....	104
Figura 44. Proporción entre levaduras no <i>Saccharomyces</i> (color azul) y Levaduras <i>Saccharomyces</i> (color gris) a lo largo de la fermentación para la modalidad con <i>Cándida boidinii</i> / <i>Cándida oleophila</i> 50:50 10^7 ufc/mL.....	106
Figura 45. Proporción entre levaduras no <i>Saccharomyces</i> (color azul) y Levaduras <i>Saccharomyces</i> (color gris) a lo largo de la fermentación para la modalidad con SO_2 ufc/mL.....	107
Figura 46. Proporción entre levaduras no <i>Saccharomyces</i> (color azul) y Levaduras <i>Saccharomyces</i> (color gris) a lo largo de la fermentación para la modalidad Sin Antimicrobiano.	108
Figura 47. Población de BAL (log UFC/mL) a lo largo de FA en las diferentes estrategias de inoculación (CO: <i>Cándida oleophila</i> , SO_2 : Control con SO_2 , SA: Sin Antimicrobiano).	111
Figura 48. Población de BAL (log UFC/mL) a lo largo de FA en las diferentes estrategias de inoculación (CB: <i>Cándida boidinii</i> , SO_2 : Control con SO_2 , SA: Sin Antimicrobiano).....	111
Figura 49. Población de BAL (log UFC/mL) a lo largo de FA en las diferentes estrategias de inoculación (CO/CB: Inoculo mixto <i>Cándida oleophila</i> / <i>Cándida boidinii</i> , SO_2 : Control con SO_2 , SA: Sin Antimicrobiano).	112
Figura 50. Población de BAA (log UFC/mL) a lo largo de FA en las diferentes estrategias de inoculación (CO <i>Cándida oleophila</i> , SO_2 : Control con SO_2 , SA: Sin Antimicrobiano).....	115
Figura 51. . Población de BAA (log UFC/mL) a lo largo de FA en las diferentes estrategias de inoculación (CB: <i>Cándida boidinii</i> , SO_2 : Control con SO_2 , SA: Sin Antimicrobiano).	116
Figura 52. Población de BAA (log UFC/mL) a lo largo de FA en las diferentes estrategias de inoculación (CO/CB: <i>Cándida oleophila</i> / <i>Cándida boidinii</i> , SO_2 : Control con SO_2 , SA: Sin Antimicrobiano).....	116

Figura 53. Población de <i>Brettanomyces bruxellensis</i> (log UFC/mL) a lo largo de FA en las diferentes estrategias de inoculación (CO: <i>Cándida oleophila</i> , SO ₂ : Control con SO ₂ , SA: Sin Antimicrobiano).	120
Figura 54. Población de <i>Brettanomyces bruxellensis</i> (log UFC/mL) a lo largo de FA en las diferentes estrategias de inoculación (CB: <i>Cándida boidinii</i> , SO ₂ : Control con SO ₂ , SA: Sin Antimicrobiano).	120
Figura 55. Población de <i>Brettanomyces bruxellensis</i> (log UFC/mL) a lo largo de FA en las diferentes estrategias de inoculación (CB: <i>Cándida boidinii</i> , SO ₂ : Control con SO ₂ , SA: Sin Antimicrobiano).	121
Figura 56. Cantidad de compuestos volátiles promedios detectados por muestras asociadas a las distintas levaduras ± desviación estándar en fermentación monocultivo de la variedad Sauvignon blanc en comparación a SO ₂ .	130
Figura 57. Clasificación por familia de los compuestos analizados para las distintas levaduras no <i>Saccharomyces</i> bioprotectoras aplicadas en la variedad Sauvignon blanc y en fermentación con <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en comparación al control con SO ₂ . En la simbología se detalla CO (<i>Cándida oleophila</i>), CB (<i>Cándida boidinii</i>), CO-CB (<i>Cándida oleophila</i> y <i>Cándida boidinii</i> 50/50), SA (Sin antimicrobiano) y SO ₂ (Control).	132
Figura 58. Gráfico de doble proyección para las diferentes estrategias de bioprotección en fermentación monocultivo utilizando distintas levaduras nativas en comparación al control con SO ₂ y a la fermentación sin antimicrobiano. CO (<i>Cándida oleophila</i>), CB (<i>Cándida boidinii</i>), CO-CB (<i>Cándida oleophila</i> y <i>Cándida boidinii</i> 50/50), SA (Sin antimicrobiano) y SO ₂ (Control).	134
Figura 59. Perfil de compuestos volátiles identificados para las distintas estrategias bioprotectoras. En la simbología se detalla CO (<i>Cándida oleophila</i>), CB (<i>Cándida boidinii</i>), CO-CB (<i>Cándida oleophila</i> / <i>Cándida boidinii</i> (50/50)), SA (Sin antimicrobiano) y SO ₂ (Control con sulfitos).	135
Figura 60. Rejilla de conteo de cámara Neubauer	172
Figura 61. Preparación de diluciones y las inoculaciones	173
Figura 62. Placa de Petri con medio de cultivo, dividida en secciones por dilución con muestras en triplicado.	174
Figura 63. Obtención de la velocidad específica de crecimiento para <i>Cándida oleophila</i> 10 ⁶	177
Figura 64. Obtención de la velocidad específica de crecimiento para <i>Cándida oleophila</i> 10 ⁷	177
Figura 65. Obtención de la velocidad específica de crecimiento para <i>Cándida boidinii</i> 10 ⁶	178
Figura 66. Obtención de la velocidad específica de crecimiento para <i>Cándida boidinii</i> 10 ⁷	178
Figura 67. Obtención de la velocidad específica de crecimiento para SO ₂	178
Figura 68. Obtención de la velocidad específica de crecimiento modalidad Sin Antimicrobiano	178
Figura 69. Obtención de la velocidad específica de crecimiento modalidad <i>Cándida oleophila</i> / <i>Cándida boidinii</i> 50/50 10 ⁷	179

Figura 70. Placas con medio CGA para el crecimiento de levaduras. A. Diluciones donde no se puede realizar el conteo por exceso de crecimiento. B. Diluciones 10^4 y 10^5 ufc/mL donde se logra realizar el conteo celular. C. Placa con otras diluciones donde es claramente visible cada colonia.	179
Figura 71. Placas con medio Agar Lisina para el crecimiento de levaduras. A. Diluciones 10^1 , 10^2 , 10^3 y 10^4 ufc/mL, evidenciando diferentes colores en algunos tipos de levadura. B. Placa con diluciones 10^0 y 10^1 ufc/mL.....	180
Figura 72. Placas con medio MRS Agar para el crecimiento de bacterias lácticas. A. Placa con diluciones 10^0 , 10^1 ufc/mL, B. Placa con dilución 10^2 ufc/mL. C. Placa con dilución 10^3 ufc/mL.....	180
Figura 73. Placas con medio WLD Agar para el crecimiento de bacterias acéticas.....	181
Figura 74. Placas con medio WLC Agar para el crecimiento de <i>Brettanomyces bruxellensis</i>	181
Figura 75. Distancia de Mahalanobis para la variedad Sauvignon blanc en fermentación monocultivo a escala de laboratorio.....	182
Figura 76. Gráfico de sedimentación para identificar los vectores propios en mosto Sauvignon Blanc para diferentes estrategias de bioprotección	183

Índice de tablas

Tabla 1. Efectos de la adición de SO_2 en uvas, mosto y vino.....	42
Tabla 2. Resumen de los métodos químicos alternativos al SO_2 . Obtenido de (Lisanti et al., 2019)	52
Tabla 3. Resumen de los métodos químicos alternativos al SO_2 . Obtenido de (Lisanti et al., 2019)	56
Tabla 4. Resumen de las alternativas naturales utilizadas en reemplazo del SO_2 en el vino. Obtenido de (Yıldırım et al., 2020).....	59
Tabla 5. Alcoholes superiores presentes en el vino. Obtenido de (Visan et al., 2018).....	68
Tabla 6. Ácidos grasos volátiles presentes en el vino. Obtenido de (Visan et al., 2018)	69
Tabla 7. Esteres presentes en el vino. Obtenido de (Visan et al., 2018).....	70
Tabla 8. Reactivos utilizados durante el desarrollo de las fermentaciones	75
Tabla 9. Lista de equipos.....	76
Tabla 10. Materiales y otros equipos utilizados durante el desarrollo de las fermentaciones	85
Tabla 11. Diseño de Experimentos.....	86
Tabla 12. Parámetros operacionales fermentaciones	86
Tabla 13. Parámetros ajustados en el medio de cultivo	87
Tabla 14. Resumen de las mediciones realizadas para el seguimiento de fermentaciones	90
Tabla 15. Tasa de reducción de la densidad en el tiempo en 10g/mL/día.....	96

Tabla 16. Velocidades específica máxima de crecimiento. los datos representan el promedio $\pm$ desviación estándar calculada de los matraces en triplicado para cada caso. Los valores seguidos de letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas ($\alpha = 0,05$)	100
Tabla 17. Análisis ANOVA Tukey realizado para las bacterias ácidolácticas a lo largo de la fermentación. Letras distintas indican diferencias significativas. Los valores seguidos de letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas ($\alpha = 0,05$).....	113
Tabla 18. Análisis ANOVA Tukey realizado para las bacterias ácidoacéticas a lo largo de la fermentación. Letras distintas indican diferencias significativas ($\alpha = 0,05$)	117
Tabla 19. Análisis ANOVA Tukey realizado para las levaduras <i>Brettanomyces bruxellensis</i> a lo largo de la fermentación. Letras distintas indican diferencias significativas ($\alpha = 0,05$)	122
Tabla 20. Concentración de ácido málico final bajo las diferentes estrategias de bioprotección con su respectivo análisis ANOVA Tukey para el Ácido L-málico. Letras diferentes indican diferencias significativas.	123
Tabla 21. Concentración de etanol final bajo las diferentes estrategias de bioprotección, con su respectivo ANOVA Tukey de diferencias significativas para el Etanol. Letras diferentes indican diferencias significativas.	124
Tabla 22. Concentración de ácido acético final bajo las diferentes estrategias de bioprotección Análisis ANOVA Tukey de diferencias significativas para el ácido acético. Letras diferentes indican diferencias significativas.	125
Tabla 23. Concentración de glicerol final para cada una de las estrategias con su respectivo análisis ANOVA Tukey de diferencias significativas para el glicerol. Letras diferentes indican diferencias significativas.	126
Tabla 24. Análisis ANOVA Tukey de diferencias significativas para el ácido L-láctico. Letras diferentes indican diferencias significativas.....	127
Tabla 25. Análisis ANOVA Tukey de diferencias significativas para el ácido tartárico. Letras diferentes indican diferencias significativas.....	128
Tabla 26. Análisis ANOVA Tukey de diferencias significativas para la Glucosa/Fructosa. Letras diferentes indican diferencias significativas.	129
Tabla 27. Resultados de rendimiento de producto por sustrato consumido en fermentaciones secuenciales	130
Tabla 28. Análisis estadístico ANOVA aplicando la prueba Tukey con un nivel de significancia del 95% (Valor $p \leq 0,05$) para los compuestos asociados a la fermentación con distintas modalidades de bioprotección.....	136
Tabla 29. Medios sólidos comúnmente empleados para reactivar microorganismos	171

Tabla 30. Análisis de los valores propios de la matriz de correlación para Sauvignon blanc monocultivo.	183
Tabla 31. Análisis de los vectores propios de la matriz de correlación para Sauvignon Blanc	184
Tabla 32. Análisis estadístico ANOVA aplicando la prueba Tukey con un nivel de significancia del 95% (Valor $p \leq 0,05$) para los compuestos asociados a la fermentación con distintas modalidades de bioprotección.....	184

CAPITULO 1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

1.1. Introducción

Históricamente, el dióxido de azufre (SO₂) ha desempeñado un papel crucial en la industria vinícola debido a sus propiedades antioxidantes y antimicrobianas, su capacidad para inhibir el desarrollo de microorganismos patógenos, como levaduras y bacterias ácidolácticas (LAB) y por su potencial para prevenir las reacciones de pardeamiento (Cabaroğlu & Canbas, 1993). No obstante, en las últimas décadas, las preocupaciones sobre la seguridad del consumidor han surgido debido a posibles reacciones alérgicas asociadas a este aditivo (Vally & Thompson, 2006), lo que ha llevado a establecer límites para su uso en vinificación.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha establecido una ingesta diaria máxima aceptable (IDA) de 0,7 mg/kg de peso corporal (Food and Agriculture Organization FAO, World Health Organization WHO, 2009), y la Organización Internacional de la Viña y el Vino (OIV) ha limitado progresivamente las concentraciones máximas de SO₂ permitidas en el vino; 150mg/L en vinos tintos y 200mg/L en vinos blancos (Stockley et al., 2021; García-Ruiz, et al., 2008). La creciente demanda de alimentos libres de aditivos químicos, sumada a las recomendaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS) para disminuir el empleo de sulfitos, ha propiciado un cambio significativo en la investigación enológica. Este cambio se orienta hacia la búsqueda de alternativas que puedan sustituir, ya sea parcial o completamente, el uso de sulfitos en los procesos de vinificación. (Santos, et al., 2012; Lisanti, et al., 2019; Yidirim & Darici, 2020); donde la bioprotección ha surgido como una alternativa prometedora.

La bioprotección en los alimentos se refiere al uso de microorganismos, enzimas o compuestos antimicrobianos para prevenir el crecimiento de patógenos que los deterioran. En el caso del vino la principal ventaja de esta técnica es que reduce la necesidad de sulfitos, y permite conferirle características organolépticas deseables al producto final debido a la acción de levaduras *no Saccharomyces* (LVNS), las cuales generan un nicho ecológico al competir por los nutrientes contra los microorganismos deteriorantes como bacterias ácidolácticas, *Brettanomyces bruxellensis* y bacterias ácidoacéticas. Actualmente la mayoría de los estudios de bioprotección con LVNS han sido realizados con *Torulaspora delbrueckii*, *Metschnikowia pulcherrima* y *Lachancea thermotolerans* (Escribano-Viana et al., 2022; Simonin et al., 2018; Simonin et al., 2020; Simonin et al., 2022; Windholtz et al., 2021^a; Windholtz et al., 2021^b;

Windholtz et al., 2023; Lebleux et al., 2023; Rubio-Breton et al., 2018), las cuales actualmente se comercializan como cepas de bioprotección (Roudil et al., 2020). obteniendo productos de buena calidad con características organolépticas deseables. Sin embargo, hay muchas levaduras *no Saccharomyces* que aún no son probadas como biocontroladoras y considerando que cada levadura está asociada a compuestos volátiles característicos debido a las diferentes rutas metabólicas inherentes a ellas, sería interesante desde el punto de vista enológico evaluar otras alternativas que demuestren potencial biocontrolador y que al mismo tiempo tengan un beneficio organoléptico asociado. Adicionalmente, se observa una brecha significativa en la investigación de la bioprotección, ya que la mayoría de los estudios se centran exclusivamente en la evaluación de perfiles microbiológicos, químicos, volátiles o sensoriales del vino por separado, sin considerar la necesidad crucial de una evaluación simultánea de todos estos aspectos. La integración de estos elementos es esencial para obtener resultados más precisos y reales acerca de la eficacia de la bioprotección como método antimicrobiano. Además, la elección de la especie de levadura, la dosis y el momento de adición aún carecen de una base científica sólida (Alexandre et al., 2023).

El presente estudio busca abordar estas lagunas al investigar el impacto de la bioprotección como sustituto del SO₂ sobre vinos *Sauvignon Blanc* bioprotegidos con especies de un género poco estudiado en vinificación: *Cándida spp*, en específico *Cándida oleophila* y *Cándida boidinii*. Se examinarán las poblaciones de levaduras, bacterias lácticas y bacterias acéticas bajo diferentes estrategias de inoculación, junto con la composición fisicoquímica y volátil final del vino. Este enfoque integral permitirá una comprensión más profunda de las complejas interacciones y mecanismos que surgen entre los microorganismos en el proceso de vinificación.

1.2. Hipótesis

La utilización de las levaduras nativas *Cándida spp.* como agente bioprotector en la fermentación alcohólica del vino previene el desarrollo de microorganismos de deterioro y permite obtener vinos de calidad final comparable a la obtenida con el uso del aditivo químico SO₂.

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo General

Evaluar el impacto que genera en el perfil microbiológico, composición química y volátil del vino el uso de levaduras nativas *Cándida spp.* bioprotectoras como alternativa al uso de SO₂ en fermentaciones de vino.

1.3.2. Objetivos Específicos

- Evaluar el impacto bioprotector que genera inocular diferentes concentraciones de levaduras nativas *no Saccharomyces* del género *Cándida spp.* en el vino blanco.
- Determinar, cuantificar y comparar la población de microorganismos deteriorantes durante la fermentación del vino blanco entre la modalidad de bioprotección con levaduras *Cándida spp.*, el enfoque tradicional que utiliza el aditivo químico SO₂ y la fermentación sin antimicrobiano.
- Seleccionar las estrategias que presenten un mejor potencial antimicrobiano bioprotector y caracterizar el producto final obtenido, identificando metabolitos producidos, porcentaje de etanol y compuestos volátiles.
- Analizar y comparar la composición volátil y los metabolitos generados entre las fermentaciones con levaduras *Cándida spp.* bioprotectoras y el aditivo antimicrobiano tradicional SO₂.

CAPITULO 2. ANTECEDENTES GENERALES

2.1. Vino

2.2.1. Definición

El vino es una bebida alcohólica que se origina a partir de la fermentación alcohólica parcial o completa del mosto de uva. La fermentación se produce por la acción de levaduras que metabolizan los azúcares presentes para formar etanol y CO₂ (Waterhouse et al., 2016). Por lo general se utiliza la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, conocida como “levadura del vino”, sin embargo, también pueden intervenir otro tipo de levaduras no convencionales, nativas o también llamadas levaduras *no Saccharomyces*, las cuales son capaces de contribuir en los perfiles fermentativos y generar un impacto positivo en la calidad final del vino (Jolly et al., 2014). Estudios recientes han demostrado que incluso algunas cepas de levaduras *no Saccharomyces* son capaces de conferir protección antimicrobiana al mosto durante etapas prefermentativas, lo cual significaría una alternativa a los aditivos químicos tradicionales, como el SO₂, utilizados para controlar la microbiana deteriorante. (Escribano-Viana et al., 2022; Windholtz et al., 2021)

La composición final del vino está influenciada por múltiples factores, como las características inherentes de la uva, los subproductos generados por la levadura en la fermentación, los compuestos que se forman durante el almacenamiento y la maduración, el tipo de cepa utilizada e incluso elementos del suelo de la viña, como la disponibilidad de agua, el contenido de nutrientes y el pH (Jackson & Lombard, 1993), por lo que cada vino elaborado posee características únicas e inherentes a la región. Sin embargo, los componentes principales del vino siempre comprenden el agua y el etanol, los cuales constituyen el 97% de su peso (Haseeb et al., 2019). Paralelamente, los componentes restantes, como azúcares, ácidos, otros alcoholes y fenoles, desempeñan un papel crucial en aspectos tales como la dulzura, la acidez y el color, así como en los perfiles sensoriales y gustativos del vino. Además, en la compleja matriz del vino se entrelazan otros compuestos en proporciones sensiblemente menores tales como ésteres, acetales y otras moléculas traza, entre las que destacan minerales, vitaminas y compuestos ricos en azufre y nitrógeno (Haseeb et al., 2019). En la actualidad, se han identificado de forma analítica más de 500 compuestos en el vino, estando la mayoría de ellos presentes en concentraciones que oscilan entre 10⁻¹ y 10⁻⁶ mg/L (Soleas et al., 1997; Stockley et al., 2012).

2.2.2. Industria Vitivinícola en Chile

La industria del vino es actualmente una de las más relevantes del país, representando el 5,7% de las exportaciones que no son cobre, un 16,5% de las exportaciones agropecuarias y aportando 205 millones de dólares de recaudación fiscal por pago de IVA e ILA (Wines of Chile, s.f.). Hoy, en territorio nacional, existen 800 bodegas activas, 11697 productores y 394 empresas exportadoras, de las cuales un 76% son pymes. Adicionalmente, se debe destacar el rol descentralizador que tiene el vino en Chile, donde un 91% de la superficie vitícola, un 92% de las bodegas y un 85% del trabajo asociado a esta industria se encuentra fuera de la región Metropolitana, concentrándose la mayor cantidad de viñas en O'Higgins (32,7%) y el Maule (37,9%) (Wines of Chile, 2023).

Con relación a la producción de vinos con denominación de origen en el país durante el año 2022, el 69% del total equivalente a 714.658.348 litros, correspondió a vinos provenientes de cepajes tintos y el 31% equivalente a 320.827.860 litros corresponde a vinos provenientes de cepajes blancos. En cuanto a los tipos de cepa, el *Cabernet Sauvignon* corresponde a la cepa con mayores volúmenes, representando un 37% del total, seguido del *Merlot* con un 13%, *Carmenere* con un 10,6%, *Sauvignon Blanc* con un 8,6% y *Chardonnay* con un 7,7% (SAG, 2022). En la figura 1 se muestran las 10 variedades de vino con mayores existencias durante el 2022.

En cuanto a la variación en la producción de vinos con denominación de origen según la variedad, se observa que en los cepajes tintos, las mayores fluctuaciones el 2022 con respecto a la cosecha 2021 se evidencian en la cepa Pinot Noir, experimentando un notable incremento del 8,1%. Asimismo, la variedad Syrah presenta un aumento significativo, alcanzando un incremento del 4,4%. Por otra parte, las variedades que presentaron una disminución en su producción respecto a la vendimia 2021 fueron Pedro Jiménez, País y Cot-Malbec con una disminución del 42,5%, 20% y 12,2% respectivamente (ODEPA, 2023).

La producción total nacional de los últimos años se muestra en la figura 2, en donde la producción total del año 2022 alcanzó los 1.244.369.981 litros, inferior en un 7,4% al año 2021. Con relación a los vinos sin denominación de origen, estos aumentaron en un 1,6% con respecto al año 2021, sin embargo, la mayor variación la tuvieron los vinos elaborados con uva de mesa,

disminuyendo su producción en un 72,6%, debido al alza disparada que tuvieron el año 2021 por los efectos de las lluvias inesperadas de enero del mismo año (WIP, 2022).

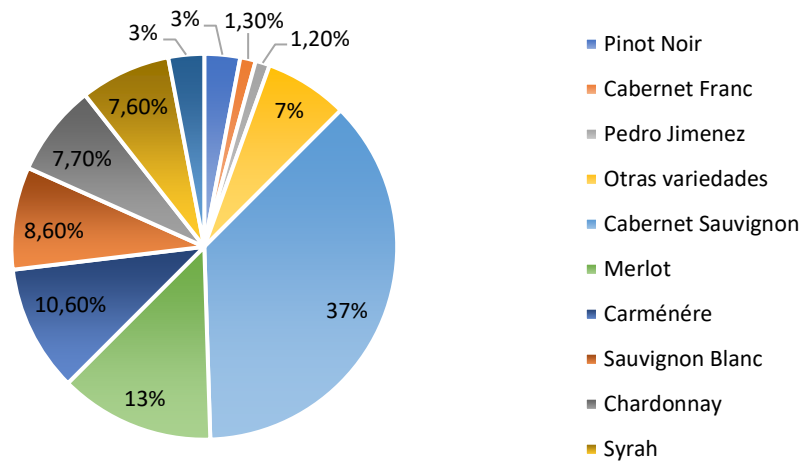


Figura 1. Producción de vinos con denominación de origen por variedades durante el año 2022. Elaboración propia en base a datos obtenidos del SAG (SAG, 2022)

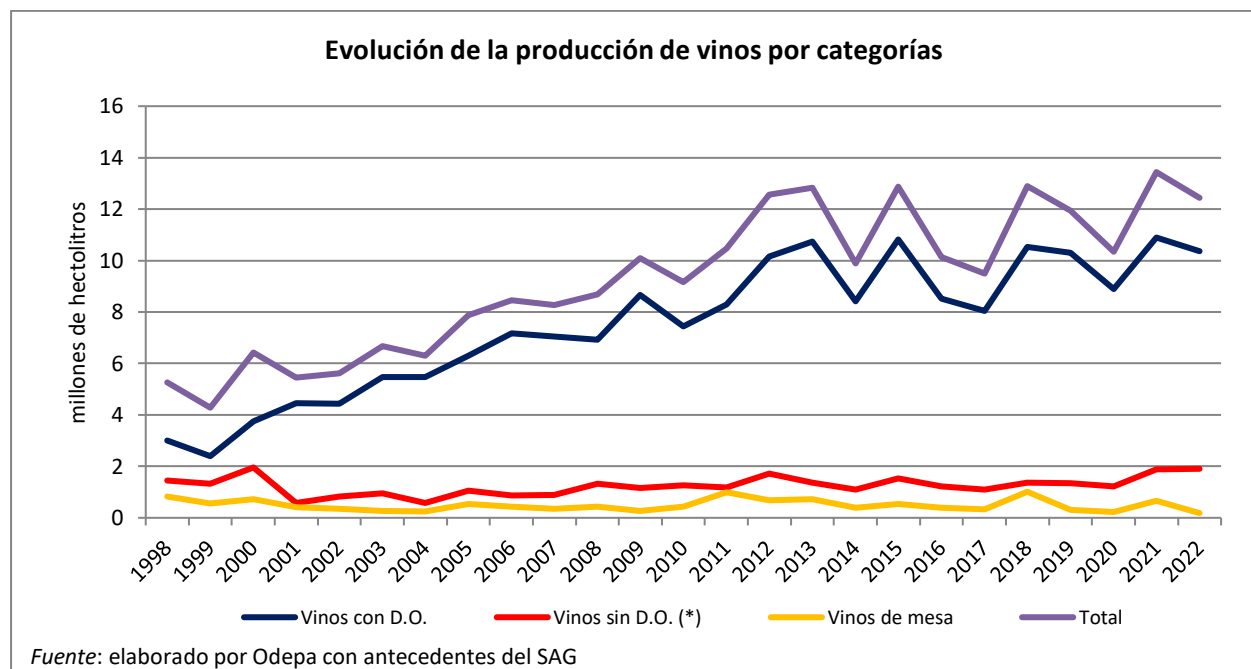


Figura 2. Producción de vino en Chile. Elaborado por ODEPA con información del SAG.

En cuanto a la exportación de vinos orgánicos, esta creció en un 36% en los últimos 10 años, sin embargo, en el 2022 siguen representando sólo un 3% del total de las exportaciones de vino (diario financiero, 2022). Cabe destacar que se considera orgánico a un vino cuyo control de

plagas se realiza mediante microorganismos, animales o insectos, utilizando además productos como compost orgánico y levaduras nativas para la fertilización de la uva (Remaud et al., 2018).

2.3. Proceso de Vinificación

Este proceso se realiza desde la cosecha de la vid hasta la obtención del vino y está compuesto por las siguientes etapas (Boulton et al., 2013):

1. Vendimia: Consiste en la recolección de las uvas cuidadosamente en el momento adecuado de madurez. La vendimia puede ser manual o mecánica y debe realizarse en el momento adecuado considerando factores como clima, disponibilidad de mano de obra y madurez de la uva.
2. Despalillado: Esta etapa consiste en la separación de las uvas del racimo y la eliminación de los pedúnculos, también llamados raspón o escobajos, puede ser realizada de manera manual o mecánica dependiendo del tipo de uva, la preferencia del enólogo y la madurez de la fruta. El raspón debe ser eliminado ya que puede aportar sabores y aromas no deseados, como mayor astringencia y amargor. En esta etapa la uva se desinfecta y se lava para pasar a la etapa de estrujado.
3. Estrujado: Etapa donde las uvas son sometidas a una presión suave para liberar el jugo y los compuestos solubles de las semillas y las pieles. Esta etapa puede realizarse mediante prensado mecánico o pisado de la uva.
4. Fermentación alcohólica: En esta etapa, los azúcares del mosto se transforman en alcohol etílico y dióxido de carbono por acción de las levaduras añadidas o presentes de forma natural en la uva.
5. Fermentación Maloláctica: Proceso que ocurre después de la fermentación alcohólica donde se convierte el ácido málico en ácido láctico, lo que puede mejorar el sabor del vino, impactando en la acidez, el sabor, el aroma y la estabilidad microbiológica.
6. Crianza: Etapa donde se mejora la calidad del vino mediante un envejecimiento en barricas de acero inoxidable, roble u otros recipientes, para que adquieran su carácter distintivo y complejidad.
7. Clarificación: Etapa que tiene como objetivo eliminar las partículas sólidas suspendidas restantes y las sustancias no deseadas en el vino para que este obtenga una apariencia más estable y clara. Este proceso se puede llevar a cabo mediante decantación natural, clarificantes químicos y filtración.

8. Embotellado: Embotellamiento del vino y almacenamiento bajo condiciones adecuadas de temperatura y humedad para su maduración y envejecimiento.

Estas son las principales etapas en el proceso de vinificación, aunque dependiendo del tipo de vino, pueden añadirse o eliminarse algunas de estas o variar su orden.

En la figura 3 se detalla el proceso de producción del vino desde la cosecha hasta el embotellado, diferenciando las etapas entre vinos tintos, blancos y rosados.

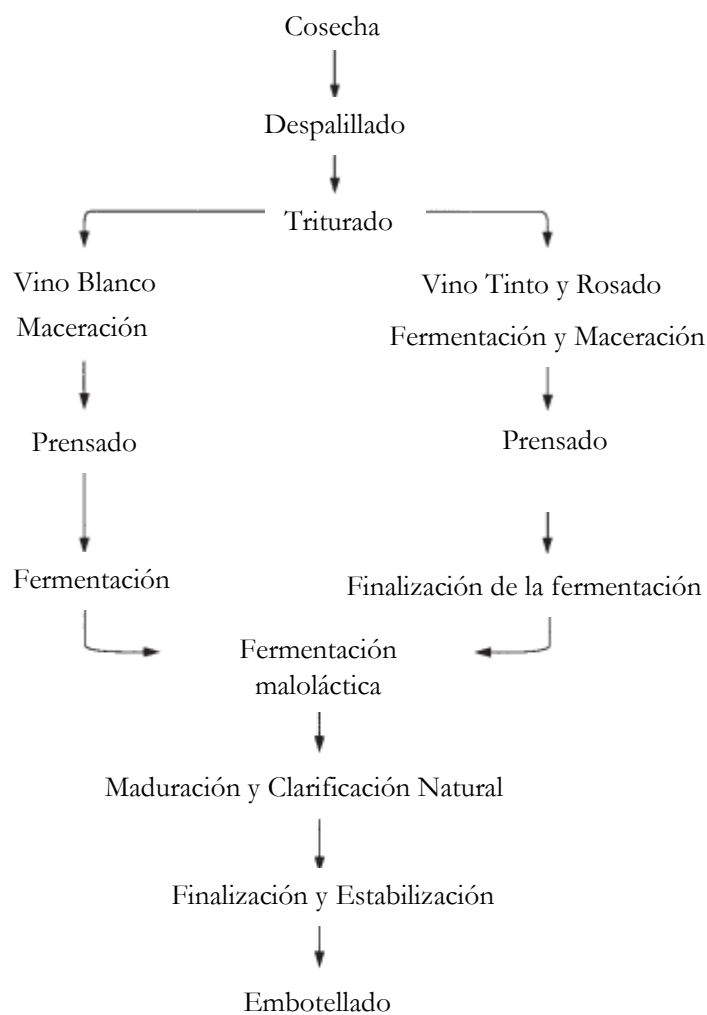


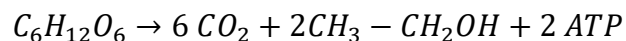
Figura 3. Etapas del Proceso de Vinificación (Jackson, 2008)

2.4. Fermentación Alcohólica del vino

2.4.1. Bioquímica de la fermentación alcohólica

En la fermentación alcohólica se pueden distinguir 2 etapas, primero la respiración celular, donde las levaduras degradan las moléculas de azúcar fermentable por vía respiratoria; el metabolismo sigue la ruta de la glucólisis y a partir de una molécula de glucosa o fructosa se generan 2 moléculas de ácido pirúvico, dos moléculas de ATP y una molécula de NADH (Chandel, 2021), para posteriormente continuar al ciclo de Krebs en la mitocondria, que mediante el uso de O₂ genera una elevada producción de energía permitiendo la reproducción celular (Müller, 1964). Una vez agotado el oxígeno, se pasa a la segunda etapa, donde las levaduras comienzan a seguir la vía fermentativa y el ácido pirúvico se descarboxila a acetaldehído, el cual se convierte en aceptor de hidrógeno para reducirse y así formar alcohol etílico. La ganancia de energía en este proceso es muy baja, ya que toda la energía inicial de la glucosa permanece en el etanol (Tortora et al., 2007), por ello las levaduras deben transformar gran cantidad de azúcar en alcohol para cubrir sus necesidades energéticas. La reacción que representa el proceso de fermentación se presenta en la ecuación 1, y en la figura 4 se muestran las diferentes rutas metabólicas, caracterizando la parte anaeróbica (fuera de la mitocondria) y la parte aeróbica (dentro de la mitocondria), además de todos los metabolitos formados durante el proceso.

Ecuación 1. Reacción que representa el proceso de fermentación



Cabe destacar que no todos los azúcares son degradados por la misma ruta, sino que, dependiendo de los requerimientos energéticos de la levadura, esta degradará los azúcares por la vía glicéropirúvica o fermentativa. Mediante la vía glicéropirúvica se forma glicerol a partir de dihidroxiacetona fosfato, tal cual se muestra en la figura 4, siendo el glicerol el segundo componente cuantitativamente más importante del vino después del etanol, encontrándose en cantidades de entre 6 a 10 g/L (Mesas & Alegre, 1999), atribuyéndose a este compuesto caracteres de suavidad y aterciopelado del vino. Por otro lado, el ácido pirúvico o piruvato también es capaz de formar otros compuestos secundarios de la fermentación alcohólica como el ácido acético, ácido láctico, ácido succínico, entre otros metabolitos (Epifanio, 2005).

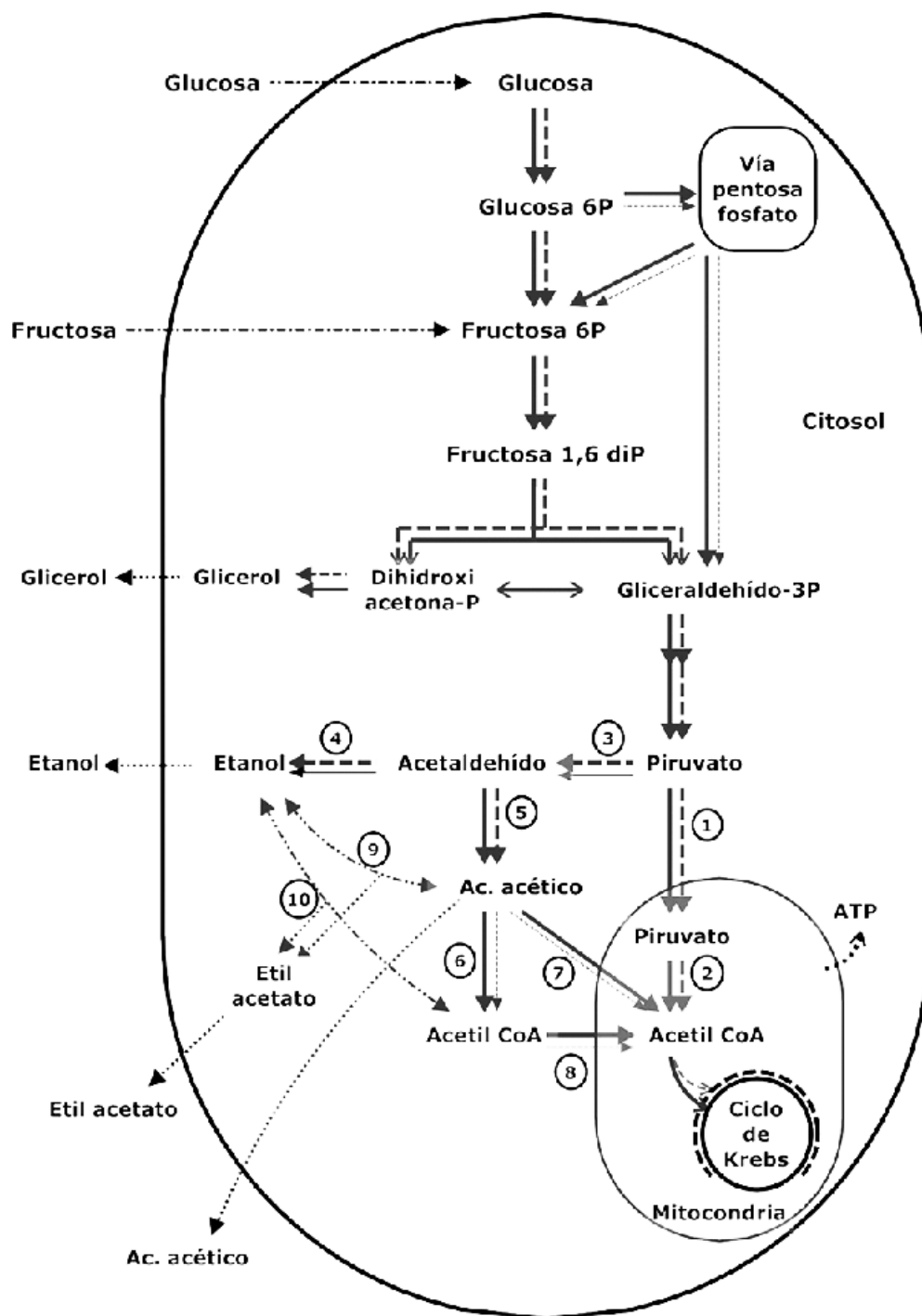


Figura 4. Metabolismo típico de levaduras: Respiratorio (-) y respirofermentativo (-). 1: Transporte de piruvato a la mitocondria, 2: Complejo piruvato deshidrogenasa, 3: Piruvato descarboxilasa, 4: Alcohol deshidrogenasa, 5: Acetaldehído deshidrogenasa, 6: Acetil CoA sintetasa (citoplasmática), 7: Acetil CoA sintetasa (mitocondrial), 8: Transporte de acetil CoA mediado por la vía carnitina. Formación de ésteres, 9: Acetiltransferasa, 10: éster sintasa. Obtenido de (Fredlund et al., 2004).

estacionaria, donde se mantiene la viabilidad de las levaduras presentes, pero no hay multiplicación celular, y la tercera fase corresponde a la fase de declive, donde comienza la mortalidad celular. En la figura 6.B se muestran la curva de crecimiento típica de una población de microorganismos.

La fase de crecimiento de las levaduras se puede construir mediante la medición con métodos directos e indirectos, tales como el conteo celular o la medición de la turbidez. El seguimiento y control del sustrato en el tiempo se puede medir de forma indirecta mediante el refractómetro (°brix) o densidad, donde la fermentación alcohólica se dará por finalizada cuando se lleguen a valores que oscilen entre los 990 y 994 kg/m³ de densidad y se mantengan constantes durante 48h. También se puede medir el contenido de azúcares residuales, los cuales deben estar por debajo de los 2 g/L (Werner-Washburne et al., 1993).

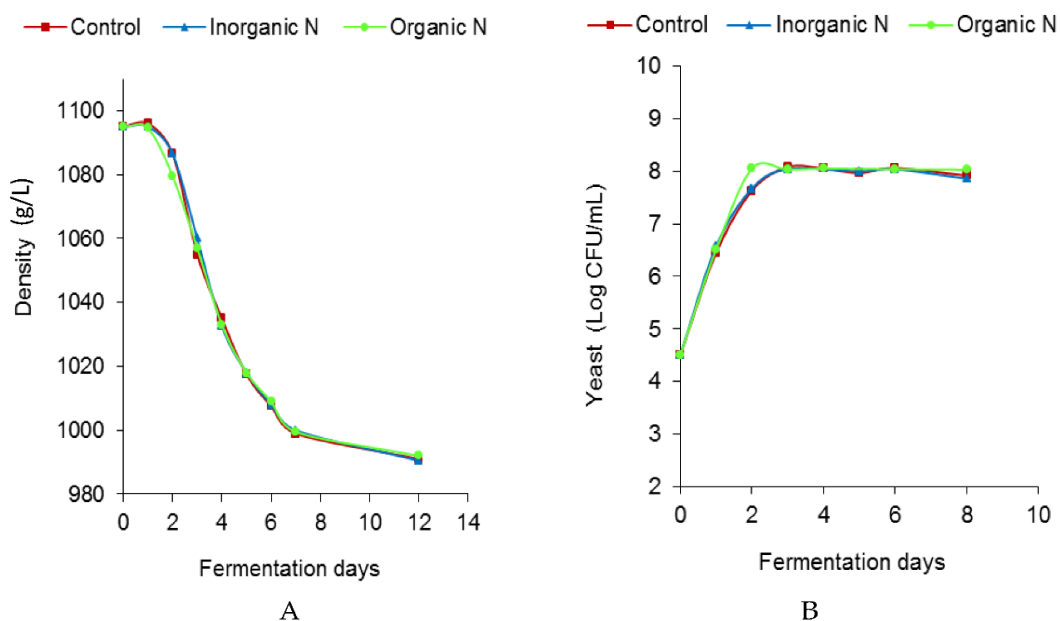


Figura 6. Evolución de la densidad (A) y población de levaduras (B) durante la fermentación alcohólica (Santamaría et al., 2020)

En la figura 6.A se muestra la curva de consumo de sustrato representada mediante la medición de la densidad, aunque también puede ser representada en °brix o en g/L, también es posible visualizar las distintas etapas de consumo, la primera corresponde a la etapa de latencia en donde no existe degradación de azúcares en el mosto, manteniendo la densidad sin variaciones, luego viene la etapa de crecimiento exponencial a velocidad constante, donde se visualiza un decaimiento constante del sustrato producto del consumo del microorganismo y por último una

etapa de decaimiento de la velocidad de consumo de sustrato producto del agotamiento de los nutrientes necesarios para el crecimiento del microorganismo, manteniendo constante el valor de °brix, densidad o azúcares residuales.

2.4.3. Factores que afectan el desarrollo de la fermentación alcohólica

Existen diversos factores tanto químicos como físicos que influyen de forma positiva o negativa sobre el transcurso de la fermentación alcohólica o incluso sobre el desarrollo de las levaduras (Navarra et al., 1994), y por ende en las propiedades del producto terminado. Los más relevantes se nombran a continuación:

- **Influencia de la temperatura**

La temperatura afecta la velocidad de reproducción y actividad de las levaduras que realizan la fermentación. De hecho, la intensidad de la fermentación se duplica por cada aumento de temperatura de 10°C, es decir es dos veces más rápida a 30°C que a 20°C y por cada aumento de 1°C, la levadura transforma un 10% más de azúcar en el mismo tiempo transcurrido (Ribéreau-Gayon et al., 2006). Sin embargo, la velocidad de fermentación es máxima a los 35°C y comienza a disminuir a los 40°C, ya que a temperaturas excesivamente altas disminuye la viabilidad celular, provocando muerte celular (Mesas & Alegre, 1999). Además, la temperatura también influye en la cinética de fermentación, donde el rendimiento de alcohol es menor a temperaturas elevadas y la mayoría de los productos secundarios de la fermentación gliceropirúvica se encuentran en concentraciones mayores, cabe destacar que los alcoholes superiores, ésteres y ácidos grasos son los más afectados frente a las altas temperaturas, dado que su formación es máxima a 20°C y luego su concentración disminuye progresivamente al incrementar la temperatura (Ribéreau-Gayon et al., 2006), sin embargo temperaturas excesivamente bajas podrían detener la fermentación por completo (Crespo, 1997), debido a que hay una disminución del número de levaduras viables por inactivación (Mesas & Alegre, 1999).

- **Influencia de la concentración inicial de azúcares reductores**

Dependiendo de la variedad de uva y del nivel de maduración de esta, la cantidad de azúcares reductores como la glucosa y la fructosa en el mosto varía entre 120 y 250 g/L. La concentración de azúcar es determinante para la velocidad de la fermentación, donde concentraciones elevadas que sobrepasan los 200g/L provocan que la degradación de azúcares sea realizada hasta la fase

de declive con poblaciones de levadura en situación de supervivencia y una actividad metabólica reducida (Crespo, 1997), lo que puede dar lugar a fermentaciones incompletas, además si la concentración de sustrato es demasiado alta puede provocar un estrés osmótico para las levaduras, lo que significa que las células tienen dificultad para lidiar con el exceso de azúcares provocando una disminución de la actividad fermentativa (Jackson, 2008), una modificación de las vías metabólicas convencionales y cambios en el perfil aromático del vino (Martín-García et al., 2023). Un estudio realizado por De Lerna et al. (2012), demostró que como respuesta al estrés osmótico algunas cepas de *S. cerevisiae* pueden producir ácido acético en altas concentraciones. Por otro lado, las bajas concentraciones de azúcares reductores provocan que las levaduras no tengan suficiente alimento para llevar a cabo una fermentación vigorosa, lo que puede llevar a agregar azúcares adicionales (Jackson, 2008), sin embargo, la metabolización ocurre en fases de multiplicación y fase estacionaria (Crespo, 1997).

- **Influencia del pH**

Las levaduras tienen una gama óptima de pH en la cual pueden funcionar de manera más eficiente, el pH del vino se encuentra generalmente en el rango de 2,75 – 4,3 para un proceso fermentativo. Un pH ácido puede tener un impacto en las levaduras, reduciendo el crecimiento y afectando la fermentación. Mientras que un pH alto favorece el crecimiento de bacterias dañinas que pueden competir con las levaduras por los nutrientes y producir compuestos indeseables en el vino, por ejemplo, las bacterias lácticas son capaces de crecer a valores de pH superiores a 3,5, mientras que a rangos entre 2,9 y 3,1 se mantienen controladas bajo un crecimiento moderado (Du Plessis, 2018). Por otro lado, cualquier cambio brusco en el pH puede inhibir a la levadura fermentativa (Jackson, 2008).

En cuanto a la influencia del pH sobre los compuestos volátiles, Knoll et al. (2011) demostraron que un pH más bajo resultó en mayores cantidades de esteres frutales, de hecho, a pH 3,2 se observó un aumento de esteres de ácido etílico y acético en fermentaciones de vino *Chardonnay* y *Riesling* con *S. cerevisiae* comercial, mientras que a pH más alto se observó una disminución de estos compuestos. En el mismo estudio se demostró que el contenido de los terpenos óxido de trans- y cis-linalol y α -terpineol aumentó con valores de pH más bajos y el contenido de linalol aumentó con un pH más alto.

Además, un estudio realizado por Sims & Morris (1984) examinó el efecto de tres niveles de pH (2,90; 3,20; 3,80) sobre el color y la estabilidad del vino tinto de uva muscadina, obteniendo que a valores de pH altos y tras 9 meses de almacenamiento se produce una pérdida de intensidad del color y enrojecimiento, mientras que a pH más bajo se tiene una pérdida de antocianinas libres no polimerizadas, aumentando la polimerización.

- **Influencia de la adición de nutrientes**

La adición de sales de amonio como DAP o sulfato de amonio es una forma eficiente de aumentar la tasa de fermentación, por otro lado, el oxígeno es esencial para mantener la viabilidad celular (Bely et al., 1990). El momento de la adición de estos nutrientes es clave para el correcto desarrollo de la fermentación. Por otro lado, el mejor momento para la oxigenación es al final de la fase de crecimiento en cantidades de 10mg/L (Sablayrolles et al., 1996). Si se agrega nitrógeno en el momento de la inoculación, este compuesto se metaboliza y se utiliza para el crecimiento adicional de la levadura, pero si se añade en la fase estacionaria, se utiliza para reactivar las levaduras existentes, lo cual es deseable (Sablayrolles, 2009). Además las concentraciones de aditivo también son determinantes cuando se trata de fermentaciones, ya que niveles muy bajos de nitrógeno asimilable de levadura (YAN) aumentan la producción de compuestos de azufre indeseables, como sulfuro de hidrógeno y alcoholes superiores, y da como resultado niveles bajos de ésteres de ácidos grasos volátiles de cadena larga, mientras que los niveles muy altos de YAN aumentan la formación de acetato de etilo, ácido acético y la acidez volátil (Bell & Henschke, 2005). Lo mismo ocurre con el oxígeno, donde adiciones excesivas del aditivo (>50mg/L) tienen un impacto organoléptico negativo tanto en los compuestos aromáticos como en la oxidación del vino (Bateyron & Sablayrolles, 2001).

- **Influencia de los compuestos químicos**

Compuestos químicos agregados durante las diferentes etapas del proceso de fermentación como pesticidas y SO₂ pueden ralentizar la fermentación o incluso detenerla (Silva & van Wyk, 2021). Si bien estos aditivos cumplen funciones positivas sobre el vino como control de hongos y podredumbre gris durante el viñedo, control de microorganismos indeseables y prevención de la oxidación excesiva durante la fermentación; muchos microorganismos como levaduras y bacterias lácticas, necesarias para la fermentación alcohólica y maloláctica respectivamente, pueden verse fuertemente inhibidas frente a altas concentraciones de estos compuestos (Mesas

& Alegre, 1999). Sin embargo, la resistencia de las levaduras a estos aditivos químicos externos depende del tipo de levadura, de hecho, algunas levaduras *no Saccharomyces* son capaces de tolerar concentraciones de SO₂ de hasta 400mg/L, mientras que la mayoría de las cepas de *no Saccharomyces* no pueden superar los 100mg/L (Nadai et al., 2016).

2.5. Microorganismos que intervienen en la producción del vino

El vino es un ecosistema complejo compuesto por una gran red microbiológica, donde destacan levaduras y bacterias que desempeñan un papel determinante en la fermentación y por ende en las cualidades organolépticas del producto final. La diversidad de cepas que interactúan es muy alta, lo que vuelve al vino un entorno donde la competencia por nutrientes y espacio es determinante para la calidad y el perfil aromático, donde una mínima variación en la composición microbiológica podría cambiar el sabor y el carácter del producto (Carrascosa et al., 2011). A continuación, se describen los principales microorganismos presentes en el vino.

2.5.1. Levaduras

El vino es el producto final de la actividad fermentativa desarrollada por levaduras y/o bacterias a partir del jugo de uva. La microbiota puede variar significativamente dependiendo del tipo de uva, cepa y de las condiciones climáticas de la región donde se cultivó (Blateyron & Sablayrolles, 2001; Bokulich et al., 2014). Actualmente se han aislado más de 40 géneros y 100 especies diferentes de levaduras (Ocón, 2015).

Existen 2 tipos de poblaciones microbianas en el vino: autóctonas e inoculadas. En fermentaciones autóctonas o nativas, no se produce una adición de cultivos puros, ya que la microbiota residente del viñedo realiza la conversión en vino, observándose mayor complejidad de aroma y caracteres de sensación en boca (Bokulich et al., 2014). Mientras que las poblaciones inoculadas, principalmente de *S. cerevisiae* sobre el mosto, aseguran una dominancia sobre la fermentación, minimizando la contribución de levaduras y bacterias no controladas que afecten negativamente la progresión de la fermentación o induzcan la producción de compuestos indeseables en el producto final.

A continuación, se realiza una descripción de las principales levaduras que participan en alguna etapa del proceso de vinificación:

2.5.1.1. Levadura *Saccharomyces cerevisiae* (LVSC)

Dentro de las levaduras *Saccharomyces* destaca la levadura del vino *Saccharomyces cerevisiae*, debido a su importancia enológica por su gran capacidad fermentativa de los azúcares del mosto, su poder alcoholígeno elevado (17°), su resistencia al SO₂ (250 a 400 mg/L) y al aumento de las concentraciones de ácidos y etanol. Esta levadura es capaz de superar una gran cantidad de estrés fermentativo, logrando estar presente hasta el final de la fermentación (Cordente et al., 2012). Además de formar grandes cantidades de alcoholes superiores, ésteres y aldehídos (Cordente et al., 2012), provocando un complejo carácter sensorial y organoléptico en el vino (Eldarov et al., 2016).

Los representantes típicos de los alcoholes superiores que se encuentran en el vino tradicional producido por *S. cerevisiae* son el 1-propanol (estupefaciente), el 1-butanol (olor a aceite de fusel), el isobutanol (sabor alcohólico), el 2 feniletanol (notas florales, de rosa) y el alcohol isoamílico (sabores de mazapán) (Swiegers & Pretorius, 2005). En cuanto a los ésteres, es sabido que *S. cerevisiae* sintetiza dos tipos, los ésteres de acetato de alcoholes superiores y los ésteres etílicos de ácidos grasos de cadena media. Tales ésteres incluyen acetato de etilo (barniz, esmalte de uñas, afrutado), acetato de isoamilo (plátano, pera), acetato de isobutilo (plátano), acetato de feniletilo (rosa, miel, afrutado, floral), hexanoato de etilo (manzana, plátano, violetas), octanoato de etilo (piña, pera) y decanoato de etilo (floral). Mientras que el principal aldehído sintetizado por *S. cerevisiae* durante la fermentación del vino es el acetaldehído, que constituye más del 90% del contenido total de aldehídos del vino (Liu & Pilone, 2000; Styger et al., 2011) y cuando está presente en bajas concentraciones, confiere un agradable aroma afrutado, pero en exceso produce sabores desagradables a verde y hierba (Styger et al., 2011).

Esta levadura es un organismo modelo y por ende una de las más estudiadas en la literatura, sin embargo, a diferencia de otros organismos modelos como *Escherichia coli* o *Caenorhabditis elegans*, *S. cerevisiae* es una especie muy valiosa, debido a que produce y acumula etanol, compuesto tóxico para la mayoría de las especies, generando su propio nicho ecológico y eliminando la competencia. Por otro lado, se sabe que esta característica también está presente en otros géneros de levadura, como *Lachancea* y *Cándida* (Gonzalez & Morales, 2022).

Otra propiedad importante de este género de levaduras es que son casi las únicas especies capaces de consumir todos los azúcares del vino con una cinética de fermentación adecuada,

por lo que si se quisiese utilizar levaduras alternativas, estas se agregarían en combinación con cultivos iniciadores de *S. cerevisiae*, ya sea en forma secuencial o en cocultivo para otorgar cualidades aromáticas diferentes a los vinos, dada su capacidad para formar metabolitos distintos a los producidos por *S.cerevisae* (Gonzalez & Morales, 2022). Sin embargo, en la actualidad también hay estudios monocultivo con levaduras *no Saccharomyces* que logran terminar a fermentación por sí solas (Vejarano & Gil-Calderón, 2021).

2.5.1.2. Levaduras *no Saccharomyces* (LVNS)

Las levaduras *no Saccharomyces* se encuentran en las uvas naturalmente y son metabólicamente activas, por lo que sus metabolitos influyen en la calidad del vino. En el pasado estas levaduras se asociaban a deterioro, por lo que se eliminaban mediante la inoculación inmediata de levaduras del género *Saccharomyces* y la adición de SO₂, sin embargo, en las últimas décadas se ha demostrado que estas levaduras le otorgan complejidad al vino al inocularse en fermentaciones mixtas o secuenciales con las levaduras fermentativas (Jolly et al., 2006)

Las levaduras *no Saccharomyces* del mosto de uva y que están presentes durante la fermentación se pueden dividir en tres grupos:

1. Levaduras principalmente aeróbicas: *Pichia spp.*, *Debaryomyces spp.*, *Rhodotorula spp.*, *Cándida spp.* (por ejemplo, *C. pulcherrima* y *C. stellata*) y *Cryptococcus albidus*.
2. Levaduras apiculadas con baja actividad fermentativa, por ejemplo: *K. apiculata* (*H. Uvarum*), *Kloeckera apis*, *Loeckera Javanica*. Estas levaduras son aquellas más frecuentes en el viñedo y representan más de la mitad de las levaduras nativas presentes en el mosto de uva.
3. Levaduras con metabolismo fermentativo, por ejemplo, *Kluyveromyces marxianus*, *Torulaspora spp.* (p ej. *T. globosa* y *T. delbrueckii*) y *Zygosaccharomyces spp.* (Jolly et al., 2003)

En el pasado se creía que todas las levaduras *no Saccharomyces* morían después del comienzo de la fermentación alcohólica debido al aumento de la concentración de etanol y la adición de aditivos químicos como SO₂ (Pretorius, 2000; Rainieri et al., 2000). Sin embargo, se ha demostrado que algunas levaduras *no Saccharomyces* pueden sobrevivir hasta 12 días de fermentación en densidades celulares de 10⁶ a 10⁸ cell/mL. No obstante, su presencia hasta el final de la fermentación depende de las condiciones climáticas, por ejemplo, el exceso de lluvias

durante la maduración de la uva contribuye a un mayor número de levaduras *no Saccharomyces* en etapas iniciales y durante la fermentación, otros factores como la limitación de nutrientes, las bajas temperaturas, la inoculación con levaduras *Saccharomyces* y la tolerancia a altos niveles de etanol también podría tener un efecto supresor en la supervivencia de este tipo de levaduras (Querol et al., 1990). Un estudio realizado por Granchi et al. (1998), informó que el número de *K. apiculata* disminuyó una vez que *S. cerevisiae* se volvió dominante, en lugar de cuando la temperatura de fermentación y la concentración de etanol alcanzó valores que inhiben el crecimiento de levaduras apiculadas. Otro estudio informó que *T. delbrueckii* y *K. thermotolerans* son menos tolerantes a los niveles bajos de oxígeno en lugar de a las altas concentraciones de etanol (Holm Hansen et al., 2001). Mientras que el efecto de las bajas temperaturas utilizadas para la liberación de pigmentos solubles al comienzo de la fermentación favoreció a *Hanseniospora spp.* y *Cándida spp.* sobre *Saccharomyces spp.* a temperaturas cercanas a 14°C (Maturano et al., 2015).

Por otro lado, las levaduras *no Saccharomyces* en conjunto con cepas de *S. cerevisiae* en cultivos mixtos y co-inoculaciones han demostrado un impacto sobre el contenido de etanol (Ivit et al., 2020), reduciendo los niveles de alcohol en el vino, de hecho, algunos estudios han informado rendimientos de etanol moderadamente reducidos, con valores entre 0,2 y 0,7 %v/v menos que en cultivos únicos con la levadura tradicional *S. cerevisiae* (Contreras et al., 2014), mientras la concentración de glicerol se ve favorecida en presencia de algunas levaduras *no Saccharomyces* (Ivit et al., 2020), donde las especies *Metschnikowia pulcherrima*, *Lachancea thermotolerans*, *Cándida stellata* y *Torulaspora delbrueckii*, son capaces de redirigir el consumo de azúcar a las vías gliceropirúvica, aumentando la concentración de glicerol (Contreras et al., 2014).

En cuanto al perfil aromático, el uso de LVNS influye directamente sobre las características del vino final resultante mediante la producción de enzimas extracelulares y metabolitos de importancia enológica capaces de modificar las propiedades sensoriales y organolépticas del vino (Franco et al., 2021). De hecho, está demostrado que algunas levaduras *no Saccharomyces* son capaces de convertir los compuestos volátiles en aromas, influyendo en el sabor del vino. Por ejemplo, la inoculación secuencial de *Torulaspora delbrueckii* y *S. cerevisiae* aumenta la complejidad aromática y disminuye la acidez volátil (Ehsani et al., 2012). Además, la producción de compuestos volátiles como el acetato de etilo y el 2-feniletanol, se ven afectados

por la proporción *S. cerevisiae*: no *Saccharomyces* (Contreras, et al., 2011). Otras especies no *Saccharomyces* como *Pichia kluyveri* también son capaces de liberar aromas varietales del tipo tiol como: 4-metil-4-mercaptopentan-2-ona (4M4MP-boj, retama), 3-mercaptohexanol (3MH-pomelo) y acetato de 3-mercaptohexilo (3MHA-maracuyá) en concentraciones similares o superiores a *S.cerevisiae* (Morata, 2019). De hecho, la producción de 3MH aumenta de 625 ng/L a 3000 ng/L, mientras que la producción de 3MHA aumenta de 500 ng/L a 1700 ng/L desde fermentaciones individuales a inoculaciones mixtas. Otro estudio realizado sobre *M. pulcherrima*, demostró que contribuye a la fracción volátil del vino con la producción de compuestos aromáticos característicos debido a su actividad β -glucosidasa y β -xilosidasa, que potencia los aromas varietales relacionados con matices de boj, maracuyá, pomelo y cítricos, de hecho, un estudio realizado por Clemente-Jimenez et al. (2004), demostró que *M. pulcherrima* y *P.fermentans* producen vinos con una contribución positiva de 2-feniletilo provocando aromas florales parecidos a rosa.

2.5.1.2.1. Levadura *Cándida oleophila* y *Cándida boidinii*

Actualmente no hay muchos estudios acerca de la fermentación de mosto de uva con este tipo de levaduras, sin embargo destaca el estudio realizado por Benavides et al. (2022) ,donde se utilizaron estas 2 levaduras sobre mosto *Sauvignon Blanc* a escala laboratorio y a escala de microvinificación, tanto en monocultivo como en fermentaciones secuenciales y se logró demostrar que *Cándida boidinii* era capaz de reducir el contenido de etanol en ambos tipos de fermentaciones, mientras que *Cándida oleophila* lo hizo exclusivamente sobre fermentaciones monocultivo. Además, ambas levaduras aumentaron el contenido de glicerol en estrategias monocultivo y demostraron ser capaces de terminar por sí solas la fermentación; aún en ausencia de la levadura fermentativa *S.cerevisiae*.

Por otro lado, el género *Cándida* se ha estudiado en procesos de biodegradación, siendo capaz de degradar compuestos fenólicos al utilizarlos como fuente de carbono (Acikgoz et al., 2016), convirtiéndolos en intermediarios del ciclo de Krebs y evitando que las aguas residuales del proceso de elaboración del vino presenten un alto contenido orgánico de compuestos fenólicos, altamente contaminantes. En específico se ha utilizado a *Cándida oleophila* para degradar al compuesto malvidina-3-o-monoglucósido (Mv3G), una antocianina abundante en vinos tintos jóvenes (Barbosa et al., 2019).

En cuanto al papel biocontrolador de este género de levaduras, se ha estudiado que *Cándida oleophila* es una levadura controladora de la podredumbre post cosecha de frutas y verduras, estando disponible comercialmente con el nombre de Aspire (Ecogen Inc., Langhorn, PA) (Droby & Lichter, 2007). Esta levadura actúa como antagonista, compitiendo por los nutrientes y el espacio a través de una fuerte adhesión a las hifas de los patógenos, rompiendo las estructuras y provocando muerte celular (Droby & Lichter, 2007). Sin embargo, la mayoría de los estudios con *Cándida oleophila* se han realizado sobre cítricos como pomelo (Bar-Shimon et al., 2004; Droby et al., 2002) y kiwi (Gao et al., 2019), y tubérculos como papa (Zheng et al., 2021), no sobre uva. Con respecto a *Cándida boidinii* no se han realizado aún estudios relacionados con el biocontrol.

2.5.2. Microorganismos de deterioro en la producción del vino

Las uvas, el mosto y el vino son susceptibles a enfermedades fúngicas, como podredumbre gris y podredumbre negra y también frente a patógenos indeseados derivados de su microflora natural como el género de levaduras *Brettanomyces/Dekkera* (*Brettanomyces custersianus*, *Brettanomyces naardenensis*, *Brettanomyces nanus*, *Brettanomyces anomalus* y *B. bruxellensis*), bacterias ácidoacéticas (*Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Gluconoactobacter*), bacterias ácidolácticas (*Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*) y algunos tipos de levaduras no *Saccharomyces* nativas como los géneros *Schizosaccharomyces spp.* y *Zygosaccharomyces spp.* (Silva & Van Wyk, 2021).

2.5.2.1. Bacterias ácidoacéticas (AAB)

Las bacterias acéticas (AAB) poseen una morfología que puede variar desde bastones esféricos en forma de maza, alargados, hinchados y hasta formas curvas filamentosas (Campaniello & Sinigaglia, 2017). Este microorganismo está presente de manera nativa en uvas sanas y vírgenes, en concentraciones de entre 10^2 y 10^3 cell/g, sin embargo, en uvas contaminadas las AAB pueden llegar hasta niveles de 10^6 cell/g, provocando que el mosto llegue a concentraciones de 3,9 g/L de ácido acético, compuesto que confiere un sabor ácido característico, superando el límite permisible de entre 1,2 a 1,4 g/L (Campaniello & Sinigaglia, 2017).

La cepa *Acetobacter aceti*, es una de las bacterias acéticas que provoca una de las enfermedades más indeseadas en el vino, conocida como “picado acético” (Mesas & Alegre, 1999). Esta enfermedad se caracteriza por el avinagramiento del vino debido a que este tipo de

microorganismo oxida el etanol a compuestos como ácido acético, acetaldehído y agua, además de ser capaz de combinarse con el etanol y formar el éster acetato de etilo, el principal responsable del olor a quitaesmalte en los vinos (umbral de aroma 7,5 mg/L) (Francis & Newton, 2005). Un vino atacado por esta enfermedad va ganando acidez volátil y perdiendo color, volviéndose inconsumible cuando la concentración de ácido acético supera 1g/L (Mesas & Alegre, 1999). Por su parte el acetaldehído es un metabolito intermedio de la producción de ácido acético, sin embargo, es capaz de unirse al SO₂, el principal antimicrobiano del vino, disminuyendo su efectividad (Campaniello & Sinigaglia, 2017). Otro aspecto negativo de la presencia de este tipo de microorganismos es que cuando hay oxígeno presente, los géneros de *Acetobacter* y *Gluconobacter* pueden oxidar el ácido láctico a acetoína, confiriéndoles aromas desagradables a mantequilla al vino terminado (Campaniello & Sinigaglia, 2017).

Por último, la presencia de un exceso de bacterias acéticas provoca que los vinos mal almacenados generen un anillo visible de crecimiento bacteriano en el cuello de la botella, también conocido como biopelícula entre la unión entre la superficie del vino y el espacio libre creado por el cierre de la botella (Campaniello & Sinigaglia, 2017). Lo anterior debido a que el ingreso de oxígeno permite el crecimiento descontrolado de estas bacterias, estrictamente aeróbicas, por lo que una adecuada inocuidad durante la fermentación y buen almacenamiento y posicionamiento de las botellas es indispensable para la calidad del vino. En la figura 7 se observa como la presencia de bacterias acéticas en el vino en combinación con el paso del tiempo y el mal almacenamiento de este provoca la formación de compuestos indeseables y de un biofilm en la boquilla de la botella.

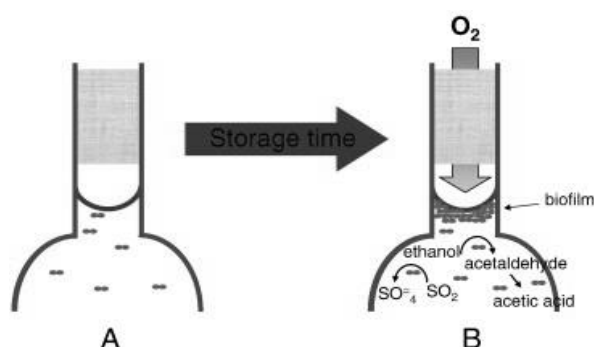


Figura 7. Modelo de formación de biopelículas y depósitos en el cuello de la botella para producir deterioro del vino por bacterias ácidoacéticas (AAB) en botellas de vino verticales. A: ingreso insuficiente de oxígeno para permitir el crecimiento de una pequeña población residente de AAB; B: ingreso de suficiente oxígeno a través del cierre hacia el espacio de cabeza para permitir el crecimiento de AAB e iniciar la formación de un depósito visible en la interfaz vino-espacio de cabeza. Obtenido de (Bartowsky & Henschke, 2008).

2.5.2.2. Bacterias ácidolácticas (LAB)

Las bacterias lácticas (LAB) son levaduras con forma de bastón y son consideradas positivas en enología (Campaniello & Sinigaglia, 2017), principalmente en vinos donde es necesario realizar la fermentación maloláctica (FML) después de la fermentación alcohólica (FA). Sin embargo, hay una gran parte de este tipo de bacterias que afectan la calidad del vino debido a que proliferan en el momento equivocado, provocando compuestos indeseables. Además, muchos de los metabolitos producidos por este tipo de bacterias son de carácter volátil, lo que afecta las cualidades sensoriales del vino cuando se tienen bacterias lácticas de carácter negativo (Campaniello & Sinigaglia, 2017).

En uvas sanas, las LAB se encuentran en concentraciones menores a 10^3 ufc/g y si logran sobrevivir a la fermentación alcohólica pueden alcanzar concentraciones de entre 10^6 y 10^8 ufc/mL, ejerciendo diferentes efectos en el vino dependiendo de su actividad metabólica. Las BAL homofermentativas producen ácido D-láctico, que se asocia a deterioro, mientras que las BAL heterofermentativas producen ácido acético, aumentando el contenido ácido del vino (Du Toit & Pretorius, 2000), lo cual tampoco es deseable.

Las principales enfermedades del vino provocadas por la presencia de bacterias lácticas se resumen a continuación:

- El picado láctico: Se produce como consecuencia de la utilización de los azúcares residuales de un vino por todo tipo de bacterias lácticas del vino (perjudiciales o útiles) para generar manitol y otros metabolitos como ácido D- láctico, ácido acético, n-propanol, 2-butanol y diacetilo lo que transmite al vino un sabor agrisado y viscoso (Bartowsky, 2009).
- Amertuno: La enfermedad de amertuno (amargo en francés) es típica de vinos tintos viejos embotellados (Mesas & Alegre, 1999), y se caracteriza por un sabor amargo que se debe a la transformación del glicerol en acroleína por parte de algunas bacterias acéticas (*Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus* y *Pediococcus*), compuesto capaz de reaccionar con las antocianinas y producir un amargor indeseado en el vino (Du Toit & Pretorius, 2000).
- La grasa: Los géneros de bacterias lácticas *Leuconostoc* y *Pediococcus* son capaces de producir compuesto de D-glucano, que en presencia de etanol forma polisacáridos

(Campaniello & Sinigaglia, 2017), cuya presencia en el vino provoca un aspecto ahilado, aceitoso y viscoso (Dobson et al., 2002).

- La vuelta: Consiste en la utilización del ácido tartárico por las denominadas bacterias perjudiciales (*Lactobacillus Plantarum* y *Lactobacillus Brevis*) para dar ácido láctico, ácido acético y CO₂. El vino pierde acidez total, concretamente acidez fija, y gana en acidez volátil, depreciándose notablemente la calidad del vino (Du Toit & Pretorius, 2000).

2.5.2.3. *Brettanomyces bruxellensis*

Brettanomyces es la forma no sexual y no esporulada de *Dekkera*, esta levadura se encuentra en la superficie de las uvas y en las barricas, sin embargo, se considera contaminante cuando está en el vino en concentraciones superiores a 10⁴ ufc/mL (Wedral et al., 2010). *Brettanomyces* es capaz de tolerar entre 14 y 14,5% de etanol y retarda el crecimiento de *Saccharomyces spp.* al producir altos niveles de ácido acético (Aguilar Uscanga et al., 2003; Delia-Dupuy & Miniac, 1995). En cuanto al requerimiento de sustrato, esta levadura puede proliferar su biomasa con concentraciones de tan sólo 0,3 g/L de azúcares residuales (glucosa y fructosa), por lo que son propensas a crecer al final de la FA, dado que un vino se considera seco cuando su nivel de azúcar es inferior a 4 g/L (OIV, 2014).

El principal factor que afecta las propiedades sensoriales del vino es la capacidad de esta levadura para producir 4-etilfenol (4-EP) y 4-etilguaiacol (4-EG) (Vigentini et al., 2008) a partir de ácido p-cumárico y ácido ferúlico respectivamente, mediante la descarboxilación y reducción enzimática provocada por la enzima cinamato descarboxilasa (PAD). Esta enzima posee una actividad diferente sobre *B. bruxellensis* en comparación al resto de las levaduras, ya que no presenta inhibición por retroalimentación, es decir, la actividad de *B. bruxellensis* no se ve reducida frente a altas concentraciones de etilfenoles, por lo que puede producir varios miligramos de 4-EP y 4-EG por litro de vino, sin verse inhibida en ningún momento, siendo la cantidad producida directamente proporcional a su población (Chatonnet et al., 1992). Lo anterior es perjudicial ya que los compuestos 4-EP y 4-EG confieren sabores y olores desagradables al vino, obteniendo un producto final con olor a tinta, pegamento, animal, corral, sudor de caballo y cuero (Aguilar Uscanga et al., 2003; Chatonnet et al., 1992).

En cuanto al color, los vinos contaminados con esta levadura pueden presentar un color indeseable, debido a actividades glicosídicas y a la formación de piranoantocianinas vinilfenólicas (Oelofse et al., 2008) que modifican el color original del vino. Debido a lo anterior, es de suma importancia realizar un correcto control antimicrobiano, con el objetivo de prevenir el desarrollo de cualquiera de estos microorganismos indeseados durante la fermentación. Actualmente el SO₂ es el principal antimicrobiano utilizado en vinificación, sin embargo, su eficacia es selectiva dependiendo del tipo de microorganismo, siendo capaz de inhibir bacterias lácticas, *Brettanomyces bruxellensis* y en menor medida bacterias ácidoacéticas.

2.6. SO₂ en Vinificación

2.6.1. Uso de los sulfitos en el vino

El anhídrido sulfuroso es el aditivo más utilizado en vinificación, cuya adición está asociada a diferentes etapas del proceso de producción del vino (p. ej., después de la cosecha de la fruta, después de la trituración, añadido al mosto antes de la fermentación, antes de la maduración y previo al embotellado) (Giacosa et al., 2019). Este aditivo cumple un rol indispensable debido a su acción antimicrobiana y a su efecto antioxidante (Ribéreau-Gayon et al., 2006; Guerrero & Cantos-Villar, 2015), siendo capaz de inhibir levaduras no deseadas, bacterias ácidolácticas (LAB) y, en menor medida, bacterias ácidoacéticas (AAB). Mientras que como antioxidante el SO₂ puede actuar de múltiples formas: captando de manera directa el oxígeno; reaccionando con el peróxido de hidrógeno, reduciendo las quinonas formadas durante el proceso de oxidación a su forma fenólica (Oliveira et al., 2011a), inactivando enzimas como polifenol-oxidasa (PPO), peroxidasa (POD) y proteasa, e inhibiendo las reacciones de Maillard (García-Ruiz et al., 2011), lo que previene el pardeamiento del vino y evita la pérdida de compuestos fenólicos (Garde-Cerdán et al., 2006; Ribéreau-Gayon et al., 2006).

Por otro lado, la adición de este compuesto al vino provoca la formación de compuestos combinados que se caracterizan por ser formas antimicrobianas inactivas que no contribuyen positivamente en la calidad del producto final (Ribéreau-Gayon, et al., 2006; Waterhouse & Laurie, 2006). A pesar de lo anterior, disminuir las concentraciones utilizadas de SO₂ para evitar las formas combinadas no asegura la adecuada estabilidad del vino frente a una oxidación, ni tampoco generaría un adecuado control microbiano (Du Toit & Pretorius, 2000); y por el

contrario una dosis excesiva de SO₂ no es recomendable ya que puede provocar alteraciones organolépticas en el producto final, tales como neutralización de los aromas, producción de compuestos aromáticos negativos y formación de compuestos que producen olores de reducción como el sulfuro de hidrogeno (H₂S) (García-Ruiz et al., 2011; Garde-Cerdán et al., 2007). Por eso la legislación europea establece una concentración límite de SO₂ total en 150 mg/L para vinos tintos y 200 mg/L para vinos blancos y rosados que contienen un máximo de 5 g/L de azúcares reductores (Reglamento UE n° 606/2009). Estos límites se reducen de entre 30 a 50 mg/L en vinos ecológicos. (Reglamento UE n° 203/2012).

En la tabla 1 se muestra un resumen de los efectos de la adición de sulfitos sobre uva, mosto y vino, mientras que en la figura 8 se indican las etapas de la vinificación donde se puede añadir este aditivo.

Tabla 1. Efectos de la adición de SO₂ en uvas, mosto y vino.

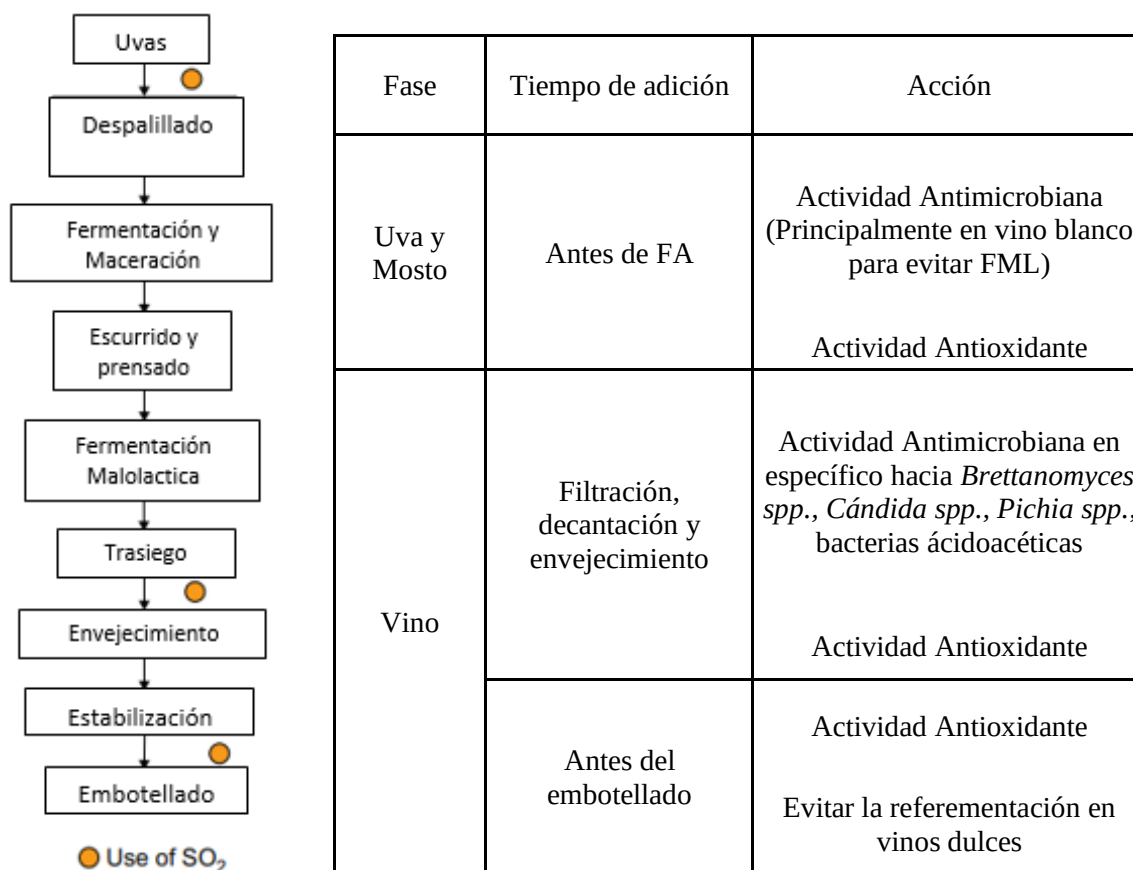


Figura 8. Diagrama de flujo de la elaboración del vino. El punto naranja indica las principales fases en las que generalmente se utiliza SO₂

2.6.2. Problemática: Efectos adversos del SO₂.

En las últimas décadas el uso de SO₂ en la industria ha generado preocupaciones sobre la salud de los consumidores (Vally & Thompson, 2003), ya que se ha relacionado con reacciones alérgicas en algunas personas (1% de la población) al consumir cantidades que oscilan entre 20 y 50 mg (Vally et al., 2009). Las personas alérgicas pueden experimentar una variedad de síntomas, que incluyen dermatitis, urticaria, angioedema, broncoespasmos, síntomas gastrointestinales, anafilaxia y dolor abdominal. Además, el SO₂ y sus derivados pueden llegar a ser agentes tóxicos sistémicos, induciendo el aumento en la frecuencia de aberraciones cromosómicas, el intercambio de cromátidas hermanas en algunas especies de mamíferos e incluso se ha estudiado que puede llegar a desempeñar un papel en el padecimiento de cáncer de pulmón (Qin & Meng, 2010). Por todo lo anteriormente mencionado, la Organización Mundial de la Salud (OMS) estimó una ingesta diaria máxima aceptable (IDA) de 0,7 mg/kg de peso corporal de SO₂ (García-Ruiz et al., 2011) y la Organización Internacional de la Viña y el Vino (OIV) ha ido reduciendo progresivamente la concentración máxima autorizada en los vinos (García-Ruiz, et al., 2008), además de exigir la etiqueta con la frase: “Contiene sulfitos” en los vinos cuya concentración de SO₂ supere los 10mg/L.

Por otro lado, reducir los insumos químicos durante la elaboración del vino se ha convertido en una prioridad desde el punto de vista legal y social, actualmente los vinos libres de aditivos son considerados más sanos, naturales y sostenibles (Silva & van Wyk, 2021), de hecho, el consumo mundial de botellas de vino orgánico arroja un crecimiento anual del 20% desde el 2020, cuando era de apenas un 4% en los años anteriores (DF MAS, 2023). Un estudio realizado por Amato et al., (2017), demostró que los consumidores italianos y españoles están dispuestos a cambiar la botella de vino que consumen habitualmente por un producto sin sulfitos, y de hecho más del 80% de los consumidores están dispuestos a pagar sobrepagos adicionales por un producto libre de aditivos químicos.

En cuanto al perfil sensorial, el SO₂ puede tener efectos negativos, produciendo olores a sulfuro de hidrogeno y mercaptanos debido al metabolismo de la levadura (Ribéreau-Gayon, Dubourdieu, et al., 2006). Por esta razón la investigación actual se basa en buscar otros conservantes y tecnologías innovadoras e inofensivas para la salud, con el fin de reducir o reemplazar el SO₂ en el vino.

2.6.3. Equilibrio Ácido-Base de los sulfitos en el vino

El SO₂ se puede adicionar al vino como solución diluida al 5% v/v de SO₂ y también mediante sales azufradas, como metabisulfito de sodio (Na₂S₂O₅), metabisulfito de potasio (K₂S₂O₅), bisulfito de potasio (KHSO₃), bisulfito de calcio (CaHSO₃), bisulfito de sodio (NaHSO₃) y sulfito de sodio (Na₂SO₃) (Aktan & Yildirim, 2014). Después de añadirlo al vino los compuestos que contienen sulfuro se disuelven en sus iones sulfuro, (HSO⁻ y SO⁻) y ácido sulfuroso (H₂SO₃) (Yidirim & Darici, 2020), que permiten formar SO₂, HSO₃⁻, SO₃⁻² en función del pH del vino, el contenido de etanol y la fuerza iónica (Ribereau-Gayon, et al., 2006). Cuando el SO₂ es añadido al mosto o al vino, una fracción es capaz de reaccionar con azúcares, aldehídos (etanol) o cetonas, llamándose fracción combinada, mientras que la fracción restante se conoce como libre, la cual es la responsable de las propiedades antioxidantes y antimicrobianas.

El SO₂ actúa como un ácido débil, formando sus bases conjugadas que son bisulfito y sulfito, según las ecuaciones presentadas en la figura 9b. Al pH del vino (3 a 4), el ion bisulfito (HSO₃⁻) es la forma predominante de entre las formas libres, con un porcentaje superior al 90%, mientras que el ion sulfito (SO₃⁻²) y el SO₂ molecular están presentes en cantidades insignificantes (Waterhouse, et al., 2016). Además, a medida que aumenta el pH del vino, disminuye la capacidad antimicrobiana (Silva & van Wyk, 2021).

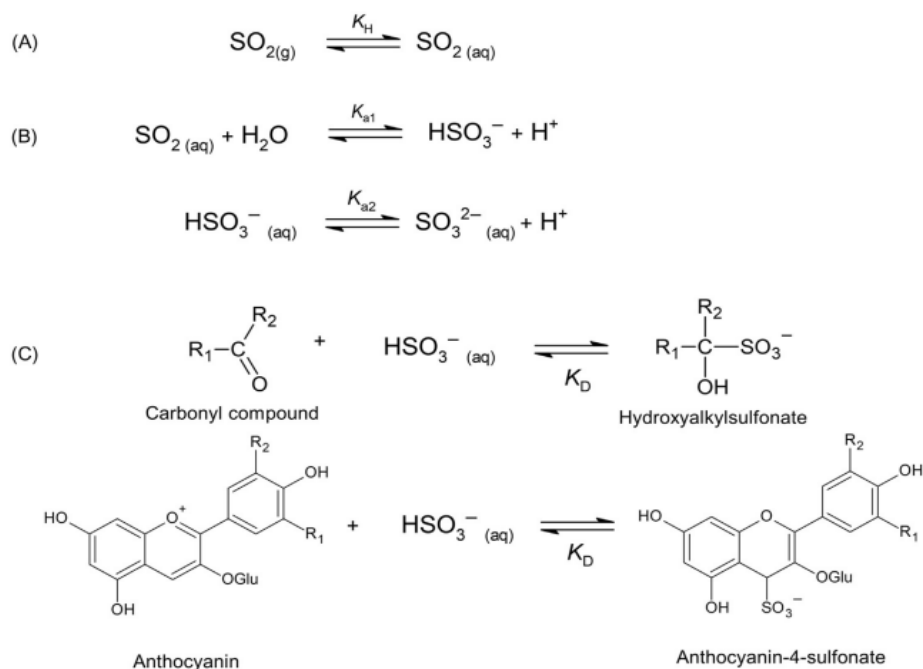


Figura 9. Ecuaciones de Equilibrio del SO₂. A. Solubilización (Ley de Henry) B. Ionización Ácido-base C. Formación de aductos de hidrogenosulfito (HSO₃⁻) con compuestos carbonílicos y antocianinas. Obtenido de (Giacosa et al., 2019)

La manera en que estas tres formas actúan e impactan en el proceso de elaboración del vino es conocida y ha sido ampliamente descrita (Danilewicz, 2016; Makhotkina & Kilmartin, 2013; Waterhouse & Laurie, 2006). Primero, la forma molecular (SO_2) es la forma activa responsable de la actividad antimicrobiana, considerándose 20 veces más efectiva que el bisulfito en la inhibición de las levaduras y 500 veces más efectiva en la inhibición de las bacterias (Zamora, 2005). Además, posee cierta actividad antioxidante, ya que reduce el daño oxidativo mediante la captura del peróxido de hidrógeno, un potente oxidante, producido a partir de la oxidación de compuestos fenólicos (Zironi, et al., 2009). Sin embargo, existe solo una fracción muy pequeña del dióxido de azufre libre presente en el mosto en la forma molecular (SO_2) con un 6% a pH 3 y 0,6% a pH 4, además la forma libre molecular es altamente volátil, por lo que es la responsable del olor picante presente en algunos vinos y de la pérdida gradual de SO_2 por evaporación en circunstancias naturales de envejecimiento en bodega (Boulton, et al., 1999).

El bisulfito o hidrogeno sulfito (HSO_3^-) es la forma predominante a pH 3-4, sin embargo, es la menos deseable desde el punto de vista enológico, ya que es capaz de combinarse con otros compuestos como los acetaldehídos, cetoácidos, glucosa, quinonas y con los carbonos de las antocianinas monoméricas de los vinos tintos (Figura 9.C), las cuales son las responsables de darle color al vino, volviéndolo incoloro (Boulton, et al., 1999). Estos aductos covalentes formados se conocen como la fracción de SO_2 combinado, los cuales no ofrecen ninguna protección al vino, sin embargo, hay combinaciones de SO_2 que son reversibles, según las constantes de disociación de la reacción, por lo que representan una reserva de SO_2 libre, como las combinaciones con ácido pirúvico y cetoglutarato (Waterhouse, et al., 2016). A pesar de lo anterior, el bisulfito es el principal componente involucrado en la acción antioxidante del SO_2 (Danilewicz, 2007), capaz de reaccionar con las quinonas, peróxido de hidrógeno, inhibir las reacciones de Fenton e inactivar la enzima polifenol oxidasa (Zamora, 2005), la cual es responsable de la oxidación de los polifenoles. Por otro lado, el sulfito (SO_3^{2-}) representa menos del 1% al pH del vino, por lo que su acción es despreciable (Waterhouse, et al., 2016).

2.6.4. Efecto antioxidante del SO_2

2.6.4.1. Oxidación o Pardeamiento del Vino

El oxígeno es indispensable durante todas las fases del proceso de vinificación, desempeñando un papel activo desde la vendimia hasta el embotellado (Fernández-González et al., 2003) y

provocando cambios químicos que afectan la capacidad de envejecimiento y las características sensoriales del vino (del Alamo-Sanza et al., 2014; Oliveira et al., 2011a). La presencia de oxígeno permite una buena fermentación alcohólica, una estabilización del color y una reducción de los caracteres astringentes y amargos (Schmidtke et al., 2011). Sin embargo, siempre es necesario controlar la cantidad de O₂ presente en el mosto, debido a que un exceso podría provocar un deterioro microbiológico y reacciones de oxidación que afecten negativamente el sabor del producto final, junto con la aparición de compuestos no deseados debido a la reacción con compuestos fenólicos (Schmidtke et al., 2011; Laurie et al., 2014).

El pardeamiento u oxidación del vino se puede clasificar en enzimático y no enzimático en función del mecanismo de iniciación (Li, Guo, & Wang, 2008), el primero ocurre casi en su totalidad en el mosto de uva, mientras la oxidación no enzimática, prevalece en el vino fermentado (Es-Safi et al., 2003; Main, 1992; Spagna et al., 2000; Sullivan, 2002). Lo anterior se debe a que la enzima encargada del pardeamiento enzimático es la polifenol oxidasa (PPO) y su actividad disminuye gradualmente con la oxidación, y debido a operaciones como la clarificación, el tratamiento con SO₂ y la producción de etanol, no existe PPO en los productos fermentados (Cheynier et al., 1989; Ribéreau-Gayon, Dubourdieu, et al., 2006; Spagna et al., 2000b)

La oxidación no enzimática, también llamada oxidación química comienza con la oxidación de fenoles a través del ciclo redox del hierro entre Fe (II) y Fe (III) (Figura 10). Cabe destacar que el oxígeno por sí solo no reacciona directamente con los compuestos fenólicos sin la presencia de metales de transición como hierro, cobre y manganeso (Cacho et al., 1995; Danilewicz, 2013; Waterhouse & Laurie, 2006), los cuales actúan como catalizadores y son de gran importancia durante el proceso de pardeamiento no enzimático del vino (Clark & Scollary, 2002; Es-Safi et al., 2003; López-Toledano et al., 2002; Oszmianski et al., 1996; Palacios Macías et al., 2001). De hecho, un estudio reciente sugirió que la reacción determinante de la velocidad de la vía de oxidación no enzimática del vino es la oxidación del Fe(II) a Fe(III) (Nguyen & Waterhouse, 2021), dado que el Fe(III) luego oxida los polifenoles formando radicales de semiquinona y benzoquinonas y al mismo tiempo el oxígeno se reduce a peróxido de hidrógeno (H₂O₂). La oxidación de los polifenoles se debe a que contienen una parte formada por orto-dihidroxibenceno (un anillo de catecol) o una parte 1,2,3-trihidroxibenceno (un grupo galaoilo),

las cuales son propensas a la oxidación (Oliveira et al., 2011). Sin embargo, no todos los polifenoles se oxidan fácilmente, de hecho, la oxidación se da principalmente en los siguientes compuestos: (+)-catequina/(-)-epicatequina, galocatequina, ácido gálico y sus esteres y ácido cafeico (Annual, 2001; Kilmartin et al., 2001; Singleton, 1987).

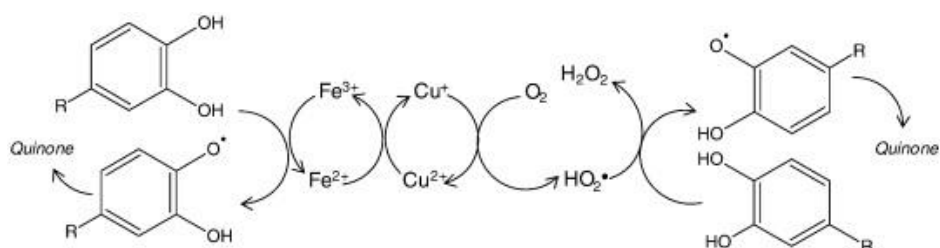


Figura 10. Acción catalítica de los iones de hierro y cobre en la oxidación de catecoles para producir quinonas y peróxido de hidrogeno.

El peróxido de hidrogeno formado, en presencia de Fe(II) se convierte en radicales hidroxilo ($\text{HO}\cdot$) mediante las reacciones de Fenton (Figura 11). Estos radicales son especies altamente inestables no selectivas que reaccionan inmediatamente con cualquier sustancia presente en el vino en proporción a sus concentraciones (Danilewicz, 2013; Nguyen & Waterhouse, 2021; Waterhouse & Laurie, 2006), algunas de esas sustancias son el etanol y ácido tartárico, generando respectivamente, acetaldehído y ácido glioxílico (Li, Guo, & Wang, 2008). El acetaldehído es el compuesto aldehído más abundante en el vino, y en niveles altos puede estar asociado con olores desagradables a manzana oxidada y magullada (Rapp & Mandery, 1986). Por otro lado, las quinonas formadas pueden causar la formación de pigmentos marrones mediante reacciones de condensación que forman productos coloreados con alto peso molecular (Voltea et al., 2022; Pati et al., 2020). Los estudios que involucraron soluciones modelo de vino confirmaron la formación de dos tipos de compuestos marrones, sales de xantilio y esteres etílicos de sales de xantilio, ambos derivados de la oxidación de flavonoles (Es-Safi et al., 2000). Además, las quinonas poseen un alto carácter electrofílico y pueden reaccionar espontáneamente con compuestos nucleófilos, incluidos algunos compuestos sulfhídricos, fenólicos y aminas y producir dímeros o polímeros que debido a su menor potencial redox en comparación a sus fenoles iniciales pueden formar nuevos difenoles que posteriormente se oxidaran acelerando el proceso de polimerización (Nguyen & Waterhouse, 2021; Oliveira et al., 2011a; Waterhouse & Laurie, 2006).



Figura 11. Reacción de Fenton provocada por la formación de peróxido de hidrogeno

Por otro lado, el pardeamiento u oxidación enzimática tiene lugar en el mosto de jugo de uva y se asocia con las enzimas oxidorreductasas polifenol oxidasa (OPP), a saber, la catecol oxidasa o tirosinasa, la lacasa y las peroxidasas (POD). La polifenoloxidasa es una enzima que contiene cobre (Oliveira et al., 2011), y que se encuentra predominantemente en las membranas de los tilacoides de los cloroplastos, mientras que sus sustratos fenólicos se encuentran en las vacuolas de las células vegetales (López-Miranda et al., 2011), por lo que cuando las uvas se trituran o prensan durante la vinificación el complejo enzima-sustrato entra en contacto y se produce una rápida oxidación de fenoles en presencia de oxígeno. En específico la PPO cataliza la hidroxilación de monofenoles a o-difenoles (actividad cresolasa) y la oxidación de estos a sus quinonas (actividad de las catecolasa) (Orenes-Piñero et al., 2006), las cuales como electrófilos reaccionan con nucleófilos como derivados de amino (Kutyrev & Moskva, 1991) de igual forma que en la oxidación no enzimática, provocando pigmentos marrones, rojos o negros indeseables (Gandía-Herrero et al., 2004), mientras que como oxidantes, las quinonas oxidan sustancias que tienen un potencial menor, como los polifenoles, el ácido ascórbico y el SO_2 , reduciéndose a su catecol original (Oliveira et al., 2011).

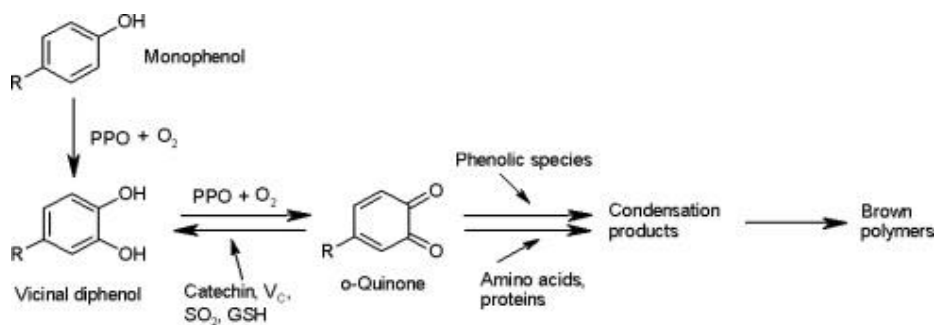


Figura 12. Mecanismos de oxidación enzimática (Oliveira et al., 2011b)

Específicamente en el mosto de uva el pardeamiento enzimático se correlaciona con el ácido caftarico y el ácido cutárico, los cuales son monofenoles que tras la oxidación producida por la PPO producen o-quinonas de ácido cafeoiltartárico (CTAQ), las cuales pueden formar dímeros mediante la unión con otra molécula de fenol o regenerar los fenoles originales mediante la presencia de un medio ácido favorable (Figura 12), cerrando así el ciclo de reacción (Wang,

1990), y también puede ocurrir la polimerización y condensación con compuestos fenólicos y no fenólicos formando compuestos marrones (Figura 12) (Robards et al., 1999)

Las o-quinonas de ácido cafeoil tartárico (CTAQ) reaccionan con el glutatión (GSH), tripéptido que se encuentra naturalmente en las uvas (Cheynier et al., 1988), para formar 2-S-glutatiónil cafeoil tartárico (GRP), compuesto no oxidable por la enzima PPO, evitando que el mosto se polimerice y reduciendo la formación de compuestos marrones (Robards et al., 1999). Sin embargo, el GRP es oxidable por la enzima lacasa y por el CTAQ a marrón, pero en menor medida (Main, 1992).

Por su parte la peroxidasa (POD) contiene Fe y su eficacia depende del peróxido de hidrógeno disponible (H_2O_2) en el medio (Li, Guo, & Wang, 2008), y su actividad para degradar fenoles mejora cuando coexiste con la polifenol oxidasa (Robards et al., 1999). Sin embargo, cabe destacar que no toda la oxidación enzimática es indeseable, también existe la hiperoxigenación del mosto (Li, Guo, & Wang, 2008), la cual disminuye el potencial de pardeamiento del vino mediante la desaparición de la tirosinasa y el agotamiento de los sustratos fenólicos oxidables durante las reacciones de oxidación (Ribéreau-Gayon, Dubourdieu, et al., 2006).

2.6.5. Mecanismos de acción antioxidante del SO_2

Los mecanismos de protección antioxidante por parte del SO_2 no implican una reacción directa con el oxígeno como se creía desde hace mucho tiempo (Ribéreau-Gayon et al., 2021), sino que este aditivo actúa de 2 formas diferentes: Al reaccionar con el peróxido de hidrógeno evitando la generación de radicales hidroxilo ($HO\bullet$) (Figura 13) (Elias & Waterhouse, 2010) y reduciendo las quinonas formadas durante el proceso de oxidación a su forma fenólica (Ferreira et al., 2015; Danilewicz, et al., 2010; Oliveira et al., 2011). De hecho, investigaciones recientes que involucran una o-quinona, han obtenido resultados consistentes, donde la mayor parte de la o-quinona se reduce a catecol, con una fracción adicional que se convierte en sulfonato (Waterhouse & Nikolantonaki, 2015) (Figura 14).

El dióxido de azufre también puede formar aductos de diversas estabilidades con otros componentes del vino, incluidos antocianinas y aldehídos como el acetaldehído, evitando la formación de productos de condensación y polimerización por parte de este compuesto, dado que en combinación al SO_2 pierde su reactividad (Atanasova et al. 2002, Fulcrand et al. 2006).

En la figura 13 se observa como el H_2O_2 es capaz de reaccionar con el HSO_3^- , evitando su oxidación. Mientras que en la figura 14 se observa como las quinonas reaccionan con el aditivo.

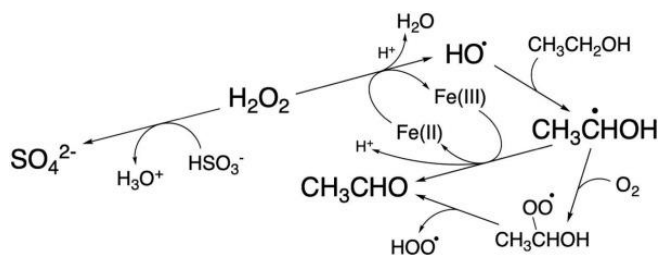


Figura 13. Punto de ramificación del peróxido de hidrógeno en la vía de oxidación del vino: enfriamiento por bisulfito (izquierda) o la oxidación Fenton del etanol (derecha) en presencia y ausencia de oxígeno (Nguyen & Waterhouse, 2022).

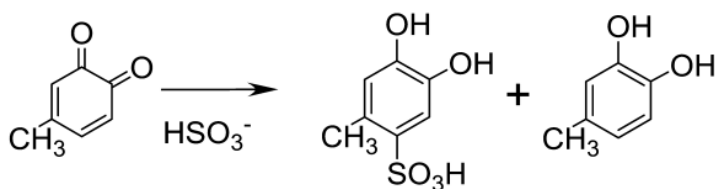


Figura 14. Reacciones competitivas de o-quinona con sulfito, formando catecol y sulfonato

2.6.6. Acción antimicrobiana del SO_2

La acción antimicrobiana del SO_2 previene la formación de neblina de levadura, la fermentación secundaria indeseable, el crecimiento de *Brettanomyces*, el desarrollo de levaduras micodérmicas y varios tipos de deterioro bacteriano. La mayor actividad antimicrobiana la muestra el SO_2 molecular, mientras que los iones bisulfito muestran una capacidad antimicrobiana débil, al igual que el SO_2 combinado (Tedesco et al., 2022).

El mecanismo de acción de este aditivo sobre los microorganismos varía dependiendo de la especie y de sus rutas metabólicas activas, por lo que es muy difícil de definir. Sin embargo, la mayoría de los estudios se han realizado sobre la levadura del vino *Saccharomyces cerevisiae*, donde el SO_2 en su forma molecular ingresa a la célula de levadura a través de la membrana plasmática mediante un mecanismo de difusión simple (Stratford & Rose, 1986), para posteriormente unirse a proteínas, coenzimas, ácidos nucleicos, cofactores y vitaminas, interfiriendo en procesos intracelulares fundamentales de las células, inhibiendo el crecimiento microbiano y la reproducción celular. Por otro lado, el nivel de tolerancia al SO_2 por parte de *S.*

cerevisiae es conocido, debido a que produce mecanismos de resistencia, tales como: Vías metabólicas implicadas en la producción de azufre (Donalies & Stahl, 2002), eflujo de membrana para desintoxicación de sulfitos (Donalies & Stahl, 2002) y producción de moléculas de unión al SO₂ como acetaldehído (Zara & Nardi, 2021), lo que permite que siga realizando el proceso fermentativo mientras el SO₂ afecta al resto de la microbiota.

De hecho, la acción contra levaduras va enfocada principalmente hacia levaduras nativas *no Saccharomyces* indeseadas. Un estudio realizado por Edinger et al. (1998) demostró que en la fermentación espontánea del vino en concentraciones de SO₂ total superiores a 40mg/L se limitan el desarrollo de la mayoría de las levaduras nativas, a excepción de *Hanseniaspora osmophila* y *Cándida spp.* Otro estudio realizado por Cuijvers et al. (2020) demostró que concentraciones inferiores a 40 mg/L inhiben el desarrollo de las especies del género *Metschnikowia spp.*, y concentraciones entre 60 y 100 mg/L inhiben el desarrollo de *Torulaspora spp.* Además, especies nativas como *Kloeckera apiculata* y *Hansenula anomala* son muy sensibles a este compuesto (Warth, 1985), mientras que *Zygosaccharomyces bailii*, *Schizosaccharomyces pombe* y *Saccharomycodes ludwigii* se han descrito como especies muy tolerantes al SO₂ (Divol et al., 2012; Theron et al., 2017).

En cuanto a la acción de este aditivo contra las bacterias, su mecanismo de acción no ha sido aclarado (Tedesco et al., 2022). Por ejemplo, *Oenococcus oeni*, bacteria láctica responsable de la fermentación maloláctica, es altamente susceptible al SO₂, lo cual es positivo sobre todo en la elaboración de vinos blancos donde no se desea la FML. Por otro lado, el control de AAB se realiza mediante el control de oxígeno por parte del aditivo (efecto antioxidante), ya que las bacterias acéticas son aerobias facultativas (MamLouk & Gullo, 2013) y una restricción del oxígeno limita su crecimiento celular. Sin embargo, al igual que como ocurre con *Brettanomyces /Dekkera*, estos microorganismos pueden sobrevivir al SO₂, ya que entran en el estado VBNC, conocido como estado viable pero no cultivable, donde los microorganismos pueden esperar condiciones más favorables manteniendo su actividad metabólica y reanudando su desarrollo cuando las condiciones lo permitan (Millet & Lonvaud-Funel, 2000). De hecho, Du Toit et al., (2005) informó que *Acetobacter pasteurianus* es capaz de sobrevivir en VBNC condiciones anaeróbicas y la presencia de SO₂, reanudando el estado viable cuando las condiciones de oxígeno vuelven a ser favorables.

2.7. Alternativas al SO₂ para la estabilización del vino

Como se mencionó en capítulos anteriores, la industria vitivinícola está orientada a disminuir el uso de aditivos químicos. Actualmente se han estudiado una gran cantidad de alternativas que van desde inhibidores químicos, métodos físicos y reemplazos biológicos y naturales.

2.7.1. Aditivos Químicos

En la tabla 2 se presentan los principales aditivos químicos estudiados en la actualidad como reemplazo el SO₂ en vinificación.

Tabla 2. Resumen de los métodos químicos alternativos al SO₂. Obtenido de (Lisanti et al., 2019)

Reemplazo	Mecanismo de inhibición	Actividad	Límite máximo permisible	Observaciones
Dimetil Dicarbonato	Desactivación enzimática al reaccionar con grupos amino en los sitios activos de las enzimas celulares	Menos efectivo contra bacterias que contra levaduras	200 mg/L	No controla eficientemente a las bacterias. Produce metanol
Lisozima	Lisis celular por hidrólisis de los enlaces 1,4-β entre los ácidos N-acetil murámico y N-acetilD glucosamina en las paredes celulares de los microorganismos	Altamente efectivo contra bacterias lácticas; menos eficaz contra bacterias acéticas e inactivo contra levaduras	500 mg/L	No es efectivo contra levaduras. Puede unirse a los polifenoles en vino. Formación de turbidez en vinos blancos
Quitosano	Mecanismo de acción desconocido	Altamente efectivo reduciendo las poblaciones de <i>Brettanomyces</i> / <i>Dekkera</i>	100 g/hl	La eliminación total de <i>Brettanomyces</i> / <i>Dekkera</i> difícilmente se logra
		Acción antioxidante mediante reducción del contenido de hierro, plomo, cadmio y cobre		
Bacteriocinas	Vuelven permeable la membrana citoplasmática de las bacterias a los componentes iónicos, provocando lisis celular	Activo contra bacterias Grampositivas, pequeña o nula actividad contra bacterias Gram negativas, levaduras y hongos	30 mg/L	Nisina es el único tipo de bacteriocina aprobado por la OIV y con estatus GRAS
Complejo de Plata Coloidal (CSC)	Generación de nanopartículas e iones de plata de especies reactivas de oxígeno (ROS) Daño directo a membranas celulares	Activo contra levaduras, LAB y AAB en mosto y vino	100 mg/L	El límite residual no debe superar los 0,1 mg/L

2.7.1.1. Dicarbonato de dimetilo (DMDC)

El DMDC (dimetil dicarbonato) se utiliza en la industria vinícola para inhibir microorganismos no deseados en el vino, actualmente su uso está aprobado por la Unión Europea en vinos tintos como blancos (Santos, et al., 2012). Este aditivo es altamente eficaz contra levaduras, y provoca un efecto antimicrobiano parcial en bacterias ácidolácticas, dado que algunas cepas son más resistentes a él. Sin embargo, no afecta a las bacterias ácidoacéticas (Delfini, et al., 2002), permitiendo su rápido crecimiento en el mosto bajo condiciones aeróbicas.

El DMDC ofrece un efecto protector temporal y no es adecuado para su uso en vinos de almacenamiento prolongado, sin embargo, su ventaja radica en su descomposición, dado que no produce niveles tóxicos de metanol (Divol, et al., 2005) y reacciona con amonio y aminoácidos, generando bajas concentraciones de carbamato de metilo (Costa, et al., 2008).

2.7.1.2. Lisozima

La lisozima es una proteína con diversas propiedades biológicas descubierta por Alexander Fleming en 1922. Se utiliza en la elaboración de vinos para controlar la actividad bacteriana durante la fermentación maloláctica, con una dosis máxima de 500 mg/L aprobada por la OIV (OIV, 2020). Sin embargo, su uso puede representar un riesgo para personas alérgicas a la clara de huevo, ya que pequeñas cantidades pueden desencadenar reacciones alérgicas.

El mecanismo de acción de la lisozima implica la destrucción del peptidoglicano de bacterias Grampositivas, debilitando la pared celular y causando la lisis celular por ingreso de agua a la célula (Carrillo, 2013). Se ha demostrado que la lisozima es efectiva contra algunas bacterias de ácido láctico (LAB), pero no reemplaza completamente al dióxido de azufre (SO₂), debido a su limitada acción contra bacterias ácidoacéticas y levaduras (Delfini, 2004). Por eso, se han estudiado combinaciones alternativas, como la adición de lisozima y taninos durante la fermentación alcohólica, o la mezcla de lisozima, DMDC y SO₂, permitiendo reducir, pero no reemplazar completamente a los sulfitos (Yidirim & Darici, 2020).

2.7.1.3. Quitosano

El quitosano es un biopolímero derivado de la quitina por desacetilación (Raafat & Sahl, 2009). Se utiliza en la industria vinícola como agente clarificante y antimicrobiano, estando actualmente aprobado por autoridades europeas y la OIV para su uso en vinificación. Su acción antimicrobiana y antioxidante se basa en la eliminación de polifenoles oxidados, control de

bacterias ácidoacéticas (Valera et al., 2017) y prevención del desarrollo de levaduras, en específico de poblaciones de *Brettanomyces spp.* (Lisanti, et al., 2019). Las dosis comúnmente utilizadas para este compuesto en vinificación van desde los 50 a 100 g/hL (Gómez-Rivas et al., 2004) o 20 a 50 g/hL (Guerrero & Cantos-Villar et al., 2015).

El mecanismo de acción del quitosano implica una unión entre su carga positiva y la carga negativa de las bacterias, lo que altera la permeabilidad de la membrana bacteriana y causa la liberación de componentes intracelulares, resultando en la decadencia y ruptura celular (Raafat & Sahl, 2009). Además, este compuesto acelera el consumo de glucosa en fermentaciones mixtas (Gómez-Rivas et al., 2004), evitando fermentaciones estancadas que no llegan a su fin.

2.7.1.4. Complejo de Plata Coloidal (CSC)

La plata coloidal (CSC) ha demostrado ser eficaz como agente antimicrobiano contra diversas bacterias Grampositivas (Gr+) y Gramnegativas (Gr-) en la vinificación (Izquierdo-Cañas et al., 2012). La OIV ha autorizado su uso en vinificación, con una concentración límite permitida de 100 mg/L (OIV, 145/2009) en vinos finales.

Un estudio realizado por Gil-Sánchez, et al 2019, demostró que las nanopartículas de plata estabilizadas con polietilenglicol poseían un gran potencial antimicrobiano para controlar LAB y AAB después de la fermentación alcohólica, incluso mayor que el SO₂ (Gil-Sánchez, et al., 2019). Sin embargo, un estudio realizado por (Izquierdo & Cañas, et al., 2012) indicaron que el uso de CSC en vinos blancos puede conducir a la oxidación y afectar la composición del vino resultante, provocando un menor grado alcohólico y un mayor contenido de acetaldehído en comparación con los vinos elaborados solo con SO₂. Además, aunque las concentraciones residuales de CSC suelen estar por debajo del límite de la OIV, todavía existen preocupaciones sobre posibles riesgos para la salud relacionados con la ingesta intestinal de trazas de CSC (Gil-Sánchez et al., 2019), por lo que se necesita realizar más investigaciones para comprender mejor los riesgos asociados a este aditivo en la salud y su aplicación en vinificación.

2.7.1.5. Bacteriocinas

Las bacteriocinas, como la nisina, pediocina y plantaricina, son polipéptidos producidos por cepas de bacterias Grampositivas (Gr+) y Gramnegativas (Gr-), que poseen propiedades antimicrobianas y actúan sobre las bacterias haciéndolas permeables a los componentes iónicos y provocando la lisis celular (Chung & Hancock, 2000). La nisina es la única bacteriocina

aprobada por la FDA como aditivo alimentario debido a su estatus de QPS (Calificación de Presunta Seguridad) (Abee, Krockel, & Hill, 1995) y a que ha demostrado ser eficaz contra bacterias lácticas y acéticas (LAB y AAB) en la vinificación, especialmente contra *Oenococcus oeni* con una concentración inhibitoria mínima (MIC) de 0.024 µg/mL. A pesar de que su efecto sobre las levaduras es limitado (Rojo-Bezares et al., 2007), está probado que la combinación de nisina y dióxido de azufre (SO₂) puede reducir significativamente la concentración de SO₂ requerida para controlar el crecimiento de LAB en los vinos (Fernández-Pérez et al., 2018).

Otras bacteriocinas, como la pediocina PD-1, han demostrado ser efectivas contra *Oenococcus oeni* en mosto Chardonnay (Nel et al., 2002). Sin embargo, al igual que la nisina posee un efecto limitado sobre las levaduras (Bauer et al., 2003).

Finalmente, dada la eficacia de las bacteriocinas contra las bacterias y del DMDC contra las levaduras, la combinación de estos compuestos podría ser prometedora para preservar el vino. De hecho, la combinación de estas estrategias de reemplazo es muy común en enología, permitiendo un control antimicrobiano contra levaduras como con bacterias y una mayor reducción de las concentraciones de SO₂ (Tedesco et al., 2022).

2.7.2. Tecnologías o métodos de sustitución físicos

En los últimos años se han utilizado con éxito varias tecnologías que permitirían eliminar microorganismos en alimentos y bebidas sin necesidad de añadir aditivos químicos al proceso. En la tabla 3 se muestra la lista de los métodos utilizados hasta la fecha en vinificación o aquellos que podrían ser prometedores para la industria.

Tabla 3. Resumen de los métodos químicos alternativos al SO₂. Obtenido de (Lisanti et al., 2019)

Reemplazo	Principio	Mecanismo de acción	Actividad antimicrobiana	Observación
<i>Altas Presiones</i>	Aplicación de presiones entre 100 y 1000 Mpa utilizando un líquido transmisor de presión a temperatura ambiente	La presión produce un cambio en el volumen, provocando alteraciones en el metabolismo y fuga celular	Efectivo contra: <i>Oenococcus oeni</i> , <i>Lactobacillus spp.</i> , <i>Acetobacter spp.</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Brettanomyces bruxellensis</i>	Acelera las reacciones de Maillard y provoca un envejecimiento acelerado en botella
<i>Ultrasonido</i>	La ultrasonografía de alta potencia (20-100 kHz) provoca cavitación en el líquido, formando regiones de alta presión y temperatura (50 Mpa y 5500 °C con un efecto de pasteurización localizada.	Adelgazamiento de las membranas celulares, calentamiento localizado y producción de radicales libres.	Efectivo contra <i>Brettanomyces</i> / <i>Dekkera spp.</i> en sanitización de barricas	Hay pocos estudios realizados y limitados a la sanitización en barricas
<i>Irradiación Ultravioleta</i>	La radiación UV incluye longitudes de onda del espectro de radiación electromagnética entre 100 y 400 nanómetros, siendo el rango de 200 a 280 el más efectivo contra microorganismos.	Modificación del ADN de los microorganismos, impidiendo la reproducción de levaduras y bacterias	Las levaduras poseen mayor resistencia que las bacterias, y entre estas, las Grampositivas son más sensibles	Efectos a corto y largo plazo sobre la composición química, volátil y sensorial desconocidos
<i>Campo Eléctrico</i>	Aplicación de campo eléctrico de alta intensidad (5-50 kV/cm) mediante una secuencia de pulsos de corta duración al líquido colocado entre dos electrodos	Electroporación de la membrana celular de microorganismos, lo que conduce a la pérdida de funcionalidad y la ruptura celular	Afecta a microorganismos como: <i>Brettanomyces bruxellensis</i> , <i>Oenococcus oeni</i> y <i>Pediococcus parvulus</i> .	No ha sido probado en el vino

2.7.2.1. HHP

En la industria alimentaria, la tecnología de alta presión hidrostática (HHP) se ha vuelto relevante, utilizándose en productos como jugos de fruta, mariscos y productos cárnicos procesados (Buzrul, 2012). Este método implica la inactivación de microorganismos y enzimas mediante la aplicación instantánea de presiones entre 100-1000 MPa, utilizando un medio líquido para transmitir la presión. Se aplica en modo batch, lo que implica llenar el producto envasado con el medio de transmisión de presión y luego presurizarlo, lo que limita su uso en tratamientos continuos.

La actividad antimicrobiana del HHP se ha demostrado en microorganismos como *Oenococcus*, *Lactobacillus* y *Botritis cinérea* (Delfini et al., 1995). Sin embargo, las bacterias, levaduras y mohos muestran diferentes sensibilidades a la presurización., por ejemplo, a presiones entre 200 y 500 MPa se pueden inactivar levaduras y bacterias en vinos tintos y blancos sin alterar significativamente sus propiedades organolépticas (Christofi, 2020). Sin embargo, presiones muy altas (>650 MPa) aplicadas durante un largo período de tiempo (>2 horas) pueden afectar el color del vino y reducir la cantidad de compuestos fenólicos (Yidirim & Darici, 2020).

Algunas investigaciones sugieren que esta técnica puede acelerar las reacciones de Maillard, la oxidación de alcoholes y ácidos grasos y disminuir compuestos fenólicos en vinos finales (Santos, et al., 2019). A pesar de ello, Santos, et al.(2013) informó que las propiedades sensoriales de los vinos tratados con HHP eran mejores que las de los vinos tratados con SO₂, y no se observaron cambios significativos hasta después de 6 meses de almacenamiento.

2.7.2.2.Ultrasonido de alta potencia (HPU)

El ultrasonido de alta potencia (HPU) es un método que utiliza ondas sonoras de alta potencia y baja frecuencia (20-100 kHz) para inhibir microorganismos y facilitar la extracción de compuestos fenólicos de las uvas. Su mecanismo de acción involucra la formación de burbujas inducidas por las ondas sonoras en un medio líquido, las cuales estallan y causan daño en la estructura celular de los microorganismos, aumentando la permeabilidad de la membrana y facilitando la extracción de compuestos o la inactivación del microorganismo (Pérez-Porras, et al. 2021).

Actualmente, esta tecnología ha sido aprobada por la Organización Internacional de la Viña y el Vino (OIV) para la extracción de compuestos fenólicos y la reducción del tiempo de

maceración, sin embargo, no ha sido aprobada como alternativa al anhídrido sulfuroso debido a que aún faltan estudios a escala industrial, encontrándose sólo a escala laboratorio.

2.7.2.3. Irradiación Ultravioleta (UV)

La radiación UV actúa a través de una reacción fotoquímica con el ADN de los microorganismos, alterando su capacidad de reproducción. Las longitudes de onda entre 250-260 nm son altamente efectivas para inactivar microorganismos. Sin embargo, la eficacia de este método se ve afectada por la turbidez del mosto, la densidad óptica y la carga microbiana. *M. pulcherrima*, por ejemplo, es más resistente a los rayos UV-C (requiere dosis >1.2 kJ/L), mientras que *S. cerevisiae* y *H. uvarum* son más susceptibles (requieren dosis <0.8 kJ/L) debido a sus diferentes mecanismos de reparación y de protección del ADN (Diesler, 2019).

Investigaciones han demostrado que el tratamiento con radiación UV es efectivo para inactivar parcialmente la enzima polifenol oxidasa y reducir la acidez volátil en uvas y vinos, sin causar alteraciones significativas en parámetros de calidad como pH, ácido tartárico y contenido de alcohol. Sin embargo, para inactivar completamente la enzima polifenol oxidasa se requiere una adición residual de SO₂ (Falguera et al., 2013). Además, la inactivación de microorganismos es más efectiva en vinos blancos en comparación a vinos tintos, debido a la mayor capacidad de absorción de luz ultravioleta de estos últimos (Yidirim & Darici, 2020).

2.7.2.4. Tecnología de campo eléctrico pulsado (PEF)

El tratamiento de pulsos de campos eléctricos (PEF) implica la aplicación de pulsos de campo eléctrico cortos (μ s) y de alta intensidad a un producto colocado entre dos electrodos. Este campo eléctrico tiene la capacidad de permeabilizar las membranas de células tanto eucariotas como procariotas, basándose en la teoría de la ruptura dieléctrica de Zimmerman. Cuando una célula es expuesta a un campo eléctrico, los iones en su interior y exterior se mueven siguiendo el campo eléctrico, lo que genera una acumulación de cargas opuestas en ambos lados de la membrana. Esta acumulación de cargas opuestas resulta en la compresión de la membrana, disminuyendo su espesor y creando poros que aumentan la permeabilidad y permiten la extracción de compuestos fenólicos. Para lograr esta electroporación, se utilizan campos eléctricos de aproximadamente 0.5-1 kV/cm y tiempos de aplicación de 100 a 1000 μ s (Puértolas et al., 2010).

El PEF ha demostrado ser eficaz en la inactivación de levaduras y bacterias ácidolácticas, además de reducir el tiempo de maceración y aumentar la concentración de compuestos fenólicos. No obstante, su aplicación en vino rosado ha mostrado una disminución en la intensidad del color y una menor cantidad de antocianinas (Yidirim & Darici, 2020).

2.7.3. Enfoque biológico en el reemplazo del SO₂

Los enfoques convencionales para el control de patógenos se han centrado en productos químicos o aplicaciones tecnológicas que permiten reducir la microflora deteriorante, sin embargo, en los últimos años el enfoque biológico ha tomado gran relevancia en el reemplazo del SO₂ debido a que se utilizan microorganismos beneficiosos que están presentes de forma natural en alguna de las etapas del proceso de elaboración del vino, provocando un menor riesgo de alergias y una mayor complejidad aromática. En la tabla 4 se muestra un resumen de las alternativas naturales

Tabla 4. Resumen de las alternativas naturales utilizadas en reemplazo del SO₂ en el vino. Obtenido de (Yıldırım et al., 2020)

Tratamientos	Contribución a la calidad del vino	Actividad Antimicrobiana	Desventajas
Productos de la vinificación (extractos de piel y semillas de uva)	Inhibición de enzimas, eliminación de radicales libres, mejor carácter organoléptico.	<i>Bacillus cereus</i> , <i>Campylobacter jejuni</i> , <i>E. coli</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>Salmonella enterica</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Yersinia enterocolitica</i> , <i>Pseudomonas spp.</i> , Bacterias del ácido láctico	La incorporación de taninos enológicos puede provocar vinos tintos amarillentos
Virutas y extractos de madera de roble y brotes de vid	Alta capacidad antioxidante, contribución el perfil volátil y sensorial del vino,	Bacterias ácidoacéticas	Menos efectivo en vinos blancos que en vinos tintos. Existe un número limitado de estudios
Extractos de plantas (piel de eucalipto y almendras, aceite esencial de tomillo e hidroxitirosol)	Previene la oxidación, incrementa la composición de compuestos aromáticos	<i>E. coli</i> O157:H7, <i>Salmonella enteritidis</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>Salmonella poona</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> y <i>Cándida albicans</i> , Bacterias Ácido-lácticas	Se necesitan estudios adicionales a diferentes concentraciones y condiciones de almacenamiento más prolongadas

2.8. Bioprotección

2.8.1. Mecanismos de biocontrol

Durante muchos años las levaduras *no Saccharomyces* han sido consideradas como microorganismos indeseables, salvajes y deteriorados de necesaria eliminación (Castelli, 1954), sin embargo, en los últimos años numerosas investigaciones han mostrado un especial interés en ellas debido a su impacto organoléptico en el perfil del vino y a sus características biotecnológicas como potenciales bioprotectoras de la fermentación (Ciani et al., 2010; Contreras et al., 2014).

La bioprotección en vinificación se define como el uso de cultivos antagónicos, en este caso levaduras *no Saccharomyces*, que se agregan para inhibir patógenos y/o extender la vida útil del vino, sin cambiar negativamente las propiedades sensoriales de este (Lücke, 2000), su mecanismo de acción es simple, se basa en la competencia por los nutrientes mediante la creación de un nicho ecológico, donde las levaduras, al ocupar un espacio en el mosto impactan en el crecimiento y limitan la biodisponibilidad de nutrientes para los patógenos (Leyva Salas et al., 2017). Sin embargo, esta estrategia de competencia puede ser activa o pasiva (Bauer et al., 2018), donde la competencia pasiva es ejercida por todos los microorganismos consumidores de nutrientes sobre los demás, mientras que la competencia activa es realizada por los microorganismos que dominan el proceso de fermentación al resultar más fuertes y con características únicas, como, por ejemplo, productores de toxinas asesinas (Di Gianvito et al., 2022).

2.8.2. Competencia de Explotación o Pasiva

En la competencia de explotación o pasiva están involucrados todos los mecanismos mediante los que un microorganismo quita recursos a sus competidores. Una cepa que sigue una estrategia de bioprotección mediante competencia pasiva puede restringir el acceso del competidor a los nutrientes, limitar el oxígeno del medio y colonizar el espacio mediante la formación de biopelículas (Di Gianvito et al., 2022).

En el caso de la competencia de nutrientes, esta se puede provocar vía secreción de enzimas digestivas (Diggle et al., 2007; Rendueles & Ghigo, 2012) o sideróforos (Scholz & Greenberg, 2015), modificando su propia utilización de nutrientes mediante la alteración de su regulación metabólica (Ackermann et al., 2015), a través del agotamiento del oxígeno del medio (Englezos

et al., 2018) y mediante la colonización del espacio mediante la formación de biopelículas (Ghoul & Mitri, 2016; Freimoser et al., 2019)

2.8.3. Competencia de interferencia o Activa

En la competencia de interferencia o activa, las células rivales se dañan entre sí activamente o mediante una guerra química con el objetivo final de generar una desventaja sobre las especies no deseadas y eliminar al competidor (Ghoul et al., 2016). Algunos ejemplos de competencia activa incluyen la secreción de antimicrobianos como etanol (Gao & Fleet, 1988), SO₂ (Andorrà et al., 2018), toxinas asesinas, péptidos, bacteriocinas y enzimas líticas (Bauer et al., 2018). Otra estrategia de competencia activa más sutil corresponde a la interrupción activa de moléculas de señalización a través de la extinción del quórum (Christiaen et al., 2011).

2.8.4. Levaduras no *Saccharomyces* con propiedades bioprotectoras

Actualmente se ha estudiado algunas levaduras con potencial bioprotector en vinificación, las cuales por sí solas o en combinación con bacterias u otras levaduras permiten proteger el mosto de manera natural y biológica. A continuación, se muestran las levaduras que han sido objeto de estudio en este contexto:

2.8.4.1. *Metschnikowia pulcherrima*

Metschnikowia pulcherrima es una de las levaduras más estudiadas en el ámbito del biocontrol, debido a su capacidad para sintetizar pulcherrimina, un pigmento rojo insoluble con comprobada actividad antifúngica y antimicrobiana (Kántor et al., 2015; Kurtzman & Droby, 2001; Liu et al., 2019; Parafati et al., 2015; Pawlikowska et al., 2019; Saravanakumar et al., 2008; Sipiczki, 2006; Türkel et al., 2014). El metabolito ácido pulcherrimínico es el precursor difusible de este pigmento, y es secretado por las células al medio ambiente donde se forma la pulcherrimina en contacto con los iones férricos. La acción antifúngica y antagónica de esta levadura se produce debido a la falta de hierro libre en el mosto provocada por la precipitación de los iones de hierro (III), los que son necesarios para el crecimiento de patógenos (Sipiczki et al., 2006) (Kántor et al., 2015). Actualmente se ha demostrado una actividad inhibidora frente a varias levaduras como: *Cándida albicans* y *Cándida tropicalis*, los géneros *Hanseniaspora*, *Pichia* y las *Brettanomyces* /*Dekkera*, y también frente a hongos como la *Botrytis Cinerea*, *Penicillium*, *Monilia spp.* y *Alternaria* (Kántor et al., 2015; Oro et al., 2014; Saravanakumar et al., 2008; Sipiczki, 2006). No obstante, *S. cerevisiae* no se ve afectada por la pulcherrimina (Oro et al.,

2014), lo que hace ideal a esta levadura como bioprotectora, al no inhibir a la levadura encargada de la fermentación. Sin embargo, un estudio realizado por Gore-Lloyd et al. (2019) demostró que cepas mutantes de *M. pulcherrima* que carecían de la capacidad de sintetizar ácido pulcherrimínico aún inhibían fuertemente los hongos filamentosos, lo que sugiere que la actividad antifúngica está asociada a otros aspectos diferentes a la privación de hierro.

Otro estudio realizado por Windholtz et al. (2023), donde se evaluó la variabilidad del consumo de oxígeno inter/intra especie de una colección de 47 cepas pertenecientes a 5 especies y 1 género (*Torulaspora delbrueckii*, *Saccharomyces Cerevisiae*, *Hanseniaspora Uvarum*, *Lachantea thermotolerans*, *Saccharomyces Uvarum* y *Metschnikowia spp.*) ha demostrado el potencial que tiene *M. pulcherrima* como antioxidante, obteniendo una tasa de consumo de oxígeno promedio de $1,87 \pm 0,31$ mg/L/h de O₂ consumidos, siendo la especie más eficiente de todas las estudiadas en el consumo de O₂. Mientras otro estudio realizado por Mencher et al. (2021), donde se evaluó la respuesta de *S. cerevisiae* frente a un co-cultivo con *M. pulcherrima* demostró que esta levadura reprime la respiración aerobia de *S. cerevisiae*, además de poseer una mayor capacidad respiratoria que la levadura tradicional. Los resultados anteriores son de gran relevancia en el contexto de la sustitución de sulfitos, dado que actualmente se proponen escasas alternativas para sustituir la actividad antioxidante del SO₂ en el proceso de elaboración del vino.

El potencial antioxidante de *M. pulcherrima* se puede explicar en su capacidad para llevar a cabo la fermentación aerobia basada en su efecto Crabtree negativo (Mencher et al., 2021). Actualmente las levaduras pueden subdividirse en dos grupos: Crabtree positivo y negativo. Las levaduras que sufren una represión catabólica frente a altas concentraciones de glucosa son categorizadas como Crabtree positivas y su vía respiratoria es completamente inhibida, favoreciendo la vía fermentativa del azúcar, mientras que las Crabtree negativas no lo son. Un estudio realizado por Barnett & Entian. (2005), demostró que cuando la concentración de glucosa es mayor a 1g/L, se produce una represión catabólica de la glucosa en beneficio de la fermentación en algunas levaduras, tales como *Saccharomyces Cerevisiae*, *Torulaspora delbrueckii* y *Lachantea thermotolerans*, donde las especies aerobias mostraron flujos respiratorios del ciclo de Krebs tres veces más altos que *S. cerevisiae*. Sin embargo, el estudio realizado por Windholtz et al. (2023), no pudo demostrar que todas las especies Crabtree negativas consumen mayores cantidades de oxígeno que las positivas, dado que *Hanseniaspora*

Uvarum (Crabtree negativa) consumió cantidades de O₂ equivalentes a *T.delbrueckii* y *L. thermotolerans*, ambas Crabtree positivas (Gonzalez et al., 2013), por lo que el efecto antioxidante de la levadura *M. pulcherrima* podría deberse a su capacidad oleaginosa más que a su efecto Crabtree positivo, considerando que la síntesis de lípidos está relacionada con el consumo de O₂ (Nioi et al., 2022), y *M. pulcherrima* es capaz de producir lípidos microbianos que pueden alcanzar más del 20% de su peso celular seco (Thorpe & Ratledge, 1972). En síntesis, aún no se sabe con certeza la razón de la capacidad antioxidante de esta levadura y está demostrado que la co-inoculación de *M. pulcherrima* con *S. cerevisiae* (Mencher et al., 2021) y *T. delbrueckii* (Windholtz et al., 2021) produce un menor consumo de O₂ que cuando se tiene un cultivo puro de *M. pulcherrima*.

Otros hallazgos interesantes según el estudio realizado por Sadoudi et al. (2012) fue la menor producción de ácido acético del co-cultivo *M. pulcherrima*/*S. Cerevisiae*, en comparación al monocultivo de *S.cerevisiae*. Esta disminución se podía explicar debido a la interacción levadura-levadura o al catabolismo del ácido acético (dos Santos et al., 2003). Sin embargo, el estudio de Windholtz et al. (2023) propone que las interacciones negativas registradas entre *M. pulcherrima* y el ácido acético se deben al mayor consumo de O₂ en el mosto por *M. pulcherrima*, limitando el crecimiento de las bacterias acéticas, dado que éstas son estrictamente aeróbicas y son las precursoras de compuestos como el acetato de etilo y el ácido acético (Drysdale & Fleet, 1989; Du Toit & Pretorius, 2000). La efectividad antimicrobiana de *M. pulcherrima* frente a las bacterias ácidoacéticas es un efecto bioprotector bastante deseable dado que la eficacia del SO₂ frente a estas bacterias de deterioro no está claramente establecida en la literatura (Windholtz et al., 2021).

2.8.4.2. *Torulaspora delbrueckii*

La levadura *Torulaspora delbrueckii* también ha sido ampliamente estudiada debido a su comprobada capacidad para resistir durante todo el proceso de vinificación, creciendo y sobreviviendo en un ambiente que para otras *no Saccharomyces* sería estresante, por ej., con altas concentraciones de etanol (Bely et al., 2008 ; Fleet, 2003 ; Pina et al., 2004). Además *T. delbrueckii* está presente en la fermentación sin tener un impacto significativo en la cinética fermentativa, ni en la implantación de levaduras secas activas como *S. cerevisiae* en fermentaciones secuenciales o co-cultivos (Renault et al., 2015 ; Whitener et al., 2017). Otro interés biotecnológico de esta especie es la capacidad de *Torulaspora delbrueckii* para producir

hidroxitirosol un conocido compuesto bioactivo (Álvarez-Fernández et al., 2018), que al consumirlo es capaz de estimular la biogénesis mitocondrial en las células epiteliales de la retina que contribuye a la salud ocular (Zhu et al., 2010), además de poseer propiedades anticancerígenas (Roleira et al., 2015), cardioprotectoras (Mnafigui et al., 2015), cualidades antidiabéticas e incluso propiedades neuroprotectoras (Fernández-Mar et al., 2012, Marhuenda et al., 2016 ; Rigacci y Stefani, 2016). Sin embargo el principal interés enológico en estudiar esta levadura recae en su potencial para obtener vinos finales con concentraciones más altas de 2-metilpropanoato de etilo y propionato de etilo, lo que produce una percepción más alta de aromas afrutados y aromas fermentativos en comparación a fermentaciones llevadas a cabo únicamente con la levadura tradicional *S. cerevisiae* (Chasseriaud, 2015; Loira et al., 2015; Renault et al., 2015).

En los últimos años numerosos estudios acerca de la bioprotección han considerado a *T. delbrueckii* como un buen sustituto para el SO₂ en el vino, tanto en inoculaciones por sí sola (Simonin et al., 2018a) o en conjunto a otras levaduras, como *M. pulcherrima* y *L. thermotolerans* (Escribano-Viana et al., 2022; Simonin et al., 2020; Windholtz, Dutilh, et al., 2021; Windholtz, Redon, et al., 2021). Windholtz, et al. (2021) demostraron que *T. delbrueckii* utilizada como bioprotectora en conjunto con *M. pulcherrima* es capaz de limitar el desarrollo de la levadura *Hanseniaspora Uvarum*, la cual produce metabolitos no deseados como ácido acético, acetato de etilo, compuestos azufrados y ácidos biogénicos corroborando lo demostrado en estudios previos donde se reconoció a *T. delbrueckii* como una especie con potencial antimicrobiano (Oro et al., 2014). De hecho, Johnson et al. (2020), demostraron una reducción del 44% en la producción de ácido acético y del 39% en los niveles poblacionales de *Hanseniaspora* spp. en maceración en frío de jugo de uva con el uso de *T. delbrueckii* y *M. pulcherrima* como bioprotectoras. En cuanto a su acción antimicrobiana, el estudio realizado por Escribano-Viana et al. (2022) reportó el potencial de una mezcla de *Torulaspora delbrueckii* y *Lachancea thermotolerans* aplicadas como agente bioprotector sobre los niveles de población de AAB al inicio de la fermentación alcohólica, provocando un efecto antibacteriano superior al que produce el SO₂ sobre este tipo de bacterias. El estudio realizado por Simonin et al. (2018) sobre uvas Aligoté y utilizando sólo *T. delbrueckii* como bioprotector provocó que *Brettanomyces bruxellensis* disminuyera notablemente, lo cual podría deberse a un efecto de la biomasa sobre otros microorganismos, como se explicó anteriormente (Nissen et

al., 2003).

En cuanto a la acción antioxidante de esta levadura, el mismo estudio realizado por Simonin et al. (2018) demostró que el potencial antioxidante de esta levadura estaba relacionado con su consumo de O₂ disuelto, presumiendo que la suficiente biomasa de *T. delbrueckii* podría agotar el oxígeno del medio y así proteger el mosto de la oxidación. De hecho, los resultados demostraron que se agotó el oxígeno del medio cuando se añadió *T. delbrueckii* al mosto, debido a que esta especie, al igual que otros microorganismos, necesita oxígeno para su crecimiento (Visser et al., 1990), demostrando un efecto antioxidante superior a los sulfitos. Sin embargo, no está claro si la acción antioxidante se debe realmente a la presencia de la levadura *Saccharomyces* o a la tirosinasa, cuya actividad no se ve inhibida en ausencia de SO₂ (Simonin et al., 2018).

La acción bioprotectora de esta levadura podría estar ligada a una competencia activa, mediante la producción de proteínas asesinas (Villalba et al., 2016). Sin embargo, también podría deberse a una competencia pasiva por nutrientes como oxígeno, lípidos, nitrógeno y compuestos vitamínicos (Englezos et al., 2017; Kemsawasd et al., 2015). De hecho un estudio realizado por Villalba et al. (2016) identificaron y caracterizaron una nueva toxina asesina de *Torulaspora delbrueckii* con potencial actividad biocontroladora, disminuyendo las poblaciones de algunos microorganismos de deterioro como *Brettanomyces bruxellensis*, *Pichia guilliermondii*, *Pichia manshurica* y *Pichia membranifaciens*. Aunque se observó una variabilidad en la capacidad asesina dependiente de la cepa, donde la cepa *T. delbrueckii* NPCC 1033 demostró ser la cepa con mejor potencial antimicrobiano. Además, trabajos previos realizados por los mismos autores demostraron que esta cepa asesina podría ser una buena *Cándidata* para el control biológico de levaduras que deterioran el vino como *H.Uvarum*. Mientras que otro estudio realizado por Lopes & Sangorrín. (2010) demostró que las toxinas asesinas de *T. delbrueckii* mostraron actividad asesina contra *H.Uvarum* y *B. bruxellensis* y algunas otras cepas de *P. guilliermondii* y *P. membranifaciens*.

Por último, un estudio realizado por Alasmar et al., (2020), demostró que *T. delbrueckii* también es capaz de producir compuestos orgánicos volátiles (COV) cuya eficacia aumenta a pH cercanos a los del vino y poseen potencial antagónico contra varios hongos toxigénicos y fitopatógenos, como *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium*.

2.8.4.3. *Lachancea thermotolerans*

La levadura *Lachancea thermotolerans* ha sido estudiada como potencial bioprotectora debido a su capacidad para inhibir la tasa de crecimiento del hongo *Aspergillus* (Morata et al., 2018). En particular Ponsone et al. (2016) encontraron dos cepas de *L. thermotolerans* (RCKT4 y RCKT5) que fueron capaces de aumentar la fase de latencia y disminuir la tasa de crecimiento de *Aspergillus* y reducir la acumulación de OTA (Ocratoxina A), la cual es una micotoxina producida por hongos que puede contaminar las uvas y los mostos de uva provocando toxicidad renal, mutagenicidad, teratogenicidad e inmunotoxicidad en las personas (Pfohl-Leszkowicz & Manderville, 2007). *L. thermotolerans* tiene la capacidad de liberar compuestos orgánicos volátiles (COV), los cuales modulan la expresión de genes implicados en la biosíntesis de OTA, reduciendo la germinación de esporas, el crecimiento de micelios y la producción de micotoxinas (Fiori et al., 2014).

El estudio realizado por Escribano-Viana et al. (2022) demostró que utilizando *Torulaspora delbrueckii* y *Lachancea thermotolerans* como agentes bioprotectores en etapas prefermentativas se podría ejercer un efecto negativo sobre las bacterias ácidoacéticas. Incluso el mismo estudio comprobó que a escala de bodega, el efecto bioprotector fue comparable e incluso mayor que la adición de dióxido de azufre. El estudio realizado por Windholtz et al. (2023) demostró que *L. thermotolerans* tenía capacidad antioxidante, con un consumo de O₂ intermedio de $1,49 \times 10^{-6}$ mg O₂ consumido/L/h/célula viable, siendo una levadura con potencial antioxidante de la misma forma que *M. pulcherrima*. Siguiendo la misma línea, un estudio realizado por Shekhawat et al. (2017) demostró que *L. thermotolerans* era capaz de dominar las fermentaciones mixtas con *S. cerevisiae* cuando había presencia de oxígeno en el mosto, demostrando una gran influencia de la aireación sobre esta levadura.

Mientras, otro estudio realizado por Binati et al., (2021) para evaluar el efecto de fermentaciones mixtas de *L. thermotolerans*/ *S. cerevisiae* sobre la concentración de glutatión (GSH) demostró que los vinos fermentados con la cepa DESP53 de *L. thermotolerans* tuvieron un aumento de aproximadamente 10mg/L en GSH, en comparación a las fermentaciones control con *S. cerevisiae*, demostrando un gran potencial para reducir la adición externa de este compuesto, el cual es un tripéptido con funciones antioxidantes en el vino.

L. thermotolerans es una levadura que al inocularse en conjunto a *S. cerevisiae* produce interacciones sinérgicas. De hecho, Mora et al. (1990) informaron que el crecimiento de

Lachancea thermotolerans (ex *Kluyveromyces thermotolerans*) y *S. cerevisiae* en cultivos secuenciales provocaron una reducción significativa del ácido acético, compuesto producido por bacterias acéticas presentes en el mosto.

2.9. Caracterización del producto terminado

2.9.1. Compuestos volátiles en la fermentación

Los compuestos volátiles son los principales responsables del rendimiento aromático del vino y están relacionado con atributos particulares que caracteriza el perfil sensorial general (Chen & Darriet, 2021). En la actualidad se han identificado cientos de compuestos volátiles en el vino, incluidos terpenos, fenoles, alcoholes, ésteres, aldehídos, cetonas y lactonas, con concentraciones que van desde unos pocos ng/L hasta cientos de mg/L (Tang et al., 2019). Algunos de los compuestos volátiles se forman durante el proceso de fermentación y envejecimiento, mientras que otros se emiten directamente de las bayas de la uva (González-Barreiro et al., 2015). En cuanto a un vino joven, la composición y el contenido de compuestos aromáticos dependen en gran medida de la variedad y el viñedo (Luzzini et al., 2021). Por otro lado, las diferentes combinaciones y proporciones de compuestos volátiles proporcionan vinos aromáticamente diversos y distintivos. Los vinos *Sauvignon Blanc* son bien conocidos por sus aromas característicos relacionados con los tioles varietales, los cuales pueden presentar variaciones en su concentración debido a la levadura utilizada durante el proceso (Dubourdieu et al., 2006). A continuación, se enumeran los principales compuestos volátiles presentes en el vino caracterizados por grupo.

2.9.2. Alcoholes Superiores o Fusel

Estos compuestos están formados por dos átomos de carbono y aparecen en el vino como productos anabólicos del metabolismo del azúcar y como productos catabólicos del metabolismo de aminoácidos a través de la vía de Ehrlich (Moreno-Arribas & Polo, 2009). Este tipo de compuestos volátiles se pueden clasificar en alcoholes alifáticos y aromáticos según los aminoácidos de los que se asimilan. Los alcoholes alifáticos se derivan de aminoácidos de cadena lineal o ramificada y tienen un fuerte olor parecido al de los disolventes. Los alcoholes aromáticos contienen al menos un anillo de benceno, que puede mejorar la complejidad del vino y contribuir positivamente en los aromas. Sin embargo, los alcoholes superiores contribuyen caracteres vegetales y herbáceos considerados desagradables cuando se encuentran en

concentraciones excesivas superando los 400-500 mg/L, por lo que se recomienda que estén en concentraciones cercanas a los 300 mg/L en vinos blancos (Tsai et al., 2022). El alcohol aromático más importante que se encuentra en los vinos es el 2-feniletanol (2-PE), el cual se deriva de la fenilalanina y se asocia con un aroma parecido a la rosa (Lilly et al., 2006).

Tabla 5. Alcoholes superiores presentes en el vino. Obtenido de (Visan et al., 2018)

Alcoholes superiores	Concentración en vino	Nota aromática
2-methyl-1- butanol, Pentan-1-ol	8-150 mg/L	Esmalte de uñas, solvente, malta
3-methyl-1- butanol	<0,2 g/L	Notas de alcohol, esmalte de uñas, solvente, notas amílicas, malta, acre, olor desagradable
Propanol	5-125 mg/L	Olor a solvente, químico
2-methyl-1- propanol	9-174 mg/L	Disolvente, notas de malte, nota de vino pronunciada
Butanol	<8 mg/L	Notas alcohólicas
2-feniletanol	4-197 mg/L	Floral, rosa, notas de miel, notas de melocotón
3-metiltiopropanol	-	Papa

2.9.3. Ácidos

Los ácidos grasos volátiles en los vinos se refieren a un grupo de ácidos orgánicos de cadena corta o media, incluidos los responsables de la acidez volátil (AV), donde se ha comprobado que mientras mayor sea la cadena, la volatilidad disminuye y el aroma cambia de ácido a rancio, volviéndose un compuesto indeseado en el vino. Los ácidos son de suma importancia ya que reaccionan con los alcoholes superiores y forman esteres, compuestos altamente deseados en vinificación, sin embargo, si un compuesto por sí solo supera los 20mg/L será indeseado ya que tendrá un sabor similar a la mantequilla o queso, por lo que se requiere su presencia sólo en bajas concentraciones. En cuanto a la concentración total de ácidos, está oscila entre los 500 y 1000 mg/L, donde el 90% corresponde a ácido acético, el cual posee un aroma parecido al del vinagre cuando la concentración está cerca de su umbral de percepción (0,7 a 1,1 g/L), donde

una producción excesiva de este ácido suele estar asociada con el deterioro microbiano de bacterias acéticas como *Gluconobacter* y *Acetobacter*. Por otro lado, los ácidos grasos de cadena media como ácido hexanoico, octanoico y decanoico, desempeñan un papel esencial en las notas frutales del vino.

Tabla 6. Ácidos grasos volátiles presentes en el vino. Obtenido de (Visan et al., 2018)

Ácidos grasos	Nota aromática
Ácido acético	Olor agrio, vinagre, picante
Ácido propanoico	Olor desagradable, agrio
Ácido isobutirato	Manzana podrida, mantequilla, sudor
Ácido 2-metilbutanoico	Afrutado, sudor, ácido
Ácido 3-metilbutanoico, ácido isovalerato	Frutas podridas
Ácido fenilacetico	Floral, notas verdes

2.9.4. Ésteres

Los ésteres se encuentran en el vino a través de reacciones entre alcoholes y ácidos grasos. La reacción entre acetil-CoA y un alcohol (etanol o alcoholes superiores) forma los ésteres de acetato, mientras que la combinación entre cadenas largas de acil-CoA y etanol generan ésteres etílicos (Loviso & Libkind, 2019). En los vinos blancos, los ésteres de acetato contribuyen en gran medida al carácter floral y de frutas tropicales de los vinos, y los ésteres etílicos contribuyen a la complejidad del vino con toques de aromas de frutas de árbol en concentraciones bajas, pero formando sabores desagradables como cera y miel en concentraciones elevadas. En *Sauvignon Blanc* se encuentran rangos de concentración similares de la mayoría de los ésteres a los de otras variedades de vino blanco, excepto por algunos compuestos, como el hexanoato de etilo y el isovalerato de etilo con concentraciones más altas, y el isobutirato de etilo con concentraciones más bajas se cuantifican en *Sauvignon Blanc*.

Tabla 7. Esteres presentes en el vino. Obtenido de (Visan et al., 2018)

Esteres	Límite de detección µg/L	Nota aromática
Etil butanoato	20	Piña, fresas
Etil hexanoato	14	Manzanas verdes, fresas, piñas, moras
Etil Octanoato	2	Floral, afrutado, pera, jabón
Etil decanoato	200-500	Floral, afrutado, jabón
Acetato de etilo	-	Desagradable, solvente, afrutado
Acetato de butilo	1 ppm	Plátano, floral, afrutado
Propanoato de etilo	-	Cerezas
Acetato de 2-metilbutil	-	Afrutado
Acetato de 3-metilbutil	2000-3000	Plátanos, manzanas maduras, caramelo
Acetato de 2-feniletilo	2000	Rosa, afrutado
Propanoato de 2-metiletilo	-	Fresas, moras
Butanoato de 2-metiletilo	-	Manzanas, fresas
Butanoato de 3-metiletilo	-	Frutas verdes, arándanos, fresas
Acetato de hexilo	15 ppm	Pera, ciruela, plátano, grosella
Acetato de linalool	-	Bergamota
Acetato de bencilo	-	Manzana, pera, jazmín

CAPITULO 3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Metodología Experimental General

Para cumplir con los objetivos propuestos se implementó una metodología experimental que comienza con la realización de fermentaciones a escala de laboratorio en frascos schott de 1L utilizando mosto de uva blanca del tipo *Sauvignon Blanc* proveniente de la viña Emiliana, ubicada en la comuna de San Fernando, séptima región del maule, Chile. El proceso se llevó a cabo mediante la adición de levaduras *no Saccharomyces* nativas del género *Cándida spp.* durante etapas prefermentativas, con el objetivo de actuar como bioprotectoras en reemplazo del SO₂, y posteriormente adicionar la levadura tradicional *Saccharomyces cerevisiae* para llevar a cabo la fermentación alcohólica.

El objetivo principal de esta metodología es analizar y comparar el comportamiento de distintos microorganismos patógenos durante el proceso de fermentación, al sustituir el uso del aditivo químico tradicional, anhídrido sulfuroso (SO₂), por una levadura *no Saccharomyces* con propiedades bioprotectoras. Los microorganismos de mayor interés en este estudio son las bacterias ácidolácticas (LAB), las bacterias ácidoacéticas (AAB), las levaduras *Brettanomyces bruxellensis*, las levaduras *Saccharomyces* y las levaduras *no Saccharomyces*.

La investigación comenzó con una revisión bibliográfica enfocada al desarrollo del diseño experimental, donde se revisó la bibliografía existente en relación con la utilización de levaduras *no Saccharomyces* como agentes bioprotectores en la fermentación del vino. Como resultado de esta búsqueda bibliográfica se lograron establecer las condiciones de operación recomendadas, es decir, condiciones de agitación, temperatura de incubación específica para *Sauvignon Blanc*, ajuste inicial de parámetros enológicos como YAN, pH, O₂ y SO₂, tipos de medios para el cultivo selectivo de microorganismos patógenos en placa, densidad inicial del inóculo bioprotector y tiempo de maceración prefermentativa para garantizar una adecuada protección antimicrobiana previo a la fermentación.

En base a lo anterior se decidió utilizar 2 tipos de levadura *no Saccharomyces* bioprotectoras, ambas del género *Cándida spp.*; *Cándida oleophila* y *Cándida boidinii*; 2 densidades celulares iniciales de bioprotector: 1×10^6 cell/mL y 1×10^7 cell/mL; una concentración de SO₂ de 40ppm; aireación del mosto a 0,940 L/min durante 10 min previo a la maceración, un tiempo de maceración prefermentativa de 72h a una temperatura de 10°C, fermentación alcohólica entre

18 a 20°C y una densidad celular inicial de 1×10^6 cell/mL para la levadura fermentativa *S. cerevisiae*.

Durante la etapa prefermentativa y la fermentación se monitorearon cada 24h parámetros como la densidad, concentración de azúcares vía refracción con °brix y densidad óptica con espectrofotómetro OD600. Mientras que en las muestras finales de vino se analizaron parámetros relacionados con la composición química, tales como ácido acético, ácido láctico, ácido málico, azúcares totales (glucosa-fructosa), etanol, ácido tartárico y glicerol. Finalmente se analizará la composición de compuestos volátiles en aquellos ensayos que presenten los mejores resultados de protección antimicrobiana contra microorganismos patógenos.

La metodología experimental general se resume en la figura 15, mientras que en la figura 16 se resume el desarrollo experimental desde la limpieza de la uva hasta el fin de la fermentación.

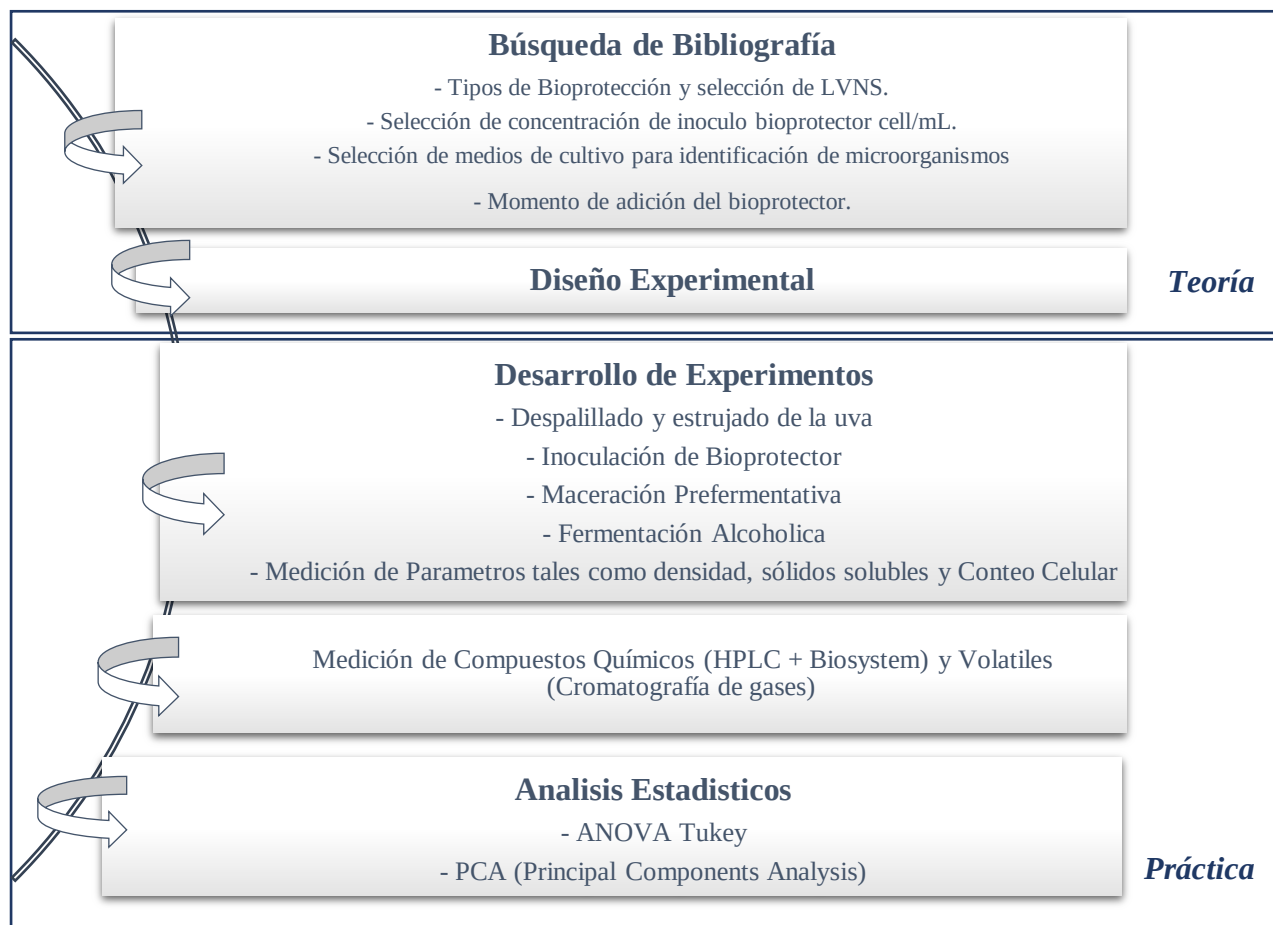


Figura 15. Metodología Experimental. Elaboración propia.

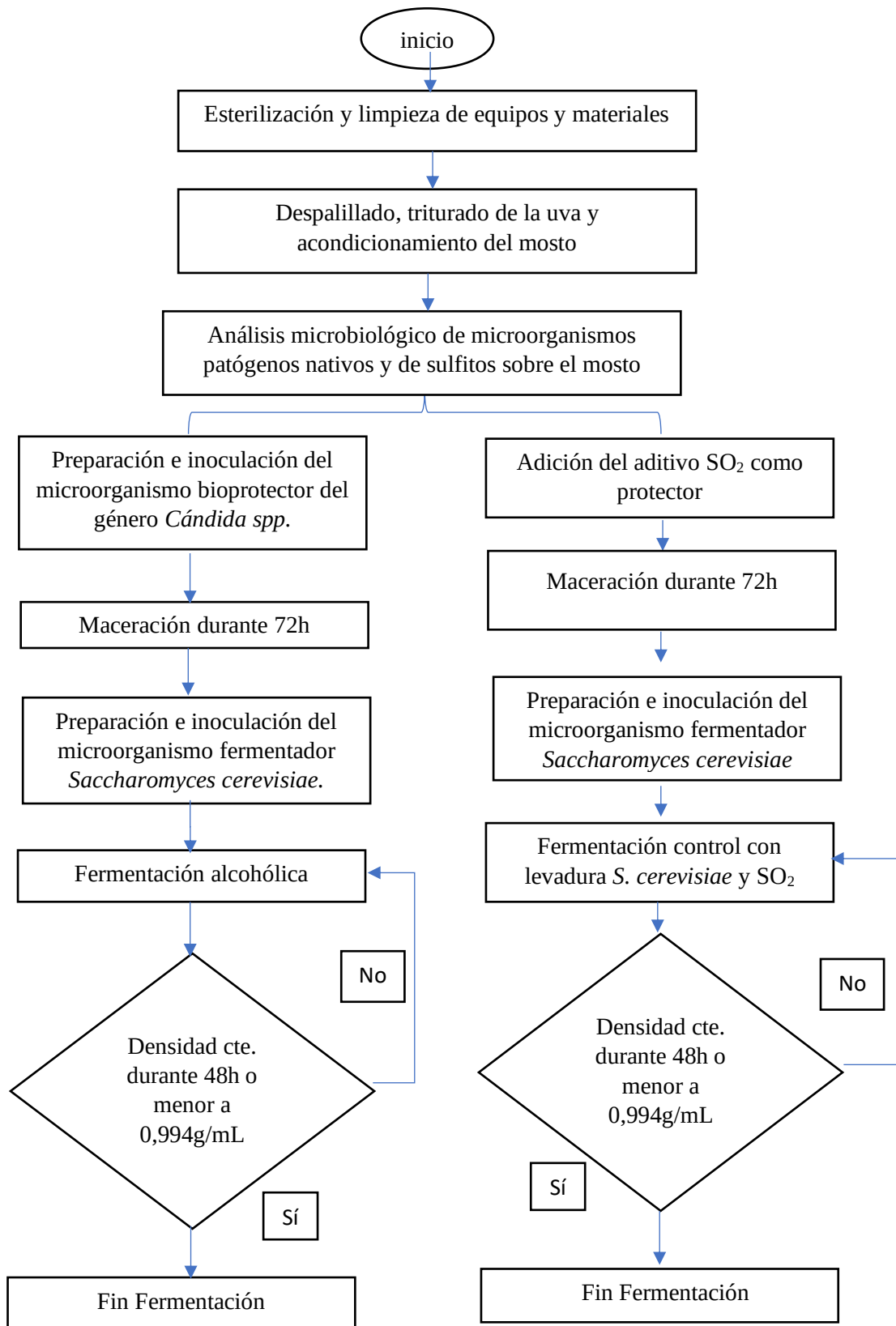


Figura 16. Resumen de los procesos fermentativos para fermentaciones bioprotegidas. Elaboración propia

3.2. Materiales, Reactivos y Equipos

3.2.1. Microorganismos

Las levaduras utilizadas como bioprotectoras: *Cándida boidinii* y *Cándida oleophila*, fueron adquiridas de la colección de cultivos del laboratorio de fermentación (Universidad Técnica Federico Santa María), las cuales fueron aisladas de la microbiota nativa presente en la uva de la viña Palo Alto, ubicada en la región del Maule (Franco et al., 2021). Para los experimentos a escala de laboratorio los cultivos de levaduras *no Saccharomyces* se mantuvieron en formato stock en medio de glicerol a una temperatura de -80°C, para posteriormente activarlas en placas de agar, las cuales se mantienen a 4°C durante aproximadamente 1 mes, según el procedimiento de reactivación de cepas de stock congelado en el Anexo A.

Por otra parte, la levadura convencional o fermentativa, será la levadura liofilizada *Saccharomyces cerevisiae* (SC) (EX 1118™ de LALVIN™), la cual viene en envases sellados al vacío de 500 g, y se mantienen bajo refrigeración a 4°C. Posee más de $1,2 \times 10^{10}$ ufc/g, y se recomienda una dosis de empleo de 20 a 30 g/hL.

3.2.2. Uva

Se utilizó uva *Sauvignon Blanc* cosecha 2023 proveniente de la viña Emiliana, del valle de San Fernando, región del Maule, Chile, sin sulfitar y se almacenó en bolsas de 2 kg c/u a una temperatura de -18°C hasta el momento de su utilización. Previo a su utilización se realizó un proceso de despalillado y de eliminación de uvas contaminadas, hojas, tallos e insectos adheridos.

3.2.3. Reactivos

A continuación, en la tabla 8 se muestran todos los reactivos utilizados durante los experimentos:

Tabla 8. Reactivos utilizados durante el desarrollo de las fermentaciones

Reactivo	Uso
Metabisulfito de sodio en solución de 100 g/L.	Como antimicrobiano SO ₂
Azul de metileno diluido en agua.	Medición de densidad celular en microscopio
Medio de Cultivo agar glucosa según Saboraud al 4%	Crecimiento de levaduras <i>no Saccharomyces</i> (NS) en medio liquido
Medio de cultivo agar-agar.	Crecimiento de levaduras NS en placa
Medio de Agua peptonada	Medio para el mantenimiento de levaduras NS
Medio de cultivo Cloranfenicol Glucosa Agar	Medio para el conteo de levaduras totales
Medio de cultivo MRS Agar	Medio para el conteo de bacterias lácticas
Medio de cultivo Agar Lisina	Medio para el conteo de levaduras NS
Medio de cultivo WLC	Medio para el cultivo de <i>Brettanomyces bruxellensis</i>
Medio de cultivo WLD	Medio para el cultivo de bacterias acéticas
Yodo	Reactivo necesario para medición de SO ₂
Ácido sulfúrico	Reactivo necesario para medición de SO ₂
Sachet de anaerobiosis	Mantenimiento de ambiente anaeróbico

3.2.4. Equipos

En la tabla 9 se presentan los equipos utilizados durante el desarrollo de las fermentaciones con una breve descripción, y a continuación se presentan sus principales parámetros operacionales.

Tabla 9. Lista de equipos.

EQUIPO	DESCRIPCIÓN
Autoclave (AMILAB)	Esterilización de materiales a 121°C durante 15min
Frascos Schott de fermentación	Frascos Schott modificados con una salida para tomar muestra desde una sonda y mantener la anaerobiosis durante todo el proceso.
Incubadora con agitación	Utilizado para mantener la temperatura y agitación constante durante el desfangado y fermentación alcohólica
Refractómetro (HI 96801)	Medición indirecta de la concentración de azúcar presente en el mosto, con una resolución de 0,1% Brix
Microscopio Óptico	Realizar el conteo celular, utilizando cámara Neubauer.
Estufa calefactora	Propiciar el crecimiento de las placas de levadura y de otros microorganismos durante el análisis microbiológico.
Espectrofotómetro UV-Vis	Medición de la densidad óptica, a una longitud de onda de 600nm.
Cromatógrafo de gases con espectrometría de masas	Separación y análisis de sustancias volátiles en el vino.
Cromatógrafo líquido de alta eficiencia (HPLC)	Medición de etanol y ácido tartárico al final de la FA
Biosystem	Medición de acidez total, volátil, glucosa/fructosa, glicerol, ácido málico y láctico al final de la FA.

3.2.4.1. Autoclave

El autoclave 21L de la marca Amilab es utilizado para esterilizar materiales mediante vapor de agua a 121°C durante 15min. El equipo viene integrado con un panel digital que permite ajustar los parámetros de operación, una válvula de emergencia y un indicador de presión de 0 a 20psi. Posee un rango de operación de hasta 125°C y tiene una capacidad de 21L. En la figura 17 se muestra una imagen de referencia del equipo.



Figura 17. Autoclave Amilab

3.2.4.2. Incubadora con agitación

Se emplearon 2 incubadoras para asegurar las condiciones de agitación y temperatura necesarias para la fermentación y para incubar las placas de cultivo. La primera incubadora utilizada para el desarrollo de la fermentación del vino blanco corresponde a la incubadora modelo JSSI-100C de JSR, la cual posee un sistema de refrigeración y calefacción, operando en un rango de temperatura que va desde los 10 a los 70°C y con una agitación desde los 20 a los 350rpm. La incubadora modelo TU-400 MRC se utiliza como incubadora para almacenar placas de cultivo a 28°C y posee un sistema de calefacción por convección de aire con un rango de temperatura que va desde los 5 a los 60°C y un rango de agitación que va desde los 20 a los 250rpm. En la figura 18 se muestra una imagen de referencia del equipo.



Figura 18. A. Incubadora modelo JSSI-100C B. Incubadora modelo TU-400 MRC

3.2.4.3.Refractómetro digital

El refractómetro digital modelo HI96811 de la marca Hanna Instruments, es un instrumento óptico que emplea la medición del índice de refracción para determinar el contenido de azúcar en muestras de vino y mostos de uva entregando un resultado en °Brix. Tiene un rango de medición de entre 0 a 50% Brix y de 0 a 80°C, además de contar con un sistema de auto apagado tras permanecer 3 minutos inactivo. En la figura 19 se muestra una imagen de referencia del equipo.



Figura 19. Refractómetro digital Hanna Instruments

3.2.4.4.Microscopio Óptico

El microscopio óptico utilizado corresponde al Zeiss KF2 (Figura 18). Este equipo cuenta con una cabeza de visualización binocular y un par de oculares CPL W 10x/18. El microscopio tiene un revolver de cuatro posiciones y se suministra con objetivos de 3.2x, 10x, 40x y 100x con aceite. La platina mecánica XY permite un desplazamiento sencillo y suave de su muestra. Cuenta con iluminación halógena mediante una luz LED de 3W. La imagen referencial se muestra en la figura 20.



Figura 20. Microscopio óptico BA310 de Motic

3.2.4.5. Estufa

La Estufa modelo UN30 de la marca Memmert se utiliza como incubadora y secadora, como, por ejemplo, regulando la temperatura interna de placas de cultivo a una temperatura de 28°C, esterilizando placas a una temperatura de 180°C durante 2h y realizando un secado rápido del material de vidrio tras su lavado. La estufa opera en un rango de temperatura de entre los 20°C y los 300° y opera gracias a una sonda de temperatura Pt100 (Clase DIN A) con sistema de medición de 4 hilos. Este equipo cuenta con un temporizador ajustable desde el minuto hasta 99 días y está integrado con la función setpointWAIT, donde el tiempo empieza a contar una vez alcanzada la temperatura nominal. En la figura 21 se muestra una imagen de referencia del equipo.



Figura 21. Estufa modelo UN30

3.2.4.6. Agitador Vortex

El agitador FineVortex de FinePCR se utiliza para la homogenización de muestras de todo tipo mediante la generación de un vórtice en el interior de las muestras. El equipo puede operar a velocidades de entre 0 a 3000 rpm y se mueve en base a una trayectoria circular. En la figura 22 se muestra una imagen de referencia del equipo.



Figura 22. Agitador Vortex

3.2.4.7.Placa calefactora y agitador magnético

La placa calefactora y agitador magnético de Cimarec modelo Thermo Scientific SP131320-33 proporciona calor a cualquier objeto ubicado sobre ella y puede llegar hasta 540°C, además de contar con un sistema de agitación que va desde los 60 hasta las 1200 rpm. Se utiliza para la preparación de medios de cultivo y para preparar disoluciones de cualquier tipo. En la figura 23 se muestra una imagen de referencia del equipo.



Figura 23. Placa calefactora y agitador magnético Cimarec

3.2.4.8.Espectrofotómetro UV/VIS

El espectrofotómetro modelo OPTIZEN POP es un equipo utilizado para medir la absorbancia de una muestra, parámetro que permite identificar de forma indirecta la concentración celular de una muestra de vino o mosto. El equipo está conformado por lámparas halógenas de deuterio y tungsteno que emiten un haz de luz con una longitud de onda específica. El equipo mide cuanta luz es absorbida mediante la diferencia en la absorbancia entre la luz que entra y sale por la celda con muestra. El rango de longitud de onda va entre 190 a 1100 nm y tiene una precisión de $<\pm 1.5$ nm. En la figura 24 se muestra una imagen de referencia del equipo.



Figura 24. Espectrofotómetro UV/VIS

3.2.4.9. Balanza Analítica

La balanza analítica M214Ai de BEL Engineering permite medir la masa de cualquier objeto utilizando un sistema de restauración de fuerza electromagnética, se utilizó para la medición de la densidad de las muestras de vino y la preparación de disoluciones en polvo como medios de cultivo. Cuenta con un sistema de doble caja, teclado ergonómico y un sistema de calibración externa o interna. Opera en un rango de temperatura que va desde los 5 a los 35°C y de medición de 20mg a 220 g, con una resolución de $\pm 0,0001$ g. En la figura 25 se muestra una imagen de referencia del equipo.



Figura 25. Balanza analítica

3.2.4.10. Centrífuga

La centrifuga modelo Z206 de HermLe se utiliza para separar los componentes líquidos y sólidos de una muestra en función de sus densidades mediante la aplicación de fuerza centrífuga. Se utilizó para separar las levaduras del medio de cultivo *Saboraud Dextrose Broth* en tubos falcón de 50mL. El rango de velocidad va desde los 200rpm hasta los 6000rpm, con ajustes de 50rpm y permite ajustar el tiempo de centrifugado mediante su panel digital. En la figura 26 se muestra una imagen de referencia del equipo.



Figura 26. Centrífuga

3.2.4.11. Sistema de aireación

El sistema de aireación se utiliza para entregar aire a los fermentadores para satisfacer la demanda de oxígeno necesario para llevar a cabo la fermentación. El sistema está compuesto por una bomba de aire y filtros pirinola. Las bombas utilizadas corresponden al modelo 188 de SONIC, las cuales son capaces de administrar 0,940L/min por cada una de sus 2 salidas. Los filtros pirinola Millex-HV de Merck se utilizaron para evitar la contaminación de los fermentadores, atrapando los microorganismos presentes en el aire externo gracias a que poseen un diámetro de poro de 0,45 μ m y un diámetro total de 33mm. El diseño del sistema de aireación se muestra en la figura 27.

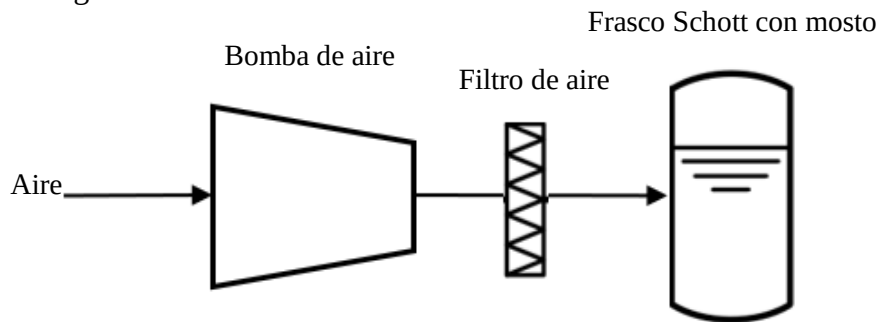


Figura 27. Diagrama del sistema de aireación

3.2.4.12. pH-metro

El pH-metro utilizado corresponde al HI2002 de la marca Hannah instruments, el cual es capaz de medir pH, temperatura y potencial redox (ORP). Posee una resolución de entre 0,01 y 0,001 pH o 0,1 mV, calibración en 5 puntos de pH y 1 en mV y un rango de pH que va desde los -2 hasta 16. En el laboratorio se utilizó para medir el pH a las muestras finales de vino. El diseño del sistema de aireación se muestra en la figura 28.



Figura 28. pH-metro

3.2.4.13. Cromatógrafo líquido de alta eficacia (HPLC)

Para la medición de los compuestos químicos como etanol y ácido tartárico se utilizó un cromatógrafo líquido de marca Agilent Technologies modelo infinity 1260 con una columna cromatográfica Aminex HPX-87H 300 mm x 7,8 mm y una columna de cationes. En la figura 29 se muestra una imagen de referencia.



Figura 29. Cromatografo líquido HPLC de alta eficiencia

3.2.4.14. Biosystem Y15/c

El Analizador automático y multiparamétrico de la marca Biosystems permite analizar la concentración de compuestos químicos de diferentes matrices de la industria alimentaria. Con una velocidad de análisis de 150 ciclos/hora, una interfaz ágil y con un máximo de 72 muestras por ciclo, permite obtener resultados de manera rápida y confiable. Se utilizó este equipo para medir contenido de glicerol, ácido láctico, ácido málico, ácido acético y glucosa/fructosa. En la figura 30 se muestra una imagen de referencia.



Figura 30. Analizador automático Biosystem

3.2.4.15. Cromatógrafo de gases con espectrometría de masas

Se empleó un cromatógrafo marca Thermo modelo Triplus 1310 con un detector de masas ISQ LT y un inyector automático de microextracción en fase sólida (SPME) TRIPLUS-RSH para adsorber los compuestos que se querían analizar. Se utilizó una columna RTX5MS de 30 metros de longitud, con un diámetro interno de 0,25 mm y una película de 0,25 micrómetros, con helio como gas portador a un flujo de 1 mL/min. El programa cromatográfico comenzó a una temperatura de 40°C durante 5 minutos, luego se aumentó la temperatura a razón de 10°C por minuto hasta llegar a 250°C, y se mantuvo durante 10 minutos. El inyector funcionó en modo de impacto electrónico a 70eV y la temperatura de la fuente se estableció en 250°C. Para analizar los datos, se utilizó el software Chromeleon 7.3 en conjunto con la librería NIST 2017 para la comparación de resultados. Esto permitió obtener una aproximación al perfil de aroma, basándose en las áreas relativas de los diferentes compuestos presentes en cada una de las muestras relacionadas con las distintas fermentaciones y tipos de levadura. En la figura 31 se muestra una imagen de referencia.



Figura 31. Cromatógrafo de gases modelo Triplus 1310 con un detector de masas ISQ LT

3.2.4.16. Otros materiales y equipos

En la tabla 10 se muestran los materiales utilizados durante el desarrollo de los experimentos.

Tabla 10. Materiales y otros equipos utilizados durante el desarrollo de las fermentaciones

Lista de Materiales	
Cámara Newbauer	Filtros pirinola antibacterianos de 30 mm x 0,2 um
Gasa estéril	Picnómetros de 10mL
Colador	Cubetas desechables de Espectrofotómetro
Vasos Precipitado de diversos tamaños	Botellas Estériles
Jeringas de 10mL	Viales ámbar de 1,5 mL para muestras de HPLC
Frascos Schott modificados de 1L	Probetas de todos los tamaños
Tubos Falcon de 15 y 50mL	Puntas para propipetas
Placas Petri de cultivo de vidrio y plásticas	Pañuelos desechables
Sondas de alimentación estériles	Racks de plástico y de plumavit para tubos de 15 y 50mL
Tubos eppendorf de 1,5mL	Frasco rectangular anaeróbico de 2,5 L
Propipetas	Colador

3.3. Diseño Experimental

Los ensayos fueron diseñados con el objetivo de estudiar el efecto bioprotector del inóculo *no Saccharomyces* en vinificaciones sin SO₂ y compararlo con el efecto del SO₂ en fermentaciones con sulfito. Para ello, se realizaron vinificaciones con uva blanca *Sauvignon Blanc* en triplicado en frascos schott modificados de 1 L siguiendo 3 estrategias de inoculación diferentes:

- Fermentación espontánea inicial sin adición de SO₂ e inoculación a las 72 h con la levadura comercial *S. cerevisiae* a dosis de 1×10^6 cell/mL.
- Fermentación espontánea inicial con adición de SO₂ a dosis de 40 ppm e inoculación a las 72 h con la levadura comercial *S. cerevisiae* a dosis de 1×10^6 cell/mL.
- Inoculación del iniciador bioprotector *Cándida spp.* a 1×10^6 cell/mL o 1×10^7 cell/mL sin adición de SO₂ e inoculación a las 72 h con la levadura comercial *S. cerevisiae* a dosis de 1×10^6 cell/mL

A continuación, en la tabla 11 se especifica el total de experimentos llevados a cabo en cada una de las fermentaciones junto con la nomenclatura utilizada para los resultados. Como se detalla en la tabla 12 se realiza un total de 4 fases fermentativas, dando un total de 25 fermentaciones,

las cuales se realizan con réplicas en triplicado, en el caso de bioprotección, o en duplicado, en el caso del control, para obtener mayor confiabilidad experimental.

Tabla 11. Diseño de Experimentos

Fase	Tipo de Antimicrobiano	Densidad celular cell/mL o Concentración ppm	Matraces	Código
F1	Bioprotección con <i>Cándida boidinii</i>	1×10^6	3	CB6.1/CB6.2/CB6.3
	Bioprotección con <i>Cándida boidinii</i>	1×10^7	3	CB7.1/CB7.2/CB7.3
	Control SO ₂	40 ppm	2	SO1.1/SO1.2
F2	Bioprotección con <i>Cándida oleophila</i>	1×10^6	3	CO6.1/CO6.2/CO6.3
	Bioprotección con <i>Cándida oleophila</i>	1×10^7	3	CO7.1/CO7.2/CO7.3
	Control SO ₂	40 ppm	2	SO1.1/SO1.2
F3	Bioprotección con <i>Cándida oleophila</i> y <i>Cándida boidinii</i> 50/50	1×10^7	3	COCB7.1/COCB7.2/COCB7.3
	Control SO ₂	40 ppm	2	SO1.1/SO1.2
F4	Sin Antimicrobiano	-	3	SA1.1/SA1.2/SA1.3

3.3.1. Parámetros operacionales

En la tabla 12 se presentan los parámetros operacionales que se mantienen constantes durante los ensayos tanto en la etapa prefermentativa como en la fermentación.

Tabla 12. Parámetros operacionales fermentaciones

Parámetro	Valor
Temperatura Maceración Prefermentativa	10°C
Agitación	100rpm
Condición de Oxígeno	Anaerobiosis
Temperatura Fermentación	18 - 20 °C

3.4. Desarrollo de Fermentaciones

3.4.1. Esterilización de materiales

Para evitar contaminación con otros microorganismos y asegurar que la fermentación se lleve a cabo sólo por las levaduras del género *Cándida spp.*, todos los insumos, materiales y equipos que entrarán en contacto con el medio de cultivo y los microorganismos se deberán esterilizar en autoclave (AMILAB) operado a 121°C durante 15min. Cualquier material que no pudiera ser sometido al reactor autoclave por tamaño o por tipo de material debe esterilizarse con etanol al 96%.

3.4.2. Preparación del mosto y acondicionamiento

En primer lugar, se descongela la uva traspasando las bolsas desde el congelador (-18°C) al refrigerador (4°C) la noche anterior a la elaboración del mosto. Una vez descongeladas las uvas son aplastadas manualmente sobre utensilios de vidrio y/o plástico, evitando la oxidación provocada por elementos metálicos. Posteriormente el mosto es filtrado en gasas estériles y almacenado en botellas plásticas estériles durante 24h en forma vertical en el refrigerador (4°C), garantizando el decantado de sedimentos y evitar la presencia de borra durante la fermentación.

Previo al montaje se realiza una caracterización y acondicionamiento del mosto, identificando las concentraciones iniciales de azúcar, YAN, SO₂ libre y pH para posteriormente ajustar el YAN y el pH según los valores presentados en la tabla 13. El ajuste se realiza con el objetivo de garantizar las mismas características iniciales en cada uno de los experimentos y resultados comparables entre fermentaciones. Los valores óptimos para el YAN rondan entre los 150 y 200 mg/L (Taillandier et al., 2007) y el valor de pH se ajustó en 3,35 (Morata et al., 2018).

Tabla 13. Parámetros ajustados en el medio de cultivo

Parámetro	Valor
YAN	250
pH	3,35-3,5

3.4.3. Montaje

En primer lugar, se agrega 1L de mosto preparado a cada uno de los frascos schott manteniendo la esterilidad con un mechero encendido. Cabe destacar que los frascos fueron adaptados con una entrada adicional que permite la inserción de una sonda (Figura 32a), la cual cumple 2

funciones: Evitar la contaminación y la exposición al aire al momento de la toma de muestras durante la maceración prefermentativa y la fermentación alcohólica y permite el ingreso de O₂ durante el acondicionamiento inicial.

Posteriormente cada uno de los frascos schott son tapados con su respectiva tapa esterilizada y sometidos a un proceso de aireación mediante el sistema explicado en el punto 3.3.11. La bomba suministra un caudal de 0,940L/min y es conectada durante 10min para asegurar la saturación del oxígeno del medio. Luego la tapa de cada frasco es reemplazada por un airlock que contiene una mezcla de agua destilada y etanol (Figura 32b), cuya función es liberar de manera controlada los gases generados durante la fermentación y proteger el producto en fermentación de una posible contaminación y oxidación.

Finalmente, los frascos son inoculados con la levadura bioprotectora o el control con SO₂ a 40ppm (Anexo I) dependiendo del caso, y colocados en el shaker incubador a una temperatura de 10°C para realizar la maceración prefermentativa en frío.



Figura 32. a. Frasco Schott modificado con su toma muestra durante la etapa de aireación. b. Fermentadores durante la etapa de maceración prefermentativa, día de montaje. c. Fermentadores en el shaker durante etapa de fermentación alcohólica.

3.4.4. Preparación del inóculo

El inóculo *no Saccharomyces* se prepara cultivando las levaduras desde la placa hasta el medio líquido Saboraud Dextrose Broth en tubos falcón de 50mL, incubándolos a 25 °C durante 48h antes de inocular los frascos schott. Para determinar la concentración celular se utilizará una cámara de Neubauer y el microscopio óptico que permitirá determinar el volumen de inoculación necesario para alcanzar la densidad celular deseada ya sea 1×10^6 cell/mL o 1×10^7

cell/mL. En el Anexo B se muestra el protocolo donde se detalla cómo realizar las mediciones de concentración celular en el microscopio.

Después de 72 h de maceración prefermentativa se inocula la levadura comercial *S. cerevisiae* siguiendo las instrucciones del fabricante a una concentración correspondiente a 1×10^6 cell/mL. El procedimiento detallado de cada tipo de preparación se detalla en el Anexo C.

3.4.5. Análisis microbiológico

Para el análisis microbiológico se recogerán muestras de 15 mL en 5 ocasiones: Mosto inicial, a las 24h de maceración prefermentativa, a las 72h de maceración prefermentativa, media fermentación alcohólica (día 6 u 8) y al final de la fermentación alcohólica (FA). Las muestras se colectarán en tubos falcón estériles, se realizarán diluciones seriadas y se sembrarán en cajas de Petri con diferentes medios de cultivo, dependiendo del tipo de microorganismo. El procedimiento detallado del método de diluciones seriadas se presenta en el Anexo D.

Para el recuento de las levaduras totales se utilizará el medio Cloranfenicol Glucosa Agar (YCA) (20 g/L de glucosa, 5 g/L de extracto de levadura, 0,1 g/L de cloranfenicol, 15 g/L de agar bacteriológico). Las poblaciones de *B. bruxellensis* se determinarán en un medio específico compuesto por 4 g/L de extracto de levadura, 5 g/L de digerido pancreático de caseína, 5 g/L de dextrosa, 0,55 g/L de fosfato monopotásico, 0,425 g/L de cloruro de potasio, 0,125 g/L de cloruro de calcio, 0,125 g/L de sulfato de magnesio, 0,0025 g/L de cloruro férrico, 0,0025 g/L de sulfato de manganeso, 20 g/L de agar, 0,022 g/L de verde de bromocresol, 10 mL/L de clicloheximida y 10 mL/L de cloranfenicol. Las bacterias acéticas se enumerarán en medio Agar WLD (4 g/L de extracto de levadura, 5 g/L de digerido pancreático de caseína, 5 g/L de dextrosa, 0,55 g/L de fosfato monopotásico, 0,425 g/L de cloruro de potasio, 0,125 g/L de cloruro de calcio, 0,125 g/L de sulfato de magnesio, 0,0025 g/L de cloruro férrico, 0,0025 g/L de sulfato de manganeso, 20 g/L de agar, 0,022 g/L de verde de bromocresol, 200 uL de clicloheximida. Las bacterias lácticas se enumerarán en medio MRS Agar (20 g/L de glucosa, 10 g/L de extracto de carne, 4 g/L de extracto de levadura, 2 g/L de fosfato dihidrógeno potásico, 5 g/L de acetato de sodio, 2 g/L de citrato de amonio, 0,2 g/L de sulfato de magnesio $\cdot 6H_2O$, 0,05 g/L de sulfato de manganeso $\cdot 4H_2O$, 1,08 mL/L de Tween 80, 16 g/L de agar bacteriológico y 10 g/L de digerido pancreático de caseína) y las levaduras *no Saccharomyces* se determinarán en medio

Agar Lisina (20g/L de agar bacteriológico, 2,5 g/L de clorhidrato de lisina y 11,75 g/L de base de carbono de levadura)

Posteriormente todas las placas se almacenan durante 48h a 28°C para garantizar el crecimiento de todos los microorganismos.

3.4.6. Monitoreo de la cinética de fermentación

Para cada fermentación se toman muestras de 12 mL en triplicado cada 24h, midiendo densidad, grados brix° y densidad óptica (OD600). Las muestras restantes son almacenadas a una temperatura de congelación de -18°C para corroborar mediciones por si fuese necesario. En la tabla 14 se muestran las mediciones realizadas junto con el Anexo donde se indica su respectivo protocolo.

Tabla 14. Resumen de las mediciones realizadas para el seguimiento de fermentaciones

Medición	Método	Replicas	Anexo
Densidad	Picnómetro	3	Anexo E
Solidos solubles	Refractómetro	3	Anexo F
Densidad óptica	Espectrofotómetro	3	Anexo G

Las mediciones se realizarán hasta que se hayan consumido todos los azúcares del medio, lo cual se alcanza cuando la densidad llegue a valores menores a 0,994 g/mL por más de 3 días consecutivos. Tras el fin de la fermentación se toman muestras finales en tubos falcón de 50 mL y se almacenan a una temperatura de congelación de -18°C para realizar los análisis de composición química y volátil.

3.5. Análisis de composición química: Biosystem y HPLC

Las muestras iniciales (mosto) y finales de vino se caracterizan químicamente determinando el volumen de etanol (%vol) y la acidez total (ácido tartárico g/L) mediante un equipo de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), mientras que la acidez volátil (ácido acético g/L), glicerol g/L, la concentración de azúcares totales (glucosa-fructosa) g/L, ácido málico g/L y ácido láctico g/L se determinan mediante el analizador de muestras de vinos Biosystem Y15.

3.6. Análisis de compuestos volátiles

La identificación de compuestos volátiles se realiza sobre las muestras obtenidas al final de la fermentación alcohólica mediante espectrofotometría de masas (Cromatógrafo de gases) acoplado a un detector de masas siguiendo el procedimiento del Anexo H. Como mínimo se deberán identificar alcoholes y esteres etílicos de ácidos grasos.

3.7. Análisis Estadístico

3.7.1. Análisis ANOVA para compuestos químicos

Se desarrollarán análisis ANOVA para cada uno de los compuestos químicos de interés, los cuales serán considerados como variables dependientes, mientras que cada una de las estrategias fermentativas corresponde a una variable independiente. El objetivo es evaluar si existen diferencias significativas entre cada una de las estrategias. Además, posteriormente se realizará la prueba Tukey con objeto de comparar todas las combinaciones posibles de grupos y determinar cuales tienen diferencias significativas en sus medias. Ambas pruebas se realizan mediante el software Minitab Statistical 21.

3.7.2. Análisis PCA y ANOVA de compuestos volátiles

Se realizará un análisis de componentes principales (PCA) debido a que permite simplificar el espacio muestral de los compuestos aromáticos, identificando las 2 dimensiones llamadas componentes principales que entregan la mayor variabilidad de información, donde la segunda componente explica la información faltante en la primera.

En primer lugar, se debían considerar sólo aquellos compuestos cuyo porcentaje de abundancia fuese significativo con el fin de asegurarse que entreguen información que sea linealmente independiente. En este caso se utilizó el criterio del 3%, es decir solo se consideraron aquellos compuestos cuya abundancia fuese superior a ese valor. Además, parte de la información entregada por el software Chromeleon 7.3 acoplado al cromatógrafo de gases corresponde al factor de confiabilidad SI el cual indica el grado de similitud entre el compuesto y el cromatograma de la biblioteca, por lo que mientras más alto el valor de SI, mayor confiabilidad en la identificación del compuesto por el equipo. Como criterio se seleccionarán sólo aquellos compuestos cuyo valor de SI sea mayor a 800. Por último, se deben eliminar los compuestos relacionados al siloxano dado que está asociado a la fibra

Divinylbenzene/Carboxen/polydimethylsiloxane utilizada por el equipo en el análisis (Perestrelo et al., 2011).

Una vez filtrados los datos se utiliza el software Minitab Statistical 21 en el que se aplica la matriz de correlación, definiendo las componentes principales como aquellas que presenten un valor propio mayor a 1 y se graficarán las 2 componentes principales para facilitar el análisis. Por otro lado, el mismo software permite identificar valores anómalos mediante la distancia de Mahalanobis, logrando eliminar aquellos datos no representativos. Finalmente, para evaluar si hay diferencias significativas en la producción de cada uno de los compuestos volátiles identificados entre las distintas modalidades estudiadas se realizará un análisis ANOVA Tukey con un nivel de significancia del 95%. En la figura 33 se presenta un diagrama de bloques asociado al análisis de compuestos volátiles realizado.

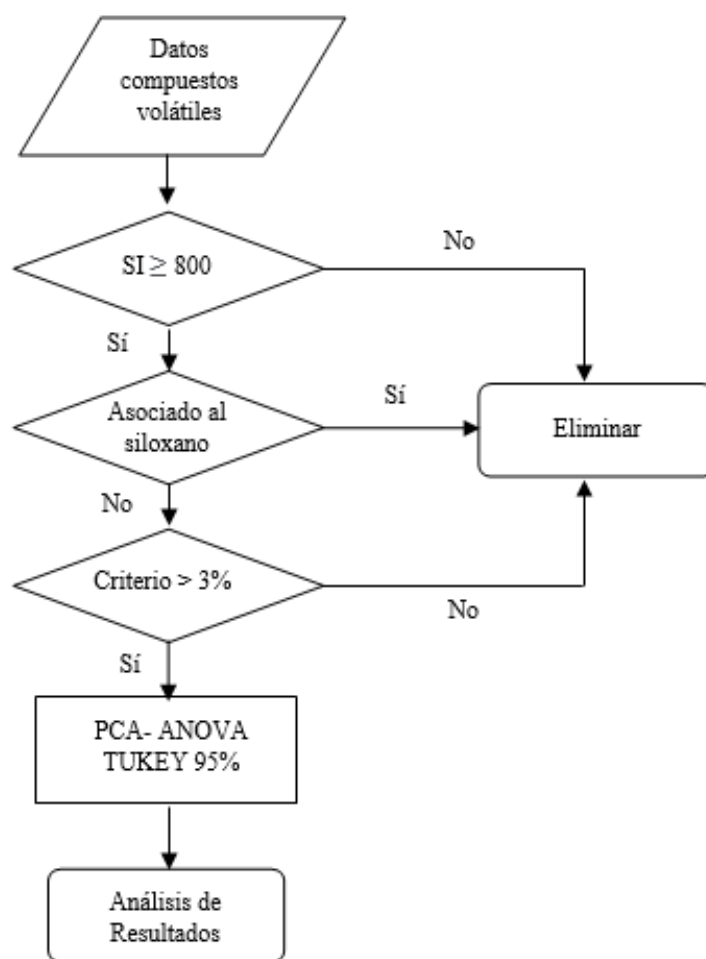


Figura 33. Diagrama de bloques que resume los filtros y los criterios previos al análisis PCA.

CAPITULO 4. RESULTADOS

En esta sección se presentan los resultados obtenidos luego de aplicar la metodología establecida en el inciso anterior. Se evaluará el efecto que genera la utilización de bioprotectores del género *Cándida spp.* en el consumo de sustrato, crecimiento celular de levaduras totales, abundancia de levaduras *no Saccharomyces* (LVNS), desarrollo de microorganismos patógenos, producción de compuestos químicos (metabolitos primarios y secundarios) y producción de compuestos volátiles. Lo anterior con el objetivo de determinar si existen diferencias significativas entre las distintas estrategias en estudio (bioprotección, SO₂, sin antimicrobiano) y comprobar si la utilización de bioprotectores podría reemplazar al SO₂ en vinificación.

4.1. Consumo de Sustrato

En las figuras 34 ,35 y 36 se presenta la evolución del consumo de sustrato medida en unidades de densidad. Inicialmente el mosto presentaba una densidad inicial de 1,095 g/mL y un contenido de sólidos solubles de 22,5°brix.

En las representaciones gráficas, se observa que la estrategia empleando la levadura *Cándida oleophila* (CO) presenta una cinética de decaimiento exponencial lenta en comparación con *Cándida boidinii* (CB) y la inoculación mixta CO/CB. Notablemente, esta última estrategia muestra una cinética de decaimiento exponencial más rápida que las demás modalidades, acompañada de una fase lag o de latencia significativamente breve. La fermentación concluye el día 8, alcanzando valores de densidad cercanos a 0,992 ufc/mL. En cuanto a la duración total de la fermentación, la modalidad con *Cándida oleophila* 10⁶ cell/mL (CO6) y el control con SO₂ terminaron la fermentación al día 12; *Cándida boidinii* (CB) en ambas modalidades y *Cándida oleophila* 10⁷ cell/mL (CO7) lo hicieron al día 11, mientras que la fermentación SA fue la estrategia que demoró más en terminar la fermentación, el día 14.

En general si se compara el control y las modalidades bioprotegidas, destaca el rápido consumo de sustrato de estas últimas. Esto se explica debido a la presencia de iniciadores *no Saccharomyces* (NS), que, aunque se añaden con el propósito de generar protección antimicrobiana, probablemente logran permanecer con vida hasta avanzada la fermentación, colaborando en conjunto a la levadura *S. cerevisiae* en el consumo de azúcares, lo que se traduciría en el descenso rápido de la densidad.

Por otro lado, los vinos elaborados por modalidad de fermentación espontánea (SA y SO₂); llamados así debido a la ausencia de iniciadores *no Saccharomyces*; experimentaron fases lag más prolongadas en comparación a los mostos bioprotegidos, especialmente aquellos experimentos con sulfito, donde se observa una larga fase adaptativa en los primeros días, manteniendo una densidad sin cambios significativos hasta el día 4. Cabe destacar que durante los primeras 72h ocurre la fase de maceración prefermentativa, donde el mosto se mantiene a 10°C con el objetivo de ralentizar la fermentación en las estrategias bioprotegidas, dado que se espera que estas no fermenten, sino que los bioprotectores sólo protejan el mosto de los patógenos. Aunque tal como se observa en las gráficas, esto no ocurre, y la fermentación comienza antes del tercer día; fenómeno más visible en el caso de la fermentación mixta CO/CB 10⁷ cell/mL, que comienza a su fase de decaimiento exponencial trascurridas sólo 24h de maceración prefermentativa.

Un aspecto destacable que también se puede apreciar en las gráficas corresponde al comportamiento de la estrategia SA, la cual inicialmente presentaba un rápido decaimiento exponencial, incluso superior a las estrategias bioprotegidas con CO (figura 34), y que al final de la fermentación se estanca en valores de densidad cercanos a 0,997 g/mL, razón por la que se da por terminada la fermentación al día 12, tras tres días sin observar reducciones significativas en la densidad. La causa de ese comportamiento se debe a la presencia de microorganismos patógenos como bacterias, capaces de consumir rápidamente el azúcar del medio durante los primeros días, pero que a media fermentación inducen la muerte temprana de las levaduras, provocando una fermentación estancada durante los últimos días.

Por otro lado, si se desea hacer una comparación de la densidad celular entre las modalidades bioprotegidas según la concentración del inóculo inicial, se destaca que los experimentos con un inóculo de 10⁷ cell/mL tuvieron un decaimiento exponencial más pronunciado y rápido que los inóculos de 10⁶ cell/mL; tal es el caso de *Cándida boidinii* 10⁷ cell/mL (CB7), que debido a la presencia de mayores concentraciones de levaduras *no Saccharomyces* logra un consumo de sustrato mucho más acelerado que CB6, sin embargo ambas estrategias terminan la fermentación el día 11. Mientras que con la levadura *Cándida oleophila*, CO7 terminó la fermentación un día antes que CO6.

Al comparar las levaduras por especie, *Cándida oleophila* tuvo una tasa de reducción de densidad inferior a *Cándida boidinii*, e incluso más baja que las fermentaciones espontaneas sin LVNS iniciadoras, tal cual se visualiza en la figura 34.

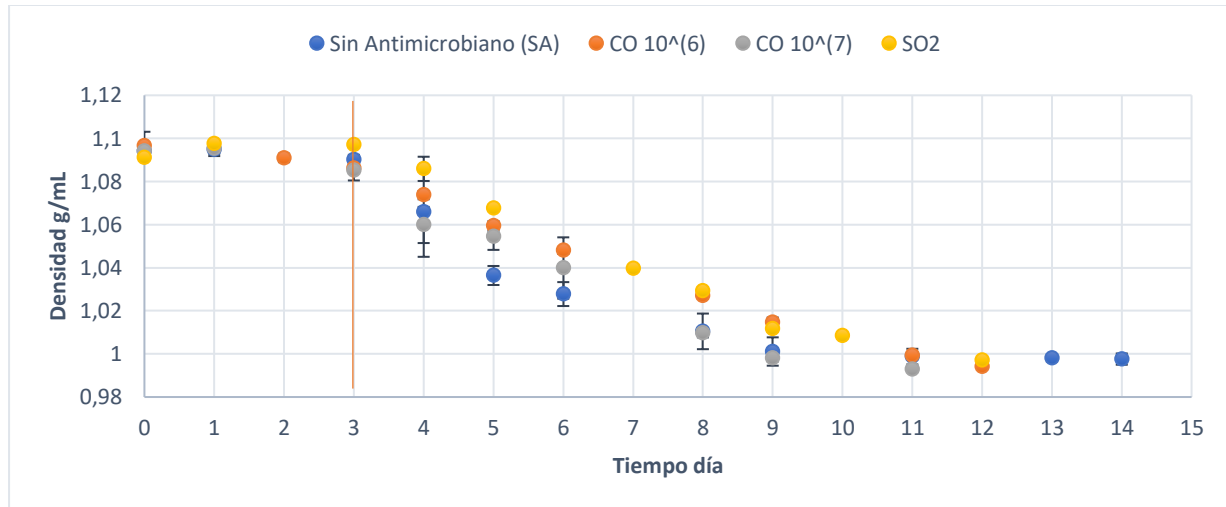


Figura 34. Seguimiento del consumo de sustrato para fermentaciones bioprotegidas con *Cándida oleophila* mediante densidad. La línea vertical naranja representa el momento en que la levadura *S. cerevisiae* es inoculada, dando termino a la maceración prefermentativa e inicio a la fase fermentativa.

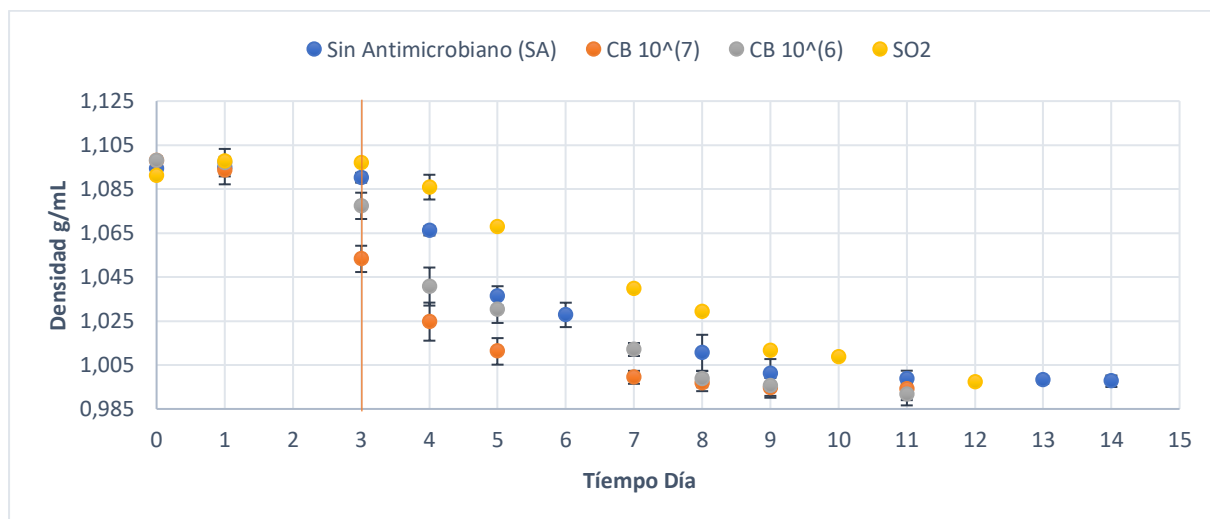


Figura 35. Seguimiento del consumo de sustrato para fermentaciones bioprotegidas con *Cándida boidinii* mediante densidad. La línea vertical naranja representa el momento en que la levadura *S. cerevisiae* es inoculada, dando termino a la maceración prefermentativa e inicio a la fase fermentativa.

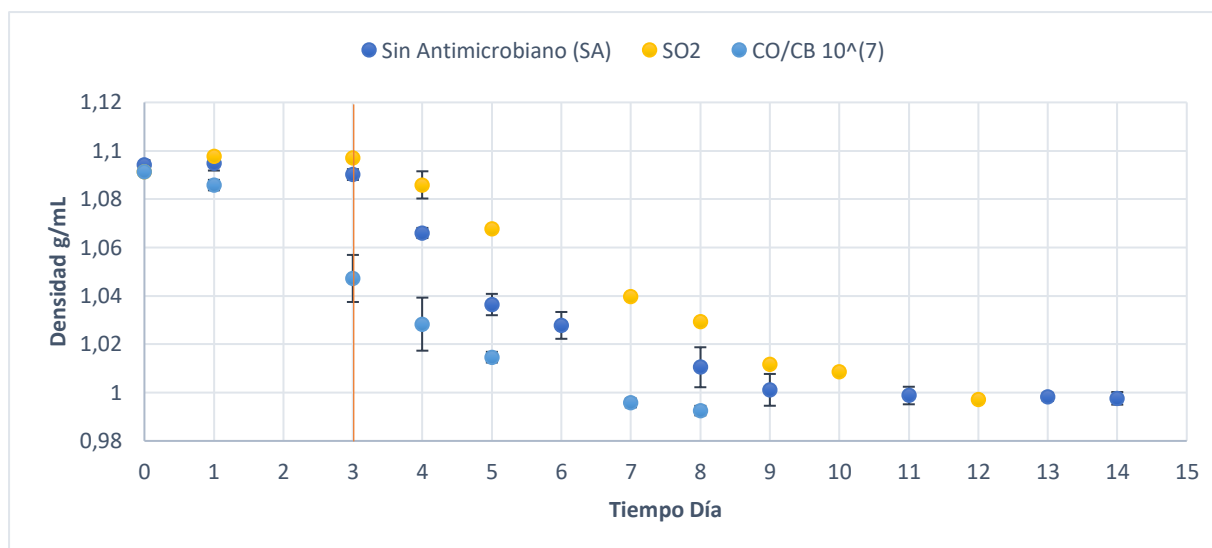


Figura 36. Seguimiento del consumo de sustrato para fermentaciones bioprotegidas con inóculo mixto *Cándida boidinii*/*Cándida oleophila* (50/50) mediante densidad. La línea vertical naranja representa el momento en que la levadura *S.cerevisiae* es inoculada, dando término a la maceración prefermentativa e inicio a la fase fermentativa.

Con el objetivo de complementar la información gráfica se obtuvieron las tasas de reducción de densidad en función del tiempo durante la etapa de decaimiento exponencial. Con esta información se podrá saber cuál de las estrategias consume más rápidamente el sustrato una vez iniciada la fermentación, dado que no todos los experimentos tuvieron una fase lag de igual duración, por lo que en este caso una rápida tasa de reducción de densidad no necesariamente está relacionada con una fermentación más corta. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 15.

Tabla 15. Tasa de reducción de la densidad en el tiempo en 10g/mL/día

Estrategia	Tasa de reducción de densidad 10g/mL/día
SO ₂	0,142
SA	0,148
CO 10 ⁶	0,119
CO 10 ⁷	0,145
CB 10 ⁶	0,157
CB 10 ⁷	0,206
CO/CB 10 ⁷	0,178

A partir de los datos de la tabla se puede establecer que las fermentaciones con *Cándida boidinii* fueron más rápidas que las con *Cándida oleophila*, lo cual era lo esperado y similar a lo reportado con anterioridad al analizar las gráficas de densidad. Por otro lado, la fermentación

con el inóculo mixto CO/CB presentó una tasa de reducción de densidad con un valor de 0,178 10g/mL/día, demostrando ser una de las fermentaciones más rápidas, quedando sólo por debajo de la estrategia con CB7, la cual tuvo un descenso de la densidad más abrupto que el resto, con un valor de 0,206 10g/mL/día, a pesar de terminar la fermentación el día 11, en comparación al inóculo mixto que terminó el día 8.

En cuanto a SA, se puede observar que tiene una tasa de reducción de densidad de 0,148 10g/mL/día, siendo más rápida que CO y SO₂, a pesar de terminar la fermentación 2 días después, por lo que la presencia de microorganismos de deterioro podría ser una buena explicación para el estancamiento ocurrido, tal cual se mencionó anteriormente.

Finalmente, sólo la estrategia con *Cándida oleophila* 10⁶ cell/mL presentó una tasa de reducción de densidad inferior al control; 0,119 10g/mL/día en comparación a 0,142 10g/mL/día; lo cual era esperado, ya que, si bien ambas estrategias terminan la fermentación el mismo día, no se puede asumir que tienen la misma velocidad de consumo dado que CO6 comenzó la fermentación el día 2, mientras el control lo hizo el día 4 (Figura 34).

Cabe destacar que la tasa de reducción de densidad aumenta a 0,145 10g/mL/día al incrementar la concentración del inóculo inicial de CO de 10⁶ a 10⁷ cell/mL. Logrando concluir que a medida que aumenta la concentración del inóculo bioprotector, aumenta la velocidad de la fermentación; y probablemente si hay participación de los biocontroladores en el consumo de azúcares.

4.2. Crecimiento celular de levaduras totales

En la figura 37, 38 y 39 se presenta la evolución del crecimiento celular de levaduras totales realizado bajo las distintas modalidades de protección antimicrobiana. Los muestreos fueron realizados los días 0, 1, 3, 8 (6 para la modalidad CO/CB) y final. Las muestras se analizaron mediante crecimiento en placa con CGA Agar, tal cual se explica en la sección 3.4.5. de la metodología. Las imágenes de las placas de agar con el crecimiento de las levaduras se presentan en el Anexo K

Tal como se visualiza en la figura 37, la modalidad con *Cándida oleophila* (CO) tuvo una cinética de crecimiento celular similar a la modalidad sin antimicrobiano (SA) diferenciándose significativamente del control con SO₂. La estrategia con CO tardó aproximadamente 3 días en llegar a su máximo crecimiento, sin importar la concentración del inóculo inicial,

manteniéndose prácticamente constante entre los días 3 y 8, con valores de 7,07 log(ufc/mL) y 7,31 log(ufc/mL) para las modalidades de CO6 y CO7, respectivamente. Mientras que la fermentación sin antimicrobiano (SA) también logró su máximo crecimiento el día 3, con un valor de 7,64 log(ufc/mL), reduciendo gradualmente la concentración hasta el final de la fermentación, siendo la modalidad que arroja la densidad celular de levaduras más baja en el último día, alcanzando un valor de 5,12 log(ufc/mL), probablemente al efecto negativo generado por los microorganismos sobre la levadura.

En cuanto al control con SO₂, esta estrategia tuvo un crecimiento lento y con un máximo de 6,3 log(ufc/mL) al día 3, diferenciándose significativamente del resto de las modalidades al presentar un crecimiento celular limitado, producto de la ausencia de inóculo bioprotector inicial y de los efectos negativos de este aditivo químico sobre las levaduras nativas del mosto.

En cuanto a *Cándida boidinii* (Figura 38), mostró un crecimiento levemente superior que *Cándida oleophila*, lo cual es consistente al consumo de sustrato obtenido en la sección anterior, alcanzando una concentración celular máxima de 7,64 log(ufc/mL) al día 8 para CB6, y de 7,52 log(ufc/mL) al día 3 para CB7.

Es necesario destacar que todas las modalidades de estudio implementadas mostraron fases de latencia breves e inexistentes, donde la fase de crecimiento exponencial comenzó desde el primer día, alargándose hasta el día 3 en la mayoría de los casos, además de mantener una fase estacionaria hasta el día 8, donde empiezan a notarse los primeros indicios de fase de muerte.

Las principales diferencias entre todas las estrategias se presentan en la modalidad *Cándida oleophila*/ *Cándida boidinii* 10⁷ (Figura 39), que tiene su máximo crecimiento al día 6 con una concentración de 7,95 log(ufc/mL), un valor significativamente alto en comparación al resto de las modalidades y que explicaría el rápido consumo de sustrato de esta estrategia. Cabe destacar que, debido al rápido descenso de la densidad de esta modalidad, fue necesario realizar el 4^{to} muestreo al día 6, dado que la fermentación concluyó el día 8.

En general, se tuvo una buena adaptación al medio, notado por el incremento de la concentración celular en las primeras 24h para todos los microorganismos.

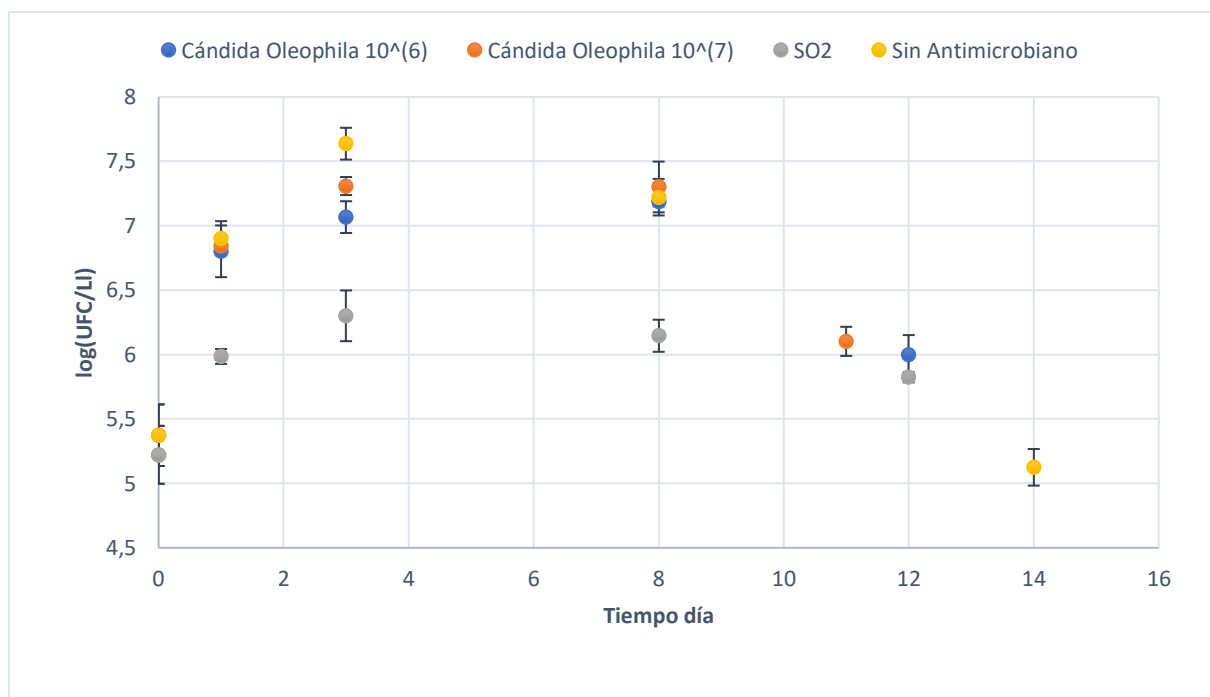


Figura 37. Gráfica de escala logarítmica de crecimiento celular en el tiempo de fermentaciones realizadas con el bioprotector *Cândida oleophila*.

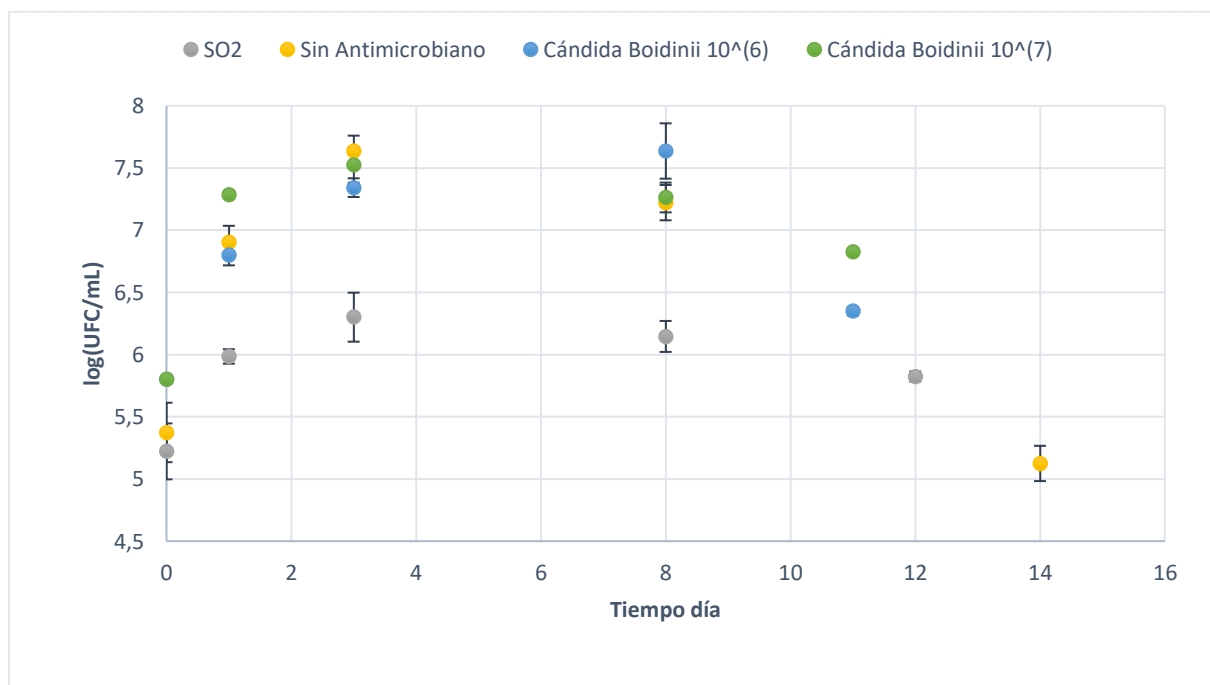


Figura 38. Gráfica de escala logarítmica de crecimiento celular en el tiempo de fermentaciones realizadas con el bioprotector *Cândida boidinii*.

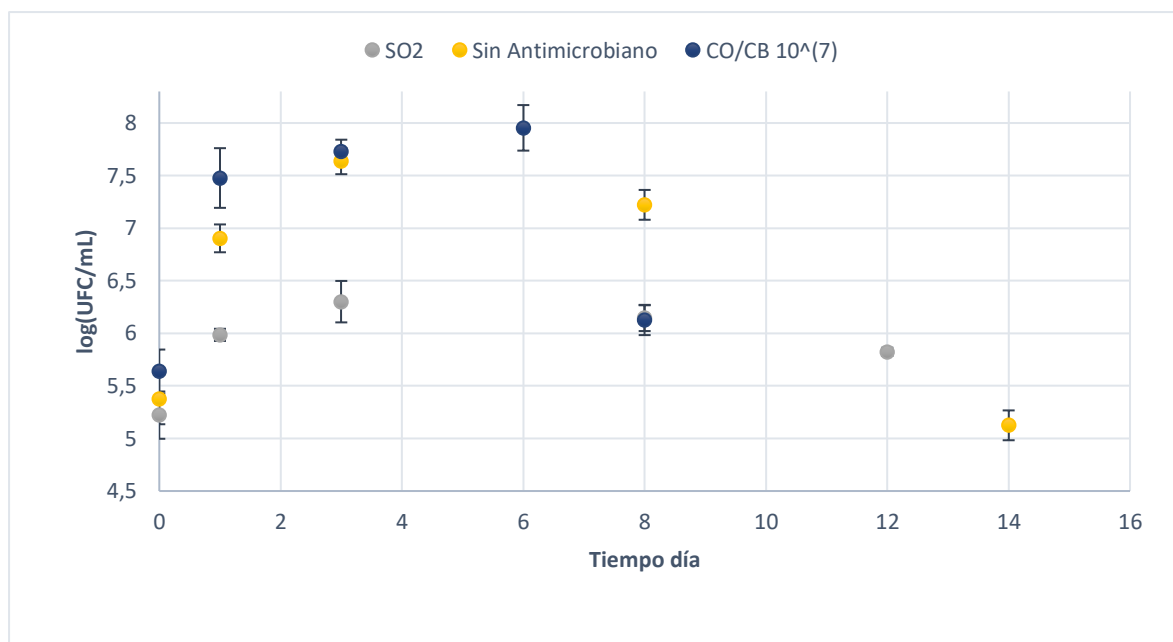


Figura 39. Gráfica de escala logarítmica de crecimiento celular en el tiempo de fermentaciones realizadas con el bioprotector *Cándida oleophila*/*Cándida boidinii*.

Para enriquecer la información visual proporcionada en las figuras anteriores, se calcularon las velocidades específicas máximas de crecimiento para cada una de las modalidades con el propósito de comparar las estrategias bajo estudio. Los resultados obtenidos se detallan en la tabla 16 y se presentan gráficamente en el Anexo 10.

Tabla 16. Velocidades específica máxima de crecimiento. los datos representan el promedio $\pm$ desviación estándar calculada de los matraces en triplicado para cada caso. Los valores seguidos de letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas ($\alpha=0,05$)

Modalidad	$\mu_{m\acute{a}x}$ 1/h
CO 10 ⁶	0,503 $\pm$ 0,0014 d
CO 10 ⁷	0,629 $\pm$ 0,0025 b
CB 10 ⁶	0,479 $\pm$ 0,0032 e
CB 10 ⁷	0,509 $\pm$ 0,0030 d
SO ₂	0,331 $\pm$ 0,0028 f
Sin Antimicrobiano	0,699 $\pm$ 0,0056 a
CO/CB 10 ⁷	0,615 $\pm$ 0,0009 c

El análisis estadístico ($\alpha = 0,05$) reveló diferencias significativas entre los resultados, con la excepción de las fermentaciones CO6 y CB7, que resultaron ser significativamente similares.

La fermentación sin antimicrobiano (SA) exhibió la mayor velocidad de crecimiento, con un $\mu_{\text{máx}}$ de $0,6989 \text{ h}^{-1}$, reflejando las elevadas concentraciones de levadura alcanzadas por esta modalidad al tercer día. En segundo lugar, sigue la modalidad mixta CO/CB, que presentó una alta velocidad de crecimiento, de $0,615 \text{ h}^{-1}$, lo que por una parte explicaría el rápido descenso en la densidad obtenido en la sección anterior (Figura 36). Con respecto al resto de las estrategias, todas mostraron velocidades de crecimiento superiores al control con SO_2 , que registró un valor de $0,3309 \text{ h}^{-1}$, producto del efecto del aditivo químico sobre las levaduras, ralentizando su crecimiento.

En cuanto a la dependencia de la concentración de inóculo, las modalidades bioprotegidas con un inóculo inicial de 10^7 cell/mL exhibieron una velocidad de crecimiento superior a las modalidades con un inóculo de 10^6 cell/mL , como era de esperar debido a la mayor concentración celular inicial de las primeras.

Al contrastar los resultados con las tasas de reducción de densidad presentadas en la tabla 15, se deduce que las estrategias con tasas de crecimiento de levadura más altas tienden a tener tasas de reducción de densidad también más altas. Esto se refleja claramente en las estrategias sin antimicrobiano (SA) y *Cándida boidinii* 10^7 cell/mL , mientras que la estrategia control con SO_2 mostró una velocidad específica de crecimiento baja y una tasa de reducción de densidad baja.

En general, los resultados indican que las estrategias bioprotegidas, que involucran levaduras *no Saccharomyces*, tienden a tener un impacto significativo en la fermentación y en la reducción de la densidad en comparación con el SO_2 . Además, los resultados obtenidos para cada modalidad en general coinciden con lo esperado, ya que, para fermentaciones con *Saccharomyces cerevisiae* en cultivos batch, las velocidades específicas de crecimiento varían entre $0,32$ y $0,54 \text{ h}^{-1}$ (De Martin, 2005), por lo que se podría asumir que al agregar las LVNS bioprotectoras, el valor de la velocidad de crecimiento pudiese incrementar.

4.3. Abundancias relativas de la población de levaduras totales

Se obtuvo la proporción existente entre las levaduras *Saccharomyces* y *no Saccharomyces* para cada uno de los puntos donde se realizó el muestreo (Día 0, 1, 3, 6 u 8 y final) con el objetivo de analizar si efectivamente los bioprotectores participan de alguna manera en la fermentación de azúcares y comprobar si hubo una correcta implementación del bioprotector en el medio

durante la maceración prefermentativa. Para obtener el total de levaduras *no Saccharomyces* se utilizó el medio Agar Lisina, tal cual se indicó en la sección 3.4.5 de la metodología. Mientras para obtener el total de levaduras *Saccharomyces* se realizó la diferencia entre las levaduras totales y las levaduras *no Saccharomyces*. Las gráficas de abundancia (relación LVS/LVNS) para cada una de las modalidades se muestran en las figuras 40-46. Y en el Anexo K se muestran fotografías de las levaduras NS en crecimiento en placas de Agar Lisina.

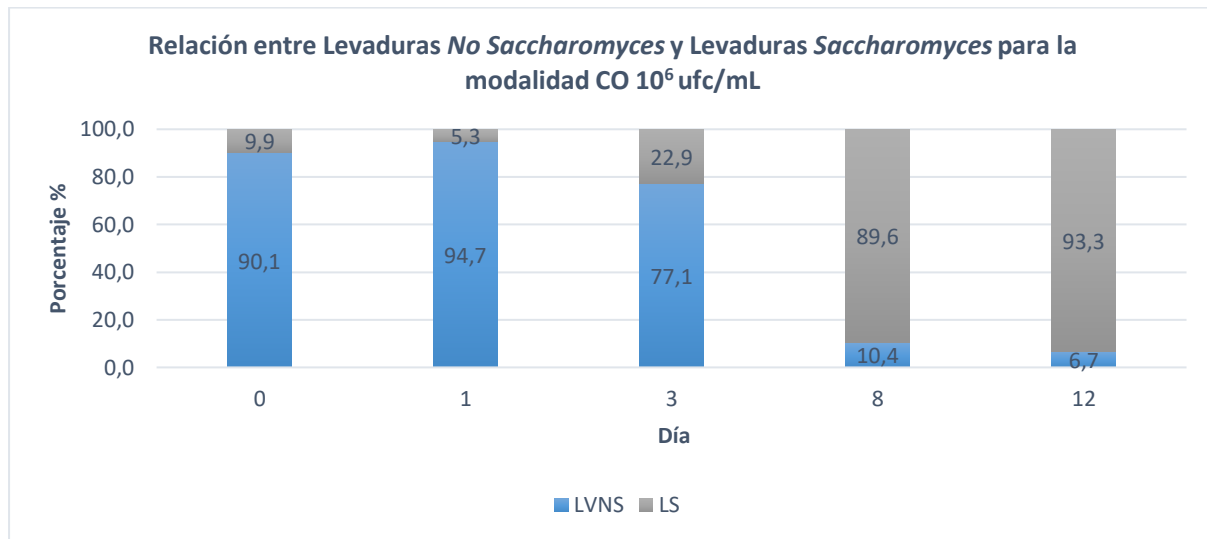


Figura 40. Proporción entre levaduras *no Saccharomyces* (color azul) y Levaduras *Saccharomyces* (color gris) a lo largo de la fermentación para la modalidad con *Candida oleophila* 10^6 cell/mL.

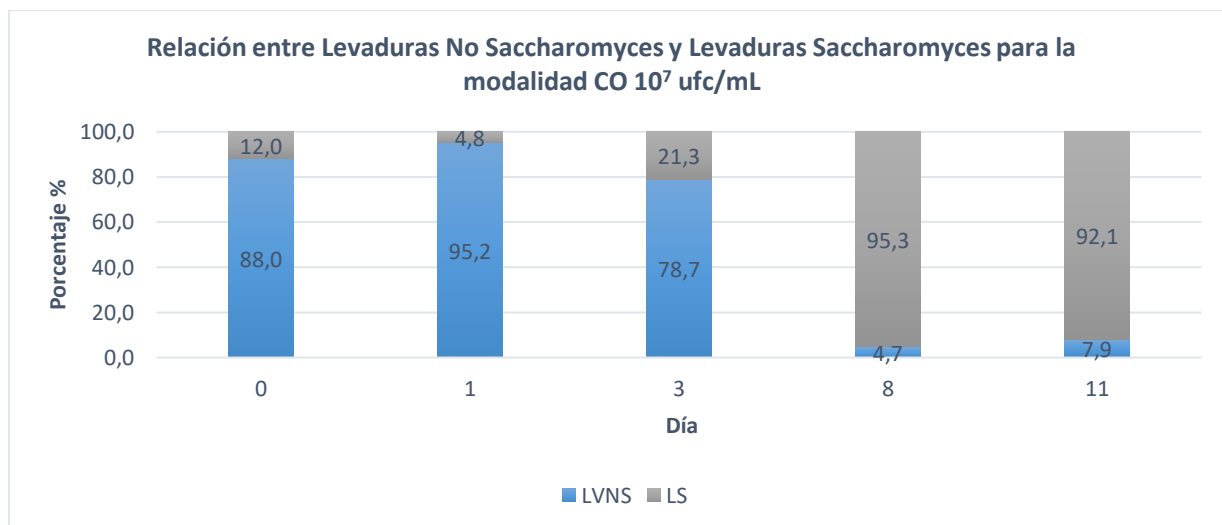


Figura 41. Proporción entre levaduras *no Saccharomyces* (color azul) y Levaduras *Saccharomyces* (color gris) a lo largo de la fermentación para la modalidad con *Candida oleophila* 10^7 cell/mL.

Se observa que al implantar la levadura *Cándida oleophila* hay un aumento en la abundancia observada desde un 90% a un 95%, en las primeras 24h, para el caso de CO6 y de un 88% hasta un 95,2% para CO7. Inicialmente la presencia de levaduras *Saccharomyces spp.* es muy baja y se debe principalmente a levaduras nativas del mosto de uva, como *Saccharomyces cerevisiae* (Raymond Eder et al., 2017) o *Saccharomycetales* (Simonin et al., 2018), tal cual fue reportado en estudios anteriores. Es importante resaltar que las levaduras *no Saccharomyces* identificadas en el mosto inicial *Sauvignon Blanc* corresponden generalmente a levaduras del género *Hanseniaspora spp.*, *Metschnikowia spp.*, *Pichia spp.*, *Lachancea spp.* y *Brettanomyces spp.* nativas (Franco et al., 2021). En general se puede asumir que hay una buena implantación de la cepa bioprotectora debido al aumento observado en la abundancia durante las primeras 24h, sin embargo, se deberían realizar análisis de identificación más específicos como PCR cuantitativa y secuenciación de alto rendimiento (HTS) con MALDI-TOF-MS (Windholtz et al., 2021), que permitan identificar a las levaduras por cepa.

Al tercer día, la población de levaduras *no Saccharomyces* disminuye sus niveles de abundancia hasta un 78%, debido a la inoculación de la levadura comercial *Saccharomyces cerevisiae*, que ocupa aproximadamente un 23% de la población total de levaduras. Cabe destacar que el día 3 las muestras fueron tomadas y cultivadas en placa inmediatamente después de agregar el inóculo de levadura tradicional *S. cerevisiae*, deduciendo que la predominancia de LVNS por sobre LS, se debe a la correcta implantación y crecimiento de las primeras durante la etapa de maceración prefermentativa.

Durante el transcurso de la fermentación puede apreciarse que al día 8, la población de levaduras *no Saccharomyces* es de un 10% y de un 4,7%, para la modalidad CO6 y CO7 respectivamente, y para el final de la fermentación sólo contribuyen con el 7% y 7,9% de la abundancia total. Se deduce entonces que la levadura del vino *Saccharomyces cerevisiae* domina la fermentación, y las levaduras *no Saccharomyces* se mantienen al margen, siendo participes principalmente en etapas prefermentativas y no participando de forma relevante hasta el final del proceso de fermentación.

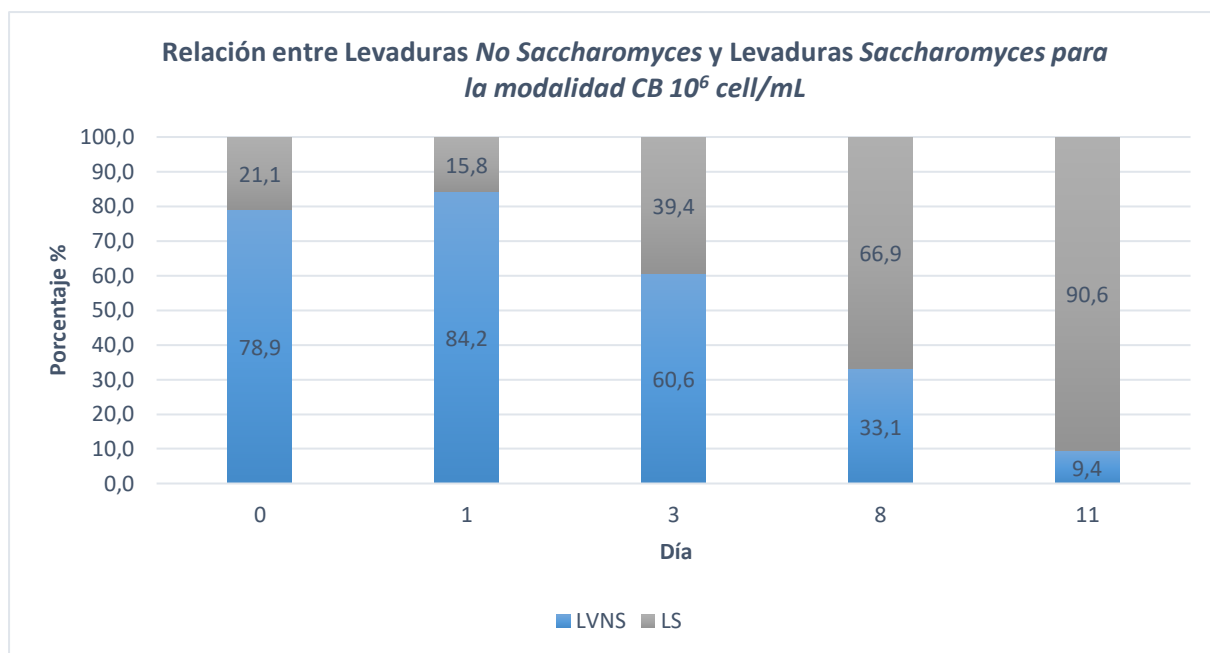


Figura 42. Proporción entre levaduras no *Saccharomyces* (color azul) y Levaduras *Saccharomyces* (color gris) a lo largo de la fermentación para la modalidad con *Cándida boidinii* 10^6 cell/mL.

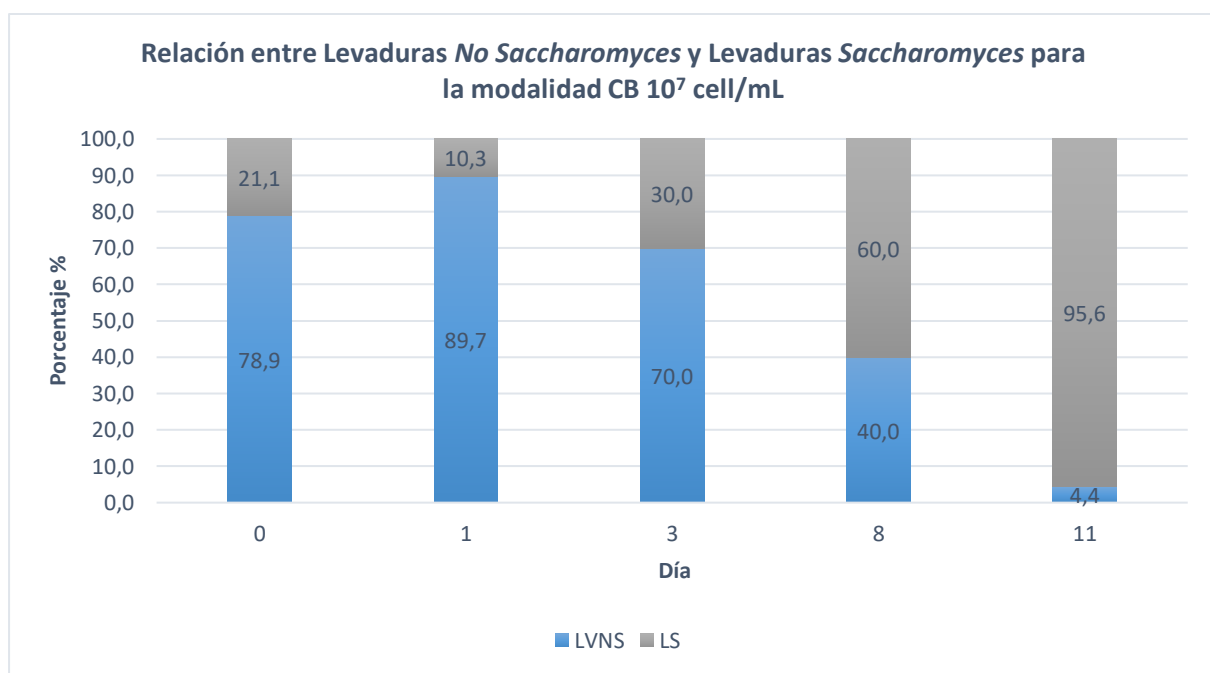


Figura 43. Proporción entre levaduras no *Saccharomyces* (color azul) y Levaduras *Saccharomyces* (color gris) a lo largo de la fermentación para la modalidad con *Cándida boidinii* 10^7 cell/mL.

En el caso de *Cándida boidinii*, tras 24 horas de maceración prefermentativa, se observa un aumento en la abundancia de levaduras no *Saccharomyces* (LVNS), asociado a la correcta implantación de la cepa bioprotectora, de manera similar a lo ocurrido con *Cándida oleophila*.

No obstante, a diferencia de *C. oleophila*, las abundancias de LVNS aún son significativas a mitad de la fermentación (día 8), con porcentajes de 33,1% y 40% para la modalidad CB6 y CB7, respectivamente.

Se podría asumir entonces que la levadura *Cándida boidinii* logra sobrevivir las abruptas condiciones del medio y crecer a pesar de la presencia de *Saccharomyces cerevisiae* y etanol, al menos hasta la mitad de la fermentación, pudiendo actuar incluso como levadura fermentativa. De hecho, estos resultados concuerdan con los obtenidos en la sección anterior respecto al consumo de sustrato, donde *Cándida boidinii* tuvo una tasa de reducción de densidad alta, con un valor de 0,157 y 0,206 10g/mL/día para CB6 y CB7, respectivamente.

En comparación, *Cándida oleophila* mostró una tasa de reducción de densidad de 0,119 y 0,145 10g/mL/día para CO6 y CO7, respectivamente, y un comportamiento de consumo de azúcares similar al obtenido con la modalidad control SO₂, estrategia donde solo interviene *S. cerevisiae* en el proceso fermentativo. Se deduce entonces que en las estrategias bioprotegidas con *C. oleophila*, la levadura bioprotectora tiene una participación insignificante o nula en el consumo de azúcares, debido a que no logran sobrevivir en concentraciones significativas hasta el final de la fermentación, probablemente por las altas concentraciones de etanol o por la presencia de *S. cerevisiae*.

Las razones de esta diferencia en el porcentaje de abundancia entre dos cepas del mismo género de levaduras no son de extrañar, ya que múltiples factores influyen en la aparición y desarrollo de levaduras durante la fermentación alcohólica. De hecho, la síntesis de etanol por *S. cerevisiae* influencia negativamente el crecimiento de especies distintas a *Saccharomyces*, como *Hanseniaspora*, *Pichia*, *Lachancea* y *Cándida*, presentes en el jugo de uva y que no toleran concentraciones de etanol superiores al 5-7%v/v, lo que explicaría su declive a medida que la fermentación avanza más allá de la etapa media (Heard & Floom, 1988). No obstante, también se han documentado especies de *Cándida*, como *Cándida stellata*, con tolerancias al etanol similares a *S. cerevisiae* (Mills et al., 2002). En este sentido, una hipótesis plausible sería que *Cándida boidinii* pertenece a ese grupo de levaduras con una mayor tolerancia al etanol, lo que explicaría su sobrevivencia hasta avanzada la fermentación.

Por otro lado, otro aspecto que se puede notar claramente en las gráficas de las figuras 42 y 43 es la dependencia de la concentración del inóculo, donde los niveles totales de LVNS caen hasta

un 61% en comparación a la estrategia CB7, que se mantiene en un 70% de abundancia tras la inoculación de la levadura fermentativa al día 3. Lo anterior tiene sentido dada la mayor concentración de levaduras bioprotectoras inoculadas en la estrategia CB7, por lo que es razonable que hayan presentado un mayor crecimiento celular en el transcurso de los días, y por ende una mejor implantación, de hecho, al día 8 se siguen manteniendo valores superiores en la estrategia CB7.

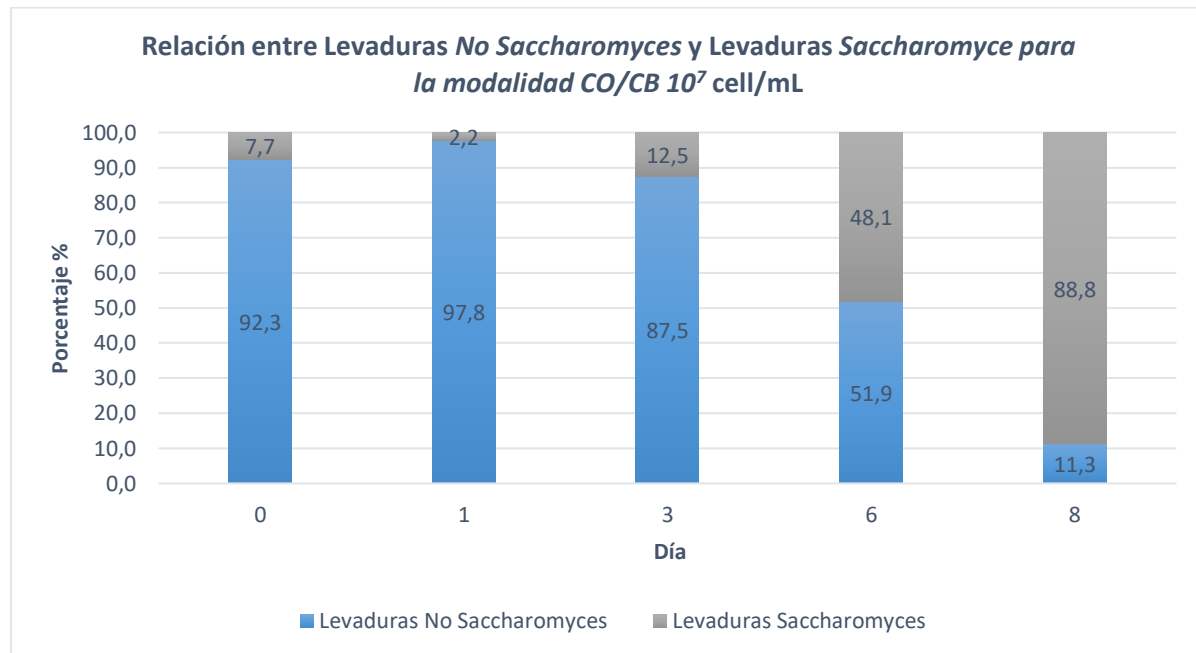


Figura 44. Proporción entre levaduras no *Saccharomyces* (color azul) y *Saccharomyces* (color gris) a lo largo de la fermentación para la modalidad con *Cándida boidinii*/*Cándida oleophila* 50:50 10^7 cell/mL.

En el caso del inóculo mixto CO/CB, se observa una clara dominancia de las levaduras *no Saccharomyces* en los primeros días de fermentación, de hecho, a las 24h de la maceración prefermentativa (día 1), se registra un modesto porcentaje de abundancia del 2,2% para las levaduras *Saccharomyces* nativas. Y, al tercer día, las levaduras *no Saccharomyces* continúan liderando la fermentación con una abundancia del 87,5% con respecto al total de levaduras, superando los valores obtenidos con *Cándida oleophila* y *Cándida boidinii* en estrategias de inoculación simple. Esto sugiere una implantación exitosa y un vigoroso crecimiento celular del inóculo mixto en el medio.

Los resultados obtenidos concuerdan con las expectativas, ya que al analizar el consumo de sustrato de esta estrategia (Figura 36), se evidencia la ausencia de la fase lag y un inicio

temprano de la fermentación en esta estrategia, explicado por los altos niveles de crecimiento de las levaduras *no Saccharomyces* tras los primeros días de su implantación. De hecho, esta modalidad presenta una alta tasa de reducción de densidad, con un valor de 0,178 10g/mL/día, observando una reducción en la densidad ya en la etapa de maceración prefermentativa (Figura 36), antes de la inoculación de *S. cerevisiae*, confirmando que en este caso las LVNS bioprotectoras sí fermentan el vino, logrando terminar la fermentación en tan sólo 8 días.

Es importante señalar que hubiera sido relevante analizar cómo se mantiene la relación entre *Cándida oleophila* y *Cándida boidinii* a lo largo de la fermentación al implantar el inoculo mixto y así determinar si alguna de las especies influye más en el proceso. Sin embargo, para este análisis específico, habría sido necesario utilizar técnicas de identificación por especie como PCR o MALDITOF, como se mencionó anteriormente.

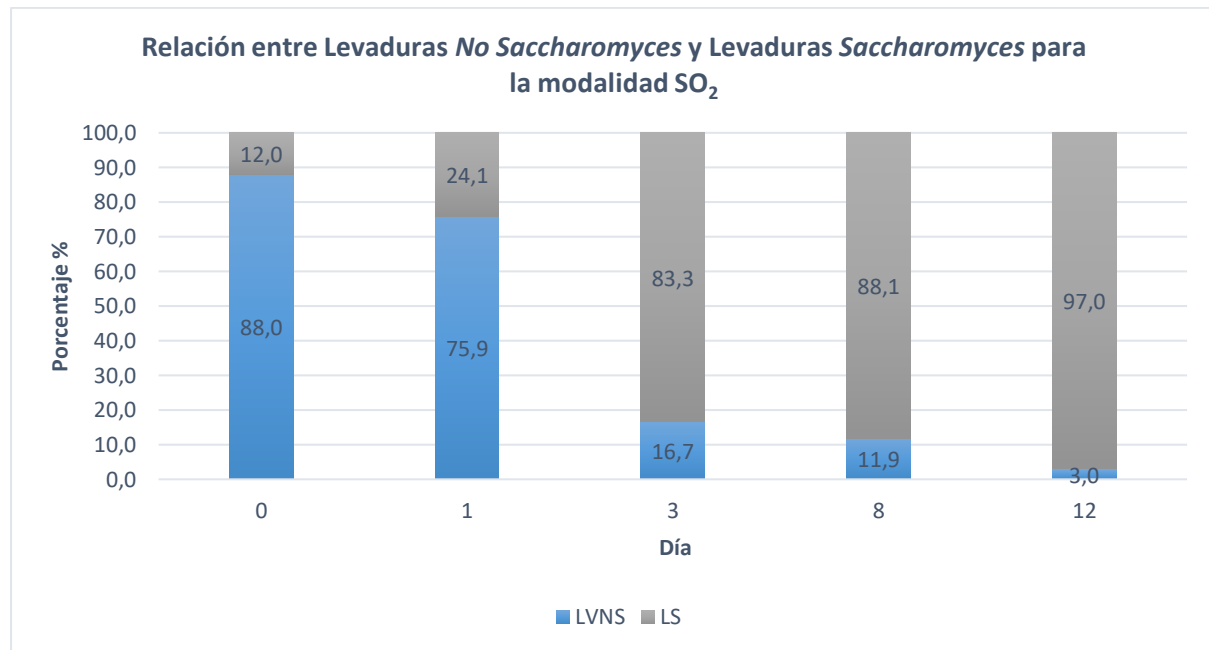


Figura 45. Proporción entre levaduras no *Saccharomyces* (color azul) y Levaduras *Saccharomyces* (color gris) a lo largo de la fermentación para la modalidad con SO₂

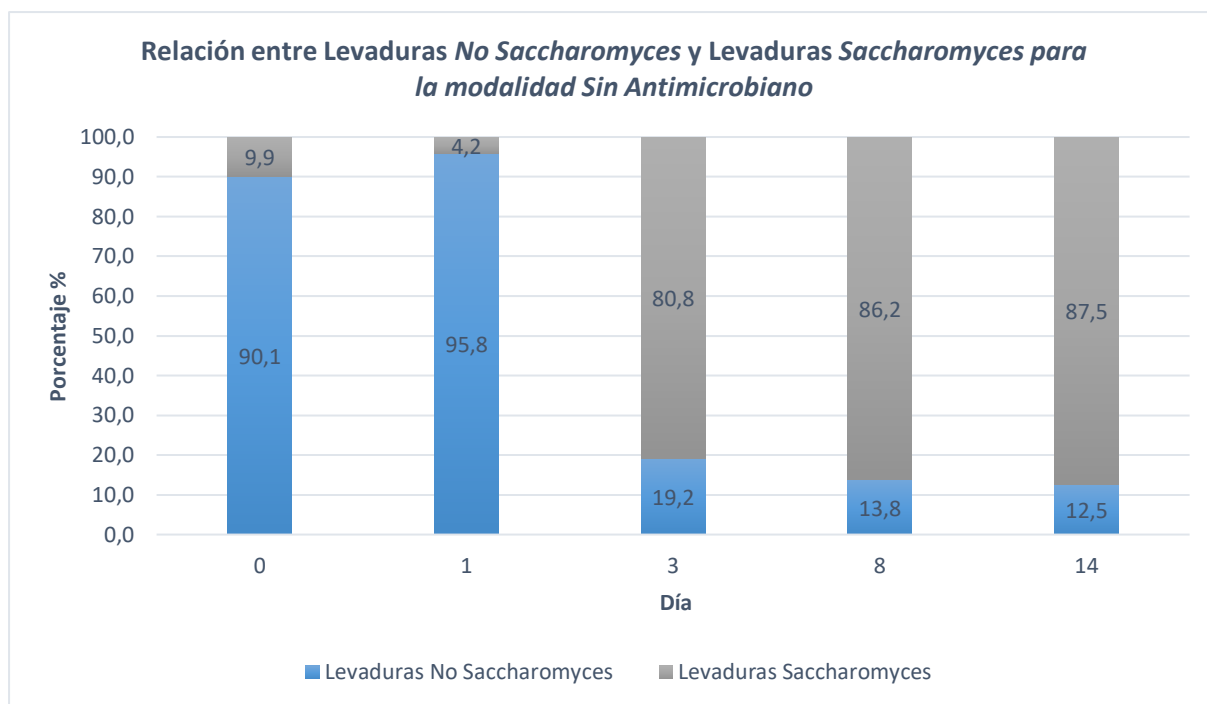


Figura 46. Proporción entre levaduras no *Saccharomyces* (color azul) y Levaduras *Saccharomyces* (color gris) a lo largo de la fermentación para la modalidad Sin Antimicrobiano.

Para las fermentaciones sin inóculo bioprotector, llamadas espontáneas; por la ausencia de levaduras inoculadas durante las primeras 72h; se observa particularmente como las levaduras nativas NS dominan el medio durante los primeros tres días, para posteriormente ser desplazadas por la levadura tradicional *S. cerevisiae*, que desde el tercer día domina la población total de levaduras, con abundancias altas en comparación a las modalidades bioprotegidas, con un 83% y un 80,8% para la fermentación control con SO₂ y la fermentación SA, respectivamente. Los resultados concuerdan con lo esperado, dado que estas modalidades no deberían tener dominancia de LVNS al no tener inóculos de *Candida spp.*

Se destaca que la fermentación modalidad SA siempre tuvo poblaciones de *no Saccharomyces* por sobre la estrategia con SO₂, lo cual demuestra la capacidad antimicrobiana de este aditivo por sobre las levaduras nativas del mosto. De hecho, al final de la fermentación los niveles de levaduras nativas en la estrategia sin antimicrobiano son de un 12,5%, mientras que la abundancia en la estrategia con sulfitos es de sólo el 3%, demostrando que las LVNS nativas son altamente sensibles a las condiciones del medio y al uso de sulfitos.

4.4. Dinámica de poblaciones de microorganismos

4.4.1. Evolución de las bacterias ácidolácticas durante la fermentación

La figura 47, 48 y 49 muestra la población de BAL (log ufc/mL) detectadas en 5 diferentes momentos durante la fermentación: mosto inicial, día 1, día 3 (Previo a la inoculación con *S. cerevisiae*), día 8; día 6 para la estrategia CO/CB; y final de la fermentación. Los análisis se realizaron mediante conteo en placa con medio MRS agar, tal cual se describió en la sección 3.4.5 de la metodología. Además, en el anexo K se muestran imágenes de las placas previo al conteo de poblaciones bacterianas.

Tal como se visualiza en las gráficas, durante el incubado el mosto inicial se encontraba con poblaciones de bacterias lácticas entre 5 y 5,5 log(ufc/mL), siendo ligeramente superior a la que normalmente se encuentra en el mosto que suele oscilar entre 3,5 y 4,5 log(ufc/mL) (Muñoz et al., 2005).

Tras las 24h de maceración prefermentativa, el efecto de la adición de *Cándida oleophila* en una concentración inicial de 1×10^7 cell/mL sobre la población de BAL fue mucho mejor al del SO₂, logrando llegar a poblaciones de 4,86 log(ufc/mL), mientras que el SO₂ sólo redujo las poblaciones hasta 5,3 log(ufc/mL). En cuanto al resto de las estrategias, estas no difirieron significativamente del control (tabla 17), con concentraciones de BAL superiores a las 5 unidades logarítmicas.

En el muestreo realizado a las 72h se observa como la fermentación espontanea (SA) no logra controlar efectivamente la población de BAL, arrojando la concentración más alta de estos patógenos, con un valor de 5,56 log(ufc/mL), mientras que las modalidades con *Cándida oleophila* superan el efecto protector del control con SO₂ (5,07 log(ufc/m)), con concentraciones de BAL de 4,75 log(ufc/mL) y 4,88 log(ufc/mL) para CO6 y CO7 respectivamente. Con respecto a *Cándida boidinii*, su protección contra BAL es débil y se mantiene en niveles comparables a la estrategia SA, sin observar diferencias significativas entre estas estrategias. Distinto es el caso del inoculo mixto CO/CB, que logró disminuir la población bacteriana a niveles de 5,12 log(ufc/mL), demostrando un efecto antimicrobiano superior a *Cándida boidinii*, pero inferior al efecto de *Cándida oleophila*, lo que era esperado tras ser una combinación de ambas estrategias.

Cabe destacar que la hora 72, es un punto de especial relevancia en el proceso, dado que es el fin de la maceración prefermentativa y el comienzo de la fermentación alcohólica, por lo que se espera que los niveles de bacterias se mantengan controladas previo a la adición del inoculo con *S. cerevisiae* y al comienzo de la fermentación. En cuanto a la efectividad de los tratamientos, se tiene el siguiente orden según capacidad de reducción de bacterias lácticas para el tercer día: $CO-10^7 > CO-10^6 > SO_2 > CB/CO-10^7 > CB-10^6 > CB-10^7 > SA$.

En el día 8 de la fermentación; día 6 para el inoculo mixto; se aprecia que el control con SO_2 logró mantener bajo control la población de BAL, incluso mejor que *Cándida oleophila*, estrategia que al día 3 controló las bacterias lácticas de forma más efectiva que el resto de las modalidades. Además, se observa como todas las estrategias se alejan aún más de la fermentación sin antimicrobiano (SA), la cual se mantiene en niveles de BAL similares a las encontradas en el muestro de las 72h. Un aspecto importante que destacar en el muestreo realizado el día 8 es la aparente eficacia que mostró la estrategia CB7, obteniendo una concentración de BAL de 4,64 log(ufc/mL), no muy distante a la obtenida con SO_2 , de 4,56 log(ufc/mL).

Por último, el muestreo realizado al fin de la fermentación mostró que el SO_2 es el antimicrobiano más efectivo para combatir las bacterias lácticas, obteniendo niveles finales de BAL con concentraciones de 3,79 log(ufc/mL). Sin embargo, al analizar las modalidades bioprotegidas, *Cándida oleophila* mostró un comportamiento controlador superior al establecido por *Cándida boidinii* y al inoculo mixto CO/CB, diferenciándose significativamente de la fermentación sin antimicrobiano (SA) en la reducción de bacterias ácidolácticas. Lo anterior permite deducir que la colonización del medio por levaduras *no Saccharomyces* inoculadas en etapas prefermentativas si produce un efecto biocontrolador por sobre las BAL al liberar compuestos tóxicos y consumir los nutrientes del medio, compitiendo con los patógenos (Costello et al., 2003). Por otro lado, se puede apreciar que *Cándida oleophila* es una levadura con una buena capacidad de control de bacterias lácticas, destacándose su acción durante las primeras 72h, donde se desea que las poblaciones de bacterias lácticas disminuyan lo más posible para evitar fermentaciones malolácticas no deseadas realizadas por *Lactobacillus* y *Pediococcus* (Bisson & Walker et al., 2015).

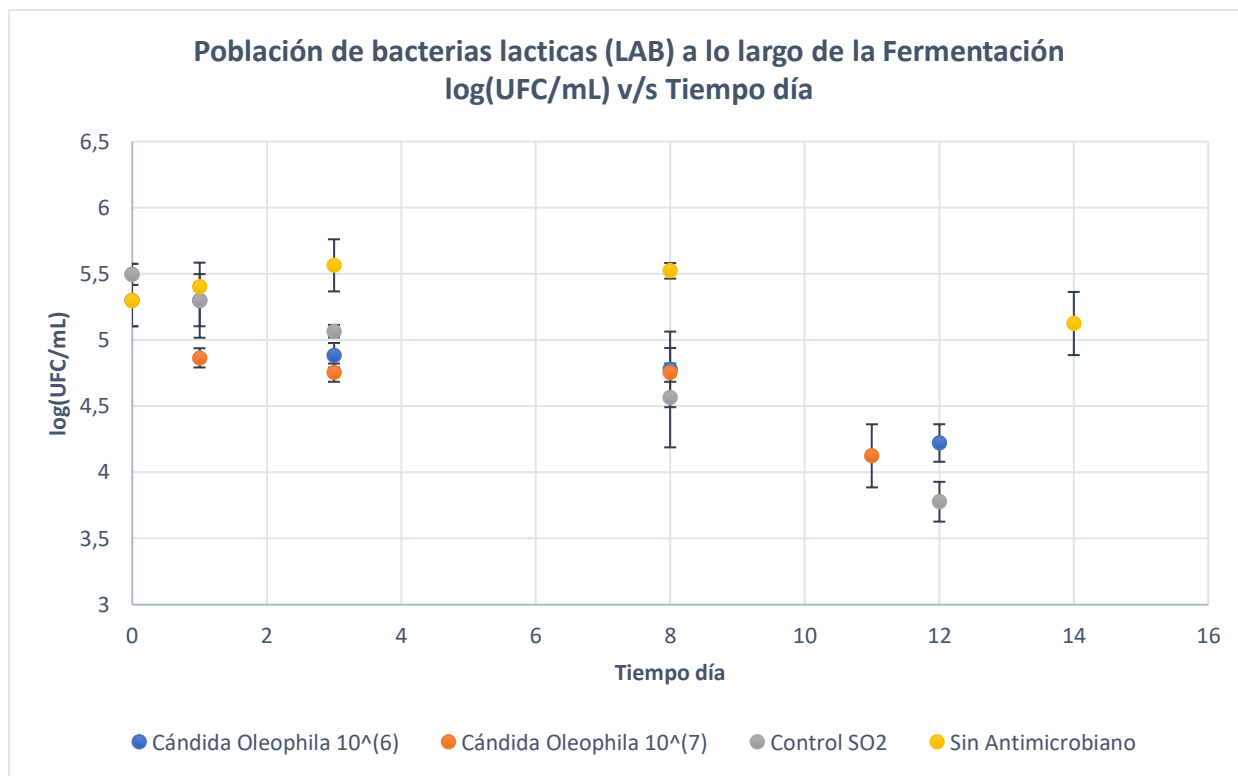


Figura 47. Población de BAL (log UFC/mL) a lo largo de FA en las diferentes estrategias de inoculación (CO: Cándida oleophila, SO₂: Control con SO₂, SA: Sin Antimicrobiano).

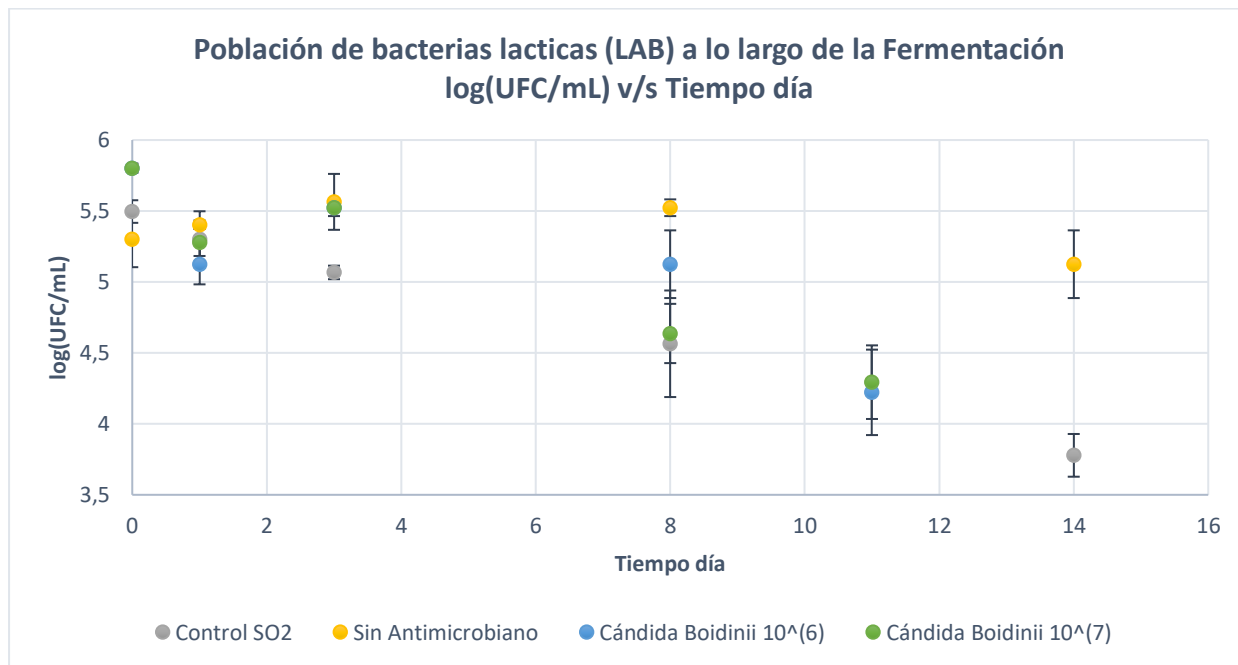


Figura 48. Población de BAL (log UFC/mL) a lo largo de FA en las diferentes estrategias de inoculación (CB: Cándida boidinii, SO₂: Control con SO₂, SA: Sin Antimicrobiano).

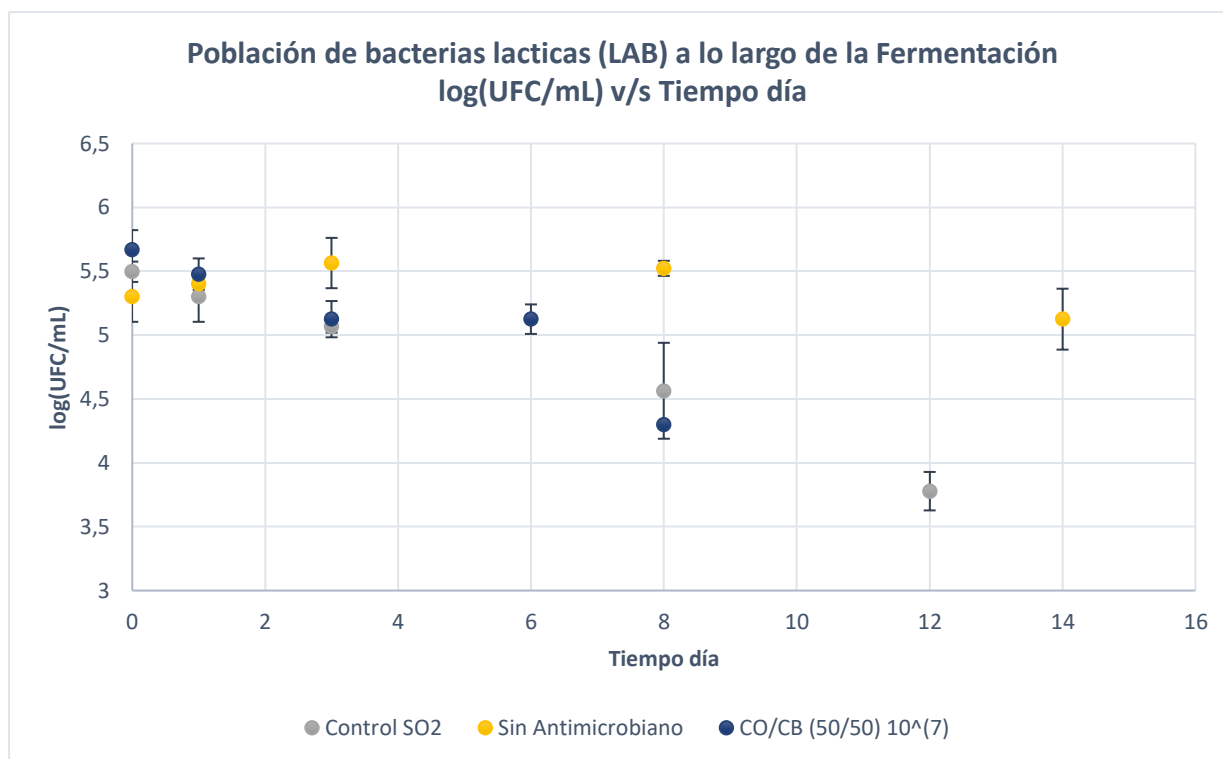


Figura 49. Población de BAL (log UFC/mL) a lo largo de FA en las diferentes estrategias de inoculación (CO/CB: Inoculo mixto *Cándida oleophila*/*Cándida boidinii*, SO₂: Control con SO₂, SA: Sin Antimicrobiano).

Según el análisis de la prueba ANOVA Tukey detallado en la Tabla 17 para cada uno de los días de muestreo destinados al análisis microbiológico, se observa que tras un día de bioprotección, existen diferencias significativas entre el grupo de control y la modalidad CO7. Esto lleva a la conclusión de que esta última protege de manera más efectiva el mosto en comparación con las demás estrategias, como se mencionó con anterioridad al analizar las gráficas.

En el tercer día, se destaca nuevamente que la modalidad de protección CO7 es significativamente menor al resto de las estrategias, ofreciendo una mejor protección al mosto en comparación con el control. Además, se observa que las modalidades con *Cándida boidinii* son significativamente distintas a las estrategias con el antimicrobiano SO₂, mostrando escasa bioprotección al medio, con valores similares a la fermentación sin antimicrobiano.

Al llegar al octavo día de la fermentación (día 6 para el inoculo mixto), se puede observar que las modalidades bioprotegidas no difieren significativamente del control con SO₂. Sin embargo, la fermentación sin antimicrobiano sí muestra diferencias significativas, evidenciando un crecimiento excesivo de bacterias lácticas en comparación con el resto de las modalidades en

estudio. Este comportamiento se mantiene hasta el final de la fermentación, donde SA presenta diferencias significativas con todas las modalidades.

Tabla 17. Análisis ANOVA Tukey realizado para las bacterias ácidoacéticas a lo largo de la fermentación. Letras distintas indican diferencias significativas. Los valores seguidos de letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas ($\alpha=0,05$)

Estrategia/Día	1		3		6 – 8		Final	
CB-10 ⁷	5,279	ab	5,523	a	4,637	b	4,294	b
CB-10 ⁶	5,125	ab	5,523	a	5,125	ab	4,222	b
CO/CB 10 ⁷	5,477	a	5,125	b	5,1249	ab	4,301	b
SO ₂	5,301	a	5,067	b	4,564	b	3,7782	a
CO-10 ⁷	4,865	b	4,753	c	4,7533	b	4,125	ab
SA	5,404	a	5,564	a	5,5229	a	5,125	c
CO-10 ⁶	5,301	a	4,885	bc	4,778	b	4,2218	b

4.4.2. Evolución de las bacterias ácidoacéticas durante la fermentación.

Las figuras 50, 51 y 52 muestran la población de BAA (log UFC/mL) detectadas en 5 diferentes momentos durante la fermentación: mosto inicial, día 1, día 3 (Previo a la inoculación con *S. cerevisiae*), día 8 (día 6 CO/CB) y día final de la fermentación. Los análisis se realizaron mediante conteo en placa con medio WLD agar, tal cual se describió en la sección 3.5.5 de la metodología. Además, en el anexo K se muestran imágenes de las placas previo al conteo de poblaciones bacterianas.

Tal como se visualiza en las gráficas en el momento del incubado el mosto inicial se encontraba con poblaciones de bacterias acéticas entre 4,5 y 5 unidades logarítmicas, siendo superior a la que normalmente se encuentra en el mosto que suele oscilar entre 2 y 3 unidades logarítmicas (Guillamón et al., 2005).

Los resultados obtenidos tras el muestreo a las 24h de maceración prefermentativa muestran que *Cándida boidinii* tuvo un efecto antimicrobiano positivo sobre la población de BAL, disminuyendo su concentración de manera más efectiva que el SO₂, logrando llegar a poblaciones de 4,52 log(ufc/mL), para el caso de CB7, y de 4,80 log(ufc/mL) para el caso de CB6, mientras que el SO₂ sólo redujo las poblaciones hasta 5,20 log(ufc/mL). En cuanto a la fermentación espontanea sin antimicrobiano (SA), esta mostró concentraciones altas de

bacterias acéticas, comparables al de la estrategia con *Cándida oleophila*, levadura que no pareció tener un efecto antimicrobiano contra estos patógenos. Mientras que el inóculo mixto presentó un comportamiento similar al SO₂, con una concentración de AAB de 5,12 log(ufc/mL).

En el muestreo realizado a las 72h se observa como la fermentación realizada con SO₂ mostró concentraciones altas de BAA (6,19 log(ufc/mL)) en comparación al resto de las modalidades, de hecho, mediante la bioprotección con *Cándida boidinii* se obtuvieron concentraciones de BAA de 5,0 log(ufc/mL) y 5,28 log(ufc/mL) para CB6 Y CB7, respectivamente. Con respecto a *Cándida oleophila*, la modalidad con el inóculo inicial de 10⁶ no mostró ningún efecto bioprotector, obteniendo concentraciones de bacterias acéticas superiores a lo esperado (7,11 log(ufc/mL)), siendo incluso superiores a la fermentación espontánea sin antimicrobiano (6,13 log(ufc/mL)). Por otro lado, cuando se inocula *Cándida oleophila* con una concentración de 10⁷ ufc/mL, se puede observar un efecto bioprotector, disminuyendo la concentración de bacterias a 5,67 unidades logarítmicas, por lo que el efecto de la concentración del inóculo inicial afecta el control de *Cándida oleophila* sobre las poblaciones de bacterias acéticas, observando un comportamiento directamente proporcional entre la concentración del inóculo inicial y la bioprotección sobre bacterias acéticas. Por último, el efecto de la adición del inóculo mixto CO/CB a las 72h, logró disminuir la población bacteriana a niveles de 5,60 log(ufc/mL), obteniendo un efecto antimicrobiano superior a *Cándida oleophila*, pero inferior a *Cándida boidinii*, lo que era esperado tras ser una combinación de ambas estrategias. En cuanto a la efectividad de los tratamientos, se tiene el siguiente orden según capacidad de control de bacterias acéticas: CB-10⁶ > CB-10⁷ > CB/CO-10⁷ > CO-10⁷ > SA > SO₂ > CO-10⁶.

En el día 8 de la fermentación; día 6 para CO/CB; se aprecia que el control con SO₂ logra controlar la población de BAA mejor que las estrategias bioprotegidas con *Cándida oleophila*. En cuanto a *Cándida boidinii*, la tendencia es la misma que la obtenida a las 72h, siendo la levadura bioprotectora con mayor efecto antimicrobiano, con concentraciones de bacterias acéticas de 4,37 y 4,56 unidades logarítmicas para las modalidades con inóculo inicial de 10⁶ y 10⁷ respectivamente. Además, se evidencia como la fermentación con el inóculo mixto *C. oleophila/C. boidinii* disminuyó la población de bacterias acéticas significativamente mejor que

el resto de las estrategias, obteniendo poblaciones de 3,22 log(ufc/mL), mientras que el ensayo SA continuó sin mostrar un efecto antimicrobiano.

Por último, el muestreo realizado al fin de la fermentación mostró que cualquiera de las modalidades donde participaba de forma exclusiva o en inóculo mixto la levadura *Cándida boidinii* mostró un efecto antimicrobiano comparable e incluso mayor al ejercido por el SO₂, obteniendo niveles finales de BAA con concentraciones inferiores a 2,73 log(ufc/mL), diferenciándose significativamente del resto de las estrategias, las cuales no mostraron efectos antimicrobianos destacables. Por otro lado, la fermentación sin antimicrobiano mostró niveles de bacterias acéticas de 5,78 unidades logarítmicas, mucho mayores a las obtenidas por *Cándida oleophila* que no superaron las 3,37 unidades logarítmicas.

Finalmente, se puede apreciar que *Cándida boidinii* es una levadura con una buena capacidad de control de bacterias acéticas, destacándose su acción antimicrobiana contra el crecimiento de estos patógenos en etapas prefermentativas. Cabe destacar que *Cándida oleophila* no mostró un buen comportamiento antimicrobiano en etapas prefermentativas, teniendo concentraciones de BAA similares a la fermentación sin antimicrobiano (SA), sin embargo, tras el avance de la fermentación se logra evidenciar de igual manera una disminución en las poblaciones de bacterias acéticas.

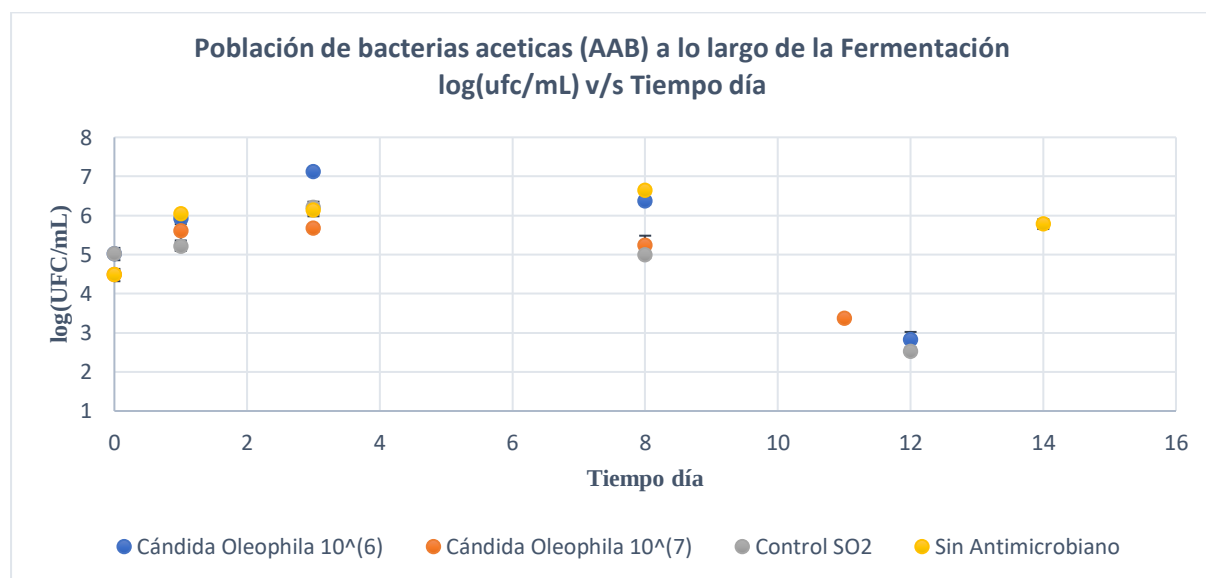


Figura 50. Población de BAA (log UFC/mL) a lo largo de FA en las diferentes estrategias de inoculación (CO *Cándida oleophila*, SO₂: Control con SO₂, SA: Sin Antimicrobiano).

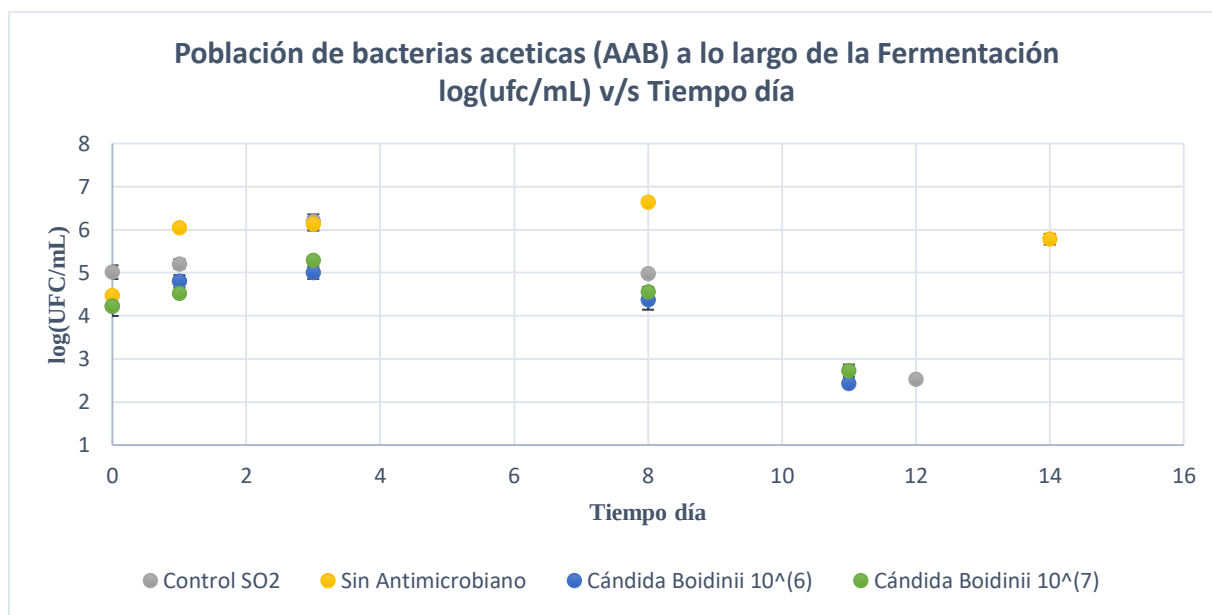


Figura 51. . Población de BAA (log UFC/mL) a lo largo de FA en las diferentes estrategias de inoculación (CB: *Cándida boidinii*, SO₂: Control con SO₂, SA: Sin Antimicrobiano).

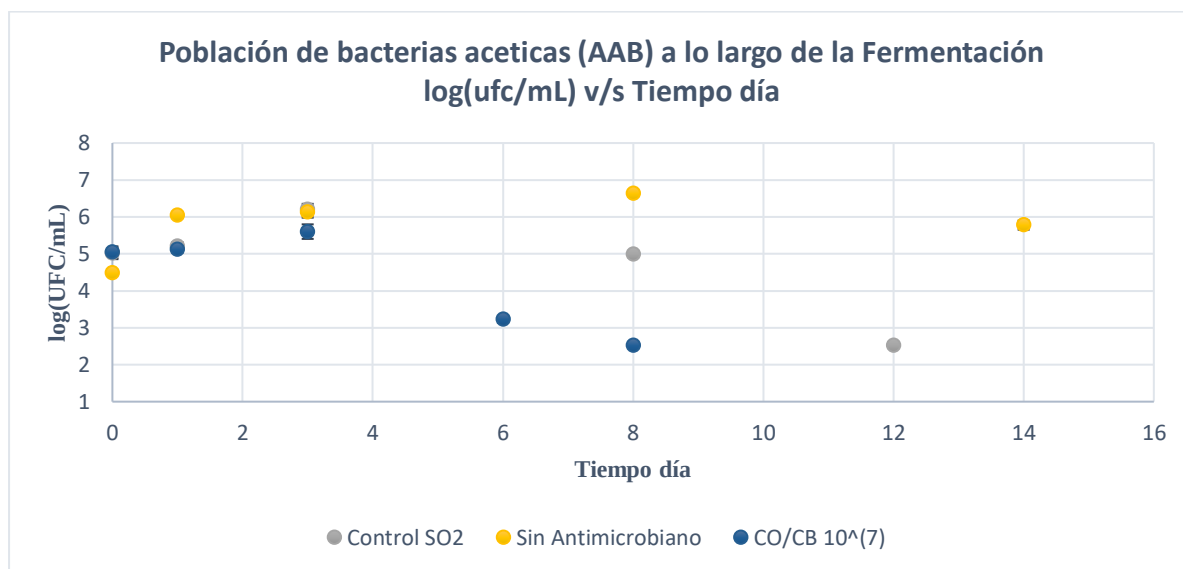


Figura 52. Población de BAA (log UFC/mL) a lo largo de FA en las diferentes estrategias de inoculación (CO/CB: *Cándida oleophila*/*Cándida boidinii*, SO₂: Control con SO₂, SA: Sin Antimicrobiano).

Según el análisis ANOVA Tukey que se muestra en la tabla 18 se puede apreciar que tras un día de bioprotección hay diferencias significativas entre el control y las modalidades de biocontrol con *Cándida oleophila* y *Cándida boidinii*, donde está última presentó concentraciones más bajas de AAB que el SO₂. Por otra parte, la fermentación mixta CO/CB no se diferenció

significativamente del control, teniendo un efecto protector contra bacterias acéticas similar al SO₂.

Durante el día 3 se aprecia que las tres modalidades de protección con *Cándida boidinii* son significativamente distintas al resto de las estrategias, protegiendo mejor el mosto que el control; además se puede observar como la fermentación sin antimicrobiano (SA) no presenta diferencias significativas con respecto al control, pudiendo concluir que el SO₂ no es realmente efectivo contra las bacterias ácidoacéticas.

Para el día 8 de la fermentación; 6 para CO/CB; se observa que la modalidad con el inóculo mixto CO/CB se aleja significativamente del resto de los experimentos con *Cándida boidinii*, otorgando un mayor control sobre AAB que el resto de las estrategias; por su parte el control tuvo un comportamiento similar a la estrategia CO7, diferenciándose de la fermentación sin antimicrobiano y CO6, donde las concentraciones de bacterias al octavo día fueron superiores. Lo anterior permite demostrar que el efecto del inóculo inicial sobre la bioprotección es determinante al momento de analizar estrategias de biocontrol. En cuanto al día final de la fermentación se pueden establecer diferencias significativas sólo con la modalidad Sin Antimicrobiano (SA) y el resto de las modalidades, lo que explicaría la importancia de la utilización de antimicrobianos para evitar la contaminación del vino. Por otro lado, la falta de diferencias significativas entre las modalidades podría deberse al efecto de la producción de etanol en el medio y no a un efecto antimicrobiano provocado por las levaduras *Cándida spp.*

Tabla 18. Análisis ANOVA Tukey realizado para las bacterias ácidoacéticas a lo largo de la fermentación. Letras distintas indican diferencias significativas ($\alpha=0,05$)

Estrategia/Día	1		3		6- 8		Final	
CO/CB 10 ⁷	5,123	cd	5,602	cd	3,222	d	2,523	b
SO ₂	5,204	c	6,195	b	4,985	b	3,570	b
CO-10 ⁶	5,921	ab	7,114	a	6,368	a	2,824	b
SA	6,041	a	6,136	b	6,640	a	5,778	a
CO-10 ⁷	5,602	b	5,669	c	5,239	b	3,368	b
CB-10 ⁷	4,523	e	5,286	de	4,564	c	2,727	b
CB-10 ⁶	4,802	de	5,0	e	4,368	c	2,426	b

4.4.3. Evolución de las levaduras *Brettanomyces* /*Dekkera*

De la misma manera que en los casos anteriores, en las figuras 53, 54 y 55 se muestra la población de *Brettanomyces/Dekkera* (log (ufc/mL)) detectadas en 5 diferentes momentos a lo largo de la fermentación: mosto inicial, día 1, día 3 (Previo a la inoculación con *S. cerevisiae*), día 8 (6 para la modalidad CO/CB) y día final de la fermentación. Los análisis se realizaron mediante conteo en placa con medio WLC agar, tal cual se describió en la sección 3.5.5. de la metodología. Además, en el anexo K se muestran imágenes de las placas previo al conteo de poblaciones bacterianas.

Los resultados obtenidos tras el muestreo a las 24h muestran que las fermentaciones con *Cándida boidinii*, tuvieron un efecto antimicrobiano positivo sobre la población de levaduras *Brettanomyces/Dekkera*, disminuyendo su concentración de manera más efectiva que el control con SO₂ y el resto de las modalidades, logrando disminuir la población de *Dekkera* hasta 5,08 log(ufc/mL), 4,75 log(ufc/mL) y 4,82 log(ufc/mL), para CO/CB, CB7 y CB6, respectivamente. Sin embargo, no pareció haber dependencia entre la población de *Brettanomyces* y la concentración del inóculo inicial de *Cándida boidinii* (10⁶ o 10⁷), obteniendo concentraciones sin diferencias significativas (tabla 19) en ambas modalidades, por lo menos las primeras 24h. Por otro lado, las estrategias que involucraban a *Cándida oleophila* no parecieron tener un efecto bioprotector, presentando concentraciones más altas de levaduras *Brettanomyces* que el control.

En el muestreo realizado a las 72h se observa como la fermentación con *Cándida boidinii* en una concentración inicial de 10⁷ presentó la mejor protección antimicrobiana, con valores de *Brettanomyces/bruxellensis* de 4,78 log(ufc/mL), diferenciándose significativamente de la modalidad con un inóculo inicial de 10⁶, que se mantuvo en concentraciones de 6,07 log(ufc/mL), de manera similar al SO₂ y a la fermentación sin antimicrobiano. Por otro lado, se observa como *Cándida oleophila* no pareció tener un control sobre las poblaciones de *Brettanomyces bruxellensis*, donde tanto la modalidad con un inóculo inicial de 10⁶ y 10⁷ presentaron valores superiores al control con SO₂, tal cual se aprecia en la figura 46. Por último, la fermentación con el inóculo bioprotector mixto CO/CB logró presentar una concentración de *Brettanomyces spp.* inferior al control, de 5,48 log(ufc/mL), sin embargo, hubo un aumento de la concentración del microorganismo patógeno con respecto a las 24h. En cuanto a la efectividad de los tratamientos, se tiene el siguiente orden según capacidad de control de *Brettanomyces /bruxellensis*: CB-10⁷ > CB/CO-10⁷ > CB-10⁶ > SO₂ > SA > CO-10⁶ > CO-10⁷.

En el día 8 de la fermentación; día 6 para la fermentación CO/CB; se aprecia que el control con SO₂ logra controlar la población de *Brettanomyces/Dekkera* mejor que las estrategias bioprotegidas con *Cándida oleophila*, las cuales no parecen tener un efecto bioprotector sobre este tipo de microorganismos patógenos. En cuanto a *Cándida boidinii*, se tienen concentraciones de *Brettanomyces bruxellensis* de 4,30 y 4,82 unidades logarítmicas para las modalidades CB6 y CB7 respectivamente. Además, se evidencia como la fermentación con el inóculo mixto CO/CB disminuyó la población de *Brettanomyces spp.* significativamente mejor que el resto de las estrategias, obteniendo poblaciones de 3,30 log(ufc/mL).

Por último, el muestreo realizado al fin de la fermentación mostró que el inóculo mixto bioprotector *Cándida oleophila/Cándida boidinii* tuvo el mejor efecto antimicrobiano, obteniendo una concentración de 1,52 log(ufc/mL), mientras que el control sólo controló las poblaciones hasta concentraciones de 2,30 log(ufc/mL). La modalidad con *Cándida boidinii* 10⁷ y *Cándida oleophila* 10⁷ mostraron resultados similares al control con SO₂ con valores de aproximadamente 2,52 log(ufc/mL), mientras que la fermentación sin antimicrobiano (SA), como era de esperarse, se alejó de manera significativa del resto de las modalidades, con poblaciones altas de *Brettanomyces bruxellensis*, específicamente de 5,99 log(ufc/mL). Cabe destacar que valores tan altos de la levadura *Brettanomyces bruxellensis* pueden estropear gravemente el vino embotellado en pocas semanas debido a la producción de 4-vinilfenol (4VF) y 4-vinilguaiacol (4vg) (Agnolucci et al., 2017).

Otro aspecto particular que destacar son los resultados finales obtenidos con *Cándida oleophila*, que no fue capaz de controlar a *Brettanomyces /Dekkera spp.* durante toda la fermentación, sin embargo, se obtuvieron valores finales más bajos que la fermentación sin antimicrobiano, e incluso cercanos a lo obtenido con SO₂, lo cual probablemente se debe al agotamiento de nutrientes en el medio y a la producción de alto contenido de alcohol, en vez de a un real efecto bioprotector de la levadura.

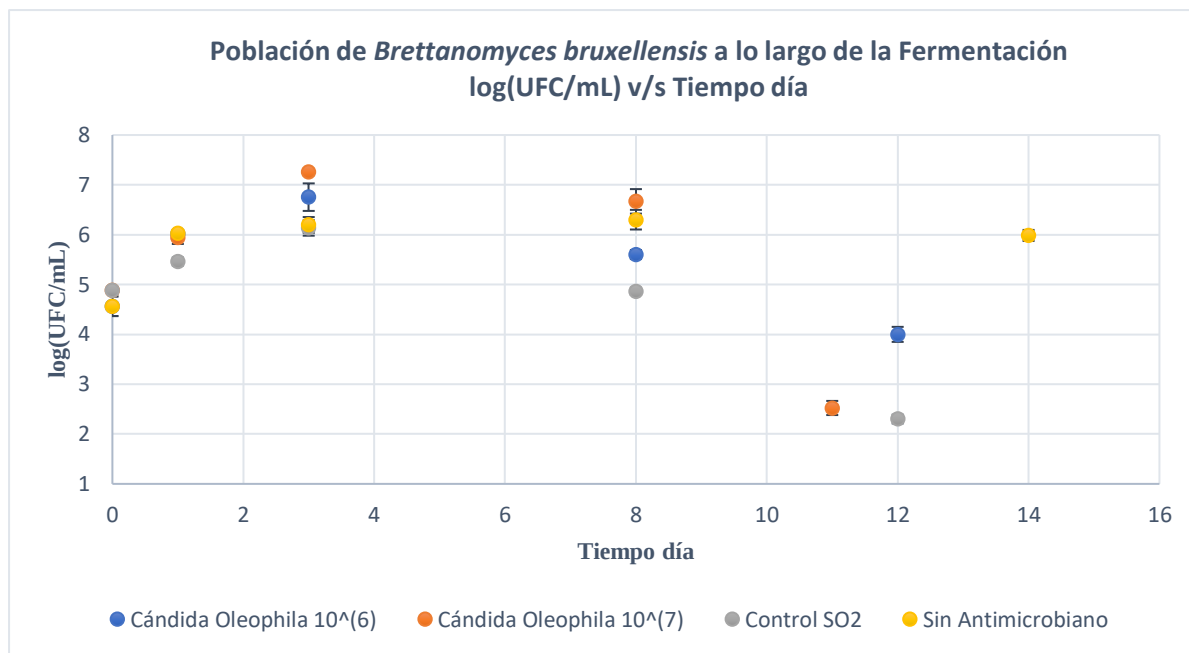


Figura 53. Población de *Brettanomyces bruxellensis* (log UFC/mL) a lo largo de FA en las diferentes estrategias de inoculación (CO: *Cándida oleophila*, SO₂: Control con SO₂, SA: Sin Antimicrobiano).

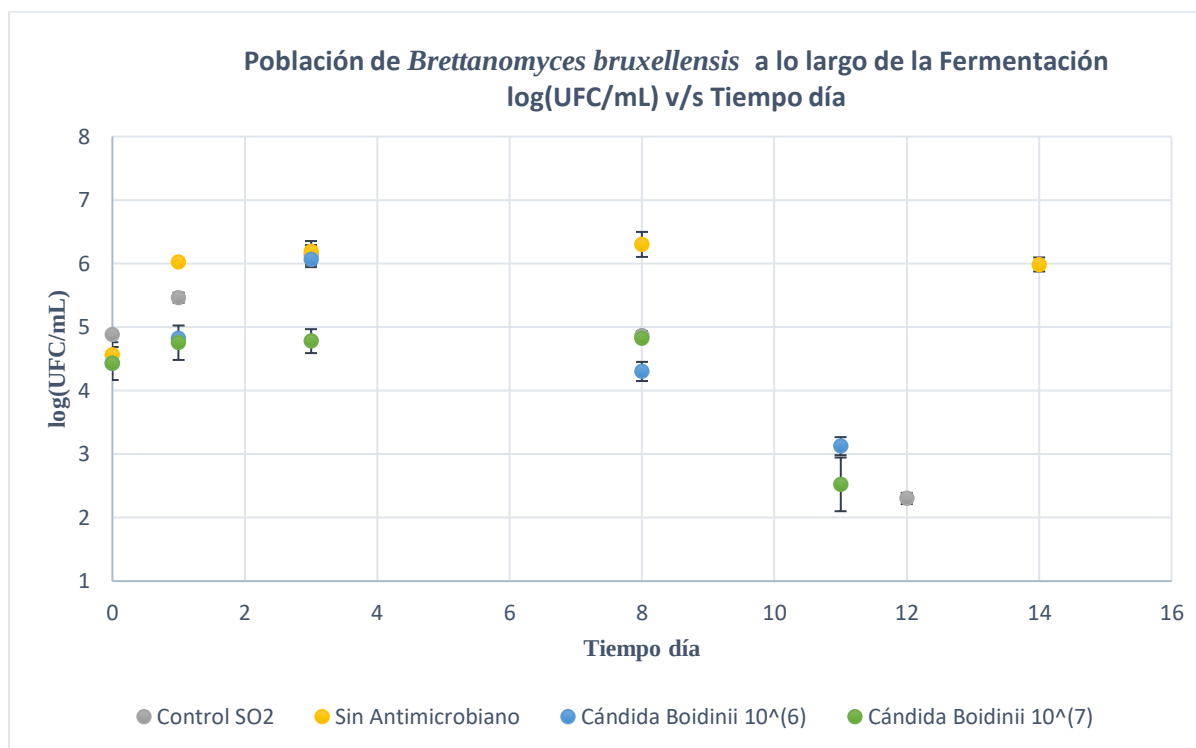


Figura 54. Población de *Brettanomyces bruxellensis* (log UFC/mL) a lo largo de FA en las diferentes estrategias de inoculación (CB: *Cándida boidinii*, SO₂: Control con SO₂, SA: Sin Antimicrobiano).

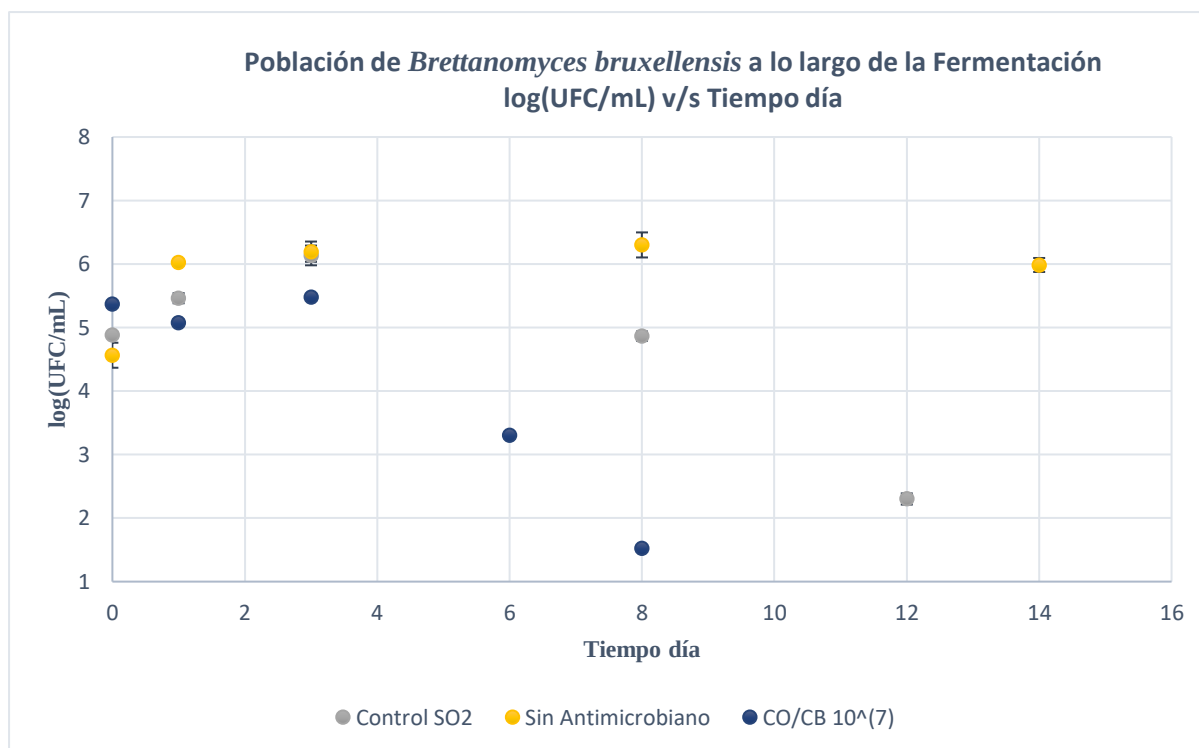


Figura 55. Población de *Brettanomyces bruxellensis* (log UFC/mL) a lo largo de FA en las diferentes estrategias de inoculación (CB: *Cándida boidinii*, SO₂: Control con SO₂, SA: Sin Antimicrobiano).

Según el análisis ANOVA Tukey que se muestra en la tabla 19 para cada uno de los días donde se realizó muestreo para análisis microbiológico, se puede apreciar que tras un día de bioprotección hay diferencias significativas entre el control con SO₂ y el resto de las modalidades, donde además *Cándida oleophila* demostró un comportamiento similar al de la fermentación sin Antimicrobiano, al no presentar diferencias significativas entre ambas estrategias.

Al día 3, la estrategia con CB7 demostró ser más efectiva que el control y que el resto de las modalidades sobre *Brettanomyces bruxellensis*, seguida de la fermentación con el inóculo mixto CO/CB, encontrándose diferencias significativas con respecto a la fermentación tradicional con SO₂, que tuvo un efecto similar a la fermentación sin Antimicrobiano y a la fermentación CB6, mientras que *Cándida oleophila* no pareció tener un efecto antimicrobiano, obteniéndose diferencias significativas con respecto al control y mayor concentración de levaduras *Brettanomyces spp.*

Al día 8 de la fermentación; 6 para CO/CB; se observa que las modalidades de *Cándida boidinii* no presentan diferencias significativas entre ellas, logrando ser estrategias con un buen control

de *Brettanomyces/Dekkera*, sólo por detrás de la fermentación con el inóculo mixto CO/CB, que se diferenció significativamente del resto de las modalidades. En general, el resto de las estrategias se comportaron de igual manera que al día 3, donde SA, CO6 y CO7, presentaron concentraciones significativamente más altas que el control.

Para el final de la fermentación se observa que CO/CB demostró tener un mejor efecto bioprotector, presentando diferencias significativas con el resto de las modalidades. Mientras que las modalidades con *Cándida oleophila* 10^7 y *Cándida boidinii* 10^7 , no presentaron diferencias significativas con el control. Sin embargo, este aparente efecto bioprotector de *Cándida oleophila* puede deberse al etanol y la producción de otros metabolitos de los que *B. bruxellensis* es sensible más que al biocontrol ejercido por la levadura, dado que durante los primeros 8 días de la fermentación no pareció tener un efecto bioprotector alguno.

Tabla 19. Análisis ANOVA Tukey realizado para las levaduras *Brettanomyces bruxellensis* a lo largo de la fermentación. Letras distintas indican diferencias significativas ($\alpha=0,05$)

Día	1		3		6 – 8		Final	
CO/CB 10^7	5,0792	c	5,4771	d	3,301	e	1,523	e
SO ₂	5,4624	b	6,136	c	4,865	c	2,301	d
CO- 10^6	6,0142	a	6,753	b	5,602	b	4	b
SA	6,028	a	6,195	c	6,301	a	5,9853	a
CO- 10^7	5,9379	a	7,2553	a	6,669	a	2,5229	d
CB- 10^7	4,753	c	4,778	e	4,824	cd	2,523	d
CB- 10^6	4,824	c	6,0669	c	4,301	d	3,1249	c

4.5. Final del proceso de fermentación

Tras los resultados de los análisis microbiológicos se puede observar que en general los experimentos bioprottegidos con un inóculo inicial de 10^7 cell/mL presentaron una mejor protección antimicrobiana contra las bacterias lácticas y la levadura *Brettanomyces bruxellensis*. Mientras que en el desarrollo de bacterias acéticas no hubo una dependencia del inóculo, donde las fermentaciones con inóculo 10^7 y 10^6 cell/mL no tuvieron diferencias significativas entre ellas, por lo que los análisis de compuestos químicos y volátiles se realizarán sólo para las modalidades bioprottegidas con un inóculo inicial de 10^7 cell/mL debido a los costos asociados a los análisis y a los mejores resultados generales obtenidos.

4.5.1. Análisis de Compuestos químicos

Se realizó un análisis de composición química para estimar la concentración de algunos compuestos de interés como etanol, ácido tartárico, ácido acético, ácido láctico, ácido málico glucosa/fructosa y glicerol, tal como se explica en la sección 3.6. de la metodología. Cada una de las mediciones se realizó en triplicado, y se complementó con un análisis ANOVA Tukey ($\alpha = 0,05$) para evaluar si existen diferencias significativas entre las distintas estrategias implementadas.

4.5.1.1. Análisis de producción de L-Ácido Málico

En la tabla 20 se presentan las concentraciones de L-ácido málico obtenidas al final de la fermentación bajo cada una de las modalidades de protección en estudio junto con su respectivo análisis ANOVA Tukey con un nivel de confiabilidad del 95%. Tal como se puede observar en la gráfica, los valores de ácido málico obtenidos son similares entre todas las estrategias, encontrándose concentraciones finales de este compuesto entre los 2,56 y los 2,75 g/L. De hecho, en el análisis ANOVA se observa que no hay diferencias significativas entre las distintas modalidades.

Tabla 20. Concentración de ácido málico final bajo las diferentes estrategias de bioprotección con su respectivo análisis ANOVA Tukey para el Ácido L-málico. Letras diferentes indican diferencias significativas.

<i>Factor</i>	<i>N</i>	<i>Media</i>	<i>Agrupación</i>
<i>SO₂</i>	3	2,753	a
<i>CO/CB</i>	3	2,723	a
<i>CO</i>	3	2,627	a
<i>CB</i>	3	2,590	a
<i>SA</i>	3	2,563	a

Se deduce entonces que la utilización de estrategias de bioprotección en lugar de SO₂ en vinificación de mosto *Sauvignon Blanc* no altera la producción de ácido L-málico en el vino. Lo cual tiene sentido considerando que este tipo de mostos no requiere pasar por la etapa de fermentación maloláctica, por lo que el ácido málico no se consume para producir ácido láctico.

4.5.1.2 Análisis de producción de etanol

En la Tabla 21 se presentan las concentraciones de etanol obtenidas al final de la fermentación bajo cada una de las modalidades de protección en estudio junto con su respectivo análisis

ANOVA Tukey con un nivel de confiabilidad del 95%. Tal cual se puede apreciar en la tabla, si hay diferencias significativas entre algunas de las estrategias utilizadas.

Tabla 21. Concentración de etanol final bajo las diferentes estrategias de bioprotección, con su respectivo ANOVA Tukey de diferencias significativas para el Etanol. Letras diferentes indican diferencias significativas.

<i>Factor</i>	<i>N</i>	<i>Media</i>	<i>Agrupación</i>
CB	3	12,78	A
SO ₂	3	11,98	B
SA	3	11,97	B
CO	3	11,70	Bc
CO/CB	3	11,37	C

Tras el análisis se determina que la producción de etanol está influenciada por la estrategia antimicrobiana utilizada, donde las modalidades sin antimicrobiano, *Cándida oleophila* y la fermentación control con SO₂ no presentaron diferencias significativas entre ellas. La razón de esto probablemente sea la influencia de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, dado que los ensayos con sulfitos y SA no tuvieron iniciadores NS y en el caso de los ensayos bioprotegidos con *Cándida oleophila* se observó una baja sobrevivencia de la levadura NS durante la fermentación en comparación a *Cándida boidinii* y a la estrategia con inoculo mixto CO/CB (Figura 40-45), por lo que se podría asumir que la generación de etanol solo estuvo influenciada por la levadura tradicional. Esta idea se fundamenta en la conexión entre el uso de levaduras *no Saccharomyces* (NS) y la concentración final de etanol en el vino. Investigaciones previas han señalado que la incorporación de levaduras NS ocasiona alteraciones significativas en la concentración final de etanol, en contraste con el uso exclusivo de *S. cerevisiae* (Ivit et al., 2020; Ciani et al., 2016; Contreras et al., 2014).

En cuanto a *Cándida boidinii* los resultados indicaron diferencias significativas con todas las estrategias, acompañado de una concentración más alta de etanol, con un valor de 12,78(%v/v). Esto podría explicarse por la falta de control de bacterias ácidolácticas reportada en la sección 4.4.1, dado que la presencia de LAB heterofermentativas puede aumentar las concentraciones de CO₂ y etanol en el vino (König & Fröhlich, 2017).

Por último, la estrategia de inoculación mixta CO/CB presentó los valores más bajos de etanol; 11,37(%v/v); obteniendo diferencias significativas con el control y el resto de las modalidades, exceptuando a *Cándida oleophila*. Esta reducción de etanol en la estrategia mixta podría deberse

a interacciones provocadas por ambas levaduras, que impactan no sólo en la dinámica poblacional sino también en el metabolismo de cada cepa, con consecuencias en los compuestos producidos y, eventualmente, en la calidad final del vino (Bordet et al., 2020), dado que el resto de los bioprotectores no mostraron reducción en la concentración de este metabolito.

4.5.1.3 Análisis de Producción de Ácido acético

En la tabla 22 se presentan las concentraciones de ácido acético obtenidas al final de la fermentación bajo cada una de las modalidades de protección en estudio junto con su respectivo análisis ANOVA Tukey con un nivel de confiabilidad del 95%. Tal cual se puede apreciar en la tabla, si hay diferencias significativas entre algunas de las estrategias utilizadas.

Tabla 22. Concentración de ácido acético final bajo las diferentes estrategias de bioprotección Análisis ANOVA Tukey de diferencias significativas para el ácido acético. Letras diferentes indican diferencias significativas.

<i>Factor</i>	<i>N</i>	<i>Media</i>	<i>Agrupación</i>
CO	3	0,267	a
SA	3	0,227	a
COCB	3	0,063	b
CB	3	0,04	bc
SO ₂	3	0	c

Tras el análisis, se determina que la producción de ácido acético está influenciada por la estrategia antimicrobiana empleada. La bioprotección con la levadura *Cándida boidinii* exhibe niveles bajos de ácido acético, con un promedio de 0,04 g/L, comparable de manera significativa a la fermentación control con SO₂, donde no se detecta presencia de ácido acético al final de la fermentación. Los resultados más notables corresponden a la estrategia de bioprotección con *Cándida oleophila*, que muestra concentraciones significativamente diferentes a la fermentación control con SO₂ y similares a la fermentación sin antimicrobiano, incluso con valores finales de ácido acético superiores a esta última. Estos hallazgos concuerdan con el análisis microbiológico, donde la *Cándida oleophila* no logró un biocontrol efectivo contra las bacterias ácidoacéticas, las principales responsables de su producción.

Finalmente, la combinación de las levaduras *Cándida oleophila* y *Cándida boidinii* en una proporción 50:50 logró reducir las concentraciones de ácido acético de manera más efectiva que la fermentación sin antimicrobiano (SA) y la estrategia con *Cándida oleophila*, presentando diferencias significativas con ambas estrategias. Sin embargo, no hay diferencias significativas

con la estrategia que utiliza solo *Cándida boidinii*, sugiriendo que la combinación de *Cándida oleophila* y *Cándida boidinii* logra una menor producción de ácido acético de manera similar a si se utilizara solo *Cándida boidinii*.

Es importante destacar que ninguna de las estrategias supera la concentración límite máxima de 1 g/L, según los estándares de la organización internacional de la viña y el vino (2018).

4.5.1.4. Análisis de Producción de Glicerol

En la tabla 23 se presentan las concentraciones de glicerol obtenidas al final de la fermentación bajo cada una de las modalidades de protección en estudio junto con su respectivo análisis ANOVA con un nivel de confiabilidad del 95%.

Tabla 23. Concentración de glicerol final para cada una de las estrategias con su respectivo análisis ANOVA Tukey de diferencias significativas para el glicerol. Letras diferentes indican diferencias significativas.

Factor	N	Media	Agrupación
SA	3	7,560	a
COCB	3	7,463	a
CB	3	8,463	a
CO	3	8,157	a
SO ₂	3	8,637	a

Tal cual se puede apreciar visualmente en la tabla en complemento al análisis de varianza presentado, no hay diferencias significativas entre las estrategias utilizadas, dado que el valor. Se deduce que la utilización de estrategias de bioprotección en reemplazo del SO₂ en vinificación de *Sauvignon Blanc* no provoca diferencias en la composición química final del glicerol en el vino, obteniendo concentraciones que van desde los 7,46 a los 8,64 g/L. Sin embargo, los resultados son inconsistentes con lo reportado en la literatura, donde el glicerol es producido en mayores concentraciones por fermentaciones con levaduras no *Saccharomyces* que por *Saccharomyces cerevisiae* (Ivit et al., 2020). Por otro lado, niveles altos de SO₂ se asocian a niveles altos de glicerol, lo cual concuerda con los resultados obtenidos donde la estrategia con sulfitos presentó los niveles más altos de glicerol, con una concentración de 8,637 g/L, sin embargo, no presentan diferencias significativas con el resto de las estrategias.

De todas formas, la producción de este metabolito depende del género de levadura utilizado y factores como los nutrientes disponibles, el pH y la temperatura (Rolle et al., 2018), por lo que puede ser que *Cándida spp.* no sea una levadura que influye en la producción de este compuesto.

4.5.1.5. Análisis de Producción de L-ácido láctico

En la tabla 24 se presentan las concentraciones de ácido L-láctico obtenidas al final de la fermentación bajo cada una de las modalidades de protección en estudio junto con su respectivo análisis ANOVA con un nivel de confiabilidad del 95%. Tal cual se puede apreciar visualmente en la tabla, no hay diferencias significativas entre algunas de las estrategias utilizadas, obteniendo concentraciones que van desde los 0 a los 0,02 g/L.

Tabla 24. Análisis ANOVA Tukey de diferencias significativas para el ácido L-láctico. Letras diferentes indican diferencias significativas.

<i>Factor</i>	<i>N</i>	<i>Media</i>	<i>Agrupación</i>
<i>SO₂</i>	3	0,020	a
<i>COCB</i>	3	0,017	a
<i>CO</i>	3	0,010	a
<i>SA</i>	3	0,007	a
<i>CB</i>	3	0	a

Los resultados concuerdan con lo esperado, dado que para la cepa de uva *Sauvignon Blanc* y los vinos blancos en general no es necesario realizar fermentación maloláctica (FML) (Gutierrez-Escobar et al., 2023) debido a que los vinos pierden su acidez característica, en consecuencia, los niveles de ácido láctico; metabolito producido durante la FML; deberían ser bajos o inexistentes.

4.5.1.6. Análisis de consumo de Ácido Tartárico

En la tabla 25 se presentan las concentraciones de ácido tartárico obtenidas al final de la fermentación bajo cada una de las modalidades de protección en estudio junto con su respectivo análisis ANOVA con un nivel de confiabilidad del 95%.

Tabla 25. Análisis ANOVA Tukey de diferencias significativas para el ácido tartárico. Letras diferentes indican diferencias significativas.

<i>Factor</i>	<i>N</i>	<i>Media</i>	<i>Agrupación</i>
<i>COCB</i>	3	1,828	a
<i>SO₂</i>	3	1,735	ab
<i>CO</i>	3	1,670	ab
<i>CB</i>	3	1,612	b
<i>SA</i>	3	1,329	c

Tal cual se puede apreciar visualmente en la tabla en complemento al análisis de varianza presentado, hay diferencias significativas entre algunas de las estrategias utilizadas. Se obtiene que la la producción de ácido tartárico no se ve afectada por la bioprotección, dado que ninguna de las estrategias con LVNS implementadas mostraron diferencias significativas con respecto al control con SO₂, mientras que la fermentación sin adición de antimicrobiano (SA), sí lo hizo, presentando la menor concentración de ácido tartárico de todas las estrategias, con un valor de 1,33g/L. La razón podría ser la alta concentración de bacterias lácticas encontradas al final de la fermentación SA, dado que estas bacterias son capaces de degradar el ácido tartárico (Muñoz et al., 2021). Otra posible explicación podría ser que el ácido tartárico se precipite formando tartrato de calcio o potasio (Dutraive et al., 2019). Además, las levaduras también pueden degradar el ácido tartárico; Gao et al., 1995, demostraron que *Cándida stellata* podía degradar el ácido tartárico hasta en un 23%, mientras que *S. cerevisiae* lo hizo en un 20%. Se podría asumir entonces que la fermentación SA al presentar mayor contenido de levaduras nativas contaminantes utilizaban más ácido tartárico por su metabolismo, sin embargo, se necesitan más estudios que respalden esta afirmación.

4.5.1.7 Análisis de concentración de azúcar residual

En la tabla 26 se presentan las concentraciones de glucosa/fructosa obtenidas al final de la fermentación bajo cada una de las modalidades de protección en estudio junto con su respectivo análisis ANOVA con un nivel de confiabilidad del 95%.

Tabla 26. Análisis ANOVA Tukey de diferencias significativas para la Glucosa/Fructosa. Letras diferentes indican diferencias significativas.

<i>Factor</i>	<i>N</i>	<i>Media</i>	<i>Agrupación</i>
<i>CB</i>	3	0,0333	a
<i>SO₂</i>	3	0,0267	a
<i>COCB</i>	3	0,0233	a
<i>SA</i>	3	0,0233	a
<i>CO</i>	3	0,0233	a

Tal cual se puede apreciar visualmente en complemento al análisis de varianza presentado en la tabla, no hay diferencias significativas entre las estrategias utilizadas. Se deduce que la utilización de estrategias de bioprotección en lugar de SO₂ en vinificación con *Sauvignon Blanc* no provoca cambios notorios en el consumo de sustrato y por ende en la concentración final de glucosa/fructosa en el vino. Se pudo comprobar que los vinos finales estaban secos y la acción de la levadura fermentativa no se vio afectada por la utilización de microorganismos bioprotectores.

4.5.1.8. Rendimiento de la fermentación

Con el objetivo de determinar la capacidad de cada una de las estrategias para consumir azúcares y producir distintos metabolitos, se evaluó la capacidad de fermentación en términos de rendimientos. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 27, donde la fermentación con el inóculo mixto CO/CB tuvo el rendimiento más bajo (0,472 g de etanol/g de glucosa), con una producción final de etanol de 89,8g/L y 11,37% v/v. Para *Cándida oleophila*, la concentración de etanol alcanzó los 92,44 g/L, 11,7% v/v y un rendimiento de 0,486 g de etanol/g de glucosa, sin embargo, no presentó diferencias significativas con la estrategia bioprottegida CO/CB. *Cándida boidinii* por su parte fue la estrategia que presentó un mayor rendimiento de etanol (0,530 g de etanol/g de glucosa), con una producción final de 100,92g/L y 12,78% v/v, siendo significativamente diferente al resto de las modalidades en estudio. En cuanto al resto de las fermentaciones; la fermentación sin antimicrobiano (SA) mostró un rendimiento de 0,497 g de etanol/g de glucosa, una producción de etanol de 94,55g/L y 11,97% v/v, siendo significativamente igual a la fermentación con *Cándida oleophila* y al control con SO₂, que tuvo un rendimiento de 0,498 g de etanol/g de glucosa, una producción de etanol de 94,77g/L y 12,00

% v/v. En términos de azúcar residual, todas las fermentaciones secuenciales terminaron con menos de 0,033 g/L, no mostrándose diferencias significativas entre las fermentaciones y atribuyéndose a un consumo efectivo de sustrato debido a la levadura tradicional *S. cerevisiae*. En cuanto al rendimiento de glicerol, este no mostró diferencias significativas entre ninguno de los tratamientos, lo cual concuerda con lo presentado en la sección 4.5.1.4.

Tabla 27. Resultados de rendimiento de producto por sustrato consumido en fermentaciones secuenciales

Estrategia	Azúcar residual g/L	Etanol g/L	Glicerol g/L	$Y_{p/s}$ Etanol	$Y_{p/s}$ Glicerol
SA	0,023	94,55	7,56	$0,497 \pm 0,00706b$	$0,0397 \pm 0,00303^a$
CO	0,023	92,44	8,16	$0,486 \pm 0,00778bc$	$0,0429 \pm 0,0069^a$
CB	0,033	100,92	8,46	$0,530 \pm 0,00756^a$	$0,0445 \pm 0,00859^a$
SO ₂	0,027	94,77	8,64	$0,498 \pm 0,00578b$	$0,0454 \pm 0,00305^a$
CO/CB	0,023	89,80	7,46	$0,472 \pm 0,00337c$	$0,0392 \pm 0,00185^a$

4.6. Análisis de Compuestos Volátiles

Considerando que cada muestra se analizó en triplicado, la figura 56 presenta la cantidad de compuestos volátiles detectados en cada una de las mediciones tras haber aplicado los criterios de confiabilidad establecidos en la sección 3.7.2. de la metodología (Figura 33).

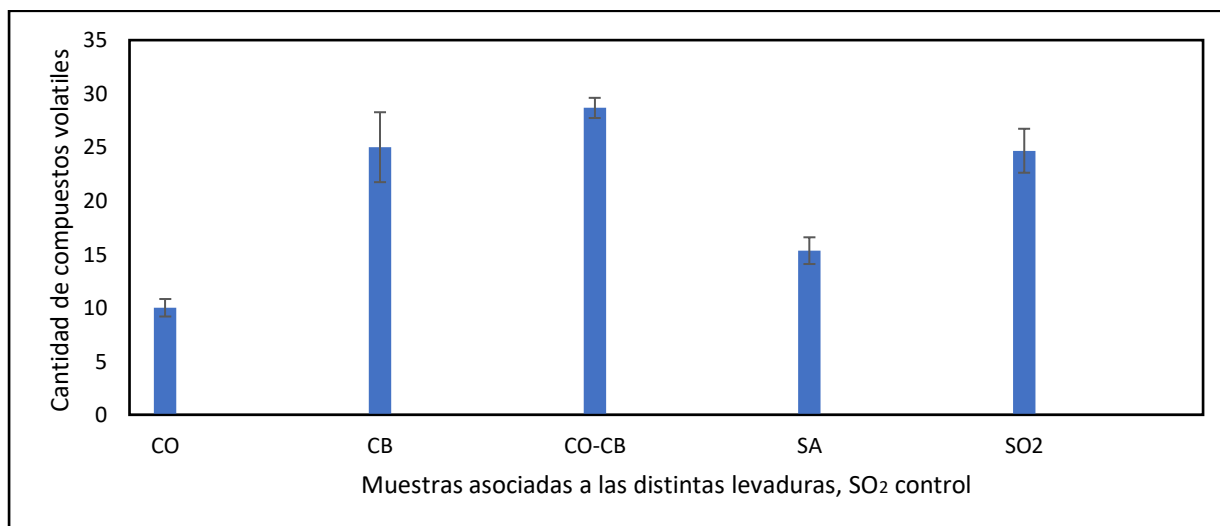


Figura 56. Cantidad de compuestos volátiles promedios detectados por muestras asociadas a las distintas levaduras $\pm$ desviación estándar en fermentación monocultivo de la variedad Sauvignon blanc en comparación a SO₂.

A partir de los resultados de la gráfica de la figura 56 es claro notar que la técnica bioprotectora que combina ambas levaduras (CO/CB) es la que presenta una mayor cantidad de compuestos volátiles con un promedio de 29 entre las tres réplicas, seguida por el control con SO₂ y la estrategia con *Cándida boidinii* (CB), ambas con un promedio de 25, mientras que el resto de las levaduras presentó una menor producción de compuestos volátiles.

En general la desviación estándar es baja, donde la estrategia con el bioprotector *Cándida boidinii* presentó la mayor desviación estándar ($\pm 3,2$). Estudios anteriores realizados sobre mosto *Sauvignon Blanc* y mediante técnicas de identificación de microextracción en fase sólida con espacio de cabeza junto con espectrometría de masas por cromatografía de gases (HS-SPME-GC-MS) a escala laboratorio, logró detectar un total de 24 compuestos aromáticos al inocular con 6 cepas distintas de *Saccharomyces cerevisiae*, siendo un número similar a los detectados por los experimentos asociados a esta investigación (Swiegers et al., 2009). Mientras que un estudio realizado por Sadoudi et al., 2012 mediante técnica de extracción por sorción en barra agitadora y desorción líquida con cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (SBSE-LD-GC-MS) logró detectar hasta 44 compuestos volátiles en *Sauvignon Blanc* cuando se inocularon cepas de *Cándida zemplinina*, *Torulaspora delbrueckii* y *Metschnikowia pulcherrima* en fermentaciones monocultivo. Sin embargo, tales diferencias se explican tanto en la estrategia como en la matriz inicial, considerando que factores como el tiempo de inoculación, temperatura y composición química del mosto inicial influyen directamente en los compuestos volátiles formados.

En cuanto a la clasificación de los compuestos volátiles por familia, se pudo identificar un total de 4 grupos predominantes: Esteres, Alcoholes, Aldehídos y Ácidos. En el Anexo L se presenta una lista de todos los compuestos con su porcentaje de abundancia y olor característico, y en la figura 57 se resumen estos resultados. Podemos notar que la producción de esterres sobrepasa significativamente la del resto de los compuestos volátiles, lo cual es altamente deseado por su capacidad para potenciar aromas y conferir complejidad aromática en el producto. De hecho, se puede apreciar que hay una relación inversamente proporcional entre la producción de alcoholes; segundo grupo con mayor abundancia; y esterres, donde a mayor producción de uno de estos grupos se evidencia menor producción del otro y viceversa.

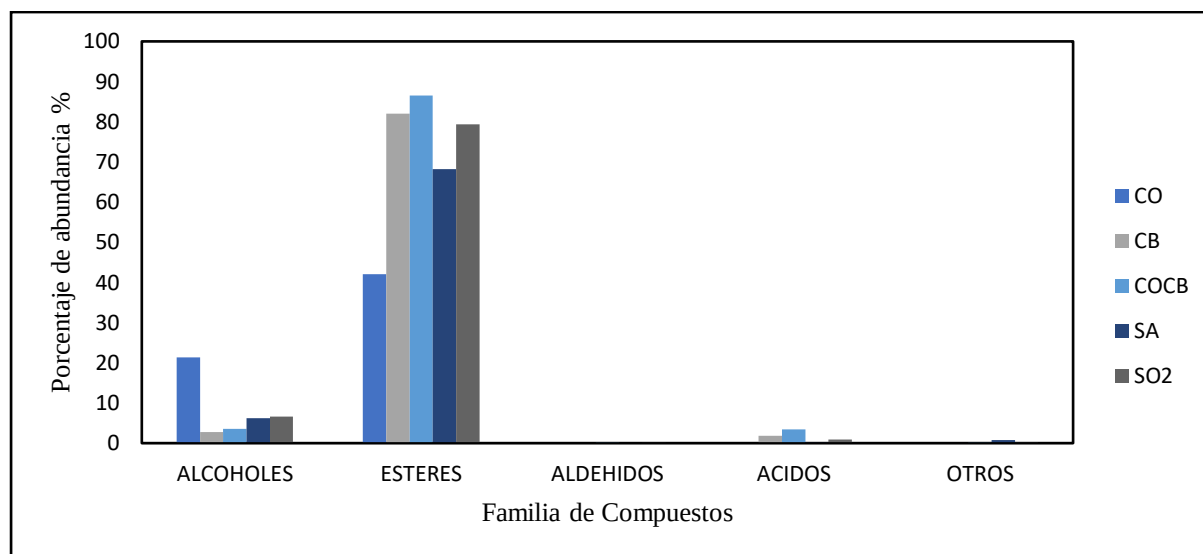


Figura 57. Clasificación por familia de los compuestos analizados para las distintas levaduras no *Saccharomyces bioprotectoras* aplicadas en la variedad Sauvignon blanc y en fermentación con *Saccharomyces cerevisiae* en comparación al control con SO_2 . En la simbología se detalla CO (*Cándida oleophila*), CB (*Cándida boidinii*), CO-CB (*Cándida oleophila* y *Cándida boidinii* 50/50), SA (Sin antimicrobiano) y SO_2 (Control).

En referencia a los resultados según el tipo de estrategia, resalta la efectividad de la combinación de *Cándida boidinii* y *Cándida oleophila* en una proporción de 50:50 como principal generadora de ésteres, superando a *Cándida boidinii* individualmente y a la estrategia convencional con SO_2 . En contraste, la utilización exclusiva de *Cándida oleophila* resultó en una menor producción de ésteres, sugiriendo que esta levadura podría no potenciar aromas de manera tan robusta como *Cándida boidinii*, a pesar de compartir el mismo género de levaduras.

Sin embargo, según se evidencia en la figura 57, en la estrategia de bioprotección con *Cándida oleophila*, se observa un mayor porcentaje de abundancia de alcoholes en comparación con las demás estrategias. Esto podría indicar que el perfil volátil de esta levadura está directamente vinculado con alcoholes en lugar de ésteres. Aunque no existen estudios publicados sobre análisis de compuestos volátiles con levaduras del género *Cándida*, los resultados obtenidos con *C. oleophila* podrían atribuirse a las elevadas concentraciones de ácido acético generadas en los mostos bajo esta estrategia, compuesto que podría reaccionar con los precursores de ésteres, evitando así su formación.

En línea con esta observación, un estudio realizado por Romano et al. (1992) predijo que un aumento en las concentraciones de ácido acético conlleva a un aumento en la concentración de

alcoholes superiores. Aunque dicho estudio se centró en levaduras apiculadas, sus conclusiones sugieren la intervención del ácido acético en el perfil volátil del vino de alguna manera.

En cuanto a la fermentación sin antimicrobiano (SA), produjo un perfil volátil similar al del control con SO₂, lo cual es esperable considerando que ambas estrategias tienen en común la ausencia de levaduras *no Saccharomyces*, precursoras de un perfil volátil complejo. De hecho, Whitener et al., (2017), evaluaron el perfil volátil del vino producido en fermentaciones secuenciales con diferentes levaduras *no Saccharomyces*, donde demostraron que la fermentación secuencial con las levaduras *M. pulcherrima*, *Cándida Zemlinina*, *Pichia kluyveri* y *Lachancea thermotolerans* en vinos *Sauvignon Blanc* produjo mayores concentraciones de esteres en comparación al control monocultivo con *S. cerevisiae*. Sin embargo, esto no concuerda con estudios realizados por Whitener et al., (2015) donde los principales compuestos volátiles como alcoholes, esteres y terpenos, fueron producidos en concentraciones mucho más bajas por las levaduras *no Saccharomyces* que por *S. cerevisiae* en mosto *Sauvignon Blanc*. En base a estas diferencias se podría asumir que el efecto de la matriz sobre la producción metabólica es relevante, tal cual es expuesto por Manzanares et al., (2011).

En cuanto a la producción de ácidos, estos se presentan en mínimas cantidades al igual que los aldehídos. Si bien es sabido que los ácidos se asocian a aromas rancios e indeseados y se espera que reaccionen con los alcoholes para formar esteres, la baja presencia de estos podría no afectar significativamente al vino, dado que se encuentran bajo el umbral de percepción y sólo aportarían complejidad. Mientras que la ausencia de terpenos es inesperada dados los resultados obtenidos por Sadoudi et al., (2012), donde las fermentaciones monocultivo con *Cándida Zemlinina* provocaron un aumento de terpenos y lactonas. De hecho, está comprobado que las levaduras que poseen enzimas glicosidasas producen mayores concentraciones de terpenos (Viana, 2011), sin embargo, *Cándida oleophila* y *boidinii* no se caracterizan por su actividad glicosidasa sino por su capacidad de producir enzimas lipolíticas, lo que puede explicar la ausencia de terpenos en el perfil volátil de estas levaduras (Bramono et al., 2006).

En cuanto al análisis PCA, se consideró un total de 7 compuestos, los cuales cumplen los criterios establecidos en la sección 3.7.2. de la metodología. Los resultados obtenidos mostraron un total de 3 componentes principales (Anexo L), que representan el 91% de la varianza total acumulada. Las 3 componentes se correlacionan positivamente con octanoato de etilo (1,3) y 9-

decanoato de etilo (2). Con el objetivo de simplificar el análisis de resultados, en la figura 65 se muestran las 2 componentes principales, que representan el 78,1% de la varianza total acumulada, identificando esteres principalmente. Además, en el Anexo L se muestra el procedimiento realizado para obtener los valores propios.

Al analizar la figura 58, se pueden apreciar los grupos de compuestos agrupados por estrategia bioprotectora, observándose una alta reproducibilidad experimental entre las muestras. El control con *S. cerevisiae* se diferencia principalmente de las estrategias con *Cándida oleophila* y *Cándida boidinii*. En el caso de *Cándida oleophila* se asocia a compuestos alcohólicos predominantes, específicamente el feniletanol (Phenylethyl alcohol) ligado a perfiles agradables como rosa y miel. Mientras que *Cándida boidinii* se asocia al 9-decanoato de etilo y dodecanoato de etilo con un aporte aromático frutal dulce y cremoso. La estrategia que combina *Cándida oleophila* y *Cándida boidinii* se caracteriza por la producción de octanoato de etilo y decanoato de etilo, asociado con aromas afrutados y dulces a pera y damasco. Por otro lado, la fermentación realizada sin ningún tipo de bioprotección (SA), se caracteriza por el ester hexanoato de etilo, confiriéndole al mosto aromas a manzana verde, fresas, piñas y moras (Visan et al., 2018). Mientras que el control con SO₂, se caracteriza principalmente por la influencia del ester hexílico del ácido acético con aromas afrutados y florales, a melocotón y jazmín.

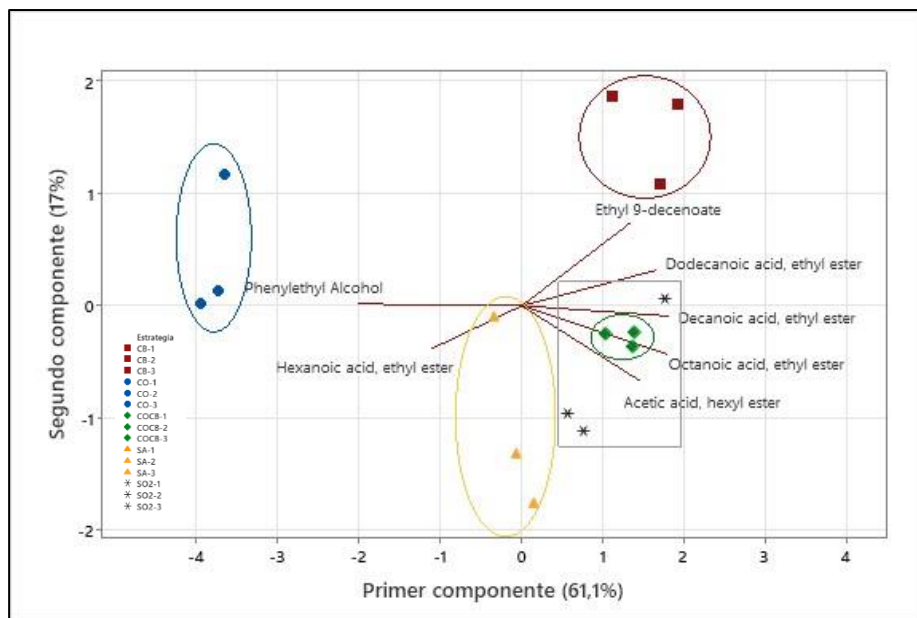


Figura 58. Gráfico de doble proyección para las diferentes estrategias de bioprotección en fermentación monocultivo utilizando distintas levaduras nativas en comparación al control con SO₂ y a la fermentación sin antimicrobiano. CO (*Cándida oleophila*), CB (*Cándida boidinii*), CO-CB (*Cándida oleophila* y *Cándida boidinii* 50/50), SA (Sin antimicrobiano) y SO₂ (Control).

Para complementar la información, la figura 59 muestra los distintos perfiles de compuestos volátiles identificados por tipo de estrategia bioprotectora. Donde se destaca que *Cándida oleophila* presenta olores únicos relacionados a flores y miel, debido al mayor porcentaje de feniletil etanol (Círculo verde), mientras que *Cándida boidinii* presenta olores afrutados y a florados distintivos como el melocotón y el jazmín (Círculo Rojo). En cuanto al SO₂ se caracteriza a olores más bien dulces, a frutas maduras como damasco, pera y algunos toques de manzana.

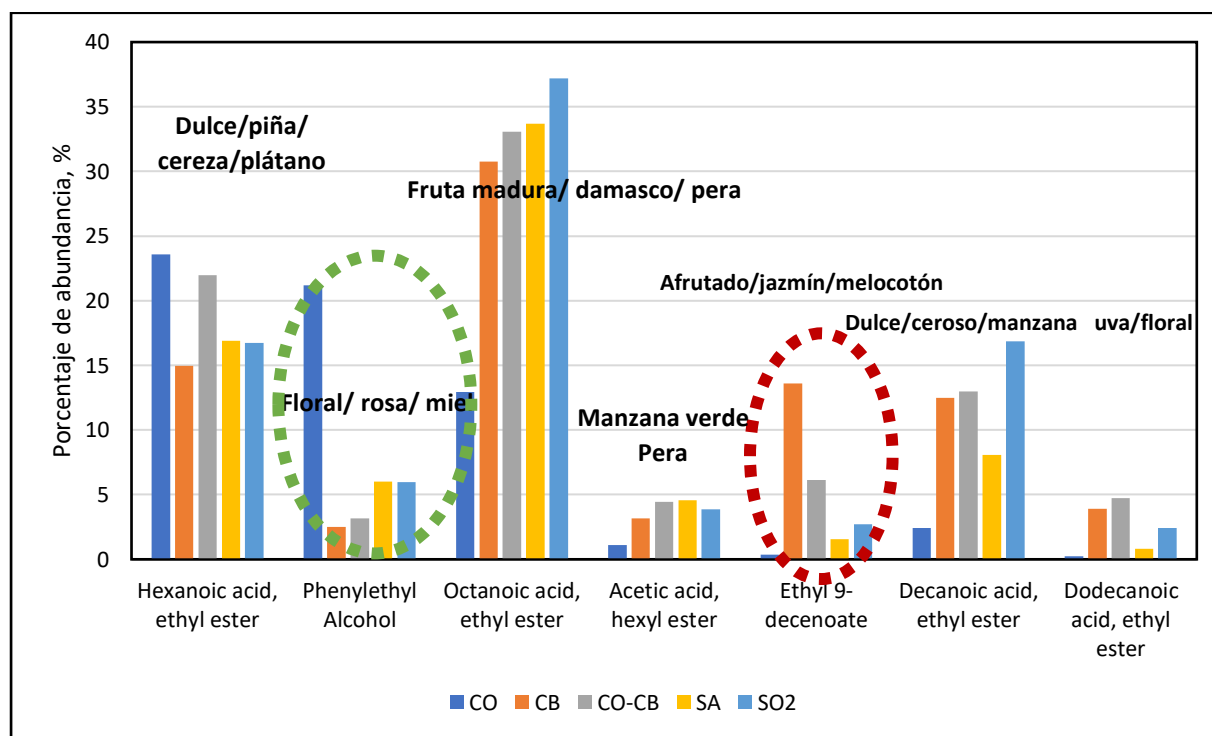


Figura 59. Perfil de compuestos volátiles identificados para las distintas estrategias bioprotectoras. En la simbología se detalla CO (*Cándida oleophila*), CB (*Cándida boidinii*), CO-CB (*Cándida oleophila/Cándida boidinii* (50/50)), SA (Sin antimicrobiano) y SO₂ (Control con sulfitos).

Cabe destacar que todas las estrategias fueron fermentadas con la levadura tradicional *S. cerevisiae*, dado que el cultivo de *no Saccharomyces* se utilizó con un rol antimicrobiano y biocontrolador más que un iniciador de la fermentación. Lo anterior explica los resultados, dado que todos producen aromas frutales que se esperan en los vinos *Sauvignon Blanc* con la levadura tradicional *S. cerevisiae* (Van Wyngaard, 2013 ; Von Mollendorf, 2013). Por otro lado, la razón de la baja producción de alcoholes encontrada en las muestras puede estar relacionada al tipo de uva. En general, las variedades de vino blanco contienen concentraciones más bajas de alcoholes

superiores que las variedades de vino tinto (Tsai et al., 2022), destacando la acción de alcoholes como el feniletil etanol en *Sauvignon blanc*.

Para analizar si hay diferencias significativas entre la producción de los distintos compuestos se realizará un análisis ANOVA Tuckey con un 95% de confiabilidad para cada uno de los compuestos volátiles producidos. Los resultados se muestran en la Tabla 28.

Tabla 28. Análisis estadístico ANOVA aplicando la prueba Tukey con un nivel de significancia del 95% (Valor $p \leq 0,05$) para los compuestos asociados a la fermentación con distintas modalidades de bioprotección.

Grupo	Compuestos Volátiles	CO (%)	CB (%)	CO-CB (%)	SA (%)	Control(%)	Valor p
Alcohol	Alcohol feniletilico	21,20±1,9a	2,5±0,18c	3,175±0,15bc	6,0±0,39b	5,949±1,14b	0,00
Ésteres	Ácido hexanoico, éster etílico	23,60±3,74a	14,961±1,24a	21,954±0,38a	16,90±3,17a	16,73±4,18a	0,06
	Ácido octanoico, éster etílico	12,96±4,31b	30,76±4,01a	33,060±1,05a	33,67±3,61a	37,20±5,11a	0,00
	Acetato de hexilo	1,084±0,27b	3,1808±0,13a	4,4325±0,06a	4,559±0,87a	3,880±0,96a	0,00
	Etil-9-decenoato	0,3468±0,05e	13,609±0,62a	6,139±0,15b	1,570±0,22d	2,723±0,36c	0,00
	Ácido decanoico, éster etílico	2,425±0,21c	12,49±3,53ab	12,965±a0,65b	8,063±0,42bc	16,86±1,96a	0,00
	Ácido dodecanoico, éster etílico	0,2494±0,05c	3,898±0,38a	4,713±0,34a	0,8042±0,04c	2,425±0,31b	0,00
Para cada compuesto volátil fermentativo, letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ($p \leq 0,05$). Los valores medios (n = 3) se muestran con su desviación estándar.							

A partir de los resultados del análisis se obtiene que hay diferencias significativas entre todos los compuestos, excepto en el hexanoato de etilo, cuyo valor p es mayor a 0,05.

Se destaca el etil 9-decenoato, cuya producción es significativamente diferente entre todas las estrategias estudiadas, mientras que en el caso del acetato de hexilo y el octanoato de etilo se destaca su baja producción cuando se utiliza la levadura *Cándida oleophila* como bioprotectora, con resultados significativamente diferentes al resto de las estrategias. Lo que concuerda con las altas concentraciones de ácido acético reportadas en el análisis químico, ya que este tipo de ester se produce por la reacción de esterificación entre un ácido (en este caso, ácido acético) y un alcohol (en este caso, hexanol); y la alta concentración de ácido acético reportada por esta estrategia en comparación al resto se podría deber a que no reaccionó con los ácidos presentes en el medio. Por otro lado, el control con SO₂ y la estrategia sin antimicrobiano presentaron porcentajes de abundancia similares y sin diferencias significativas para el alcohol feniletílico, hexanoato de etilo, octanoato de etilo y acetato de hexilo; debido a que ambas estrategias involucraron a la levadura *S. cerevisiae*; obteniendo diferencias en la producción de Etil-9-decenoato, decanoato de etilo y dodecanoato de etilo, compuestos cuyo porcentaje de abundancia fue superior en la estrategia con sulfitos.

En síntesis, se obtiene que existen diferencias entre las estrategias bioprotectoras y el control, sin embargo, dependen del compuesto aromático analizado. En general *Cándida oleophila* se comportó distinto al resto de estrategias, siendo la levadura con menor potencial al producir menor diversidad de metabolitos asociados a aromas deseados, como los esteres etílicos de ácidos grasos.

CAPITULO 5. DISCUSIÓN

Las levaduras *no Saccharomyces* de las especies *Cándida oleophila* y *Cándida boidinii* han sido poco estudiadas en la fermentación del vino. De hecho, la mayoría de los estudios actuales de bioprotección en reemplazo del SO₂ durante la fermentación se centran en levaduras *no Saccharomyces* comerciales como *Torulaspora delbrueckii* (Simonin et al., 2018), *Metschnikowia pulcherrima* (Simonin et al., 2020; Puyo et al., 2023; Lebleux et al., 2023), *Lachancea thermotolerans* (Rubio-Breton et al., 2018) y a combinaciones entre ellas (Windholtz et al., 2021). Es más, poco se habla de las levaduras del género *Cándida spp.* en vinificación, con la excepción de especies como *C. zemplinina*, *C. stellata* o *C. famata* (Magyar et al., 2011; Soden et al., 2000; Mančić et al., 2021), a pesar de las múltiples propiedades que poseen las especies pertenecientes a esta cepa, por ejemplo, la efectividad de *Cándida oleophila* se ha asociado a propiedades antifúngicas, donde la mayoría de los estudios la nombran como una levadura antagonista exitosa para el biocontrol de enfermedades postcosecha (Gao et al., 2021; Ballet et al., 2015), capaz de reducir la pudrición causada por *Penicillium spp.*, un hongo con la capacidad de descomponer las frutas. Por otro lado, *Cándida boidinii* ha estado relacionada a estudios en otras áreas, como producción enzimática y biodegradación de sustancias contaminantes. Uno de los únicos estudios que hasta la fecha ha estudiado el efecto de *Cándida oleophila* y *Cándida boidinii* como levaduras fermentativas en el vino ha sido el de Benavides et al., (2022), el cual se desarrolla sobre mosto *Sauvignon Blanc* chileno y evalúa el potencial fermentativo de estas levaduras en la producción de vino, obteniendo resultados prometedores, comprobando que estas cepas son capaces de terminar la fermentación por sí solas en estrategias monocultivo y capaces de reducir el etanol al utilizar mostos concentrados en azúcar.

En la actualidad, la bioprotección ha surgido como una respuesta a la necesidad de reducir la concentración de sulfitos en el vino, proceso que consiste en añadir microorganismos en etapas prefermentativas, generando un nicho ecológico y evitando el desarrollo de patógenos (Simonin et al., 2018). En la actualidad, existen diversas limitaciones en el ámbito de la bioprotección. Entre ellas, se destaca la escasa variabilidad de las especies de levaduras *no Saccharomyces* (LVNS) investigadas, así como la focalización de estudios principalmente en el mosto de vino tinto. Además, se evidencia una carencia de datos científicos exhaustivos que permitan una comparación integral de la composición microbiológica, química, volátil y sensorial dentro de

un mismo estudio, dado que la mayoría de las investigaciones se enfocan sólo en un perfil en específico.

Este trabajo de tesis utiliza levaduras autóctonas del género *Cándida spp.* para llevar a cabo este estudio de bioprotección en mosto blanco *Sauvignon Blanc* chileno, enfocándose principalmente en evaluar el desarrollo microbiológico, junto con los compuestos químicos y volátiles finales obtenidos, y contrastarlo con el aditivo convencional: el dióxido de azufre (SO₂). Además, se realizaron ensayos libres de antimicrobiano y biocontroladores, para evaluar el desarrollo de la microflora nativa del mosto.

5.1. Las levaduras *no Saccharomyces* utilizadas como bioprotectoras intervienen en el perfil microbiológico del vino.

Los resultados indicaron que hay una diferencia significativa en el desarrollo de bacterias y levaduras patógenas al utilizar las cepas bioprotegidas en comparación al SO₂. Donde la capacidad bioprotectora dependió de la naturaleza de la cepa utilizada, la concentración del inóculo y el microorganismo patógeno en estudio. De hecho, tal como se muestra en la Tabla 17, la levadura *Cándida oleophila* mostró un comportamiento bioprotector superior al generado por *Cándida boidinii* y por CO/CB frente a las bacterias ácidolácticas (LAB), donde el efecto biocontrolador se vio incrementado al aumentar la concentración de *Cándida oleophila* desde 1×10^6 cell/mL hasta 1×10^7 cell/mL, mostrando una dependencia de la concentración sobre el perfil microbiológico del vino al utilizar esta levadura. En la actualidad no hay investigaciones que asocien a las cepas de *Cándida spp.* como potenciales antimicrobianas contra bacterias ácidolácticas; pero, tal cual se mencionó; se ha investigado activamente el uso de *C. oleophila* en el control de enfermedades postcosecha, siendo un agente antagonista eficaz contra varios patógenos que causan pudrición, de hecho, esta levadura fue el agente activo utilizado en el primer producto comercial creado para el control de estas enfermedades; Aspire® (Droby et al., 1998); debido a su capacidad para competir por los nutrientes y el espacio (Sui et al., 2020). Si bien todas sus cualidades controladoras se asocian a enfermedades postcosecha de frutas, relacionadas principalmente a hongos, puede ser que su capacidad se extienda a bacterias ácidolácticas. De hecho, levaduras como *Metschnikowia pulcherrima* y *Lachancea thermotolerans*; biocontroladoras comprobadas de las bacterias ácidolácticas (Escribano-Viana,

et al., 2022), también han sido estudiadas como agentes antimicrobianos de enfermedades postcosecha (Bosqueiro et al., 2023), demostrando que las levaduras controladoras de hongos también podrían limitar el desarrollo de bacterias lácticas. Sin embargo, faltan estudios al respecto que lo confirmen, pero podría ser una razón del efecto antimicrobiano demostrado por *C. oleophila*, el cual logró ser superior al efecto provocado por los sulfitos cuando se utilizaba el inóculo de 1×10^7 cell/mL.

Por otro lado, es curioso que el efecto de las altas concentraciones de LAB no se haya visto reflejado en la concentración de ácido láctico (Tabla 24), dada la capacidad de las bacterias lácticas para producir este compuesto (König & Fröhlich, 2017), sin embargo, no se muestran diferencias significativas en la producción de ácido láctico entre las distintas estrategias implementadas, lo que podría explicarse en el tipo de bacterias lácticas presentes en la fermentación. Los géneros de bacterias *Leuconostoc* y *Lactococcus* son predominantes en la fermentación espontánea de *Sauvignon Blanc* chileno (Franco et al., 2021), y estas bacterias pertenecen al tipo heterofermentativo, lo que significa que su principal producto de fermentación no es el ácido láctico, sino que generan dióxido de carbono (CO_2) y etanol, como indican König & Fröhlich (2017). Este fenómeno podría explicar la ausencia de ácido láctico en los medios de fermentación sin antimicrobiano y en aquellos protegidos con *Cándida boidinii* a pesar de las altas concentraciones de bacterias ácidolácticas obtenidas.

Con respecto al resto de patógenos, *Cándida boidinii* presentó un buen comportamiento bioprotector frente a bacterias acéticas (Tabla 18) y *Brettanomyces bruxellensis* (Tabla 19). Si bien hasta la fecha no hay ningún estudio que mencione a esta levadura como un potencial antimicrobiano, la causa de su actividad controladora podría deberse a su rápido poder fermentativo en comparación a *Cándida oleophila*, capaz de producir etanol más rápido debido a su abrupto descenso en la densidad. De hecho, las tasas de reducción de densidad obtenidas en este estudio por *Cándida boidinii* fueron de 0,206 y 0,178 10g/mL/día (Tabla 15), para CB7 y CO/CB respectivamente, donde la estrategia CB7 presentó un rendimiento de $0,530 \pm 0,0076$ g etanol/g azúcar (Tabla 35), valor significativamente más alto que el resto de las estrategias, y que explica el alto porcentaje final de etanol obtenido con esta modalidad, con un 12,78 %v/v. Es más, la rápida fermentación provocada por la levadura *Cándida boidinii* ya había sido reportada en un estudio realizado por Benavides et al., (2022) sobre *Sauvignon Blanc*,

demostrando que las fermentaciones secuenciales *C. boidinii* – *S. cerevisiae* terminaban la fermentación en 8 días, mientras que el dúo *C. oleophila* – *S. cerevisiae* lo hacían en 15 días. La importancia de esto radica en que el etanol es considerado un compuesto biocontrolador activo (Di Gianvito et al., 2022), debido a que la mayoría de los microorganismos son inhibidos en presencia de altas concentraciones de este compuesto, por lo que la rápida producción de etanol por parte de las estrategias con *Cándida boidinii*, acompañado de un rápido consumo de sustrato, pudo provocar que las bacterias acéticas y la levadura *Brettanomyces bruxellensis* disminuyeran su población abruptamente durante los primeros 3 días. Cabe destacar que las bacterias lácticas no fueron controladas por la cepa bioprotectora *Cándida boidinii* durante los primeros días, pero se debe a que son resistentes a este compuesto (Pittet et al., 2011). Por el contrario, la levadura *Cándida oleophila* no pareció tener efecto alguno sobre las bacterias ácidoacéticas, notándose una disminución durante los últimos días de la fermentación que son propias de los altos niveles de etanol y de las condiciones anaeróbicas del medio, de hecho, estos resultados concuerdan con las concentraciones finales de ácido acético obtenidas (Tabla 27), compuesto producido por AAB; que fueron significativamente superiores en las estrategias con *Cándida boidinii* y la fermentación sin antimicrobiano.

Por su parte, la acción antimicrobiana del SO₂ se destacó principalmente en bacterias ácidolácticas, ya que frente a bacterias ácidoacéticas tuvo un efecto limitado (Tabla 18), dado que este compuesto tiene un control pobre sobre este tipo de microorganismos, en efecto, está demostrado que las poblaciones de BAA no poseen sensibilidad al antimicrobiano, por lo que pueden continuar su crecimiento a pesar de la presencia de sulfitos en el medio (Andorrà et al., 2008; González et al., 2005). Por otro lado, el efecto de este aditivo químico sobre *Brettanomyces bruxellensis* también fue escaso (Tabla 19), de hecho, algunas cepas de esta levadura son tolerantes a las dosis de SO₂ utilizadas habitualmente en vinificación (Avramova et al., 2018), por lo que una hipótesis podría ser que las cepas encontradas en el mosto correspondían principalmente a ellas, provocando que su población no disminuyera sólo al agregar sulfitos. Sin embargo, para asegurarlo hay que realizar análisis más complejos que permitan identificar las especies.

5.2. La abundancia de levaduras no *Saccharomyces* a lo largo de la fermentación se vio fuertemente afectada por la cepa bioprotectora implementada

A diferencia de *Cándida oleophila*, la levadura *Cándida boidinii* persiste hasta el final de la fermentación alcohólica y probablemente participa en el proceso de fermentación de azúcares lo cual se evidencia en los resultados de abundancia (Figura 42 y 43).

La abundancia de LVNS totales presentes entre media y el final de la fermentación en las estrategias bioprotegidas con *Cándida oleophila* son bajas, de hecho, más del 90% del total de levaduras son levaduras del género *Saccharomyces* (Figura 40 y 41), mientras que en la estrategias bioprotegidas con *Cándida boidinii* a media fermentación (día 8) las LVNS representan el 33,1% para CB6 y el 40% para la estrategia CB7; de hecho, la abundancia aumenta aún más en la estrategia bioprotectora mixta *Cándida oleophila/Cándida boidinii*, donde a media fermentación (día 6) se tiene un porcentaje de abundancia de un 51,9% (Figura 44). Las diferencias obtenidas se basan principalmente en el metabolismo propio de las levaduras, los cuales no tienen la misma respuesta a las condiciones del medio, incluso cuando se trata de especies de un mismo género como es el caso de *Cándida boidinii* y *Cándida oleophila*. Una posible hipótesis de estas diferencias obtenidas podría estar relacionada a la producción de etanol, donde altas concentraciones alterarían el metabolismo de *C. oleophila* llevándola hasta la muerte celular.

Está demostrado que la síntesis de etanol a lo largo de la fermentación influencia directamente el crecimiento de levaduras *no Saccharomyces* nativas, donde concentraciones superiores al 5-7 (%v/v) provocan la muerte celular de estas especies (Heard & Fleet, 1988) sin embargo, tal como lo plantea Mills et al. (2002), hay cepas tolerantes a este compuesto, como *Cándida stellata*, que demostró tolerancias al etanol similares a *S. cerevisiae* en fermentaciones de vino botritizadas; otro estudio realizado por Wayman & Parekh. (1985), demostró que la levadura *Cándida Shehatae* ATCC 22984 logra tolerar concentraciones de etanol de hasta 80g/L sin alterar su capacidad fermentativa, la cual se redujo hasta detenerse por completo a concentraciones de 100g/L de etanol; sin embargo, la levadura no moría, sólo detenía su metabolismo. Es más, un estudio realizado para evaluar la microflora nativa del mosto Riesling en la bodega Heymann-Löwenstein (Bajo Mosela, Alemania), encontró células vivas de *C. boidinii* hasta el final de la fermentación (König & Claus, 2018), demostrando el potencial de esta cepa para tolerar altas concentraciones de etanol a diferencia de *Cándida oleophila*, que probablemente vea afectado su metabolismo frente a los cambios del entorno. Por otro lado, el

estudio realizado por Benavides et al. (2022) demostró que *Cándida oleophila* podía terminar la fermentación en vinos *Sauvignon Blanc* chilenos a 15°C en estrategias monocultivo alcanzando concentraciones de etanol de 12,10 %v/v, lo que podría ser contradictorio con lo anteriormente planteado, sin embargo es importante destacar que las temperaturas influyen directamente en el comportamiento de las levaduras y que en el caso de esta investigación, el cambio de temperatura ocurrido al tercer día; al pasar de maceración prefermentativa a fermentación (desde 10°C hasta 20°C); pudo provocar cambios en el metabolismo de *Cándida oleophila*.

Otra hipótesis probable pueden ser las interacciones levadura-levadura, donde *Saccharomyces cerevisiae* podría inducir la muerte celular de *Cándida oleophila* o una disminución en su metabolismo secretando enzimas con actividad glucanasa (Magliani et al., 1997), compuestos proteicos (Pérez-Nevado et al., 2006) y/o péptidos antimicrobianos (Branco et al., 2014), de hecho, muchos estudios confirman que muchas veces la falta de cultivabilidad de especies *no Saccharomyces* está relacionada a la presencia de *Saccharomyces* en lugar de etanol (Granchi et al., 1998).

5.3. La rápida fermentación provocada por el inóculo mixto bioprotector *Cándida oleophila*/*Cándida boidinii* no afectó su perfil volátil.

El efecto del inóculo mixto provocó mayores abundancias en la población de levaduras *no Saccharomyces* (Figuras 40-44), lo que ocasionó una fermentación más rápida (Figura 36) y con un menor porcentaje de etanol (Tabla 24), diferenciándose de la estrategia con sulfitos. Sin embargo, el perfil volátil obtenido no presenta diferencias, y de hecho CO/CB fue la estrategia bioprotectora con una mayor similitud significativa con respecto al control en la producción de compuestos volátiles, destacándose por su similitud en la concentración de hexanoato de etilo, octanoato de etilo y acetato de hexilo. De hecho, la única diferencia destacable fue la producción de Etil-9-decenoato en mayores concentraciones por la estrategia bioprotectora, compuesto que proporciona aromas afrutados y florales a melocotón y jazmín, proporcionando aún mayor complejidad aromática al vino.

Una hipótesis con respecto a esto podría ser el efecto provocado al combinar las 3 levaduras, dado que CO/CB es la única estrategia donde tanto *Cándida oleophila*, *Cándida boidinii* y

Saccharomyces cerevisiae participan en conjunto, y su interacción pudo provocar que una cepa predominará sobre otras, en este caso *Saccharomyces cerevisiae*.

De hecho pudo producirse una complementariedad metabólica, donde 2 o más especies complementan sus capacidades y son más eficientes en el consumo de nutrientes, provocando una sinergia interespecies y probablemente la producción de una mayor variedad de enzimas que pueden acelerar la descomposición de sustratos complejos en productos finales, de hecho, las interacciones levadura-levadura pueden ser tan importantes como la composición del consorcio de levaduras en el vino, influyendo en la variación de la población y la dominancia durante la fermentación (Zilelidou et al., 2021).

5.4. Las levaduras no *Saccharomyces*, aplicadas como bioprotección afectan la composición volátil final del vino.

Con las condiciones experimentales utilizadas se obtuvieron vinos sin compuestos desagradables asociados principalmente a carácter afrutado, pero que pudieron diferenciarse según el tipo de antimicrobiano utilizado.

Los vinos pudieron diferenciarse según la naturaleza de las especies utilizadas, donde aquellos bioprotegidos con *Cándida oleophila* se caracterizaron por altas concentraciones de alcohol fenetílico (2-feniletanol), diferenciándose significativamente del resto de las estrategias que se destacaron por la producción de esteres etílicos de ácidos grasos lineales (Figura 59). La estrategia con *Cándida oleophila* se caracterizó por presentar bajas abundancias de levaduras no *Saccharomyces* desde media fermentación en adelante (Figura 40 y 41) y concentraciones altas de *Brettanomyces bruxellensis* (Tabla 19), lo que podría estar relacionado con las altas concentraciones de 2-feniletanol. Un estudio realizado por Lindsay et al. (2022), demostró el potencial de *Brettanomyces bruxellensis* para producir alcohol feniletílico natural en la fermentación del orujo de zanahoria a través de la vía de Ehrlich, donde ocurre la bioconversión de fenilalanina en 2-feniletanol; por lo que esta capacidad de *Brettanomyces bruxellensis* también podría asociarse a mosto de uva. Además, actualmente ya se han investigado otras levaduras debido a su capacidad para producir alcohol feniletílico, de hecho, un estudio realizado por Ghosh et al. (2008), demostró la aptitud de *Cándida albicans* para producir este compuesto, por lo que una hipótesis podría ser que *Cándida oleophila* también produzca este compuesto. Sin embargo, la baja abundancia de LVNS desde media fermentación en adelante

desencadenan otra hipótesis asociada a los lípidos; liberados por la muerte celular de *Cándida oleophila*; los cuales reprimen a las enzimas alcohol acetil transferasas (ATF), disminuyendo la síntesis de esteres a partir de alcoholes superiores (Fujii et al., 1997). De hecho, un estudio actual realizado por Guittin et al. (2021) sobre vino blanco, demostró que la alta turbidez del mosto asociada a altas concentraciones de lípidos promovió la síntesis de compuestos volátiles como isobutanol, 2-feniletanol y metionol.

Otro aspecto relevante en los resultados del perfil volátil corresponde a la estrategia con *Cándida boidinii*, la cual produjo altas concentraciones de Etil-9-decenoato, con un porcentaje de abundancia del 13,61% (Figura 59), seguida por la estrategia mixta *Cándida oleophila/Cándida boidinii* con un 6,14% de abundancia, mientras que el resto de las modalidades presentaron bajos porcentajes de abundancia de este compuesto. Una posible razón de esto podría ser la presencia de bacterias lácticas en el medio, dado que el bioprotector *Cándida boidinii* no fue capaz de controlar adecuadamente a estos microorganismos. Un estudio realizado por Wang et al.(2022) acerca del efecto de los cultivos iniciadores sobre los compuestos aromáticos y la microbiota del vino, demostró que aquellos vinos con mayor población de bacterias *Leuconostoc* y *Lactobacillus* se correlacionaron positivamente con el 9-decenoato de etilo, sin embargo aún no se establece una directa relación entre las bacterias lácticas y las vías de producción de este compuesto, además que el estudio fue realizado sobre Cabernet Sauvignon y no sobre Sauvignon blanc.

Los vinos control elaborados sólo con la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, es decir la estrategia con SO₂ se caracterizaron por la presencia de esteres de ácidos grasos, como hexanoato de etilo, octanoato de etilo, decanoato de etilo y dodecanoato de etilo, lo que concuerda con lo reportado en la literatura en vinos *Sauvignon Blanc* fermentados con *Saccharomyces cerevisiae* (Coetzee et al., 2012). De hecho, un estudio realizado para evaluar el efecto del SO₂ sobre mosto *Sauvignon Blanc* demostró que los esteres etílicos hexanoato de etilo, octanoato de etilo y decanoato de etilo se produjeron en cantidades mayores en aquellos vinos con adición de sulfitos en comparación a los que no los tenían (Coetzee et al., 2012).

En general, el perfil volátil no se vio afectado al utilizar bioprotectores, y de hecho estos confirieron complejidad aromática al vino, en especial *Cándida boidinii*. Sin embargo, *Cándida*

oleophila tuvo un perfil muy distinto al control, y al resto de las modalidades, con bajas concentraciones de esteres y menor cantidad de compuestos volátiles.

CAPITULO 6. CONCLUSIONES

Tras los resultados se concluye que las levaduras bioprotectoras del género *Cándida* son capaces de controlar de manera eficaz la microflora deteriorante del mosto *Sauvignon Blanc* chileno. Sin embargo, se evidencia que la eficacia de estas levaduras depende de la cepa seleccionada, ya sea *C. oleophila* o *C. boidinii*, la concentración del inoculo inicial; 1×10^6 o 1×10^7 cell/mL y el microorganismo deteriorante específico que se pretende controlar.

Cándida oleophila posee un control comparable y superior al del SO_2 sobre las bacterias ácidolácticas, alcanzando concentraciones de 4,885 y 4,753 log(ufc/mL) para CO6 y CO7 respectivamente al final de la maceración prefermentativa. Por otro lado, *Cándida boidinii* demostró un control más efectivo sobre las bacterias acéticas y la levadura *Brettanomyces bruxellensis* en comparación con el SO_2 , obteniendo concentraciones finales de 5,0; 5,286 y 6,195 log(ufc/mL) para CB6, CB7 y SO_2 en el caso del ácido acético, y de 6,07; 4,778 y 6,136 log(ufc/mL) para CB6, CB7 y SO_2 , respectivamente. Por su parte, el inoculo mixto CO/CB controló tanto las bacterias acéticas como *Brettanomyces bruxellensis*, con concentraciones finales de 5,602 y 5,477 log(ufc/mL), destacando su eficacia especialmente contra esta última.

Al evaluar el impacto de los bioprotectores en el perfil microbiológico del vino, se concluye que no es posible designar a una levadura bioprotectora como sustituto total del SO_2 , dado que todas fueron eficaces únicamente frente a algunos microorganismos patógenos. Sin embargo, mientras mayor es el inoculo inicial de levadura bioprotectora mayor es la protección.

En relación con el perfil químico, no se observaron diferencias significativas en la producción de ácido láctico, ácido málico, ácido tartárico, glicerol ni en la concentración de azúcar residual entre las estrategias bioprotectoras y el control. No obstante, se registraron diferencias en las concentraciones finales de ácido acético y etanol. La fermentación llevada a cabo por el bioprotector *Cándida oleophila* presentó una concentración final de 0,267 g/L de ácido acético, significativamente superior al control. Por su parte, el bioprotector *Cándida boidinii* presentó una concentración final de etanol de un 12,78 %v/v, siendo significativamente superior al resto de las estrategias y al control, que registró una concentración final de 11,98 %v/v. Ambos valores, sin embargo, no superaron los límites máximos tolerables para *Sauvignon Blanc*, concluyendo que el perfil químico no se ve alterado al utilizar bioprotectores en lugar de SO_2 .

Finalmente, en cuanto al perfil volátil, se destaca la producción de ésteres etílicos de ácidos grasos con aromas afrutados, como hexanoato de etilo, octanoato de etilo, decanoato de etilo y dodecanoato de etilo y no se obtuvieron diferencias significativas importantes con respecto al control, excepto en la estrategia con *Cándida oleophila*, que presentó un comportamiento con mayor concentración de alcoholes, en específico el 2-feniletanol, alcanzando un porcentaje de abundancia del 21,20%, mientras que en el control fue de un 5,95%. Esta estrategia se destacó por sus aromas a rosa y miel, diferenciándose de los aromas frutales del resto de los ensayos. En consecuencia, el uso del bioprotector *Cándida oleophila* modifica significativamente el perfil volátil del vino, mientras que el resto de las estrategias bioprotectoras no influyen en él.

En el contexto de la reducción de sulfitos, los resultados confirman el potencial de *Cándida boidinii* como cepa bioprotectora, ya que *Cándida oleophila* presentó un perfil aromático con baja abundancia de ésteres y nula capacidad para controlar efectivamente las bacterias ácidoacéticas y la levadura *Brettanomyces bruxellensis*. Sin embargo, debido a que *Cándida boidinii* no es eficaz contra bacterias lácticas, no es posible reemplazar totalmente al SO₂, y deberían evaluarse estudios que combinen la bioprotección con sulfitos o a las levaduras *Cándida oleophila* y *Cándida boidinii* en distintas proporciones, dado que con el inóculo mixto 50:50, no se pudo concluir un efecto antimicrobiano realmente efectivo contra LAB.

CAPÍTULO 7. RECOMENDACIONES

Esta sección tiene como objetivo entregar un resumen de las sugerencias a realizar para futuras investigaciones, en las cuales se recomiendan mejoras a la metodología. Estas se presentan a continuación a modo de punteo:

- Utilizar técnicas de identificación genética para identificar especies de Levadura *no Saccharomyces* y cepas de bacterias presentes en el mosto. Esto permitirá asegurar si hay participación de los bioprotectores en la fermentación y verificar la correcta implantación de la cepa bioprotectora, además de identificar las levaduras nativas del mosto. Los estudios pueden realizarse mediante PCR cuantitativa o EM MALDI-TOF.
- Utilizar otras concentraciones en el inóculo inicial de bioprotector, con el objetivo de estudiar el efecto de la concentración en la capacidad bioprotectora de la levadura, además de probar inóculos mixtos a diferentes proporciones; no sólo 50:50.
- Realizar controles con bioprotectores comerciales probados y autorizados, como la combinación de *Torulaspora delbrueckii*/ *Metschnikowia pulcherrima*, ZYMAFLORE® EGIDE, con el objetivo de comparar los resultados obtenidos con un control bioprotector.
- Agregar la cepa bioprotectora directamente sobre la uva durante la cosecha mediante maquinas o aspersores, de la misma manera que se agrega el SO₂ en las uvas sulfitadas, y verificar si las cepas del género *Cándida spp.* podrían ser bioprotectoras eficientes en etapas prefermentativas.
- Incluir la evaluación sensorial a los análisis, dado que es fundamental para garantizar la calidad y consistencia del producto obtenido en base a una opinión experta que identifica los defectos y problemas enológicos clave.

CAPITULO 8. REFERENCIAS

- Abee, T., Krockel, L., & Hill, C. (1995). Bacteriocins: modes of action and potentials in food preservation and control of food poisoning. *International journal of food microbiology*, 28(2), 169-185.
- Acikgoz, E., & Ozcan, B. (2016). Phenol biodegradation by halophilic archaea. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 107, 140-146.
- Ackermann, M. (2015). A functional perspective on phenotypic heterogeneity in microorganisms. *Nature Reviews Microbiology*, 13(8), 497-508.
- Agnolucci, M., Tirelli, A., Cocolin, L., & Toffanin, A. (2017). *Brettanomyces bruxellensis* yeasts: Impact on wine and winemaking. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33, 1-6.
- Aguilar Uscanga, M. G., Délia, M. L., & Strehaiano, P. (2003). *Brettanomyces bruxellensis*: effect of oxygen on growth and acetic acid production. *Applied microbiology and biotechnology*, 61, 157-162.
- Aktan, N., Yildirim, M., & Murathan, C. (2014). Almost f-cosymplectic manifolds. *Mediterranean Journal of Mathematics*, 11, 775-787.
- Alasmar, R., Ul-Hassan, Z., Zeidan, R., Al-Thani, R., Al-Shamary, N., Alnaimi, H., ... & Jaoua, S. (2020). Isolation of a novel *Kluyveromyces marxianus* strain QKM-4 and evidence of its volatilome production and binding potentialities in the biocontrol of toxigenic fungi and their mycotoxins. *ACS omega*, 5(28), 17637-17645.
- Alexandre, H., Puyo, M., & Tourdot-Maréchal, R. (2023). Bioprotection in Winemaking.
- Álvarez-Fernández, M. A., Fernández-Cruz, E., Cantos-Villar, E., Troncoso, A. M., & García-Parrilla, M. C. (2018). Determination of hydroxytyrosol produced by winemaking yeasts during alcoholic fermentation using a validated UHPLC–HRMS method. *Food chemistry*, 242, 345-351.
- Amato, M., Ballco, P., López-Galán, B., De Magistris, T., & Verneau, F. (2017). Exploring consumers' perception and willingness to pay for "Non-Added Sulphite" wines through experimental auctions: A case study in Italy and Spain. *Wine Economics and Policy*, 6(2), 146-154.
- Andorrà, I., Martín, L., Nart, E., Puxeu, M., Hidalgo, C., & Ferrer-Gallego, R. (2018). Effect of grape juice composition and nutrient supplementation on the production of sulfur dioxide and carboxylic compounds by *Saccharomyces cerevisiae*. *Australian journal of grape and wine research*, 24(2), 260-266.
- Andorrà, Imma, et al. "Effect of oenological practices on microbial populations using culture-independent techniques." *Food Microbiology* 25.7 (2008): 849-856.
- Atanasova, V., Fulcrand, H., Cheynier, V., & Moutounet, M. (2002). Effect of oxygenation on polyphenol changes occurring in the course of wine-making. *Analytica Chimica Acta*, 458(1), 15-27.
- Avramova, Marta, et al. "Molecular diagnosis of *Brettanomyces bruxellensis*' sulfur dioxide sensitivity through genotype specific method." *Frontiers in Microbiology* 9 (2018): 1260.

- Ballet, N., J. L. Souche, and P. Vandekerckove. "Efficacy of *Cándida oleophila*, strain O, in preventing postharvest diseases of fruits." III International Symposium on Postharvest Pathology: Using Science to Increase Food Availability 1144. 2015.
- Barbe, J. C., De Revel, G., Joyeux, A., Bertrand, A., & Lonvaud-Funel, A. (2001). Role of botrytized grape micro-organisms in SO₂ binding phenomena. *Journal of Applied Microbiology*, 90(1), 34-42.
- Barbosa, P., Araujo, P., Oliveira, J., Fraga, I., Pissarra, J., & Amaral, C. (2019). Metabolic pathways of degradation of malvidin-3-O-monoglucoside by *Cándida oleophila*. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 144, 104768.
- Barnett, J. A., & Entian, K. D. (2005). A history of research on yeasts 9: regulation of sugar metabolism 1. *Yeast*, 22(11), 835-894.
- Bar-Shimon, M., Yehuda, H., Cohen, L., Weiss, B., Kobeshnikov, A., Daus, A., ... & Droby, S. (2004). Characterization of extracellular lytic enzymes produced by the yeast biocontrol agent *Cándida oleophila*. *Current genetics*, 45, 140-148.
- Bartowsky, EJ (2009). Deterioro bacteriano del vino y estrategias para minimizarlo. *Cartas en microbiología aplicada*, 48 (2), 149-156.
- Bartowsky, EJ y Henschke, PA (2008). Deterioro del vino tinto embotellado por bacterias ácidoacéticas: una revisión. *Revista internacional de microbiología de alimentos*, 125 (1), 60-70.
- Bauer, M. A., Kainz, K., Carmona-Gutierrez, D., & Madeo, F. (2018). Microbial wars: competition in ecological niches and within the microbiome. *Microbial cell*, 5(5), 215.
- Bauer, R., Nel, H. A., & Dicks, L. M. (2003). Pediocin PD-1 as a method to control growth of *Oenococcus oeni* in wine. *American journal of enology and viticulture*, 54(2), 86-91.
- Bell, S. J., & Henschke, P. A. (2005). Implications of nitrogen nutrition for grapes, fermentation and wine. *Australian journal of grape and wine research*, 11(3), 242-295.
- Bely, M., Sablayrolles, JM y Barre, P. (1990). Detección automática de carencias de nitrógeno asimilable durante la fermentación alcohólica en condiciones enológicas. *Revista de fermentación y bioingeniería*, 70 (4), 246-252.
- Bely, M., Stoeckle, P., Masneuf-Pomarède, I., & Dubourdieu, D. (2008). Impact of mixed *Torulaspora delbrueckii*–*Saccharomyces cerevisiae* culture on high-sugar fermentation. *International journal of food microbiology*, 122(3), 312-320.
- Benavides, S., Franco, W., Ceppi De Lecco, C., Durán, A. y Urtubia, A. (2022). Evaluación de *Cándida oleophila* y *Cándida boidinii* autóctonas en monocultivo y fermentaciones secuenciales: impacto en la reducción de etanol y perfil químico en vinos sauvignon blanc chilenos. *Revista de hongos*, 8 (3), 259.
- Binati, R. L., Salvetti, E., Bzducha-Wróbel, A., Bašinskienė, L., Čižeikienė, D., Bolzonella, D., & Felis, G. E. (2021). Non-conventional yeasts for food and additives production in a circular economy perspective. *FEMS Yeast Research*, 21(7), foab052.
- Bisson, L. F., & Walker, G. A. (2015). The microbial dynamics of wine fermentation. In *Advances in fermented foods and beverages* (pp. 435-476). Woodhead Publishing.

- Blateyron, L. y Sablayrolles, JM (2001). Fermentaciones estancadas y lentas en enología: estudio estadístico de las causas y eficacia de las adiciones combinadas de oxígeno y fosfato diamónico. *Revista de biociencia y bioingeniería* , 91 (2), 184-189.
- Bokulich, NA, Thorngate, JH, Richardson, PM y Mills, DA (2014). La biogeografía microbiana de las uvas para vinificación está condicionada por el cultivo, la cosecha y el clima. *Actas de la Academia Nacional de Ciencias* , 111 (1), E139-E148.
- Bordet, F., Joran, A., Klein, G., Roullier-Gall, C., & Alexandre, H. (2020). Yeast–yeast interactions: mechanisms, methodologies and impact on composition. *Microorganisms*, 8(4), 600.
- Bosqueiro, Ariane Silva, Rodolfo Bizarria Jr, and Márcia Maria Rosa-Magri. "Biocontrol of post-harvest tomato rot caused by *Alternaria arborescens* using *Torulaspora indica*." *Biocontrol Science and Technology* 33.2 (2023): 115-132.
- Boulton, R. B., Singleton, V. L., Bisson, L. F., Kunkee, R. E., Boulton, R. B., Singleton, V. L., ... & Kunkee, R. E. (1999). The role of sulfur dioxide in wine. *Principles and practices of winemaking*, 448-473.
- Boulton, RB, Singleton, VL, Bisson, LF y Kunkee, RE (2013). *Principios y prácticas de la elaboración del vino* . Medios de ciencia y negocios de Springer.
- Bramono, K., Yamazaki, M., Tsuboi, R., & Ogawa, H. (2006). Comparison of proteinase, lipase and alpha-glucosidase activities from the clinical isolates of *Cándida* species. *Japanese journal of infectious diseases*, 59(2), 73.
- Branco, Patrícia, et al. "Identification of novel GAPDH-derived antimicrobial peptides secreted by *Saccharomyces cerevisiae* and involved in wine microbial interactions." *Applied microbiology and biotechnology* 98 (2014): 843-853.
- Buzrul, S. (2012). High hydrostatic pressure treatment of beer and wine: A review. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 13, 1-12.
- Cabaroğlu, T., & Canbaş, A. (1993). Şarapçılıkta kükürt dioksit kullanımı ve önemi. *Gıda*, 18(1).
- Cacho, J., Castells, J. E., Esteban, A., Laguna, B., & Sagristá, N. (1995). Iron, copper, and manganese influence on wine oxidation. *American Journal of Enology and Viticulture*, 46(3), 380-384.
- Campaniello, D. y Sinigaglia, M. (2017). Fenómenos de deterioro del vino. En *La calidad microbiológica de los alimentos* (págs. 237-255). Publicación Woodhead.
- Carrascosa, A., Fernández, JM, Ferrández, Á., López-Siguero, JP, López, D., Sánchez, E., & Colaborador, G. (2011). Estudios españoles de crecimiento 2010. *Rev Esp Endocrinol Pediatr* , 2 (1), 59-62.
- Castelli, T. (1954). Les agents de la fermentation vinaire. *Archiv für Mikrobiologie*, 20, 323-342.
- Chandel, NS (2021). Señalización y metabolismo. *Perspectivas de Cold Spring Harbor en biología* , 13 (2), a040600.

- Chasseriaud, L., Miot-Sertier, C., Coulon, J., Iturmendi, N., Moine, V., Albertin, W., & Bely, M. (2015). A new method for monitoring the extracellular proteolytic activity of wine yeasts during alcoholic fermentation of grape must. *Journal of microbiological methods*, 119, 176-179.
- Chatonnet, P., Dubourdie, D., Boidron, JN y Pons, M. (1992). El origen de los etilfenoles en los vinos. *Revista de Ciencias de la Alimentación y la Agricultura* , 60 (2), 165-178.
- Chen, L., & Darriet, P. (2021). Strategies for the identification and sensory evaluation of volatile constituents in wine. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 20(5), 4549-4583.
- Cheynier, V., Basire, N., & Rigaud, J. (1989). Mechanism of trans-caffeoyltartaric acid and catechin oxidation in model solutions containing grape polyphenoloxidase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 37(4), 1069-1071.
- Cheynier, V., Owe, C., & Rigaud, J. (1988). Oxidation of grape juice phenolic compounds in model solutions. *Journal of Food Science*, 53(6), 1729-1732.
- Christiaen, S. E., Brackman, G., Nelis, H. J., & Coenye, T. (2011). Isolation and identification of quorum quenching bacteria from environmental samples. *Journal of microbiological methods*, 87(2), 213-219.
- Christofi, S., Malliaris, D., Katsaros, G., Panagou, E., & Kallithraka, S. (2020). Limit SO₂ content of wines by applying High Hydrostatic Pressure. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 62, 102342.
- Chung, W., & Hancock, R. E. (2000). Action of lysozyme and nisin mixtures against lactic acid bacteria. *International journal of food microbiology*, 60(1), 25-32.
- Ciani, M., Comitini, F., Mannazzu, I., & Domizio, P. (2010). Controlled mixed culture fermentation: a new perspective on the use of non-*Saccharomyces* yeasts in winemaking. *FEMS yeast research*, 10(2), 123-133.
- Ciani, M., Morales, P., Comitini, F., Tronchoni, J., Canonico, L., Curiel, J. A., ... & Gonzalez, R. (2016). Non-conventional yeast species for lowering ethanol content of wines. *Frontiers in Microbiology*, 7, 642.
- Clark, A. C., & Scollary, G. R. (2002). Copper (II)-mediated oxidation of (+)-catechin in a model white wine system. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 8(3), 186-195.
- Clemente-Jimenez, J. M., Mingorance-Cazorla, L., Martínez-Rodríguez, S., Las Heras-Vázquez, F. J., & Rodríguez-Vico, F. (2004). Molecular characterization and oenological properties of wine yeasts isolated during spontaneous fermentation of six varieties of grape must. *Food microbiology*, 21(2), 149-155.
- Coetzee, Carien, and Wessel Johannes du Toit. "A comprehensive review on Sauvignon blanc aroma with a focus on certain positive volatile thiols." *Food Research International* 45.1 (2012): 287-298.
- Contreras, A., Hidalgo, C., Henschke, P. A., Chambers, P. J., Curtin, C., & Varela, C. (2014). Evaluation of non-*Saccharomyces* yeasts for the reduction of alcohol content in wine. *Applied and environmental microbiology*, 80(5), 1670-1678.
- Cordente, AG, Curtin, CD, Varela, C. y Pretorius, IS (2012). Levaduras de vino aromatizantes. *Microbiología y Biotecnología Aplicadas* , 96 , 601-618.

- Costa, A., Barata, A., Malfeito-Ferreira, M., & Loureiro, V. (2008). Evaluation of the inhibitory effect of dimethyl dicarbonate (DMDC) against wine microorganisms. *Food microbiology*, 25(2), 422-427.
- Costello, P. J., Henschke, P. A., & Markides, A. J. (2003). Standardised methodology for testing malolactic bacteria and wine yeast compatibility. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 9(2), 127-137.
- Crespo, JV (1997). Aspectos microbiológicos y bioquímicos de la crianza biológica de los vinos de jerez (Tesis doctoral, Universidad Politécnica de Madrid).
- Cuijvers, K., Van Den Heuvel, S., Varela, C., Rullo, M., Solomon, M., Schmidt, S., & Borneman, A. (2020). Alterations in yeast species composition of uninoculated wine ferments by the addition of sulphur dioxide. *Fermentation*, 6(2), 62.
- Danilewicz, J. C. (2007). Interaction of sulfur dioxide, polyphenols, and oxygen in a wine-model system: Central role of iron and copper. *American Journal of Enology and Viticulture*, 58(1), 53-60.
- Danilewicz, J. C. (2013). Reactions involving iron in mediating catechol oxidation in model wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 64(3), 316-324.
- Danilewicz, J. C. (2016). Fe (II): Fe (III) ratio and redox status of white wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 67(2), 146-152.
- De Lerma, N. L., García-Martínez, T., Moreno, J., Mauricio, J. C., & Peinado, R. A. (2012). Volatile composition of partially fermented wines elaborated from sun dried Pedro Ximénez grapes. *Food chemistry*, 135(4), 2445-2452.
- De Martin, A. M. (2005). Control del metabolismo de *Saccharomyces cerevisiae* en la síntesis de glutatión. (Editorial de la Universidad de Granada, Ed.). UNIVERSIDAD DE GRANADA.
- del Alamo-Sanza, M., & Nevares, I. (2014). Recent advances in the evaluation of the oxygen transfer rate in oak barrels. *Journal of agricultural and food chemistry*, 62(35), 8892-8899.
- Delfini, C., Cersosimo, M., Del Prete, V., Strano, M., Gaetano, G., Pagliara, A., & Ambrò, S. (2004). Resistance screening essay of wine lactic acid bacteria on lysozyme: efficacy of lysozyme in unclarified grape musts. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(7), 1861-1866.
- Delfini, C., Conterno, L., Carpi, G., Rovere, P., Tabusso, A., Cocito, C., & Amati, A. (1995). Microbiological stabilisation of grape musts and wines by high hydrostatic pressures. *Journal of wine research*, 6(2), 143-151.
- Delfini, C., Gaia, P., Schellino, R., Strano, M., Pagliara, A., & Ambrò, S. (2002). Fermentability of grape must after inhibition with dimethyl dicarbonate (DMDC). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(20), 5605-5611.
- DELIA-DUPUY, M. L., De Miniac, M., Phowchinda, O., & Strehaiano, P. (1995). Contamination par les levures *Brettanomyces* dans les fermentations alcooliques. *MAN Microbiologie, aliments, nutrition*, 13(4), 349-359.
- Di Gianvito, P., Englezos, V., Rantsiou, K., & Cocolin, L. (2022). Bioprotection strategies in winemaking. *International Journal of Food Microbiology*, 364, 109532.

Di Gianvito, Paola, et al. "Bioprotection strategies in winemaking." *International Journal of Food Microbiology* 364 (2022): 109532.

Diario financiero.(2022).
https://www.df.cl/noticias/site/docs/20230728/20230728211400/suplemento_20230730_a.pdf

Diesler, K., Golombek, P., Kromm, L., Scharfenberger-Schmeer, M., Durner, D., Schmarr, H. G., ... & Fischer, U. (2019). UV-C treatment of grape must: Microbial inactivation, toxicological considerations and influence on chemical and sensory properties of white wine. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 52, 291-304.

Divol, B., du Toit, M., & Duckitt, E. (2012). Surviving in the presence of sulphur dioxide: strategies developed by wine yeasts. *Applied microbiology and biotechnology*, 95, 601-613.

Divol, B., Strehaiano, P., & Lonvaud-Funel, A. (2005). Effectiveness of dimethyldicarbonate to stop alcoholic fermentation in wine. *Food Microbiology*, 22(2-3), 169-178.

Donalies, U. E., & Stahl, U. (2002). Increasing sulphite formation in *Saccharomyces cerevisiae* by overexpression of MET14 and SSU1. *Yeast*, 19(6), 475-484.

dos Santos, M. M., Gombert, A. K., Christensen, B., Olsson, L., & Nielsen, J. (2003). Identification of in vivo enzyme activities in the cometabolism of glucose and acetate by *Saccharomyces cerevisiae* by using ¹³C-labeled substrates. *Eukaryotic Cell*, 2(3), 599-608.

Droby, S. y Lichter, A. (2007). Infección por Botrytis poscosecha: etiología, desarrollo y manejo. En *Botrytis: biología, patología y control* (págs. 349-367). Dordrecht: Springer Países Bajos.

Droby, S., et al. "Commercial testing of Aspire: a yeast preparation for the biological control of postharvest decay of citrus." *Biological control* 12.2 (1998): 97-101.

Droby, S., Vinokur, V., Weiss, B., Cohen, L., Daus, A., Goldschmidt, EE y Porat, R. (2002). Inducción de resistencia a *Penicillium digitatum* en pomelo por el agente de biocontrol de levadura *Cándida oleophila*. *Fitopatología* , 92 (4), 393-399.

Drysdale, G. S., & Fleet, G. H. (1989). The effect of acetic acid bacteria upon the growth and metabolism of yeasts during the fermentation of grape juice. *Journal of applied bacteriology*, 67(5), 471-481.

Du Plessis, H. W. (2018). Effect of non-*Saccharomyces* yeasts and lactic acid bacteria interactions on wine flavour (Doctoral dissertation, Stellenbosch: Stellenbosch University).

Du Toit, M., & Pretorius, I. S. (2000). Microbial spoilage and preservation of wine: using weapons for nature's own arsenal.

Dubourdieu, D., Tominaga, T., Masneuf, I., des Gachons, C. P., & Murat, M. L. (2006). The role of yeasts in grape flavor development during fermentation: the example of Sauvignon blanc. *American Journal of Enology and Viticulture*, 57(1), 81-88

Dutraive, O., Benito, S., Fritsch, S., Beisert, B., Patz, C. D., & Rauhut, D. (2019). Effect of sequential inoculation with non-*Saccharomyces* and *Saccharomyces* yeasts on Riesling wine chemical composition. *Fermentation*, 5(3), 79.

- Edinger, Daniel, & Monk. (1998). Selective effects of sulfur dioxide and yeast starter culture addition on indigenous yeast populations and sensory characteristics of wine. *Journal of Applied Microbiology*, 84(5), 865-876.
- Ehsani, M., Renault, P., & López, V. P. (2012). L'impact organoleptique de *Torulaspora delbrueckii* en conditions oenologiques lors d'une inoculation séquentielle aec *Saccharomyces cerevisiae*. *Revue des oenologues et des techniques vitivinicoles et oenologiques: magazine trimestriel d'information professionnelle*, 39(143), 23-26.
- Eldarov, MA, Kishkovskaia, SA, Tanaschuk, TN y Mardanov, AV (2016). Genómica y bioquímica de cepas de levadura enológica *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioquímica (Moscú)*, 81, 1650-1668.
- Elias, R. J., & Waterhouse, A. L. (2010). Controlling the Fenton reaction in wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(3), 1699-1707.
- Englezos, V., Giacosa, S., Rantsiou, K., Rolle, L., & Cocolin, L. (2017). *Starmerella bacillaris* in winemaking: Opportunities and risks. *Current Opinion in Food Science*, 17, 30-35.
- Englezos, V., Rantsiou, K., Cravero, F., Torchio, F., Pollon, M., Fracassetti, D., ... & Cocolin, L. (2018). Volatile profile of white wines fermented with sequential inoculation of *Starmerella bacillaris* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Chemistry*, 257, 350-360.
- Epifanio, S. (2005). La influencia de la tecnología de la vinificación en la microbiología y el desarrollo de la fermentación alcohólica (Doctoral dissertation, Universidad de la Rioja).
- Escribano-Viana, R., González-Arenzana, L., Garijo, P., Fernández, L., López, R., Santamaría, P., & Gutiérrez, AR (2022). Efecto bioprotector de un inóculo mixto de *Torulaspora delbrueckii*/Lachancea thermotolerans en la elaboración de vinos tintos. *Fermentación*, 8 (7), 337.
- Es-Safi, N. E., Cheynier, V., & Moutounet, M. (2003). Implication of phenolic reactions in food organoleptic properties. *Journal of Food Composition and Analysis*, 16(5), 535-553.
- Es-Safi, N. E., Le Guernevé, C., Fulcrand, H., Cheynier, V., & Moutounet, M. (2000). Xanthylum salts formation involved in wine colour changes. *International journal of food science & technology*, 35(1), 63-74.
- Falguera, V., Forns, M., & Ibarz, A. (2013). UV-vis irradiation: An alternative to reduce SO₂ in white wines?. *LWT-Food Science and Technology*, 51(1), 59-64.
- Fernández-González, M., Di Stefano, R., & Briones, A. (2003). Hydrolysis and transformation of terpene glycosides from muscat must by different yeast species. *Food microbiology*, 20(1), 35-41.
- Fernández-Pérez, R., Sáenz, Y., Rojo-Bezares, B., Zarazaga, M., Rodríguez, J. M., Torres, C., ... & Ruiz-Larrea, F. (2018). Production and antimicrobial activity of nisin under enological conditions. *Frontiers in microbiology*, 9, 1918.
- Fiori, S., Urgeghe, P. P., Hammami, W., Razzu, S., Jaoua, S., & Migheli, Q. (2014). Biocontrol activity of four non-and low-fermenting yeast strains against *Aspergillus carbonarius* and their ability to remove ochratoxin A from grape juice. *International journal of food microbiology*, 189, 45-50.

Fleet, G. H. (2003). Yeast interactions and wine flavour. *International journal of food microbiology*, 86(1-2), 11-22.

Francis, IL y Newton, JL (2005). Determinación del aroma del vino a partir de datos compositivos. *Revista Australiana de Investigación sobre la Uva y el Vino* , 11 (2), 114-126.

Franco, W., Benavides, S., Valencia, P., Ramírez, C., & Urtubia, A. (2021). Native yeasts and lactic acid bacteria isolated from spontaneous fermentation of seven grape cultivars from the maule region (Chile). *Foods*, 10(8), 1737.

Fredlund, E., Blank, LM, Schnürer, J., Sauer, U. y Passoth, V. (2004). Regulación dependiente de oxígeno y glucosa del metabolismo central del carbono en *Pichia anomala*. *Microbiología aplicada y ambiental* , 70 (10), 5905-5911.

Freimoser, F. M., Rueda-Mejia, M. P., Tilocca, B., & Migheli, Q. (2019). Biocontrol yeasts: Mechanisms and applications. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 35, 1-19.

Fujii, T., Kobayashi, O., Yoshimoto, H., Furukawa, S., & Tamai, Y. (1997). Effect of aeration and unsaturated fatty acids on expression of the *Saccharomyces cerevisiae* alcohol acetyltransferase gene. *Applied and environmental microbiology*, 63(3), 910-915.

Fulcrand, H., Dueñas, M., Salas, E., & Cheynier, V. (2006). Phenolic reactions during winemaking and aging. *American journal of Enology and Viticulture*, 57(3), 289-297.

Gandía-Herrero, F., García-Carmona, F., & Escribano, J. (2004). Purification and characterization of a latent polyphenol oxidase from beet root (*Beta vulgaris* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(3), 609-615.

Gao, C., & Fleet, G. H. (1988). The effects of temperature and pH on the ethanol tolerance of the wine yeasts, *Saccharomyces cerevisiae*, *Cándida stellata* and *Kloeckera apiculata*. *Journal of Applied Bacteriology*, 65(5), 405-409.

Gao, C., & Fleet, G. H. (1995). Degradation of malic and tartaric acids by high density cell suspensions of wine yeasts. *Food Microbiology*, 12, 65-71.

Gao, Z., Zhang, R. y Xiong, B. (2021). Manejo de enfermedades poscosecha del kiwi con una combinación de la levadura de biocontrol *Cándida oleophila* y un oligogalacturónido. *Control biológico* , 156 , 104549.

Gao, Zhe, Ruichang Zhang, and Bo Xiong. "Management of postharvest diseases of kiwifruit with a combination of the biocontrol yeast *Cándida oleophila* and an oligogalacturonide." *Biological Control* 156 (2021): 104549.

García-Ruiz, A., Bartolomé, B., Martínez-Rodríguez, A. J., Pueyo, E., Martín-Álvarez, P. J., & Moreno-Arribas, M. V. (2008). Potential of phenolic compounds for controlling lactic acid bacteria growth in wine. *Food Control*, 19(9), 835-841.

García-Ruiz, A., López, ME, Secades, PM, Marcos, JM, Bartolomé, B., & Moreno-Arribas, MV (2008). Potencial de polifenoles y de péptidos antimicrobianos para reducir el empleo del SO₂ en

enología. En Trabajos presentados con motivo del VI Foro Mundial del Vino:recurso electrónico. La Rioja, 2008 (pág. 75). Consejería de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural.

García-Ruiz, A., Moreno-Arribas, M. V., Martín-Álvarez, P. J., & Bartolomé, B. (2011). Comparative study of the inhibitory effects of wine polyphenols on the growth of enological lactic acid bacteria. *International journal of food microbiology*, 145(2-3), 426-431.

Garde-Cerdán, T., & Ancín-Azpilicueta, C. (2006). Review of quality factors on wine ageing in oak barrels. *Trends in Food Science & Technology*, 17(8), 438-447.

Garde-Cerdán, T., & Ancín-Azpilicueta, C. (2007). Effect of SO₂ on the formation and evolution of volatile compounds in wines. *Food Control*, 18(12), 1501-1506.

Ghoul, M., & Mitri, S. (2016). The ecology and evolution of microbial competition. *Trends in microbiology*, 24(10), 833-845

Giacosa, S., Segade, S. R., Cagnasso, E., Caudana, A., Rolle, L., & Gerbi, V. (2019). SO₂ in wines: Rational use and possible alternatives. In *Red wine technology* (pp. 309-321). Academic Press.

Gil-Sánchez, I., Monge, M., Miralles, B., Armentia, G., Cueva, C., Crespo, J., ... & Moreno-Arribas, M. V. (2019). Some new findings on the potential use of biocompatible silver nanoparticles in winemaking. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 51, 64-72.

Gómez-Rivas, L., Escudero-Abarca, B. I., Aguilar-Uscanga, M. G., Hayward-Jones, P. M., Mendoza, P., & Ramírez, M. (2004). Selective antimicrobial action of chitosan against spoilage yeasts in mixed culture fermentations. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 31(1), 16-22.

González, Á., Hierro, N., Poblet, M., Mas, A., & Guillamón, J. M. (2005). Application of molecular methods to demonstrate species and strain evolution of acetic acid bacteria population during wine production. *International journal of food microbiology*, 102(3), 295-304.

González, R., & Morales, P. (2022). La verdad en la levadura del vino. *Biotecnología microbiana*, 15 (5), 1339-1356.

Gonzalez, R., Quiros, M., & Morales, P. (2013). Yeast respiration of sugars by non-*Saccharomyces* yeast species: a promising and barely explored approach to lowering alcohol content of wines. *Trends in Food Science & Technology*, 29(1), 55-61.

González-Barreiro, C., Rial-Otero, R., Cancho-Grande, B., & Simal-Gándara, J. (2015). Wine aroma compounds in grapes: A critical review. *Critical reviews in food science and nutrition*, 55(2), 202-218.

Gore-Lloyd, D., Sumann, I., Brachmann, A. O., Schneeberger, K., Ortiz-Merino, R. A., Moreno-Beltrán, M., ... & Freimoser, F. M. (2019). Snf2 controls pulcherriminic acid biosynthesis and antifungal activity of the biocontrol yeast *Metschnikowia pulcherrima*. *Molecular microbiology*, 112(1), 317-332.

Granchi, L., Ganucci, D., Messini, A., Rosellini, D., & Vincenzini, M. (1998). Dynamics of yeast populations during the early stages of natural fermentation for the production of Brunello di Montalcino wines. *Food Technology and Biotechnology*, 36, 313-318.

Guerrero, R. F., & Cantos-Villar, E. (2015). Demonstrating the efficiency of sulphur dioxide replacements in wine: A parameter review. *Trends in Food Science & Technology*, 42(1), 27-43.

Guillamón, J.M.; Mas, A. Bacterias acéticas. In Microbiología del Vino; Carrascosa, A.V., Muñoz, R., González, R., Eds.; AMV Ediciones: Madrid, Spain, 2005. Google Scholar

Guittin, Charlie, et al. "Impact of high lipid contents on the production of fermentative aromas during white wine fermentation." *Applied Microbiology and Biotechnology* 105 (2021): 6435-6449.

Gutiérrez-Escobar, R., Aliaño-González, M. J., Marrufo-Curtido, A., Jiménez-Hierro, M. J., Puertas, B., & Cantos-Villar, E. (2023). Sulfur dioxide-free Verdejo wines through the use of a pure stilbene extract: exploring possible synergistic effect with glutathione. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 103(3), 1152-1160.

Haseeb, S., Alexander, B., Santi, RL, Liprandi, AS y Baranchuk, A. (2019). ¿Qué hay en el vino? La perspectiva de un médico. *Tendencias en Medicina Cardiovascular* , 29 (2), 97-106.

Heard, G. M., & Fleet, G. H. (1988). The effects of temperature and pH on the growth of yeast species during the fermentation of grape juice. *Journal of Applied Bacteriology*, 65(1), 23-28.

Holm Hansen, E., Nissen, P., Sommer, P., Nielsen, JC y Arneborg, N. (2001). El efecto del oxígeno sobre la supervivencia de levaduras no *Saccharomyces* durante fermentaciones de cultivos mixtos de jugo de uva con *Saccharomyces cerevisiae*. *Revista de Microbiología Aplicada* , 91 (3), 541-547.

Ivit, NN, Longo, R. y Kemp, B. (2020). El efecto de las levaduras no *Saccharomyces* y *Saccharomyces* no *cerevisiae* sobre los niveles de etanol y glicerol en el vino. *Fermentación* , 6 (3), 77.

Izquierdo-Cañas, P. M., García-Romero, E., Huertas-Nebreda, B., & Gómez-Alonso, S. (2012). Colloidal silver complex as an alternative to sulphur dioxide in winemaking. *Food Control*, 23(1), 73-81.

Jackson, D. I., & Lombard, P. B. (1993). Environmental and management practices affecting grape composition and wine quality-a review. *American journal of enology and viticulture*, 44(4), 409-430.

Jackson, RS (2008). *Ciencia del vino: principios y aplicaciones* . Prensa académica.

Johnson, J., Fu, M., Qian, M., Curtin, C., & Osborne, J. P. (2020). Influence of select non-*Saccharomyces* yeast on *Hanseniaspora uvarum* growth during prefermentation cold maceration. *American Journal of Enology and Viticulture*, 71(4), 278-287.

Joint, F. A. O., WHO Expert Committee on Food Additives, & World Health Organization. (2009). Evaluation of certain food additives and contaminants: sixty-ninth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. World Health Organization.

Jolly, NP, Augustyn, OPR y Pretorius, IS (2003). El efecto de las levaduras no *Saccharomyces* sobre la fermentación y la calidad del vino. *Revista Sudafricana de Enología y Viticultura* , 24 (2), 55-62.

Jolly, N. P., Augustyn, O. P. H., & Pretorius, I. S. (2006). The role and use of non-*Saccharomyces* yeasts in wine production.

Jolly, NP, Varela, C. y Pretorius, IS (2014). No es una levadura común y corriente: se descubren levaduras no *Saccharomyces* en la producción de vino. *Investigación de levadura FEMS* , 14 (2), 215-237.

- Joyeux, A., Lafon-Lafourcade, S., & Ribéreau-Gayon, P. (1984). Evolution of acetic acid bacteria during fermentation and storage of wine. *Applied and Environmental Microbiology*, 48(1), 153-156.
- Kántor, A., Hutková, J., Petrová, J., Hleba, L., & Kacániová, M. (2015). Antimicrobial activity of pulcherrimin pigment produced by *Metschnikowia pulcherrima* against various yeast species. *The Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 5(3), 282.
- Kemsawasd, V., Viana, T., Ardö, Y., & Arneborg, N. (2015). Influence of nitrogen sources on growth and fermentation performance of different wine yeast species during alcoholic fermentation. *Applied microbiology and biotechnology*, 99, 10191-10207.
- Kilmartin, P. A., Zou, H., & Waterhouse, A. L. (2001). A cyclic voltammetry method suitable for characterizing antioxidant properties of wine and wine phenolics. *Journal of agricultural and food chemistry*, 49(4), 1957-1965.
- Knoll, C., Fritsch, S., Schnell, S., Grossmann, M., Rauhut, D. y Du Toit, M. (2011). Influencia del pH y el etanol en la fermentación maloláctica y la composición de compuestos aromáticos volátiles en vinos blancos. *LWT-Ciencia y tecnología de los alimentos*, 44 (10), 2077-2086.
- König, H., & Fröhlich, J. (2017). Lactic acid bacteria. *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine*, 3-41.
- König, Helmut, and Harald Claus. "A future place for *Saccharomyces* mixtures and hybrids in wine making." *Fermentation* 4.3 (2018): 67.
- König, Helmut, and Jürgen Fröhlich. "Lactic acid bacteria." *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine* (2017): 3-41.
- Kurtzman, C. P., & Droby, S. (2001). *Metschnikowia fructicola*, a new ascosporic yeast with potential for biocontrol of postharvest fruit rots. *Systematic and applied microbiology*, 24(3), 395-399.
- Kutyrev, A. A., & Moskva, V. V. (1991). Nucleophilic reactions of quinones. *Russian Chemical Reviews*, 60(1), 72.
- Lambrechts, M. G., & Pretorius, I. S. (2000). Yeast and its importance to wine aroma.
- Laurie, V. F., Salazar, S., Campos, M. I., Cáceres-Mella, A., & Peña-Neira, Á. (2014). Periodic aeration of red wine compared to microoxygenation at production scale. *American Journal of Enology and Viticulture*, 65(2), 254-260.
- Lebleux, Manon, et al. "Must protection, sulfites versus bioprotection: A metabolomic study." *Food Research International* 173 (2023): 113383.
- Leyva Salas, M., Mounier, J., Valence, F., Coton, M., Thierry, A., & Coton, E. (2017). Antifungal microbial agents for food biopreservation—A review. *Microorganisms*, 5(3), 37.
- Li, H., Guo, A., & Wang, H. (2008). Mechanisms of oxidative browning of wine. *Food chemistry*, 108(1), 1-13.

Lilly, M., Bauer, F. F., Lambrechts, M. G., Swiegers, J. H., Cozzolino, D., & Pretorius, I. S. (2006). The effect of increased yeast alcohol acetyltransferase and esterase activity on the flavour profiles of wine and distillates. *Yeast*, 23(9), 641-659.

Lisanti, M. T., Blaiotta, G., Nioi, C., & Moio, L. (2019). Alternative methods to SO₂ for microbiological stabilization of wine. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 18(2), 455-479.

Liu, S. Q., & Pilone, G. J. (2000). An overview of formation and roles of acetaldehyde in winemaking with emphasis on microbiological implications. *International journal of food science & technology*, 35(1), 49-61.

Liu, Y., Yi, L., Ruan, C., Yao, S., Deng, L., & Zeng, K. (2019). Proline increases pigment production to improve oxidative stress tolerance and biocontrol ability of *Metschnikowia citriensis*. *Frontiers in Microbiology*, 10, 1273.

Loira, I., Morata, A., Comuzzo, P., Callejo, M. J., González, C., Calderón, F., & Suárez-Lepe, J. A. (2015). Use of *Schizosaccharomyces pombe* and *Torulaspora delbrueckii* strains in mixed and sequential fermentations to improve red wine sensory quality. *Food Research International*, 76, 325-333.

Lopes, C. A., & Sangorrín, M. P. (2010). Optimization of killer assays for yeast selection protocols. *Rev Argent Microbiol*, 42(4), 298-306.

López-Miranda, S., Hernández-Sánchez, P., Serrano-Martínez, A., Hellín, P., Fenoll, J., & Núñez-Delicado, E. (2011). Effect of ripening on protein content and enzymatic activity of Crimson Seedless table grape. *Food Chemistry*, 127(2), 481-486.

Lopez-Toledano, A., Mayen, M., Merida, J., & Medina, M. (2002). Yeast-induced inhibition of (+)-catechin and (–)-epicatechin degradation in model solutions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(6), 1631-1635.

Loviso, C. L., & Libkind, D. (2019). Síntesis y regulación de los compuestos del aroma y sabor derivados de la levadura en la cerveza: alcoholes superiores. *Revista argentina de microbiología*, 51(4), 386-397.

Lücke, F. K. (2000). Utilization of microbes to process and preserve meat. *Meat science*, 56(2), 105-115.

Luzzini, G., Slaghenaufi, D., Pasetto, F., & Ugliano, M. (2021). Influence of grape composition and origin, yeast strain and spontaneous fermentation on aroma profile of Corvina and Corvinone wines. *Lwt*, 143, 111120.

Macías, V. P., Pina, I. C., & Rodríguez, L. P. (2001). Factors influencing the oxidation phenomena of sherry wine. *American journal of enology and viticulture*, 52(2), 151-155.

Magliani, Walter, et al. "Yeast killer systems." *Clinical microbiology reviews* 10.3 (1997): 369-400.

Magyar, Ildikó, and Tamás Tóth. "Comparative evaluation of some oenological properties in wine strains of *Cándida stellata*, *Cándida zemplanina*, *Saccharomyces uvarum* and *Saccharomyces cerevisiae*." *Food Microbiology* 28.1 (2011): 94-100.

Main, G. L. (1992). Juice fining treatments to reduce browning and use of sulfur dioxide in white wine production. University of Arkansas.

- Makhotkina, O., & Kilmartin, P. A. (2013). Electrochemical oxidation of wine polyphenols in the presence of sulfur dioxide. *Journal of agricultural and food chemistry*, 61(23), 5573-5581.
- MamLouk, D., & Gullo, M. (2013). Acetic acid bacteria: physiology and carbon sources oxidation. *Indian journal of microbiology*, 53, 377-384.
- Mančić, Stojan, et al. "Fermentative potential of native yeast *Cándida famata* for prokupac grape must fermentation." *Agriculture* 11.4 (2021): 358.
- Manzanares, P., Valles, S., & Viana, F. (2011). Non-*Saccharomyces* yeasts in the winemaking process. *Molecular Wine Microbiology*, Elsevier, 85-110.
- Martín-García, FJ, Palacios-Fernández, S., López de Lerma, N., García-Martínez, T., Mauricio, JC, & Peinado, RA (2023). El efecto de la levadura, el azúcar y el dióxido de azufre sobre los compuestos volátiles del vino. *Fermentación* , 9 (6), 541.
- Maturano, YP, Mestre, MV, Esteve-Zarzoso, B., Nally, MC, Lerena, MC, Toro, ME, ... & Combina, M. (2015). Dinámica de la población de levaduras durante el macerado prefermentativo en frío de vinos Cabernet Sauvignon y Malbec. *Revista internacional de microbiología de alimentos* , 199 , 23-32.
- Mencher, A., Morales, P., Curiel, J. A., Gonzalez, R., & Tronchoni, J. (2021). *Metschnikowia pulcherrima* represses aerobic respiration in *Saccharomyces cerevisiae* suggesting a direct response to co-cultivation. *Food Microbiology*, 94, 103670.
- Mesas, JM y Alegre, MT (1999). El Papel De Los Microorganismos En La Elaboración Del Vino the Role of the Microorganisms in Winemaking O Papel Dos Microorganismos Na Elaboración Do Viño. *CYTA-Revista de Alimentación* , 2 (4), 174-183.
- Millet, V., & Lonvaud-Funel, A. (2000). The viable but non-culturable state of wine micro-organisms during storage. *Letters in applied microbiology*, 30(2), 136-141.
- Mills, D. A., Johannsen, E. A., & Cocolin, L. (2002). Yeast diversity and persistence in botrytis-affected wine fermentations. *Applied and environmental microbiology*, 68(10), 4884-4893.
- Mills, David A., Eric A. Johannsen, and Luca Cocolin. "Yeast diversity and persistence in botrytis-affected wine fermentations." *Applied and environmental microbiology* 68.10 (2002): 4884-4893.
- Mora, J., Barbas, J. I., & Mulet, A. (1990). Growth of yeast species during the fermentation of musts inoculated with *Kluyveromyces thermotolerans* and *Saccharomyces cerevisiae*. *American Journal of Enology and Viticulture*, 41(2), 156-159.
- Morata, A., Escott, C., Bañuelos, MA, Loira, I., Del Fresno, JM, González, C., & Suárez-Lepe, JA (2019). Contribución de las levaduras no *Saccharomyces* a la frescura del vino. Una revisión. *Biomoléculas* , 10 (1), 34.
- Morata, A., Loira, I., Tesfaye, W., Bañuelos, M. A., González, C., & Suárez Lepe, J. A. (2018). *Lachancea thermotolerans* applications in wine technology. *Fermentation*, 4(3), 53.
- Moreno-Arribas, M. V., & Polo, M. C. (Eds.). (2009). *Wine chemistry and biochemistry* (Vol. 735, p. 975). New York, NY, USA:: Springer.

- Müller, LE (1964). Manual de laboratorio de fisiología vegetal (núm. 14). Biblioteca IICA Venezuela.
- Muñoz, E. e Ingledew, WM (1990). Cáscaras de levadura en fermentaciones de vino: una revisión. *Revista de investigación del vino*, 1 (3), 197-209.
- Muñoz, R., Moreno-Arribas, V., & De Las Rivas, B. (2005). Bacterias lácticas. *Microbiología del vino*. Carrascosa, V., Muñoz, R. y Gonzalez, R. AMV Ediciones. Madrid, 231-272.
- Nadai, C., Treu, L., Campanaro, S., Giacomini, A., & Corich, V. (2016). Different mechanisms of resistance modulate sulfite tolerance in wine yeasts. *Applied microbiology and biotechnology*, 100, 797-813.
- Navarra, C., Leterme, S., Ghislain, M. y Goffeau, A. (1994). El papel de dos pequeños proteolípidos asociados a la H⁺-ATPasa de la membrana plasmática de levadura. En *Mecanismos moleculares y celulares del transporte de H⁺* (págs. 199-204). Berlín, Heidelberg: Springer Berlín Heidelberg.
- Nel, H. A., Bauer, R., Wolfaardt, G. M., & Dicks, L. M. T. (2002). Effect of bacteriocins pediocin PD-1, plantaricin 423, and nisin on biofilms of *Oenococcus oeni* on a stainless steel surface. *American journal of enology and viticulture*, 53(3), 191-196.
- Nguyen, T. H., & Waterhouse, A. L. (2021). Redox cycling of iron: Effects of chemical composition on reaction rates with phenols and oxygen in model wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 72(3), 209-216.
- Nguyen, T. H., & Waterhouse, A. L. (2022). Acid complexation of iron controls the fate of hydrogen peroxide in model wine. *Food Chemistry*, 377, 131910.
- Nioi, C., Lisanti, M. T., Meunier, F., Redon, P., Massot, A., & Moine, V. (2022). Antioxidant activity of yeast derivatives: Evaluation of their application to enhance the oxidative stability of white wine. *LWT*, 171, 114116.
- Nissen, P., Nielsen, D., & Arneborg, N. (2003). Viable *Saccharomyces cerevisiae* cells at high concentrations cause early growth arrest of non-*Saccharomyces* yeasts in mixed cultures by a cell-cell contact-mediated mechanism. *Yeast*, 20(4), 331-341.
- Oelofse, A., Pretorius, IS y Du Toit, M. (2008). Importancia de *Brettanomyces* y *Dekkera* durante la elaboración del vino: una revisión sinóptica.
- OIV.(2014). <https://www.oiv.int/standards/compendium-of-international-methods-of-analysis-for-spirituuous-beverages-and-alcohols>
- Oliveira, C. M., Ferreira, A. C. S., De Freitas, V., & Silva, A. M. (2011). Oxidation mechanisms occurring in wines. *Food Research International*, 44(5), 1115-1126.
- Orenes-Piñero, E., García-Carmona, F., & Sánchez-Ferrer, A. (2006). Latent polyphenol oxidase from quince fruit pulp (*Cydonia oblonga*): purification, activation and some properties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86(13), 2172-2178.
- Oro, L., Ciani, M., & Comitini, F. (2014). Antimicrobial activity of *Metschnikowia pulcherrima* on wine yeasts. *Journal of applied microbiology*, 116(5), 1209-1217.

- Oszmianski, J., Cheynier, V., & Moutounet, M. (1996). Iron-catalyzed oxidation of (+)-catechin in model systems. *Journal of agricultural and food chemistry*, 44(7), 1712-1715.
- Parafati, L., Vitale, A., Restuccia, C., & Cirvilleri, G. (2015). Biocontrol ability and action mechanism of food-isolated yeast strains against *Botrytis cinerea* causing post-harvest bunch rot of table grape. *Food microbiology*, 47, 85-92.
- Pati, S., Crupi, P., Savastano, M. L., Benucci, I., & Esti, M. (2020). Evolution of phenolic and volatile compounds during bottle storage of a white wine without added sulfite. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 100(2), 775-784.
- Pawlikowska, E., James, S. A., Breierova, E., Antolak, H., & Kregiel, D. (2019). Biocontrol capability of local *Metschnikowia* sp. isolates. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 112, 1425-1445.
- Perestrelo, R., Barros, A. S., Câmara, J. S., & Rocha, S. M. (2011). In-depth search focused on furans, lactones, volatile phenols, and acetals as potential age markers of Madeira wines by comprehensive two-dimensional gas chromatography with time-of-flight mass spectrometry combined with solid phase microextraction. *Journal of agricultural and food chemistry*, 59(7), 3186-3204.
- Pérez-Nevado, F.†, et al. "Cellular death of two non-*Saccharomyces* wine-related yeasts during mixed fermentations with *Saccharomyces cerevisiae*." *International journal of food microbiology* 108.3 (2006): 336-345.
- Pérez-Porras, P., Bautista-Ortín, A. B., Jurado, R., & Gómez-Plaza, E. (2021). Using high-power ultrasounds in red winemaking: Effect of operating conditions on wine physico-chemical and chromatic characteristics. *LWT*, 138, 110645.
- Pfohl-Leszkowicz, A., & Manderville, R. A. (2007). Ochratoxin A: An overview on toxicity and carcinogenicity in animals and humans. *Molecular nutrition & food research*, 51(1), 61-99.
- Pina, C., Santos, C., Couto, J. A., & Hogg, T. (2004). Ethanol tolerance of five non-*Saccharomyces* wine yeasts in comparison with a strain of *Saccharomyces cerevisiae*—influence of different culture conditions. *Food Microbiology*, 21(4), 439-447.
- Pittet, Vanessa, Kendra Morrow, and Barry Ziola. "Ethanol tolerance of lactic acid bacteria, including relevance of the exopolysaccharide gene *gtf*." *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 69.1 (2011): 57-61.
- Ponsone, M. L., Nally, M. C., Chiotta, M. L., Combina, M., Köhl, J., & Chulze, S. N. (2016). Evaluation of the effectiveness of potential biocontrol yeasts against black sur rot and ochratoxin A occurring under greenhouse and field grape production conditions. *Biological Control*, 103, 78-85.
- Pretorius, IS (2000). Adaptación de la levadura de vino para el nuevo milenio: enfoques novedosos del antiguo arte de la elaboración del vino. *Levadura* , 16 (8), 675-729.
- Puértolas, E., López, N., Condón, S., Álvarez, I., & Raso, J. (2010). Potential applications of PEF to improve red wine quality. *Trends in Food Science & Technology*, 21(5), 247-255.
- Puyo, Maëlys, et al. "Bioprotección en enología por *Metschnikowia pulcherrima*: de los resultados de campo a la investigación científica". *Fronteras en Microbiología* 14 (2023).

- Qin, G., & Meng, Z. (2010). Sulfur dioxide and benzo (a) pyrene modulates CYP1A and tumor-related gene expression in rat liver. *Environmental Toxicology: An International Journal*, 25(2), 169-179.
- Querol, A., Jiménez, M. y Huerta, T. (1990). Parámetros microbiológicos y enológicos durante la fermentación de mostos procedentes de vendimias pobres y normales en la región de Alicante (España). *Revista de ciencia de los alimentos*, 55 (6), 1603-1606.
- Raafat, D., & Sahl, H. G. (2009). Chitosan and its antimicrobial potential—a critical literature survey. *Microbial biotechnology*, 2(2), 186-201.
- Rainieri, S. y Pretorius, IS (2000). Selección y mejora de levaduras enológicas. *Anales de microbiología*, 50 (1), 15-32.
- Rapp, A., & Mandery, H. (1986). Wine aroma. *Experientia*, 42, 873-884.
- Raymond Eder, M. L., Reynoso, C., Lauret, S. C., & Rosa, A. L. (2017). Isolation and identification of the indigenous yeast population during spontaneous fermentation of Isabella (*Vitis labrusca* L.) grape must. *Frontiers in Microbiology*, 8, 532.
- Renault, P., Coulon, J., de Revel, G., Barbe, J. C., & Bely, M. (2015). Increase of fruity aroma during mixed *T. delbrueckii*/*S. cerevisiae* wine fermentation is linked to specific esters enhancement. *International Journal of Food Microbiology*, 207, 40-48.
- Rendueles, O., & Ghigo, J. M. (2012). Multi-species biofilms: how to avoid unfriendly neighbors. *FEMS microbiology reviews*, 36(5), 972-989.
- Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B. y Lonvaud, A. (Eds.). (2006). *Manual de enología, Volumen 1: La microbiología del vino y las vinificaciones* (Vol. 1). John Wiley e hijos.
- Robards, K., Prenzler, P. D., Tucker, G., Swatsitang, P., & Glover, W. (1999). Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food chemistry*, 66(4), 401-436.
- Rojo-Bezares, B., Saenz, Y., Navarro, L., Zarazaga, M., Ruiz-Larrea, F., & Torres, C. (2007). Coculture-inducible bacteriocin activity of *Lactobacillus plantarum* strain J23 isolated from grape must. *Food Microbiology*, 24(5), 482-491.
- Rolle, L., Englezos, V., Torchio, F., Cravero, F., Río Segade, S., Rantsiou, K., ... & Cocolin, L. (2018). Alcohol reduction in red wines by technological and microbiological approaches: A comparative study. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 24(1), 62-74.
- Romano, P., Suzzi, G., Comi, G., & Zironi, R. (1992). Higher alcohol and acetic acid production by apiculate wine yeasts. *Journal of Applied Bacteriology*, 73(2), 126-130.
- Roudil, L., Russo, P., Berbegal, C., Albertin, W., Spano, G., & Capozzi, V. (2020). Non-*Saccharomyces* commercial starter cultures: Scientific trends, recent patents and innovation in the wine sector. *Recent patents on food, nutrition & agriculture*, 11(1), 27-39.
- Rubio-Bretón, Pilar, et al. "Bioprotection as a tool to free additives winemaking: Effect on sensorial, anthocyanic and aromatic profile of young red wines." *Lwt* 98 (2018): 458-464.

Sablaylorles, J. M., Dubois, C., Manginot, C., Roustan, J. L., & Barre, P. (1996). Effectiveness of combined ammoniacal nitrogen and oxygen additions for completion of sluggish and stuck wine fermentations. *Journal of fermentation and bioengineering*, 82(4), 377-381.

Sablaylorles, JM (2009). Control de la fermentación alcohólica en la elaboración del vino: Situación actual y perspectivas. *Investigación de Alimentos Internacional* , 42 (4), 418-424.

Sadoudi, M., Tourdot-Maréchal, R., Rousseaux, S., Steyer, D., Gallardo-Chacón, J. J., Ballester, J., ... & Alexandre, H. (2012). Yeast–yeast interactions revealed by aromatic profile analysis of *Sauvignon Blanc* wine fermented by single or co-culture of non-*Saccharomyces* and *Saccharomyces* yeasts. *Food Microbiology*, 32(2), 243-253.

SAG. (2022). Informe de las existencias de vinos a granel. <https://www.sag.cl/sites/default/files/informe%20existencia%202022.pdf>

Santamaría, P., González-Arenzana, L., Garijo, P., Gutiérrez, A. R., & López, R. (2020). Nitrogen sources added to must: effect on the fermentations and on the Tempranillo red wine quality. *Fermentation*, 6(3), 79.

Santos, M. C., Nunes, C., Cappelle, J., Gonçalves, F. J., Rodrigues, A., Saraiva, J. A., & Coimbra, M. A. (2013). Effect of high pressure treatments on the physicochemical properties of a sulphur dioxide-free red wine. *Food Chemistry*, 141(3), 2558-2566.

Santos, M. C., Nunes, C., Ferreira, A. S., Jourdes, M., Teissedre, P. L., Rodrigues, A., ... & Coimbra, M. A. (2019). Comparison of high pressure treatment with conventional red wine aging processes: Impact on phenolic composition. *Food research international*, 116, 223-231.

Saravanakumar, D., Ciavarella, A., Spadaro, D., Garibaldi, A., & Gullino, M. L. (2008). *Metschnikowia pulcherrima* strain MACH1 outcompetes *Botrytis cinerea*, *Alternaria alternata* and *Penicillium expansum* in apples through iron depletion. *Postharvest Biology and Technology*, 49(1), 121-128.

Schmidtke, L. M., Clark, A. C., & Scollary, G. R. (2011). Micro-oxygenation of red wine: techniques, applications, and outcomes. *Critical reviews in food science and nutrition*, 51(2), 115-131.

Scholz, R. L., & Greenberg, E. P. (2015). Sociality in *Escherichia coli*: enterochelin is a private good at low cell density and can be shared at high cell density. *Journal of bacteriology*, 197(13), 2122-2128.

Shekhawat K, Bauer FF, Setati ME (2017) Impact of oxygenation on the performance of three non-*Saccharomyces* yeasts in co-fermentation with *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol* 101:2479–2491

Silva, F. V., & Van Wyk, S. (2021). Emerging non-thermal technologies as alternative to SO₂ for the production of wine. *Foods*, 10(9), 2175.

Simonin, S., Alexandre, H., Nikolantonaki, M., Coelho, C., & Tourdot-Maréchal, R. (2018). Inoculation of *Torulaspora delbrueckii* as a bio-protection agent in winemaking. *Food Research International*, 107, 451-461.

Simonin, S., Roullier-Gall, C., Ballester, J., Schmitt-Kopplin, P., Quintanilla-Casas, B., Vichi, S., ... & Tournier-Maréchal, R. (2020). Bio-protection as an alternative to sulphites: impact on chemical and microbial characteristics of red wines. *Frontiers in microbiology*, 11, 1308.

Sims, CA y Morris, JR (1984). Efectos del pH, dióxido de azufre, tiempo de almacenamiento y temperatura sobre el color y la estabilidad del vino tinto de uva moscadina. *Revista Estadounidense de Enología y Viticultura*, 35 (1), 35-39.

Singleton, V. L. (1987). Oxygen with phenols and related reactions in musts, wines, and model systems: Observations and practical implications. *American Journal of Enology and Viticulture*, 38(1), 69-77.

Sipiczki, M. (2006). *Metschnikowia* strains isolated from botrytized grapes antagonize fungal and bacterial growth by iron depletion. *Applied and environmental microbiology*, 72(10), 6716-6724.

Soden, A., et al. "Effects of co-fermentation with *Candida stellata* and *Saccharomyces cerevisiae* on the aroma and composition of Chardonnay wine." *Australian Journal of Grape and Wine Research* 6.1 (2000): 21-30.

Soleas, GJ, Diamandis, EP y Goldberg, DM (1997). El vino como fluido biológico: historia, producción y papel en la prevención de enfermedades. *Revista de análisis de laboratorio clínico*, 11 (5), 287-313.

Spagna, G., Barbagallo, R. N., Martino, A., & Pifferi, P. G. (2000). A simple method for purifying glycosidases: α -L-rhamnopyranosidase from *Aspergillus niger* to increase the aroma of Moscato wine. *Enzyme and Microbial Technology*, 27(7), 522-530.

Stockley, C., Paschke-Kratzin, A., Teissedre, P. L., Restani, P., Tejedor, N. G., & Quini, C. (2021). Oiv collective expertise document SO₂ and wine: a review 1 march 2021 SO₂ and wine: a review.

Stockley, C., Teissedre, PL, Boban, M., Di Lorenzo, C. y Restani, P. (2012). Biodisponibilidad de compuestos fenólicos derivados del vino en humanos: una revisión. *Alimentación y función*, 3 (10), 995-1007.

STRATFORD, M., & ROSE, A. H. (1986). Transport of sulphur dioxide by *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology*, 132(1), 1-6.

Styger, G., Prior, B. y Bauer, FF (2011). Sabor y aroma del vino. *Revista de Microbiología y Biotecnología Industrial*, 38 (9), 1145.

Sui, Yuan, et al. "Genome sequence, assembly, and characterization of the antagonistic yeast *Candida oleophila* used as a biocontrol agent against post-harvest diseases." *Frontiers in Microbiology* 11 (2020): 295.

Sullivan, P. J. (2002). The effects of microoxygenation on red wines. California State University, Fresno.

Swiegers, J. H., Kievit, R. L., Siebert, T., Lattey, K. A., Bramley, B. R., Francis, I. L., ... & Pretorius, I. S. (2009). The influence of yeast on the aroma of *Sauvignon Blanc* wine. *Food microbiology*, 26(2), 204-211.

Swiegers, JH y Pretorius, IS (2005). Modulación por levaduras del sabor del vino. *Avances en microbiología aplicada*, 57, 131-175.

- Taillandier, P., Portugal, F. R., Fuster, A., & Strehaiano, P. (2007). Effect of ammonium concentration on alcoholic fermentation kinetics by wine yeasts for high sugar content. *Food microbiology*, 24(1), 95-100.
- Tedesco, F., Siesto, G., Pietrafesa, R., Romano, P., Salvia, R., Scieuzo, C., ... & Capece, A. (2022). Chemical methods for microbiological control of winemaking: An overview of current and future applications. *Beverages*, 8(3), 58.
- Theron LW, Bely M, Divol B (2017) Characterisation of the enzymatic properties of MpAPr1, an aspartic protease secreted by the wine yeast *Metschnikowia pulcherrima*. *J Sci Food Agric* 97:3584–3593
- Thorpe, R. F., & Ratledge, C. (1972). Fatty acid distribution in triglycerides of yeasts grown on glucose or n-alkanes. *Microbiology*, 72(1), 151-163.
- Tortora, GJ, Funke, BR y Case, CL (2007). *Introducción a la microbiología* . Ed. Médica Panamericana.
- Tsai, P. C., Araujo, L. D., & Tian, B. (2022). Varietal aromas of sauvignon blanc: impact of oxidation and antioxidants used in winemaking. *Fermentation*, 8(12), 686.
- Tsai, Pei-Chin, Leandro Dias Araujo, and Bin Tian. "Varietal aromas of sauvignon blanc: impact of oxidation and antioxidants used in winemaking." *Fermentation* 8.12 (2022): 686.
- Türkel, S., Korukluoğlu, M., & Yavuz, M. (2014). Biocontrol activity of the local strain of *Metschnikowia pulcherrima* on different postharvest pathogens. *Biotechnology research international*, 2014.
- Valera, M. J., Sainz, F., Mas, A., & Torija, M. J. (2017). Effect of chitosan and SO₂ on viability of *Acetobacter* strains in wine. *International Journal of Food Microbiology*, 246, 1-4.
- Vally, H., Misso, N. L., & Madan, V. (2009). Clinical effects of sulphite additives. *Clinical & Experimental Allergy*, 39(11), 1643-1651.
- Vally, H., Thompson, PJ y Misso, NL (2007). Cambios en la hiperreactividad bronquial después de pruebas con vino con niveles altos y bajos de sulfitos en pacientes asmáticos sensibles al vino. *Alergia clínica y experimental* , 37 (7), 1062-1066.
- Van Wyngaard, Elizma. Volatiles playing an important role in South African Sauvignon blanc wines. Diss. Stellenbosch: Stellenbosch University, 2013.
- Vejarano, R., & Gil-Calderón, A. (2021). Commercially available non-*Saccharomyces* yeasts for winemaking: Current market, advantages over *Saccharomyces*, biocompatibility, and safety. *Fermentation*, 7(3), 171.
- Viana, P. A., de Rezende, S. T., Alves, A. D. A., Manfrini, R. M., Alves, R. J., Bemquerer, M. P., ... & Guimarães, V. M. (2011). Activity of *Debaryomyces hansenii* UFV-1 α -galactosidases against α -D-galactopyranoside derivatives. *Carbohydrate research*, 346(5), 602-605.
- Vigentini, I., Romano, A., Compagno, C., Merico, A., Molinari, F., Tirelli, A., ... & Volonterio, G. (2008). Rasgos fisiológicos y enológicos de diferentes cepas de *Dekkera/Brettanomyces bruxellensis* en condiciones de modelo de vino. *Investigación de levadura FEMS* , 8 (7), 1087-1096.

- Villalba, M. L., Sáez, J. S., Del Monaco, S., Lopes, C. A., & Sangorrín, M. P. (2016). TdKT, a new killer toxin produced by *Torulaspora delbrueckii* effective against wine spoilage yeasts. *International journal of food microbiology*, 217, 94-100.
- Visan, L., Tamba-Berehoiu, R. M., Popa, C. N., Danaila-Guidea, S. M., & Culea, R. (2018). Aromatic compounds in wines. *SCIENTIFIC PAPERS*, 423.
- Visan, Luminita, et al. "Aromatic compounds in wines." *SCIENTIFIC PAPERS* (2018): 423.
- Visser, W., Scheffers, W. A., Batenburg-van der Vegte, W. H., & van Dijken, J. P. (1990). Oxygen requirements of yeasts. *Applied and environmental microbiology*, 56(12), 3785-3792.
- Voltea, S., Karabagias, I. K., & Roussis, I. G. (2022). Use of Fe (II) and H₂O₂ along with Heating for the Estimation of the Browning Susceptibility of White Wine. *Applied Sciences*, 12(9), 4422.
- Von Mollendorff, Anke. The impact of wine yeast strains on the aromatic profiles of *Sauvignon Blanc* wines derived from characterized viticultural treatments. Diss. Stellenbosch: Stellenbosch University, 2013.
- Wang, M., Wang, J., Chen, J., Philipp, C., Zhao, X., Wang, J., ... & Suo, R. (2022). Effect of commercial yeast starter cultures on Cabernet Sauvignon wine aroma compounds and microbiota. *Foods*, 11(12), 1725.
- Warth, A. D. (1985). Resistance of yeast species to benzoic and sorbic acids and to sulfur dioxide. *Journal of Food Protection*, 48(7), 564-569.
- Waterhouse, A. L., & Laurie, V. F. (2006). Oxidation of wine phenolics: A critical evaluation and hypotheses. *American Journal of Enology and Viticulture*, 57(3), 306-313.
- Waterhouse, A. L., & Nikolantonaki, M. (2015). Quinone reactions in wine oxidation. In *Advances in wine research* (pp. 291-301). American Chemical Society.
- Waterhouse, AL, Sacks, GL y Jeffery, DW (2016). *Comprender la química del vino*. John Wiley e hijos.
- Wayman, Morris, and Sarad Parekh. "Ethanol and sugar tolerance of *Cándida shehatae*." *Biotechnology letters* 7 (1985): 909-912.
- Wedral, D., Shewfelt, R. y Frank, J. (2010). El desafío de *Brettanomyces* en el vino. *LWT-Ciencia y tecnología de los alimentos*, 43 (10), 1474-1479.
- Werner-Washburne, M., Braun, E., Johnston, G. C., & Singer, R. A. (1993). Stationary phase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiological reviews*, 57(2), 383-401.
- Whitener, M. B., Stanstrup, J., Carlin, S., Divol, B., Du Toit, M., & Vrhovsek, U. (2017). Effect of non-*Saccharomyces* yeasts on the volatile chemical profile of Shiraz wine. *Australian journal of grape and wine research*, 23(2), 179-192.
- Whitener, Margaret E. Beckner, et al. "Early fermentation volatile metabolite profile of non-*Saccharomyces* yeasts in red and white grape must: A targeted approach." *LWT-Food Science and Technology* 64.1 (2015): 412-422.

Windholtz, S., Dutilh, L., Lucas, M., Maupeu, J., Vallet-Courbin, A., Farris, L., ... & Masneuf-Pomarède, I. (2021). Population dynamics and yeast diversity in early winemaking stages without sulfites revealed by three complementary approaches. *Applied sciences*, 11(6), 2494.

Windholtz, S., Nioi, C., Coulon, J., & Masneuf-Pomarede, I. (2023). Bioprotection by non-*Saccharomyces* yeasts in oenology: Evaluation of O₂ consumption and impact on acetic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 405, 110338

Windholtz, S., Redon, P., Lacampagne, S., Farris, L., Lytra, G., Cameleyre, M., ... & Masneuf-Pomarede, I. (2021). Non-*Saccharomyces* yeasts as bioprotection in the composition of red wine and in the reduction of sulfur dioxide. *LWT*, 149, 111781.

Wines of Chile. (s.f.). Diversidad Vitivinícola. <https://www.winesofchile.org/winegrowing-regions/>

WIO.(2022). 1ER INFORME COSECHA 2022. <https://wip.cl/1er-informe-cosecha-2022/>

Yıldırım, H. K., & Darıcı, B. (2020). Alternative methods of sulfur dioxide used in wine production. *J. Microbiol. Biotechnol. Food Sci*, 9, 675-687.

Zara, G., & Nardi, T. (2021). Yeast metabolism and its exploitation in emerging winemaking trends: from sulfite tolerance to sulfite reduction. *Fermentation*, 7(2), 57.

Zheng, X., Jiang, H., Silvy, E. M., Zhao, S., Chai, X., Wang, B., ... & Prusky, D. (2021). *Cándida oleophila* proliferated and accelerated accumulation of suberin poly phenolic and lignin at wound sites of potato tubers. *Foods*, 10(6), 1286.

Zilelidou, Evangelia A., and Aspasia Nisiotou. "Understanding wine through yeast interactions." *Microorganisms* 9.8 (2021): 1620.

CAPITULO 9. ANEXOS

9.1. Anexo A. Reactivación de Cepas de Stock Congelado

Los siguientes pasos están diseñados para preparar reactivos cultivos microbianos que se encuentran almacenado a temperaturas de congelación.

1. En un recipiente mediano, colocar hielo picado suficiente para cubrir $\frac{3}{4}$ del mismo.
2. Sacar el tubo criogénico que contiene el cultivo a reactivar e inmediatamente colocarlo en el baño de hielo preparado en el paso 1.
3. Abrir el tubo criogénico y con un asa de cultivo microbiológico estéril raspar la superficie del cultivo.
4. Cerrar rápidamente el tubo criogénico y devolver al baño de hielo.
5. Sembrar por estría el raspado en medio sólido (placa Petri con agar idóneo para el microorganismo, previamente etiquetada. Ver tabla 29).
6. Incubar por 24 a 48 horas a la temperatura correspondiente al microorganismo.
7. Lo más rápido posible, devolver el tubo criogénico al lugar de almacenamiento congelado, Los tubos no deben llegar a descongelarse completamente.
8. Las placas de cultivo obtenidas pueden conservarse activas por 1 mes a temperatura de refrigeración. Al cabo de este tiempo, tome tres colonias y siémbrelas por estría en un agar nuevo. Mantenga sus cultivos activos durante toda su investigación, ya que no es recomendable volver a sacar los tubos criogénicos de su almacenamiento de forma seguida.

Tabla 29. Medios sólidos comúnmente empleados para reactivar microorganismos

<i>Microorganismo</i>	<i>Medio</i>	<i>T incubación (°C)</i>
Levaduras	Yeast and Mould Agar, YGC	25
Bacterias ácido-lácticas	MRS Agar	30
Levaduras tipo <i>Saccharomyces</i>	YPD	25

9.2. Anexo B. Procedimiento para determinación de células totales.

Materiales y equipos: Microscopio óptico, cámara Neubauer, vórtex de agitación, matraz de 50 mL o 100mL, agua destilada, micropipeta y azul de bromotimol al 4% o de metileno al 0.1%.

Procedimiento:

1. Encender el microscopio y la lampara asociada al equipo.
2. Realizar las respectivas diluciones de las muestras teniendo en cuenta que la concentración celular sea apropiada para los conteos.
3. Agregar 0.25 mL de solución de azul de bromotimol al 4% o azul de metileno al 0,1% y 0.25 mL de la solución diluida en el paso anterior. Homogenizar mediante un agitador vórtex.
4. Lavar con agua destilada y secar cuidadosamente la Cámara de Neubauer.
5. Adicionar una gota de la solución preparada en el paso 3 a la rejilla de la Cámara de Neubauer y tapar con un vidrio limpio y seco.
6. Agregar una gota de aceite de inmersión y poner la Cámara de Neubauer en el microscopio y contabilizar las células totales teniendo en cuenta que la cámara utilizada para los conteos tiene una rejilla como la que se muestra en la Figura 60; para el caso del conteo de levaduras se utiliza la rejilla marcada con el número 3 y se cuentan 5 cuadrados. Tener en cuenta que:
 - a) Todas las células que se encuentran en las líneas límite del cuadrado analizado se cuentan solamente si están en los bordes superior o izquierdo de este.
 - b) Las aglomeraciones de levaduras, en donde no se distinga la cantidad de estas, son contabilizadas como una célula.

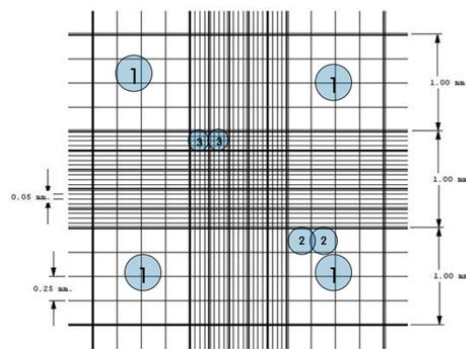


Figura 60. Rejilla de conteo de cámara Neubauer

9.3. Anexo C. Activación de levadura *S. cerevisiae* para fermentación

La levadura *S. cerevisiae* (ACTIFLORE, Laboratorio LAFFORT) se encuentra refrigerada a una temperatura de 5°C y liofilizada, por lo que debe ser previamente activada. A través de una balanza analítica se pesan 4 gramos de levadura, posteriormente se prepara una solución con

una relación 1:1 de agua – mosto de uva. Esta mezcla se calienta hasta una temperatura de 37,5°C y se añade a la levadura previamente pesada. A continuación, se mantiene la temperatura entre 37,5 y 38°C agitando a los 5, 15 y 30 minutos con el fin de liberar el CO₂ producido durante el calentamiento. Una vez activa la levadura, se establece la densidad celular mediante conteo en cámara Neubauer con el fin de tomar la cantidad necesaria para que la concentración inicial sea de aproximadamente 4×10^6 cell/mL. Cuando la diferencia de temperatura entre el mosto de uva y la levadura activa fuera menor o igual a 3 °C, se añade el volumen establecido de inóculo del microorganismo al medio de cultivo contenido en frascos schott modificados de 1L. Cabe destacar que la inoculación de *S. cerevisiae* se realiza después del desfangado.

9.4. Anexo D. Método de preparación de diluciones decimales

Se pipetea un mililitro de muestra en un tubo eppendorf con 0,9 mL de agua de peptonada. Agite el tubo durante 20 segundos mediante un agitador “Vortex”. Esta es la primera dilución (decimal), de la cual se trasvasa 0,1 mL al siguiente tubo estéril con 0,9 mL de agua de peptonada, consiguiéndose así la segunda dilución. Después de agitar durante 20 segundos, repita la operación las veces que sean necesarias (Figura 61). Para el caso de mosto sin fermentar se deben hacer 4 diluciones decimales, mientras que para mostos en fermentación y vinos: 7 diluciones decimales. Posteriormente las placas de Petri se dividen en secciones según la dilución y se agregan 3 muestras de 0,01 mL por cada sección (Figura 62).

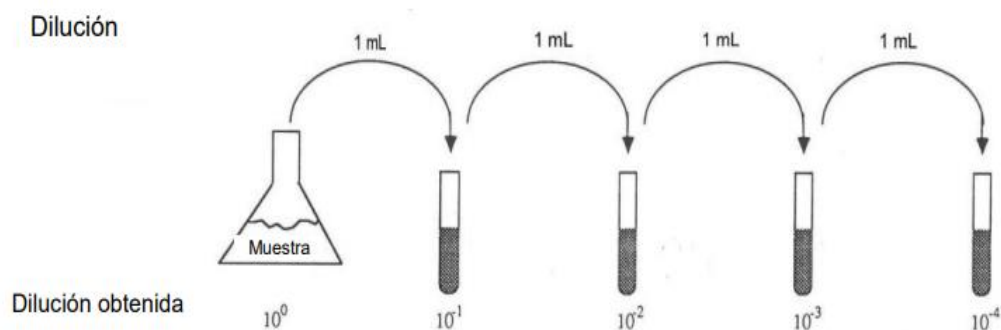


Figura 61. Preparación de diluciones y las inoculaciones

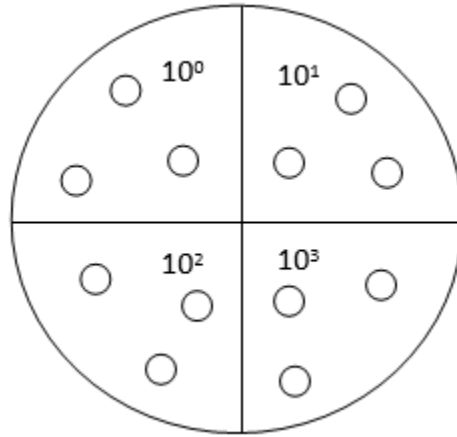


Figura 62. Placa de Petri con medio de cultivo, dividida en secciones por dilución con muestras en triplicado.

Posteriormente las placas son incubadas cabeza abajo en entorno aerobio para levaduras y acetobacterias y entorno anaerobio para lactobacterias. Todas las placas se almacenan durante 2 días a 28 ± 2 °C.

9.5. Anexo E. Procedimiento para determinación de la densidad

Materiales y equipos: Balanza analítica de precisión de 0.001g, picnómetro, agua destilada.

Procedimiento

1. Llenar el picnómetro con agua destilada hasta el tope, dependiendo del volumen del picnómetro 10 o 50 mL.
2. Secar con un pequeño trozo de papel, se recomienda usar guantes.
3. Pesar el picnómetro.
4. Vaciar el picnómetro, enjuagar con acetona, y secar al aire.
5. Dejar el picnómetro vacío, y pesar.
6. La masa de agua corresponde a la diferencia entre el picnómetro lleno y el picnómetro vacío.
7. El volumen del picnómetro corresponde a la masa del agua dividido en la densidad del agua a la temperatura que se encuentre.
8. Tomar la muestra a analizar y comenzar desde el paso 1, pero con la muestra a analizar, el volumen del picnómetro corresponderá al obtenido en el paso 7.

$$\text{Densidad} \left[\frac{\text{g}}{\text{mL}} \right] = \frac{\text{Masa picnómetro con muestra} - \text{Masa picnómetro vacío}}{\text{Volumen del picnómetro}}$$

9.6. Anexo F. Procedimiento determinación de sólidos solubles mediante °brix

Materiales y equipos: Refractómetro

Procedimiento:

1. Llevar la muestra a una temperatura cercana a 20°C y agitarla hasta su homogeneidad.
2. Colocar una pequeña muestra en el prisma del refractómetro limpio, teniendo en cuenta que la muestra cubra uniformemente toda la superficie del prisma.
3. Leer índice refractivo, y realizar al menos dos determinaciones de la muestra preparada.

9.7. Anexo G . Procedimiento determinación densidad óptica- Espectrofotómetro

Materiales: Espectrofotómetro UV/VIS OPTIZEN™ POP, celdas espectrofotómetro.

1. Encender el equipo y esperar que termine de realizar el chequeo automático, durante este proceso no se deberá manipular el equipo. Se estima que tiene una duración de 10 min.
2. En el menú principal se ha de seleccionar el método ATC en '*single wave*', para indicar que se desea determinar las absorbancias de las muestras.
3. En el menú secundario emergente se ha de configurar tanto el número de celdas como la longitud de onda a emplear.
4. Previo a las mediciones se ha de realizar una calibración del equipo, para esto se ha de incorporar una muestra a emplear como '*cero*' para las mediciones, y no se ha de retirar hasta que se desee realizar una nueva calibración o que se deje de usar el equipo.
5. Al apagar el equipo no se deben dejar celdas al interior, y se ha de apagar correctamente con el botón de encendido/apagado.

9.8. Anexo H. Procedimiento de medición de compuestos volátiles

El análisis de compuestos volátiles se realiza mediante cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de masas con microextracción en fase sólida (GC-MS-SPME). A continuación, se presenta un procedimiento detallado de cómo se realiza este análisis:

Paso 1: Preparación de muestras: Se coloca una muestra de 3 mL en un vial de espacio de cabeza de 20 mL, que cuenta con una tapa de aluminio magnética y un septum de teflón/PTFE. A esta muestra se le agrega 1 mL de solución saturada de NaCl.

Paso 2: Incubación y extracción: El vial se calienta a 50°C durante 10 minutos con agitación continua a 300 rpm. Luego, se inserta la fibra SPME en el espacio de cabeza del vial y se deja durante 15 minutos para la extracción de los compuestos volátiles.

Paso 3: Inyección en el cromatógrafo: Transcurrido el tiempo de extracción, se inserta el dispositivo en el portal del inyector del cromatógrafo, que está configurado a 250°C y en modo splitless durante 5 minutos.

Paso 4: Cromatografía: El análisis se realiza en un cromatógrafo marca Thermo modelo Triplus 1310, con un detector de masas ISQ LT. Se utiliza una columna RTX5MS (30 m x 0,25 mm ID x 0,25 μ m film) y helio como gas portador con un flujo de 1 mL/min. El programa cromatográfico inicia a 40°C durante 5 minutos y luego aumenta a una velocidad de 10°C/min hasta alcanzar los 250°C, manteniéndose a esta temperatura durante 10 minutos. Los datos obtenidos se procesan mediante el software Chromeleon 7.3 con la librería NIST 2017 para la comparación de resultados.

9.9. Anexo I. Ajuste de SO₂

Para ajustar el Dióxido de azufre o anhídrido sulfuroso (libre) primero se debe medir las ppm que contiene la muestra, esto se debe hacer mediante titulación. Luego se debe hacer la diferencia entre el SO₂ al que se quiere llegar y el contenido por la muestra.

$$SO2_f - SO2_i = SO2_a$$

Donde:

SO_{2f}: Dióxido de azufre final, al que se quiere llegar, en ppm.

SO_{2i}: Dióxido de azufre inicial, encontrado en el mosto inicialmente, en ppm.

SO_{2a}: Dióxido de azufre a adicionar, en ppm.

Para la adición se debe tomar en cuenta lo siguiente:

- Al agregar anhídrido sulfuroso a un vino, hay una parte de él que se combina con diferentes sustancias, como azúcares, cetonas y aldehídos. Particularmente con etanal (acetaldehído).
- Cuando el vino posee un nivel inferior a 20 mg/L (ppm) de sulfuroso libre puede considerarse que se combinan un 50% de anhídrido sulfuroso que se agrega, por lo que la dosis determinada debe ser el doble.

- Para niveles iniciales de 20 a 75 mg/L de sulfuroso libre, considerarse que un 33% del anhídrido sulfuroso se combina, por lo tanto, la dosis determinada debe ser un tercio mayor (multiplicar por 1,5).
- El cálculo por realizar es el siguiente:

$$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$$

Donde :

C_1 : Concentración a adicionar, SO_2 a en ppm.

V_1 : Volumen de mosto al que se adiciona la concentración: en L

C_2 : Concentración de metabisulfito de potasio: 57600 ppm (en una solución de 100 g/L).

V_2 : Volumen de Solución a agregar, en L.

9.10. Anexo J: Cálculos de velocidad específica de crecimiento

A continuación, se muestran los gráficos y líneas de tendencia de donde se obtuvieron los valores experimentales de las velocidades específicas de crecimiento para cada una de las modalidades. La pendiente de la gráfica $\log(\text{ufc/mL})$ v/s tiempo, corresponde a la velocidad específica de crecimiento para cada caso.

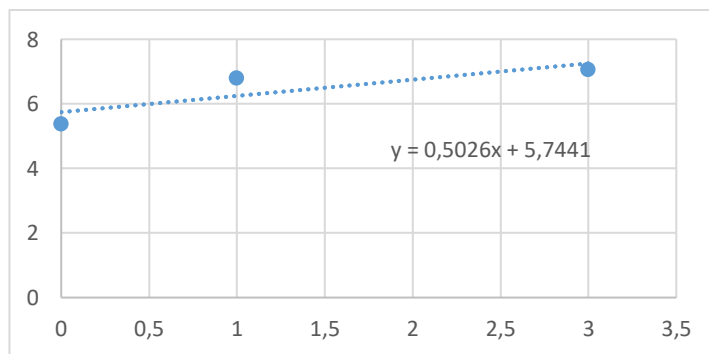


Figura 63. Obtención de la velocidad específica de crecimiento para *Cándida oleophila* 10^6

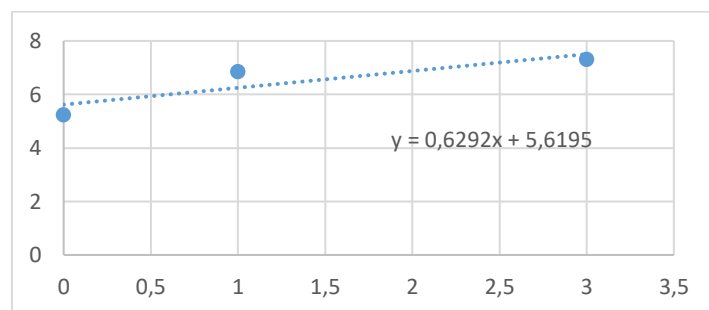


Figura 64. Obtención de la velocidad específica de crecimiento para *Cándida oleophila* 10^7

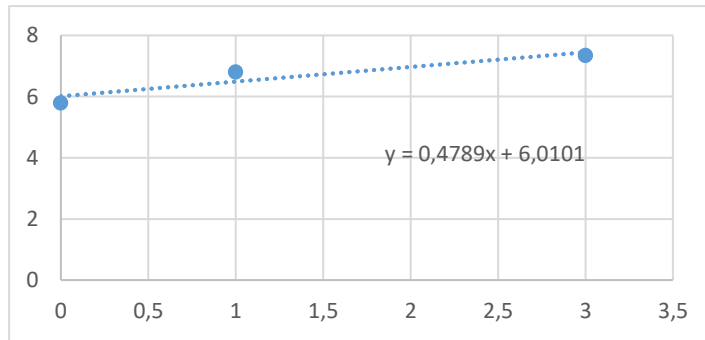


Figura 65. Obtención de la velocidad específica de crecimiento para *Cándida boidinii* 10^6

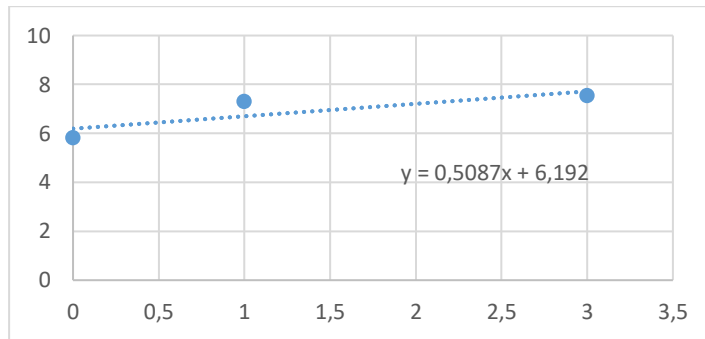


Figura 66. Obtención de la velocidad específica de crecimiento para *Cándida boidinii* 10^7

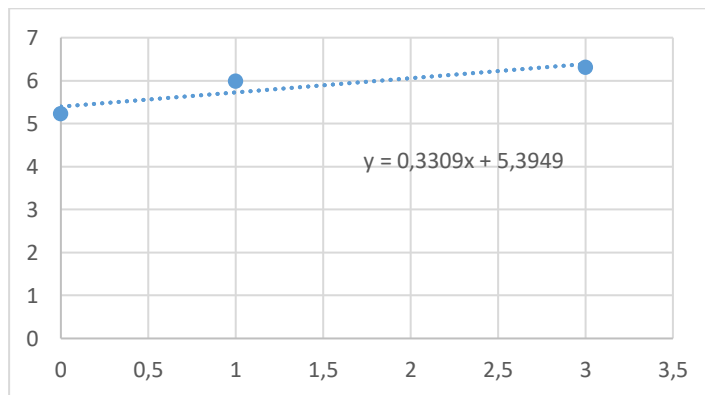


Figura 67. Obtención de la velocidad específica de crecimiento para SO_2

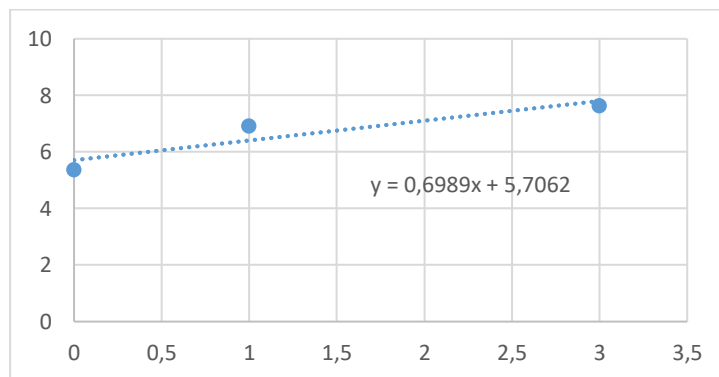


Figura 68. Obtención de la velocidad específica de crecimiento modalidad Sin Antimicrobiano

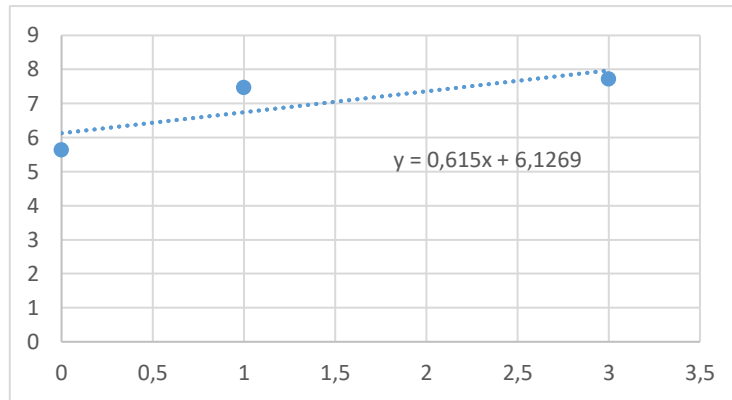


Figura 69. Obtención de la velocidad específica de crecimiento modalidad *Cándida oleophila*/*Cándida boidinii* 50/50 10^7

9.11. Anexo K: Placas de Agar con poblaciones de microorganismos.

9.11.1. Medio CGA para Levaduras Totales

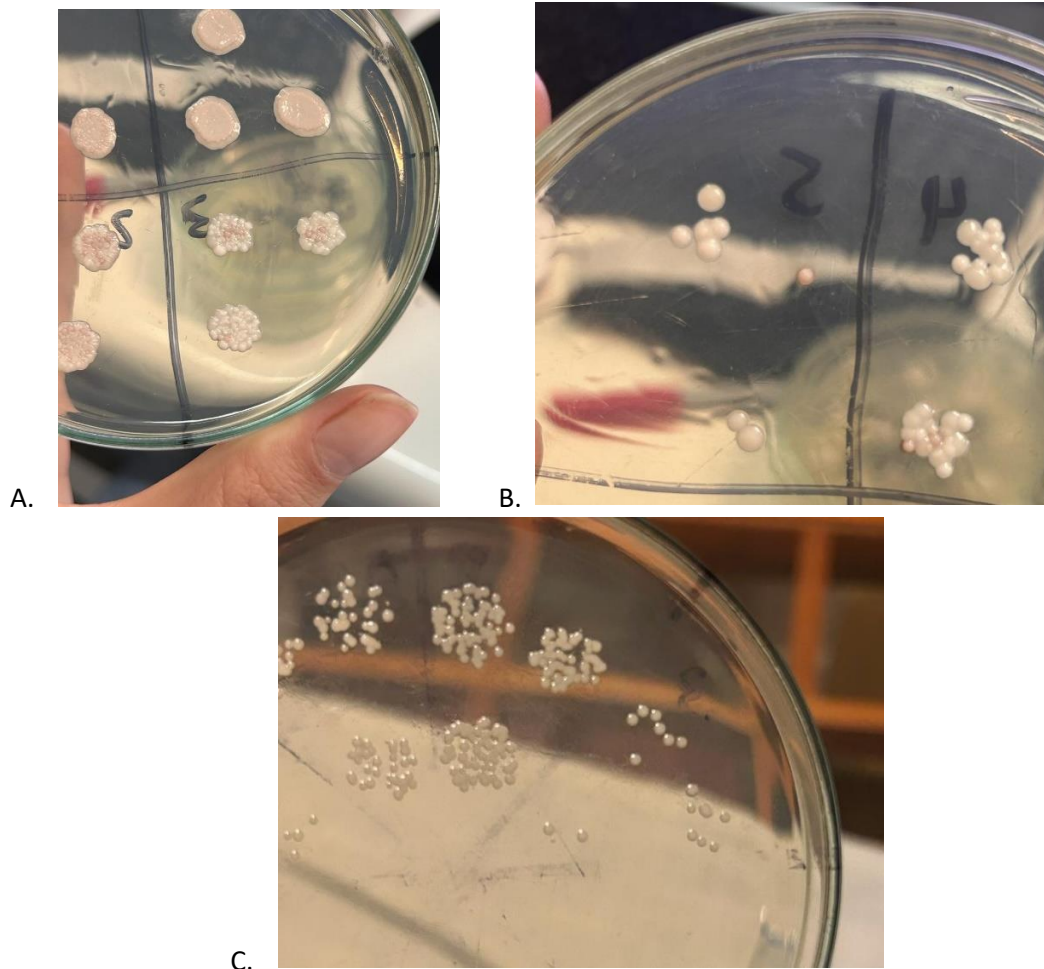


Figura 70. Placas con medio CGA para el crecimiento de levaduras. A. Diluciones donde no se puede realizar el conteo por exceso de crecimiento. B. Diluciones 10^4 y 10^5 ufc/mL donde se logra realizar el conteo celular. C. Placa con otras diluciones donde es claramente visible cada colonia.

5.11.1. Medio Agar Lisina para Levaduras *no Saccharomyces*

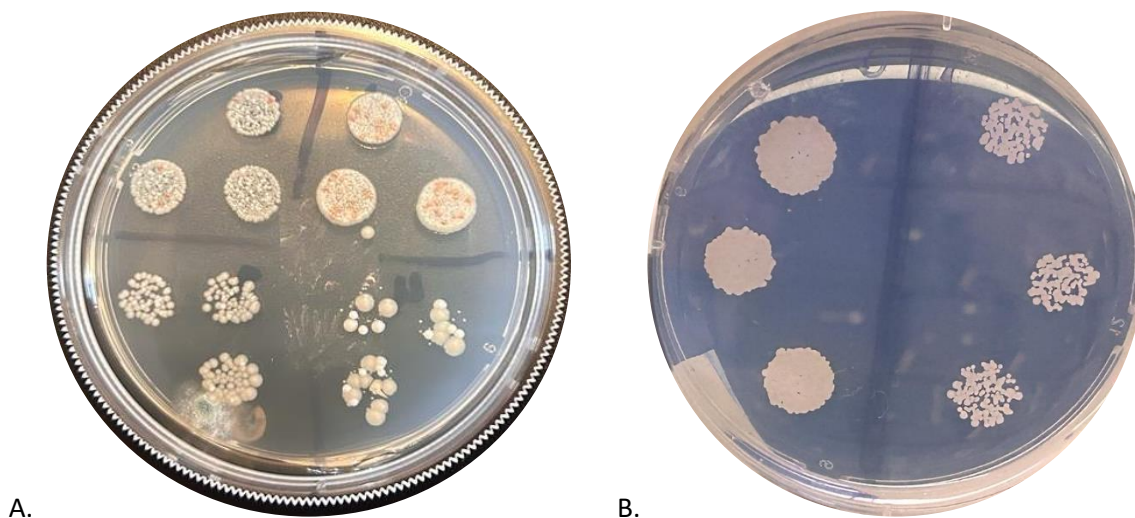


Figura 71. Placas con medio Agar Lisina para el crecimiento de levaduras. A. Diluciones 10^1 , 10^2 , 10^3 y 10^4 ufc/mL, evidenciando diferentes colores en algunos tipos de levadura. B. Placa con diluciones 10^0 y 10^1 ufc/mL.

9.11.2. Medio MRS Agar para Bacterias del ácido láctico

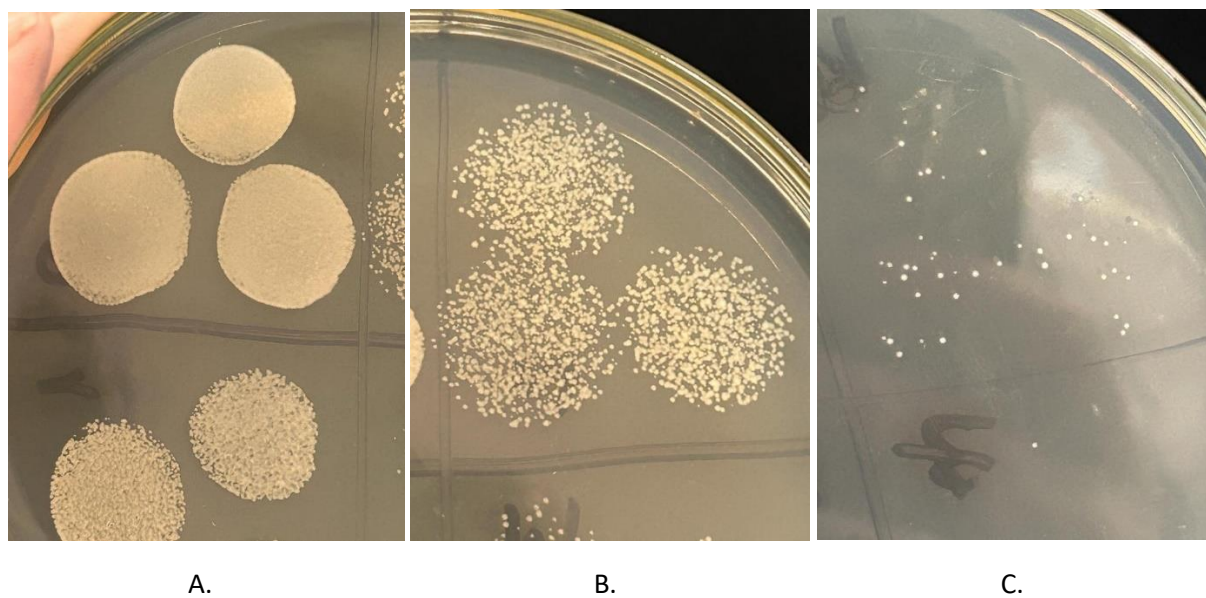


Figura 72. Placas con medio MRS Agar para el crecimiento de bacterias lácticas. A. Placa con diluciones 10^0 , 10^1 ufc/mL, B. Placa con dilución 10^2 ufc/mL. C. Placa con dilución 10^3 ufc/mL.

9.11.3. Medio WLD Agar para Bacterias ácidoacéticas

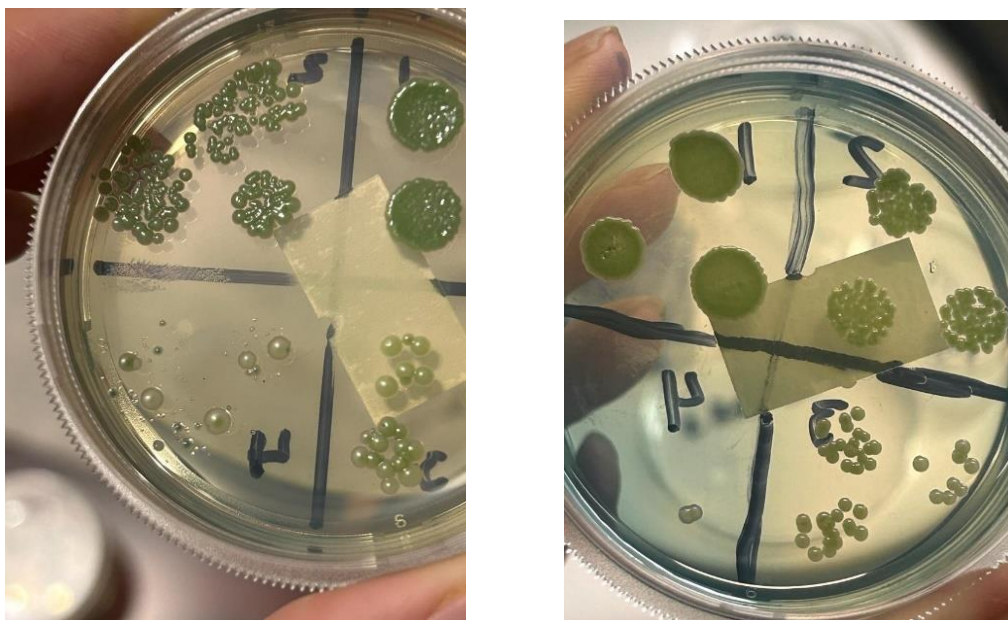


Figura 73. Placas con medio WLD Agar para el crecimiento de bacterias acéticas.

9.11.4. Medio WLC Agar para *Brettanomyces bruxellensis*



Figura 74. Placas con medio WLC Agar para el crecimiento de *Brettanomyces bruxellensis*.

9.12. Anexo L: Resultados análisis de componentes principales PCA

El análisis fue realizado en el software estadístico Minitab donde en primer lugar se obtuvo la distancia de Mahalanobis la cual reporta o no la existencia de valores anómalos. En este caso

todos los puntos se encuentran bajo la línea de referencia (Figura 75), por lo que en la muestra no existen datos anómalos.

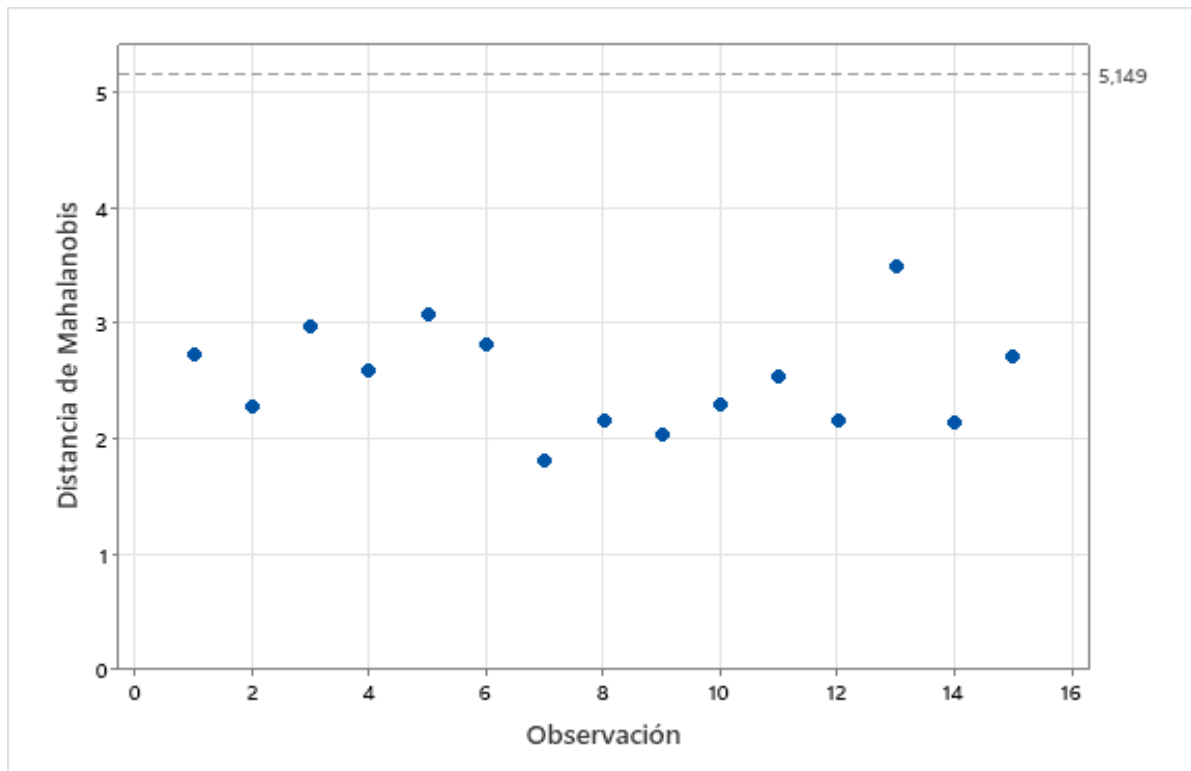


Figura 75. Distancia de Mahalanobis para la variedad Sauvignon blanc en fermentación monocultivo a escala de laboratorio

En primer lugar, se deben identificar los componentes principales, es decir la cantidad mínima de componentes que representan la mayor parte de la variación en sus datos. Para ello se utilizaran 3 criterios: Primero, la proporción acumulada de varianza debe superar el 80% de la variación. Segundo, los valores propios deben ser mayores a 1, según el criterio de Kaiser y tercero, guiarse por la curva del diagrama de pedregal o también llamado gráfico de sedimentación, donde se ordenan los valores propios de mayor a menor y el patrón ideal es una curva pronunciada seguida de una línea recta, donde la curva pronunciada representa los componentes significativos.

La tabla 30 muestra el análisis de valores propios de la matriz de correlación, donde se identifican 2 componentes principales según el criterio de Kaiser, con valores propios de 4,4745 y 1,191, para el primer y el segundo componente respectivamente. Por otro lado, se tienen 3 componentes principales según el criterio de la proporción acumulada de varianza, ya que con

el segundo componente sólo se abarca un 78,1% de la varianza acumulada, no logrando alcanzar el 80%.

Tabla 30. Análisis de los valores propios de la matriz de correlación para Sauvignon blanc monocultivo.

Valor propio	4,2745	1,191	0,9012	0,4201	0,1331	0,0725	0,0074
Proporción	0,611	0,17	0,129	0,06	0,019	0,01	0,001
Acumulada	0,611	0,781	0,91	0,97	0,989	0,999	1

En cuanto a la gráfica de sedimentación (Figura 76) se observa que hay una curva pronunciada hasta el componente número 4, ya que las componentes 5, 6 y 7 forman prácticamente una línea recta. Sin embargo, se decide determinar la existencia de 3 componentes principales, dado que la contribución del cuarto no sería representativa considerando que su proporción o aporte a la varianza acumulada es sólo del 6%.

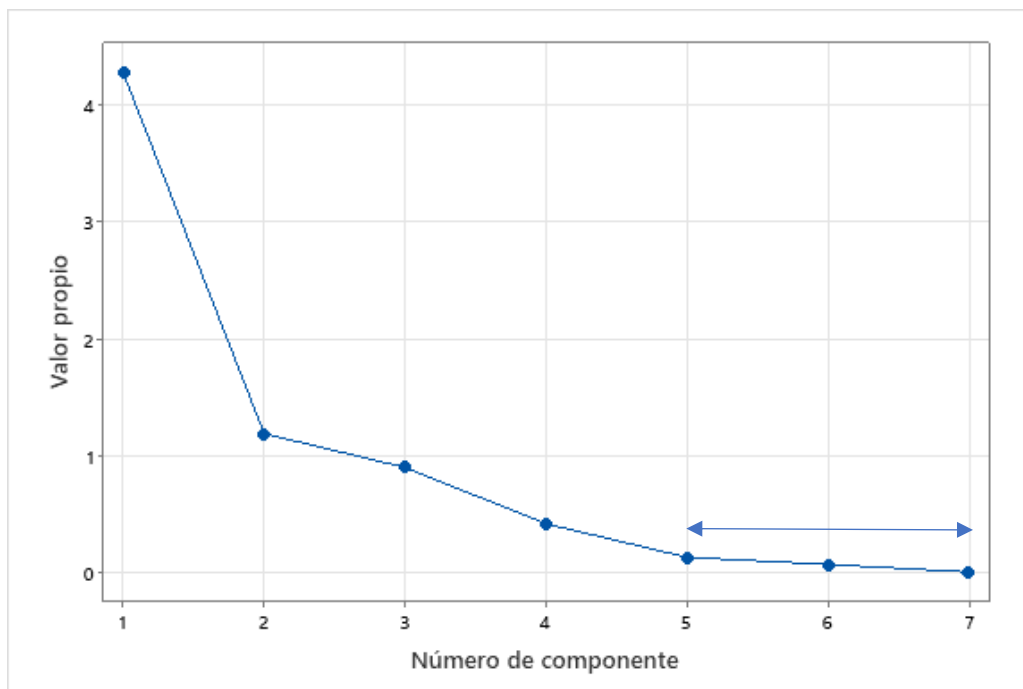


Figura 76. Gráfico de sedimentación para identificar los vectores propios en mosto Sauvignon Blanc para diferentes estrategias de bioprotección

En la tabla 31 se muestra la matriz de correlación, donde es posible visualizar las variables que más influencia tienen dentro del análisis y si se correlacionan positiva o negativamente. En este caso se observa que para los 2 primeros componentes la variable de mayor influencia

corresponde al compuesto Ethyl-9-decenoate, el cual se correlaciona positivamente con ambos componentes.

Tabla 31. Análisis de los vectores propios de la matriz de correlación para Sauvignon Blanc

Variable	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5	PC6	PC7
Hexanoic acid, ethyl ester	-0,258	-0,32	-0,802	0,121	-0,241	-0,039	0,338
Phenylethyl Alcohol	-0,47	0,014	-0,051	0,294	-0,258	-0,154	-0,774
Octanoic acid, ethyl ester	0,416	-0,361	0,161	0,16	-0,634	0,485	-0,094
Acetic acid, hexyl ester	0,338	-0,557	-0,154	-0,507	0,157	-0,354	-0,38
Ethyl 9-decenoate	0,311	0,617	-0,239	-0,307	-0,52	-0,315	-0,043
Decanoic acid, ethyl ester	0,423	-0,076	0,047	0,695	0,064	-0,564	0,093
Dodecanoic acid, ethyl ester	0,387	0,266	-0,496	0,196	0,418	0,445	-0,351

En la tabla 32 se presenta el análisis estadístico desarrollado para las fermentaciones bajo las diferentes estrategias de bioprotección. Un valor de $p \leq 0,05$ indica que hay diferencias significativas.

Tabla 32. Análisis estadístico ANOVA aplicando la prueba Tukey con un nivel de significancia del 95% (Valor $p \leq 0,05$) para los compuestos asociados a la fermentación con distintas modalidades de bioprotección.

Grupo	Compuestos Volátiles	CO	CB	CO-CB	SA	Control	Valor p
Alcoholes	Phenylethyl alcohol	21,20 ^a	2,5 ^c	3,175bc	6,0 ^b	5,949b	0,000
	Hexanoic acid, ethyl ester	23,60 ^a	14,961a	21,954a	16,90a	16,73a	0,061
	Octanoic acid, ethyl ester	12,96b	30,76a	33,060a	33,67a	37,20a	0,001
Ésteres	Acetic acid, hexyl ester	1,084b	3,1808a	4,4325a	4,559a	3,880a	0,001
	Ethyl-9-decenoate	0,3468e	13,609a	6,139b	1,570d	2,723c	0,000
	Decanoic acid, ethyl ester	2,425c	12,49ab	12,965ab	8,063bc	16,86a	0,000
	Dodecanoic acid, ethyl ester	0,2494c	3,898a	4,713a	0,8042c	2,425b	0,000

Los valores que no compartan una letra son significativamente diferentes entre ellos

9.13. Anexo M: Activación e inoculación de levaduras NS bioprotectoras

Los microorganismos no convencionales se encuentran almacenados a -80°C en tubos criogénicos por lo que se debe realizar la reactivación en placas de Petri con medio de cultivo “Yeast and Mould agar”. Con un asa de cultivo microbiológico estéril y en presencia de un mechero, se debe abrir y raspar la superficie del cultivo y sembrar por estría en la placa Petri con agar e incubarla entre 24 a 48 horas a 25°C . Una vez activos los microorganismos en las placas, se toma mediante un asa microbiológica una muestra de levadura la cual será inoculada en 10 mL de medio de cultivo “Sabouraud Dextrose Broth” (SDB, Biokar diagnostics, Francia), este inóculo se sometió a un proceso de incubación durante 48 horas a 25°C . Cumplido este tiempo, el medio de cultivo se centrifuga durante 10 minutos a 12000 rpm, con el fin de obtener un precipitado en el que se encuentra concentrada la biomasa de levaduras, que se mezcla con 10 mL de agua peptonada al 1%, previamente esterilizada. De dicha mezcla se toma un volumen de 1 mL con el que se realiza una dilución 1:10 con agua destilada, lo anterior con el fin de establecer la cantidad aproximada de células por mililitro que dicha biomasa contiene y así inocular para una densidad celular inicial cercana a 1×10^6 cell/mL o 1×10^7 cell/mL dependiendo del tipo de experimento.