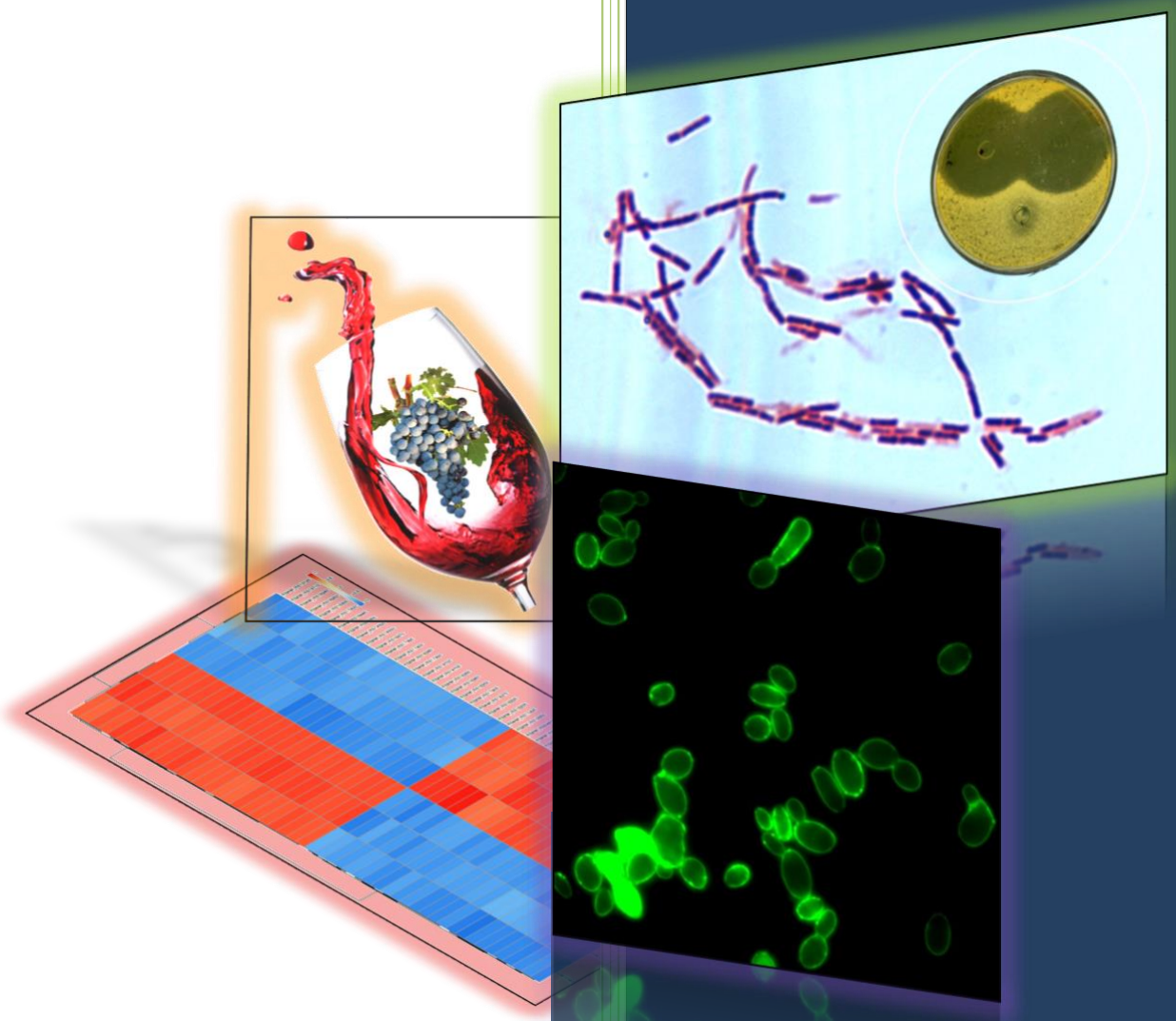
VNiVERSiDAD D SALAMANCA

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

Universidad de Salamanca

Departamento de Microbiología y Genética

BIOCONTROL DE MICROORGANISMOS QUE ALTERAN EL VINO



MARTHA ALVARADO GARCÍA

TESIS DOCTORAL

2024

La **Dra. Mª Ángeles Santos García**, Profesora Titular del Departamento de Microbiología y Genética de la Universidad de Salamanca,

AUTORIZA

La presentación y defensa de la tesis doctoral titulada "Biocontrol de microorganismos que alteran el vino" realizada por Doña Martha Alvarado García, bajo mi dirección, en el Departamento de Microbiología y Genética de la Universidad de Salamanca, para la obtención del Grado de Doctora en Microbiología y Genética Molecular.

Y para que así conste, firmo la presente autorización en Salamanca a 25 de julio 2024.

Firmado digitalmente por SANTOS GARCIA MARIA DE LOS ANGELES - ***3392** en Salamanca el día 25/07/2024 con un certificado emitido por AC FNMT Usuarios

Fdo. Dra. de los Mª Ángeles Santos García

Introducción

INTRODUCCIÓN

I.1 Hitos históricos de la Vitivinicultura

El vino ha sido una parte integral de la civilización humana durante miles de años, y los primeros signos de actividades vitivinícolas a gran escala se remontan al menos al 5000 a.C. Durante los milenios siguientes, se aplicaron estrategias de mejoramiento tradicional y selección a los precursores silvestres de las vides modernas para proporcionarnos la variedad de cultivares de *Vitis vinifera* que se utilizan hoy en día en la producción de vino.

Sin embargo, no fue hasta los siglos XIX y XX cuando se comenzaron a clasificar formalmente los microorganismos que eran responsables de la conversión del mosto de uva en vino (**Fig. 1**). Finalmente se identificó a la levadura *Saccharomyces cerevisiae* como el principal microorganismo responsable de la producción de vino, y se demostró que la bacteria *Oenococcus oeni* es responsable de la fermentación maloláctica, una fermentación secundaria que tiene lugar en muchos vinos (Borneman et al., 2013).

Figura 1. Cronología de acontecimientos más importantes en la vitivinicultura desde que se tiene registro de la aparición de la vid, hace 65 millones de años, hasta el conocimiento de la secuencia de más de 80 genomas de *S. cerevisiae*. Imagen tomada de Borneman et al., 2013.

Desde que el trabajo histórico de Antoine-Laurent de Lavoisier definió las reacciones químicas que sustentan la fermentación de los azúcares en etanol y dióxido de carbono, y Louis Pasteur determinó las bases biológicas de esta reacción, el vino ha ocupado un lugar destacado como plataforma aplicada para la investigación fundamental de vanguardia.

Esta rápida adopción de tecnología, aunque proporciona muchos beneficios a la industria del vino, incluido el uso de azufre como conservante, vides injertadas, química analítica del vino y cultivos iniciadores de levaduras y bacterias, también ha creado a menudo una división entre los llamados vinos "tradicionales" o enólogos del 'Viejo Mundo' y los del 'Nuevo Mundo' que buscan utilizar la tecnología para controlar el proceso de elaboración del vino (Borneman et al., 2013; Du Toit & Pretorius, 2019). Actualmente, la biotecnología modernaaporta novedades que mejoran la producción enológica y la calidad del producto final (Villalba, 2019).

I.2 La Vitivinicultura en España

En España, el sector vitivinícola es una parte muy importante, no solo de la economía, sino también de la sociedad y de la cultura. España es uno de los grandes productores mundiales de vino, según datos de la Organización Internacional de la Viña y el Vino (OIV, 2022), España es primero en el ranking por superficie plantada, ya que cuenta con 954,724 millones de hectáreas destinadas al cultivo de la vid en el año 2022 (aproximadamente el 13% de la superficie mundial y el 30% de la Unión Europea (Cachón, 2018). La vid ocupa el tercer lugar en extensión de los cultivos españoles, detrás de los cereales y el olivar. (www.oiv.int/es/what-we-do/country-report?oiv), tercero por producción (la producción media anual de vino y mosto es de entre 40 y 42 millones de hectólitros (40,5 millones en 2022) y segundo exportador mundial en términos de volumen con algo más de 2.300 millones de litros (2021), y tercero en término de valor con 2.914 millones de euros exportados en 2022 aportando valor a la economía.

España es responsable del 25% de la producción de vino en Europa, es decir 3 de cada 5 botellas comercializadas en el mundo proceden de la UE, elaborándose vino en las 17 Comunidades Autónomas de España, además el vino forma parte de la dieta mediterránea aportando efectos beneficiosos para la salud consumiéndolo con

moderación y en el contexto de una dieta equilibrada según datos aportados por la Federación Española del Vino (FEV) (OIV, 2022).

En España hay cerca de 150 variedades autóctonas de uva plantadas. Las más cultivadas son: Airen, Tempranillo, Bobal y Garnacha tinta. Cabe resaltar que España cuenta con una amplia red de figuras de calidad reconocidas es decir cuenta con 97 Denominaciones de Origen protegidas entre las que se incluyen denominaciones de origen, denominaciones de origen calificadas, vinos de pago y vinos de calidad. España también es líder en viñedo ecológico con 121.200 hectáreas plantadas (2020) que producen más de 400 mil toneladas de uva de vinificación. Y hay cerca de 4,133 bodegas (2020), de las que 3,536 son exportadoras. Además, los vinos españoles se venden en 189 países de todo el mundo según datos aportados por la Federación Española del Vino (FEV) https://www.fev.es/sector-cifras/.

El sector vitivinícola español tiene gran importancia, tanto por el valor económico que genera, como por la población que ocupa y por el papel que desempeña en la conservación medioambiental. (www.oiv.int/es/what-we-do/country-report?oiv).

I.3 Microbiología enológica

Según la OIV; el vino se define la bebida resultante exclusivamente de la fermentación alcohólica parcial o total de uvas frescas, estrujadas o no, o del mosto de uva. Su contenido alcohólico adquirido no debe ser inferior a 8,5% (porcentaje de alcohol por volumen) (OIV, 2022).

En una definición más amplia; el vino es una mezcla muy compleja de compuestos de uva, microorganismos y, en algunos casos, derivados del roble, que definen en gran medida sus propiedades de apariencia, aroma, sabor y sensación en boca. Los compuestos derivados de la uva proporcionan distinción varietal además de darle al vino su estructura básica. La fermentación de azúcares por levadura no sólo produce etanol y dióxido de carbono, sino también una serie de metabolitos volátiles menores, pero sensorialmente importantes, que confieren al vino su carácter vinoso. Estos metabolitos volátiles, que comprenden ésteres, alcoholes superiores, carbonilos, ácidos grasos volátiles y

compuestos de azufre, se derivan del metabolismo del azúcar y los aminoácidos (**Fig. 2**) (Swiegers & Pretorius, 2007; Borneman et al., 2013).

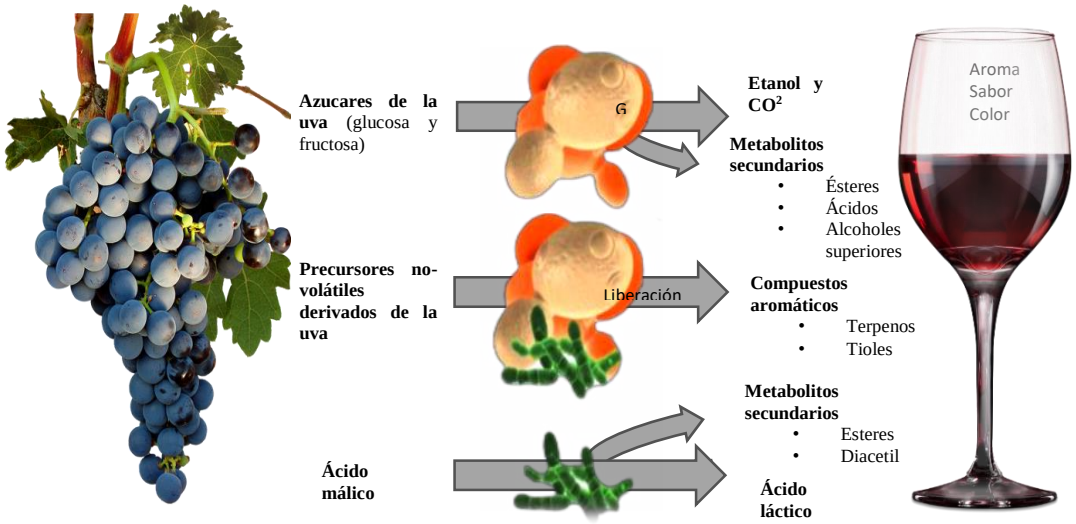


Figura 2. Impacto de las bacterias y levaduras durante la fermentación del vino (adaptado de Borneman et al., 2013)

El jugo de uva y (especialmente) el vino contienen una matriz desafiante, en la que azúcar, etanol, ácidos orgánicos, aminoácidos, ácidos grasos y otros metabolitos derivados del metabolismo de la levadura durante la fermentación alcohólica, el contenido de fenol, el pH y el dióxido de azufre (SO_2) determinan el crecimiento de los microorganismos del vino (Krieger et al., 2020)

Así pues, durante la fermentación alcohólica (FA) las levaduras son las protagonistas (levaduras no-*Saccharomyces* al principio y *Saccharomyces* posteriormente) mientras que la contribución de las bacterias lácticas y acéticas a la fermentación alcohólica es considerada nula y su desarrollo suele estar ligado a alteraciones. Después de la fermentación alcohólica, hay un crecimiento de las poblaciones de bacterias lácticas hasta 10^7 u.f.c./ml. Estas llevarán a cabo la fermentación maloláctica y, tan pronto como el ácido málico se transforma completamente a ácido láctico, esta población de bacterias comienza a declinar (Guisado, 2017).

I.3.1. Microorganismos asociados al vino

La primera observación de microorganismos en el vino en fermentación fue posible gracias al desarrollo del microscopio por Antonie van Leeuwenhoek a mediados del siglo XVII, y la microbiología del vino se explicó en la década de 1850, cuando Louis

Pasteur observó la conversión del jugo de uva en vino por la acción de la levadura. También vio que en este medio podían crecer ciertas bacterias que causaban deterioro. Los microorganismos involucrados están en el centro del proceso de elaboración del vino, ya sea para bien o para mal; afectan a la calidad del vino y determinan el balance económico de la producción vitivinícola. El proceso de elaboración del vino es un nicho ecológico complejo donde la bioquímica y la interacción de levaduras, bacterias y hongos juegan un papel fundamental en el producto final (Du Toit & Pretorius, 2019)

La función principal de los microorganismos en la elaboración del vino es convertir los azúcares de la uva en alcohol, Aunque el mosto de uva tiene una composición de nutrientes relativamente completa, sólo puede sustentar un número limitado de microorganismos, y el vino, con sus nutrientes limitados, es aún menos atractivo. Las presiones de selección más fuertes contra las levaduras y las bacterias en el mosto de uva son el alto contenido de azúcar y el bajo pH, mientras que, en el vino, son el alto contenido de etanol, acidez, SO_2 y nutrientes limitados (Bartowsky, 2008). Las contribuciones de las levaduras y las bacterias a la fermentación del vino y la tecnología elegida son factores cruciales que influyen en la composición general del vino (James et al., 2023)

La elaboración del vino incluye dos transformaciones principales, fermentación alcohólica y fermentación maloláctica. Ambas contribuyen esencialmente a la calidad final del producto y se llevan a cabo por una sucesión de microorganismos fundamentalmente levaduras y bacterias lácticas (Villalba, 2019; James et al., 2023).

De esta manera el vino contiene una gran cantidad de compuestos volátiles de sabor y aroma que no están presentes en el jugo de uva y que se producen mediante la acción de microorganismos. Durante la elaboración del vino, la conversión inicial del mosto de uva en vino inicia con la fermentación alcohólica (FA) llevada a cabo por una o más cepas de levadura, típicamente *Saccharomyces cerevisiae* (Sumby et al., 2019). La fermentación alcohólica es el proceso bioquímico por el cual los azúcares del mosto se transforman principalmente en etanol y dióxido de carbono, mediante una sucesión de reacciones en cadena que tienen lugar en el citoplasma de las levaduras (Sumby et al., 2019).

La función principal de la levadura *S. cerevisiae* es convertir los azúcares de la uva en etanol reducir la acidez del mosto e introducir aromas y sabores agradables. Durante este proceso también se producen muchos metabolitos secundarios que son los responsables de imprimir distintos sabores y aromas al producto final, el vino (Bartowsky, 2008).

La fermentación maloláctica (FML) generalmente la llevan a cabo bacterias del ácido láctico (BAL), particularmente *Oenococcus oeni*, un microorganismo Gram positivo que se cree que evolucionó para sobrevivir exclusivamente en el ambiente de bebidas fermentadas (Sumby et al., 2019). La fermentación maloláctica consiste en la desacidificación biológica del vino que resulta de la transformación del ácido L (-) málico (dicarboxílico) en ácido L (+) láctico (monocarboxílico) y dióxido de carbono por acción de las bacterias lácticas (Sumby et al., 2019).

Esta transformación tiene un doble efecto: por un lado, desacidifica el vino, es decir eleva el pH, tanto más cuanto más alto es el contenido inicial de ácido málico, y por otra parte lo suaviza, al hacer desaparecer el sabor ácido y duro del ácido málico y sustituirlo por el sabor más suave del ácido láctico. Por lo tanto, la fermentación maloláctica modifica las características organolépticas del vino a la vez que contribuye a su estabilidad microbiológica, por lo que se considera indispensable para la estabilidad del vino, constituyendo el primer paso hacia la fase de envejecimiento (Villalba, 2019).

La función principal de la bacteria *O. oeni* es realizar la fermentación maloláctica en la que el vino se desacidifica mediante la conversión de ácido málico en ácido láctico. Como se ha visto en el caso de la levadura, el crecimiento de *O. oeni* también produce metabolitos secundarios que influyen en el sabor del vino. Ambas especies también producen “enzimas liberadoras de sabor” que liberan moléculas aromáticas volátiles a partir de precursores no volátiles presentes en la uva (generalmente como glucósidos unidos a azúcar) (Pretorius et al., 2012; Borneman et al., 2013).

I.3.2 Dinámica de las poblaciones de microorganismos en la vinificación

La microflora de las uvas es muy variable, el número de levaduras en la uva justo antes de la cosecha varia de 10^3 a 10^6 u.f.c./ml (Guisado, 2017) principalmente debido a la influencia de factores externos como parámetros ambientales, ubicación geográfica, cultivares de uva y aplicación de fitoquímicos en los viñedos (Pinto et al., 2015). Al inicio de la fermentación, las especies de levaduras predominantes pertenecen a las levaduras denominadas no *Saccharomyces*, de los géneros *Hanseniaspora, Candida, Pichia, Metschnikowia, Lachancea (Kluyveromyces), Zygosaccharomyces, Torulaspora, Starmerella, Dekkera* y *Schizosaccharomyces* (Combina et al., 2005; Fleet, 2008; Barata et al., 2012; Pinto et al., 2015).

Por el contrario, la población de la principal levadura vínica *Saccharomyces cerevisiae* en el mosto es muy baja. Las levaduras no *Saccharomyces* proliferan en los primeros días de fermentación hasta poblaciones aproximadamente de 10^6 -10^7 u.f.c./ml. Sin embargo, la viabilidad de estas especies de levaduras se ve disminuida conforme avanza la fermentación alcohólica debido al aumento de la concentración de etanol, el agotamiento de nutrientes claves como el nitrógeno y el aumento constante de la temperatura de fermentación favorecen la rápida proliferación de las cepas de *S. cerevisiae* llegando a poblaciones entre 5x10^7 -10^8 u.f.c./ml en detrimento de estas otras especies mayoritarias del mosto de uva (**Fig.3**) (Ribéreau-Gayon et al., 2005; Pinto et al., 2015; Guisado, 2017)

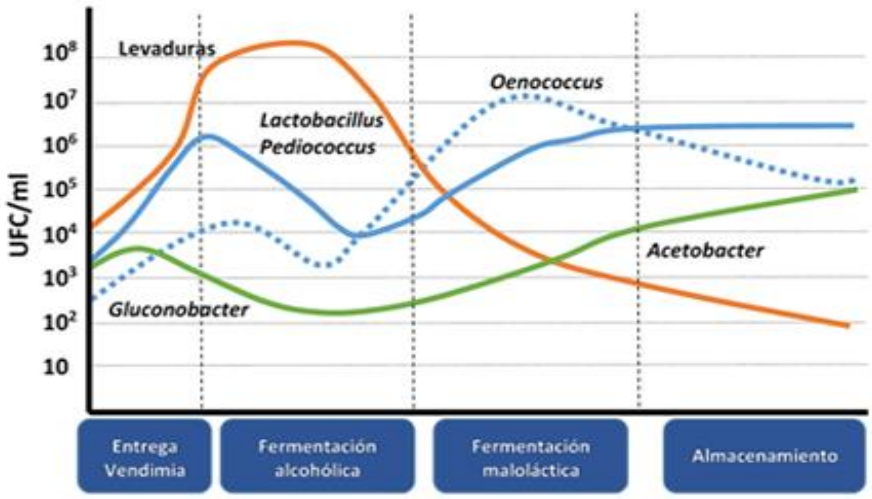


Figura 3. Dinámica de crecimiento de levaduras y bacterias durante la elaboración del vino**.** AF, fermentación alcohólica; MLF, fermentación maloláctica (Bartowsky, 2017).

Las especies de bacterias del ácido láctico más frecuentes en mosto y en vino pertenecen a los géneros *Lactobacillus, Leuconostoc, Pediococcus* y *Oenococcus*. Estas

están presentes a lo largo de la vinificación en números relativamente bajos (10^2-10^3 u.f.c./ml), debido a la competencia metabólica con las levaduras y a las características del medio (Krieger-Weber et al., 2020). Una vez concluye la fermentación alcohólica, la concentración de levaduras disminuye progresivamente y, con ello, la competencia generada con las bacterias lácticas, permitiendo que éstas se multipliquen alcanzando la población un tamaño que en ocasiones llega a ser cerca de 10^6-10^8 u.f.c./ml (Ribéreau-Gayon et al., 2005).

Por último, la presencia de bacterias acido acéticas (BAA) y hongos filamentosos en mostos y vinos, depende mayoritariamente de la calidad sanitaria de la uva. Las bacterias acéticas también pueden estar presentes durante la fermentación tanto alcohólica como maloláctica. Su presencia depende mayoritariamente de la calidad sanitaria de la uva de origen (Guisado, 2017).

Uvas podridas por exceso de lluvias, o contaminadas con *Botrytis cinerea*, producen mostos con poblaciones muy elevadas de bacterias acéticas y hongos filamentosos. En el mosto, las especies mayoritarias de bacterias ácido acéticas son *Gluconobacter oxydans*, *Acetobacter aceti* y *Acetobacter pasteurianus*, mayoritarias también en la uva y en menor medida *Gluconobacter liquefaciens* y *Ga. Hansenii* que son aisladas mayoritariamente también de uva (González et al., 2005; Valera et al., 2011)

En cuanto a los hongos filamentosos, los más comunes en las uvas son *Botrytis cinerea*, causante de la podredumbre noble o gris en uva y especies pertenecientes a los géneros, *Uncinula, Alternaria, Plasmopora, Aspergillus, Penicillium, Rhizopus*, *Oidium, Cladosporium* y *Trichoderma,* que infectan a las uvas y pueden afectar a las características organolépticas y sanitarias de los mostos y vinos. Respecto a la presencia de hongos filamentosos en el vino, es escasa debido a las condiciones de anaerobiosis de la fermentación y las condiciones del medio como, el contenido alcohólico elevado o la presencia de anhídrido sulfuroso, el cual puede penetrar en las células y, dependiendo de su concentración, puede provocar la muerte de estos hongos, acción fungicida, o inhibir temporalmente su actividad, acción fungistática. Estos hongos filamentosos aparecen en mayor concentración en mostos, disminuyendo progresivamente a niveles muy bajos conforme avanza la fermentación alcohólica (Barata et al., 2012)

Más de 22 levaduras no *Saccharomyces*, que se ha demostrado que influyen directamente en la calidad del vino, incluyen *Aureobasidium pullulans, Brettanomyces bruxellensis, Candida inconspicua, Candida stellata, Candida vini, Cryptococcus magnus, Cyberlindnera jadinii, Hanseniaspora uvarum, Hanseniaspora apiculate, Metschnikowia pulcherrima, Pichia fermentans, Pichia kluyveri, Pichia manshurica, Pichia membranifaciens, Pichia occidentalis, Rhodotorula glutinis, Rhodotorula mucilaginosa, Saccharomycodes ludwigii, Starmerella bacillaris, Torulaspora delbrueckii, Wickerhamomyces anomalus* y *Zygosaccharomyces bailii*. Además, algunas levaduras son resistentes al etanol y sobreviven durante la fermentación durante un período significativamente largo. Por ejemplo, *Schizosaccharomyces pombe, Torulaspora delbrueckii, Starmerella bacillaris* y *Zygosaccharomyces bailii* pueden sobrevivir a la fermentación alcohólica por su resistencia al etanol (James et al., 2023).

I.4 Microorganismos que deterioran el vino

Los microorganismos que deterioran el vino constituyen uno de los problemas más relevantes para la industria vitivinícola, debido a productos indeseables provocando pérdidas económicas considerables en todo el mundo (Barata et al., 2008; Berbegal et al., 2017; Lebleux et al., 2020).

El proceso de elaboración del vino incluye múltiples etapas en las que puede producirse deterioro microbiano, alterando la calidad y el estado higiénico del vino volviéndolo inaceptable (Du Toit & Pretorius, 2019). Existen tres etapas en las que los microorganismos pueden entrar en el proceso de elaboración del vino y ejercer un efecto influyente sobre la calidad del producto final. La primera etapa involucra la materia prima. La uva está en contacto directo con los equipos de la bodega (trituradoras, prensas, tanques, tuberías, bombas, unidades de filtración, etc.), y al no estar adecuadamente higienizados los equipos servirán como inoculante del mosto. No todas las uvas entregadas a una bodega se encuentran en buen estado de salud, lo que afectará a la biodiversidad natural de los microorganismos presentes en el mosto. La microflora natural se ve afectada indirectamente por condiciones externas como la variedad de uva, el estado de la uva en el momento de la cosecha, la salud de la uva (por ejemplo, daños físicos debidos a pájaros, insectos, cosecha y ataque de moho), temperatura,

precipitaciones, suelo, uso de insecticidas y fungicidas, y otras prácticas vitícolas (Du Toit & Pretorius, 2000)

La segunda etapa de deterioro puede ocurrir durante la fermentación. En este punto el mosto contiene la flora natural de la uva junto con la flora que alberga la bodega y su equipamiento. La composición del mosto (alto contenido en azúcares y ácidos, y bajo pH) y la adición de dióxido de azufre (SO_2) al mosto ejerce una presión selectiva sobre el desarrollo de levaduras y bacterias durante la fermentación alcohólica (Du Toit & Pretorius, 2000)

La tercera etapa en la que el producto puede ser susceptible de deterioro es la post fermentación. En este caso, el deterioro puede producirse en botella o durante el almacenamiento en barricas de roble. Durante esta etapa, los factores críticos son una buena higiene de la bodega, la exclusión de oxígeno y la dosis correcta de agentes antimicrobianos para garantizar un producto estable, producto que resistirá el ataque de levaduras y bacterias perjudiciales (Du Toit & Pretorius, 2000)

En los vinos, los principales microorganismos alterantes son las levaduras de los géneros *Dekkera/Brettanomyces, Candida, Hansenula, Hanseniaspora/Kloeckera, Pichia, Saccharomycodes* y *Zygosaccharomyces*, entre otros; las bacterias del ácido láctico (BAL) *Lactobacillus, Leuconostoc* y *Pediococcus*; y los géneros de bacterias del ácido acético *Acetobacter* y *Gluconobacter*. Los defectos causados incluyen un amargor excesivo y sabores desagradables, como olor a éster, vinagre, mantequilla, carácter a geranio y carácter fenólico (olor a caballo) (**Tabla 1**). También causan problemas visuales sensoriales, como formación de películas, turbidez, viscosidad y sedimentos (Bartowsky, 2008; Cosme et al., 2018) (**Fig. 4**).

Tabla 1. Alteraciones del vino asociadas a levaduras

Alteración	Levadura responsable

Olor a ésteres y aldehídos; aumento de la acidez volátil	*Pichia, Hanseniaspora, Hansenula, Metschnikowia, Dekkera, Candida*
Formación de películas superficiales	*Candida, Pichia*
Olor a ratón, caballo	*Brettanomyces*
Refermentación en la botella	*Saccharomyces, Zigosaccharomyces bailii*
Olor a oxidado por el acetaldehído	*Saccharomycodes ludwigii, Pichia membranifaciens*
Desacidificación del vino	*Schizosaccharomyces*

Datos tomados de Cosme et al., 2018

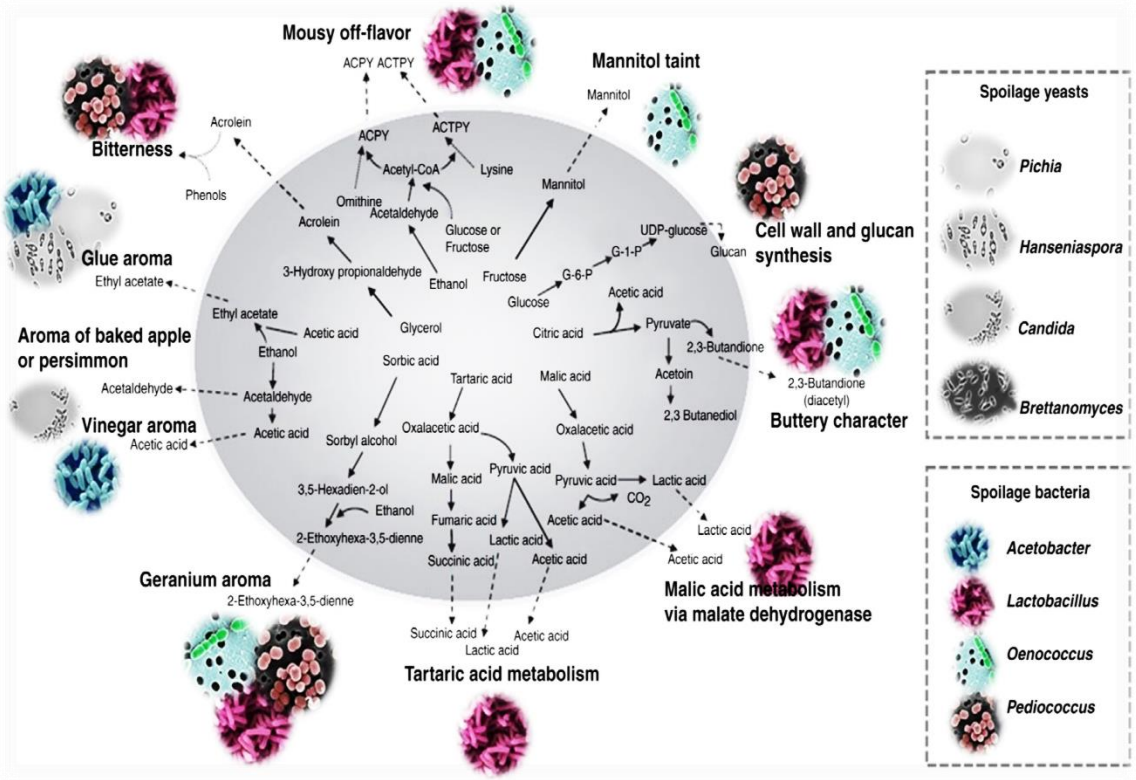


Figura 4. Principales vías metabólicas seguidas por bacterias y levaduras para la producción de las sustancias que inciden negativamente en el aroma y sabor del vino. Tomado de Cosme et al., (2018)

I.4.1 *Brettanomyces/Dekkera*

Las levaduras que pertenecen al género *Brettanomyces/Dekkera*, en particular *Brettanomyces bruxellensis*, son generalmente conocidas como los principales microorganismos de deterioro enológico (Oelofse et al., 2008; Portugal et al., 2014; Agnolucci et al., 2017; Berbegal et al., 2017; Lleixà et al., 2021; Da-Silva et al., 2023). El nombre *Brettanomyces* fue introducido por primera vez en 1904 por Claussen para describir una levadura utilizada en la producción de cerveza inglesa (Claussen, 1904).

Brettanomyces se convirtió en un género reconocido en 1920, cuando se aisló de cervezas lambic en Bélgica, y se detectó por primera vez en vino en 1930 (Agnolucci et al., 2017; Pinto et al., 2020)

B. bruxellensis se propaga dentro del entorno de la bodega mediante la importación de vino contaminado, la mala higiene de mangueras, tanques y barriles de madera, o mediante la adherencia pasiva al cuerpo de la mosca de la fruta. La levadura se caracteriza por tener un crecimiento lento y se detecta en cantidades bajas en las primeras etapas de la elaboración del vino. También es tolerante a altas concentraciones de etanol y bajas concentraciones de azúcar (Mehlomakulu et al., 2015).

B. bruxellensis, o su forma teleomorfa *Dekkera bruxellensis*, es una de las especies capaz de reproducirse sexualmente, es una de las especies reconocidas en la industria vitivinícola por conferir características olfativas no deseadas, similares a lana mojada, olores a humedad y medicinal, plástico quemado o sudor a caballo, imprimiendo a los vinos el denominado "Carácter Brett". Estos olores–sabores son debido a la producción de compuestos volátiles que se producen durante el proceso de elaboración del vino, confiriendo olores desagradables (Poblete et al., 2020; Comitini et al., 2021).

Los vinos estropeados por la presencia de los compuestos volátiles asociados a la presencia de *B. bruxellensis* provocan importantes pérdidas económicas anualmente estimadas en unos 1,4 millones de dólares en todo el mundo (Miranda et al., 2023). Estos aromas particulares se producen a partir de compuestos fenólicos que están presentes en la uva y los mostos, los ácidos hidroxicinámicos (AHC) (Poblete et al., 2020).

El origen de los fenoles volátiles implica la acción secuencial de dos enzimas sobre un sustrato de ácido hidroxicinámico (ácido ferúlico, p-cumárico o cafeico). En el primer paso, la hidroxicinamato descarboxilasa transforma los ácidos hidroxicinámicos en vinilfenoles (VP, 4-vinilfenol, 4-VG, 4-vinilguaiacol; 4-VC, 4-vinilcatecol), y luego, la vinilfenol reductasa los reduce a derivados etílicos (4-EP, 4-etilfenol; 4-EG, 4-etilguaiacol; 4-EG, 4-etilcatecol) (Oelofse, et al., 2008; Longin et al., 2016; Berbegal et al., 2018; Lebleux et al., 2020; Le Montagner et al., 2023). Todos ellos son metabolitos secundarios producidos por *Brettanomyces* a partir de los ácidos fenólicos presentes

naturalmente en vino (Portugal et al., 2014). Su umbral organoléptico en vino tinto es de 605 y 110 mg/L, respectivamente para 4-EP y 4-EG (**Fig. 5**) (Berbegal et al., 2017).

El mal sabor a ratón, en una de las primeras anotaciones, se ha descrito como un "sabor peculiarmente desagradable en el vino, que se parece mucho al olor de una residencia de ratones". El mal sabor a ratón es un problema subyacente constante para la industria del vino. Hay tres compuestos conocidos que causan un mal sabor a ratón: 2-etiltetrahidropiridina, 2-acetiltetrahidopiridina y 2-acetilpirrolina derivados de aminoácidos, azúcares y etanol (Snowdon et al., 2006) (Portugal, 2012). *B. bruxellensis* produce dos de ellos: 2-acetiltetrahidropiridina (ATHP) y 2-etiltetrahidropiridina (ETHP) lo que da origen el "gusto a ratón" en los vinos alterados, siendo muy persistente, desagradable y capaz de producir sensaciones en boca aún peores por la acción secuestrante que estos compuestos ejercen sobre los mucílagos de la saliva (Portugal, 2012). El primer compuesto tiene un umbral de 1,6µg/L y aproximadamente 100 veces menor que el de ETHP (Longin et al., 2016). La presencia de *B. bruxellensis* se reporta durante todo el proceso de elaboración del vino, desde la uva hasta el vino terminado, debido a mecanismos que le permiten crecer en condiciones estresantes (Le Montagner et al., 2023).

Otros ácidos grasos volátiles importantes producidos por estas levaduras que pueden tener un impacto en la calidad del vino incluyen: ácido isovalérico (ácido 3-metilbutanoico), ácido 2-metilbutírico y ácido isobutírico. Anteriormente se había descubierto que el ácido isovalérico era el olor dominante en vinos clasificados como que contenían un alto grado de "carácter *Brettanomyces*". El carácter aromático del ácido isovalérico se ha descrito como "rancio" tras un análisis de cromatografía de gases-olfactometría (GC-O), aunque los paneles sensoriales a menudo se refieren a aromas "sudorosos" y "a queso" al describir este compuesto (Du Toit et al., 2005; Oelofse et al., 2008; Bartowsky, 2017).

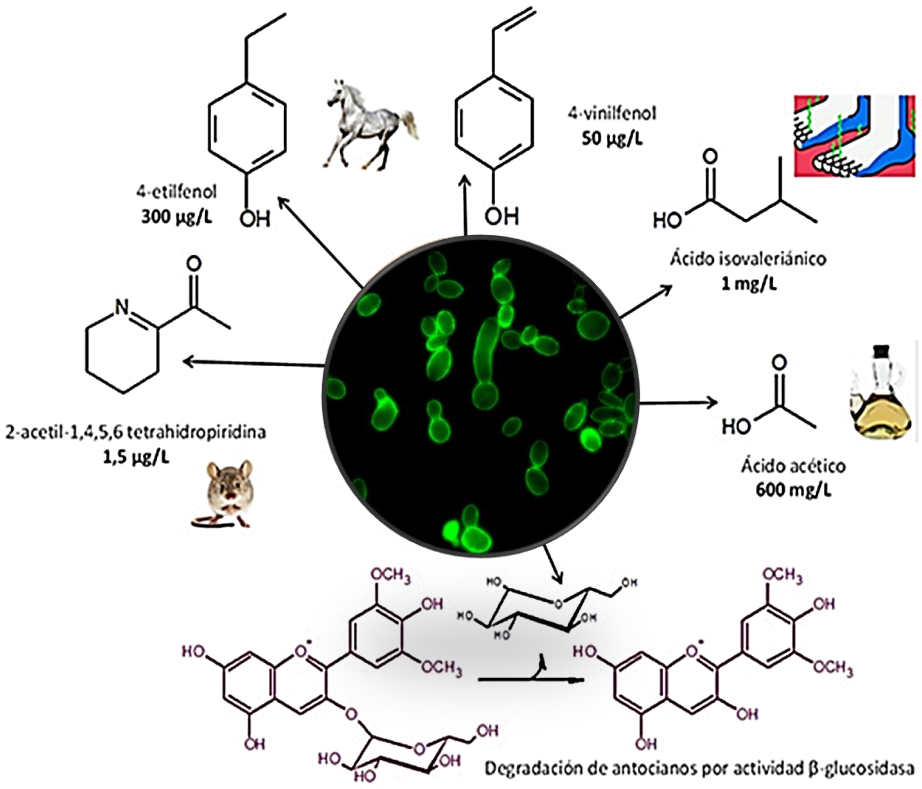


Figura 5. Defectos sensoriales en vinos producidos por el metabolismo y actividades enzimáticas de *Brettanomyces/Dekkera*.[1] Se muestran los umbrales olfativos de cada compuesto.

Estas levaduras también pueden producir otros metabolitos, incluido el ácido acético y aminas biogenicas. Una *Dekkera/ Brettanomyces bruxellensis* fue capaz de formar hasta 15 mg/L-^{1} de aminas totales, principalmente 2-feniletilamina (Vigentini et al., 2008).

También es conocido que *B. bruxellensis* puede entrar en un estado viable pero no cultivable (VBNC), caracterizado por una actividad metabólica y tamaño celular reducido, e incapaz de crecer cuando se cultiva en medios sólidos. El estado VBNC se puede mantener durante toda la fermentación alcohólica cuando los niveles de SO_2 molecular son más altos y el oxígeno es limitado. El intervalo entre el final de la fermentación alcohólica y el inicio de la fermentación maloláctica (FML) representa un período crítico durante el cual *B. bruxellensis* puede salir de la VBNC y crecer hasta niveles detectables debido a la baja concentración molecular de SO_2 en esta fase (Oelofse et al., 2008; Mehlomakulu et al., 2015).

[1] https://www.acenologia.com/brett_el_enemigo_silencioso_cienc177_0820/

Además, la disponibilidad de azúcares residuales, compuestos asimilables que contienen nitrógeno (aunque limitados), así como las condiciones microaeróbicas encontradas durante el envejecimiento en barricas de madera después de la FML, también favorecen la proliferación de *B. bruxellensis*. Los vinos tintos son particularmente propensos al desarrollo de *B. bruxellensis* y la posterior producción de etilfenoles en comparación con los vinos blancos, debido a las variedades tintas de *Vitis vinifera* que contienen precursores fenólicos, precursores no flavonoides y flavonoides (Mehlomakulu et al., 2015).

Aparte de esta levadura, existen diferentes grupos bacterianos implicados en el deterioro del vino. Varias especies de bacterias acido acéticas *Acetobacter* y *Gluconobacter*, y bacterias del ácido láctico pertenecientes a los géneros *Lactobacillus, Pediococcus* y *Leuconostoc* se encuentran con frecuencia en el vino. Su presencia se asocia a sabores desagradables debido a la producción de peróxido de hidrogeno, aminas biogénicas o de acroleína por oxidación de compuestos fenólicos. Generalmente, la actividad de estas bacterias puede producir un sabor desagradable, a veces descrito como irritante o similar a vinagre (Villalba, 2019).

I.4.2 Bacterias acido acéticas (BAA)

Las bacterias del ácido acético (BAA) también se consideran microorganismos perjudiciales en la elaboración del vino al oxidar el etanol a ácido acético en un proceso conocido como acetificación (Bartowsky, 2008; De Ullivarri et al., 2014). Las bacterias del ácido acético son bacilos gramnegativos y catalasa positivos. Se clasifican en los géneros *Acetobacter, Acidomonas, Gluconobacter* y *Gluconacetobacter*. De estos, *G. oxydans, A. aceti, A. pasteurianus, Gluconacetobacter liquefaciens* y *Gluconacetobacter hansenii* se asocian normalmente con las uvas y el vino (Du Toit et al., 2005).

Debido a las diferencias en la tolerancia al etanol y su preferencia por el etanol como fuente de carbono y energía, las especies de *Acetobacter* se aíslan con mayor frecuencia del vino, mientras que las especies de *Gluconobacter* se aíslan del mosto de uva. *Gluconobacter oxydans* es la principal especie asociada a la uva y al mosto de uva. Estas especies prefieren un ambiente rico en azúcar y usualmente mueren durante las

fermentación alcohólica (Du Toit & Lambrechts, 2002; Bartowsky & Henschke, 2008; Valera et al., 2011).

Las especies de *Acetobacter* prefieren el etanol como fuente de carbono y generalmente dominan durante las últimas etapas de la fermentación y en el vino. El género *Acetobacter* está compuesto por siete especies; cuatro son importantes en la elaboración del vino: *Acetobacter aceti, Acetobacter hansenii, Acetobacter liquefaciens* y *Acetobacter pasteurianus* (Du Toit & Pretorius, 2000). Las dos especies de *Acetobacter* que se aíslan con mayor frecuencia del vino son *A. aceti* y *A. pasteurianus* (Valera et al., 2011).

Más recientemente se ha descrito una nueva especie de *Acetobacter, A. oeni*, aislada de vino tinto estropeado en la región de Dão, Portugal (Valera et al., 2011). La principal característica distintiva entre *Acetobacter* y *Gluconobacter* es la capacidad de oxidar el ácido acético a CO_2. Las especies de *Acetobacter* pueden oxidar etanol a ácido acético y luego a dióxido de carbono y agua, mientras que las especies de *Gluconobacter* no tienen un ciclo completo del ácido cítrico y no pueden oxidar el etanol más que al ácido acético. A veces se hace referencia a *Gluconobacter* como suboxidantes y *Acetobacter* como sobreoxidantes, debido a su diferencia en el potencial oxidativo (Bartowsky & Henschke, 2008).

Los vinos estropeados por BAA tienen una volatilidad característica, una acidez parecida al vinagre en el paladar y una gama de aromas acéticos, de nuez, parecidos al jerez, a disolvente o a manzana magullada y, a menudo, una reducción de los caracteres frutales. También se produce deterioro bacteriano en vino envasado, como en botellas colocadas verticalmente. Esto es visualmente evidente como un anillo distintivo de biomasa bacteriana que se deposita en el cuello de la botella en la interfaz entre el vino y el aire (Bartowsky et al., 2003; Bartowsky & Henschke, 2008).

El aislamiento de BAA de uvas, bodegas, vinos y barricas de roble está bien documentado. *Gluconobacter* tiene preferencia por ambientes ricos en azúcar donde el alcohol está presente en bajas concentraciones. Esto explica por qué *Gluconobacter* normalmente se aísla de la uva y del mosto y desaparece en cuanto comienza la fermentación alcohólica. *Acetobacter* spp. son más tolerantes al etanol y pueden

sobrevivir a través de la fermentación alcohólica para ejercer influencia en el producto final si no se tiene cuidado. Las uvas sanas y vírgenes albergan poblaciones bajas de AAB, generalmente (Du Toit & Pretorius, 2019).

Las BAA pueden producir acetaldehído en concentraciones de hasta 250 mg/l, que supera el umbral de 100 a 125 mg/l, más allá del cual la percepción sensorial se ve afectada. El acetaldehído puede dar al vino un carácter oxidado. Las bacterias del ácido acético también son capaces de producir altas concentraciones de ácido acético, lo que se considera perjudicial para la calidad del vino en concentraciones que oscilan entre 0.7-1.2 g/l y superiores, dependiendo del estilo de vino, aunque puede ser perceptible en concentraciones más bajas (Du Toit et al., 2005).

Otro producto del metabolismo de las bacterias del ácido acético que podría afectar la calidad del vino es el acetato de etilo. Este éster de ácido acético puede contribuir positivamente al aroma del vino en concentraciones bajas, pero se considera indeseable en concentraciones más altas debido al bajo umbral de detección de 12.3 mg/l afectando el sabor, el acetato de etilo tiene un aroma penetrante, parecido al de un disolvente y que recuerda al quitaesmalte (Du Toit et al., 2005; Bartowsky & Henschke, 2008).

I.5 Métodos de control del deterioro microbiano del vino

El vino es susceptible de deteriorarse y contaminarse con la consiguiente eliminación y carga comercial. En este punto, es habitual que algunas especies de levaduras se relacionen con el deterioro enológico, alterando las características organolépticas del vino. Por lo tanto, el proceso de elaboración del vino requiere de un seguimiento microbiológico y químico en cada una de sus etapas, como selección de uva, empaque y almacenamiento final, aplicando diferentes técnicas para garantizar su calidad e inocuidad. Por ello varios estudios han evaluado técnicas efectivas, simples y económicas para controlar y monitorear la incidencia y el impacto de los microorganismos de descomposición (Bullé et al., 2022).

Se pueden aplicar estrategias físicas, químicas y biológicas para favorecer únicamente el crecimiento de microorganismos deseables en la vinificación (Agnolucci et al., 2017). Hay diferentes tratamientos disponibles para prevenir la contaminación por

B. bruxellensis y el consiguiente deterioro del vino que provoca. Durante las últimas dos décadas, la contaminación por *Brettanomyces* spp. en los vinos embotellados y en el entorno de la bodega ha despertado interés, debido a la alta producción de compuestos fenólicos volátiles, su gran resistencia al estrés y sus características metabólicas peculiares.

El uso de tecnologías emergentes, como alta presión hidrostática, ultrasonidos, campos eléctricos pulsados, irradiación UV, microondas, ozono y agua electrolizada, novedosos agentes de acabado y enfoques biotecnológicos resultaron útiles para reducir los niveles de contaminación y la producción de sabores desagradables (Pinto et al., 2020).

La adición de conservantes químicos destaca por su sencillez y bajo coste, a pesar de posibles daños a las características organolépticas del vino. La aplicación de métodos físicos, aunque costosa, muestra resultados eficientes en alterar la inactivación microbiana sin alterar las características organolépticas, sin embargo, tiene un alto costo. Aunque las técnicas biotecnológicas y los biosensores se describen como técnicas prometedoras para aplicaciones enológicas, su alto costo dificulta la implementación industrial en comparación con los métodos convencionales (Bullé et al., 2022).

En cuanto a los tratamientos físicos, los más comunes son la pasteurización flash (72ºC durante 15 segundos y enfriamiento rápido) y la filtración por membranas (tratamientos curativos), entre otros (**Tabla 2**). Mientras que los tratamientos químicos utilizan principalmente quitosano (tratamiento preventivo) (**Tabla 3**) o sulfito (tratamiento preventivo y curativo) (Longin et al., 2016).

Tabla 2. Métodos físicos para controlar la proliferación de *Brettanomyces* spp. (*)

Tecnología	Aplicación	Tratamiento	Efecto antimicrobiano	Efecto sensorial	Desventajas
Alta presión hidrostática (HHP)	Vino	400 MPa-5s	Reducción de >5 log u.f.c./ml	Sin cambios sensoriales	Altos costos del equipo
Campos eléctricos pulsados (PEF)	Mosto de uva/ vinos jóvenes	Intensidad del campo eléctrico 50 Kv/cm, energía especifica 117-121 kJ/kg	Reducción de 3 log u.f.c./ml	Sin cambios sensoriales	Recuperación de células viables durante la crianza del vino
Ultrasonidos de alta potencia (HPU) con agua caliente	Saneamiento de barriles	Frecuencia 20 kHz, 3.8 kW combinado con agua caliente (60ºC) por 6 min	Reducción de 3.4 log u.f.c./ml	Quemaduras, humo u olor a oxidado en el vino	Equipo personalizado exclusivamente para cada aplicación
Luz Ultravioleta (UV)	Vino	Dosis de UV 459-3672 J/L, flujo 4000L/h	Reducción de 4 log u.f.c./ml	Sin datos	La eficacia depende de la turbidez, el color y la carga microbiana inicial
Microondas (MW)	Mosto de uva	2.2 W/g, 200s	Constante de tasa de crecimiento	Sin datos	Dificultades en la ampliación de la tecnología

*Información extraída de Pinto et al., (2020)

Tabla 3. Métodos químicos propuestos para el control de *Brettanomyces* spp. (*)

Químico	Aplicación	Tratamiento	Efecto antimicrobiano	Desventajas
Tratamientos de desinfección				
Ozono (O_3)	Uva	32 ppm, 24 h	Reducción de 2.2 log u.f.c./g	El tratamiento no erradica en su totalidad a las levaduras
Agua electrolizada (EW)	Uva	400 mg/L cloro libre, 12 min	Reducción de >1 log u.f.c./g	Potencial formación de cloroanisoles en el vino
Agentes de acabado				
Quitosano	Vino	8 g/hL	Reducción de >3 log u.f.c./g	Recrecimiento de levaduras durante la crianza del vino
Plata coloidal	Vino	Nanopartículas de GSH-Ag 200 mg/L de timol	Reducción de 3 log u.f.c./g	Posibles problemas de seguridad
Compuestos de aceites esenciales (EOs)	Filtración del vino	Timol o carvacrol inmovilizados sobre membranas celulósicas	Reducción de la viabilidad relativa >95%	Es necesario probar la eficacia utilizando la matriz del vino
Sulfitos (SO_2)	Mosto, vino	SO_2 Se puede añadir al prensado (al mosto) o posteriormente al vino antes del envejecimiento y/o del embotellado, o ambas cosas	Puede inhibir el crecimiento de *Dekkera/Brettanomyces* cuando el SO_2 libre esta justo por debajo de 20 mg/L a pH 3.6–3.7	Altas dosis de SO_2 pueden causar problemas de salud al consumidor Inducir el estado VBNC de *B. bruxellensis* en el vino Altas concentraciones pueden tener efectos perjudiciales para la vinificación

Información extraída de Pinto et al., (2020)

I.5.1 Dióxido de azufre (SO2), sulfitos

Entre los numerosos insumos enológicos, la protección del mosto y del vino mediante dióxido de azufre (SO_2) es sin duda una de las prácticas más antiguas (Roullier-gall et al., 2017). El uso generalizado del dióxido de azufre (SO_2) parece remontarse a finales del siglo XVIII. Sus numerosas propiedades lo convierten en una ayuda indispensable en la elaboración del vino. Quizás algunos vinos podrían elaborarse en ausencia total o casi total de SO_2, pero ciertamente sería presuntuoso afirmar que todos los vinos producidos en las distintas bodegas del mundo podrían elaborarse de esta manera. También hay que tener en cuenta que las levaduras producen pequeñas cantidades de SO_2 durante la fermentación (Ribéreau-Gayon et al., 2005).

Los sulfitos son un grupo de moléculas, dióxido de azufre (SO_2), bisulfito de sodio ($NaHSO_3$) y potasio ($KHSO_3$), que se utilizan en los alimentos como agentes antimicrobianos y antioxidantes. Su efecto antimicrobiano se lleva a cabo mediante la absorción de grupos SH de los sulfitos en la célula del microorganismo, donde reaccionan con proteínas, ADN y enzimas. Mientras que el efecto antioxidante se produce al inhibir tanto las reacciones de Maillard (reacciones químicas entre aminoácidos y azucares reductores) como la enzima polifenol oxidasa (Carocho et al., 2014).

Durante el almacenamiento, el SO_2 dificulta el desarrollo de todo tipo de microorganismos: levaduras, bacterias lácticas y, en menor medida, bacterias acéticas. Evita la formación de turbidez debida a levaduras, fermentaciones secundarias de vinos blancos dulces, la contaminación por *Brettanomyces* y la posterior formación de etilfenoles, el desarrollo de la levadura micodermica (flor) y varios tipos de deterioro por bacterias (Ribéreau-Gayon et al., 2005).

Debido a un espectro de acción notablemente amplio, que incluye propiedades antioxidantes y antisépticas, su facilidad de uso y su bajo coste, este aditivo todavía se considera una herramienta esencial para muchos enólogos. Sin embargo, en un contexto de preocupación social por la conservación de alimentos y vinos, combinado con una reconocida toxicidad latente de los sulfitos, junto con la búsqueda de una producción saludable y respetuosa con el medio ambiente existe una tendencia general a reducir los

niveles de SO_2 en el vino representa hoy un gran desafío para la industria del vino (Roullier-gall et al., 2017; Simonin et al., 2020).

En los últimos años, los productores han sentido la necesidad de reducir o eliminar el uso de sulfitos, para aumentar la imagen de naturalidad de los vinos, pero también para prevenir daños a la salud de los consumidores sensibles a su presencia. Según la legislación de la Comunidad Europea, los productores tienen la obligación de indicar en la etiqueta la frase "contiene sulfitos" si el contenido es superior a 10 mg/L (Giacosa et al., 2018).

En Europa este límite está fijado por ley: 150 mg/L de SO_2 total para vinos tintos, 200 mg/L para vinos blancos, pero en otros países puede ser diferente (por ejemplo, 350 ppm en EE.UU., 250 mg/L en Australia;). Luego existen excepciones y límites más altos para los vinos dulces, con diferencias limitadas reguladas a nivel nacional (**Tabla 4**) (Giacosa et al., 2018).

La estabilidad inducida por los sulfitos en los vinos es tan conocida que incluso la reciente legislación europea relativa a los vinos ecológicos [Reglamento de Ejecución (UE) nº 203/2012 de la Comisión] admite su presencia, pero con un límite de 100 mg/L para los vinos tintos. El acuerdo de equivalencia celebrado entre la UE, Estados Unidos y Canadá reconoce la posibilidad de etiquetar los vinos orgánicos europeos como Programa Orgánico Nacional o Régimen Orgánico de Canadá, en condiciones que respeten algunos límites más restrictivos. Por ejemplo, límite máximo de 100 mg/L, añadido exclusivamente en forma gaseosa.

Tabla 4. Límites de SO_2 en diferentes países vitivinícolas para vinos tintos (*)

País	Tipo de vino	Limite (mg/L)	Referencia legal
Argentina	Tinto	130	Resolución INV Nº 2/2018
	Blanco	180	
	Tinto dulce	180	
	Blanco dulce/Rosado	210	
Australia	<35g/L de azúcar	250	ANZFSC4.5.1:Cláusula 5(5)(a)
	>35g/L de azúcar	300	
Brasil	Todos	300	ANVISA, Resolución nº 123, 2016
Canadá	Todos	350	Canadian Food&drug Reg. B.02.100
Unión Europea	Blanco/Rosado <5g/L de azúcar	200	Commission Delegated Regulation (EU) 2019/934
	Tinto <5g/Lde azúcar	150	
	Blanco/Rosado ≥ 5g/L	250	
	Tinto ≥ 5g/L de azúcar	200	
	Vinos dulces específicos	300	
	Vinos dulces específicos	350	
	Vinos dulces específicos	400	
India	Todos	450	Prevention of Food Adulteration Act & Rules, Appendix C, Table 3
Japón	Todos	350	Japan's Specifications and Standards for Food Additives
Nueva Zelanda	< 35g/L de azúcar	250	
	> 35g/L de azúcar	300	
Sudáfrica	Tinto< 5g/L	150	Liquor Products Act 60 of 1989 Regulations Regulation 32
	Blanco < 5g/L	160	
	Todos > 5 g/L	200	
	Vinos dulces específicos	300	
Estados Unidos de América	Todos	350	27 CFR 4.22(b)(1)

*Información tomada de la OIV (2021)

Si bien la aparente seguridad de los aditivos de sulfito llevó a su uso generalizado, comenzaron a surgir informes que asociaban la exposición a los sulfitos con reacciones adversas durante la década de 1970 (Vally et al., 2009; García-Gavín et al., 2012).

En este contexto, la industria del vino se enfrenta al desafío de satisfacer las demandas de los consumidores de reducir la cantidad de SO_2 agregado al vino, especialmente porque se ha asociado con algunos riesgos para la salud, como reacciones alérgicas sufridas por personas sensibles a los sulfitos (Fredericks et al., 2011; Guerrero & Cantos, 2015; Gianvito et al., 2022).

Incluso una exposición mínima (oral, parenteral, respiratoria o cutánea) en sujetos con intolerancia puede provocar diversos tipos de reacciones, como asma, rinoconjuntivitis, e incluso anafilaxia que pueden provocar la muerte (García-Gavín et al., 2012). También se han descrito un amplio rango de síntomas que incluye malestar,

mareos, confusión, hipotensión, dolor abdominal y diarrea. Aunque la gran mayoría de los informes describieron el desencadenamiento de bronco constricción en pacientes asmáticos (Vally et al., 2009).

Aparte de estas manifestaciones, que son relativamente frecuentes y bien documentadas, los sulfitos también pueden provocar reacciones cutáneas, que se pueden clasificar de la siguiente manera:

(1) enrojecimiento, urticaria o reacciones anafilácticas después de la ingestión y/o exposición parenteral, y

(2) dermatitis alérgica de contacto después del contacto con la piel. Además, estas reacciones pueden ocurrir simultáneamente, en diversas combinaciones y con distintos grados de gravedad en algunos individuos susceptibles (García-Gavín et al., 2012; OIV, 2021)

En cualquier caso, la Organización Mundial de la Salud ha fijado el límite de seguridad de ingesta diaria de sulfitos en 0,7 mg/kg de peso corporal (Giacosa et al., 2018; OIV, 2021).

El daño causado por los sulfitos depende de la concentración y el tiempo de exposición a la sustancia, lo que lleva a un control rutinario del contenido de SO_2 para producir un vino seguro (Bullé et al., 2022). De ahí que la industria vitivinícola esté buscando estrategias alternativas para sustituir o potenciar el efecto de los niveles reducidos de SO_2 sin modificar las propiedades químicas y sensoriales del vino (Fredericks et al., 2011).

La resistencia al SO_2 se encuentra en algunas levaduras y bacterias del ácido láctico (BAL). Debido a la proliferación de BAL, el SO_2 puede perjudicar la producción de vino y, como resultado, promover el deterioro del vino. En base a esto se evalúan nuevos métodos de prevención para minimizar este problema (Bullé et al., 2022).

En este contexto la bioprotección es una de las alternativas recomendadas en el sector vitivinícola. Este método consiste en añadir microorganismos al mosto de uva antes de la fermentación. Entre estos microorganismos, se ha prestado cada vez más atención a la selección de cepas de levaduras no-*Saccharomyces* para desarrollar nuevos cultivos capaces de proteger mostos de uva y vino (Simonin et al., 2020).

I.6 Biocontrol en enología

En todo el mundo, el interés por el control biológico de los microorganismos que deterioran los alimentos ha aumentado significativamente durante la última década. El vino no es una excepción a esta tendencia, ya que aumenta la demanda de los consumidores de vinos libres de conservantes que se consideran negativos para la salud humana (Gianvito et al., 2022).

El uso de microorganismos bioprotectores y/o sus metabolitos, es decir, que exhiba un efecto antagónico sobre el deterioro y/o el microorganismo patógeno mejorando la seguridad microbiológica y extendiendo la vida útil de estos productos tradicionales es un ejemplo de una estrategia de biocontrol. Los microorganismos utilizados como agentes protectores deben poseer una alta actividad antagónica hacia las especies diana, ser seguros para la salud humana por sí mismos y no tener efectos adversos sobre la calidad sensorial y nutricional del producto. El efecto inhibidor contra la especie no deseada puede ser el resultado de la competencia por nutrientes, espacio y/o la producción de compuestos inhibidores como bacteriocinas, ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno y enzimas (Oliveira et al., 2018; Simonin et al., 2020).

Los métodos biotecnológicos también se describen en la literatura como estrategias para controlar el deterioro del vino, con énfasis en la selección del cultivo iniciador para reducir los fenoles volátiles y los azúcares fermentadores, así como el biocontrol mediante toxinas killer. Así, se han explorado técnicas biológicas para controlar los microorganismos responsables del deterioro del vino. El uso asociado de iniciadores de levaduras y bacterias representa una ventaja económica para las bodegas al reducir el tiempo de vinificación. Estas interacciones promueven la estabilización microbiológica del vino, una menor tasa de contaminación por microorganismos de descomposición y una reducción en la adición de SO_2 (Bullé et al., 2022).

Para las levaduras de biocontrol estudiadas hasta ahora en detalle, es probable que en la función antagonista estén implicados múltiples mecanismos, como la competencia por los nutrientes y el espacio, la secreción de enzimas, la producción de toxinas o la liberación de compuestos orgánicos volátiles (COV) (Freimoser et al., 2019).

Las levaduras no son conocidas como productoras prolíficas de metabolitos secundarios, lo cual es una de las razones por las que a menudo plantean menos preocupaciones de bioseguridad (Freimoser et al., 2019). Algunas levaduras producen compuestos proteicos antimicrobianos definidos como toxinas killer; Estas toxinas inhiben las levaduras susceptibles pero no a sus productoras (Liu et al., 2015; Freimoser et al., 2019; Pinto et al., 2020).

El uso de levaduras killer puede considerarse una estrategia prometedora. Entre ellas, las levaduras killer *Kluyveromyces wickerhamii, Wickerhamomyces anomalus* y *Pichia membranifaciens* representan un excelente ejemplo y han sido ampliamente estudiadas por su eficacia frente a diferentes levaduras, entre las que se encuentra la levadura alterante *Dekkera/Brettanomyces* (Comitini et al., 2021).

Las toxinas killer desempeñan un papel importante en los mecanismos de defensa del cultivo iniciador de levadura contra microorganismos no deseados. Este carácter consiste en la producción de proteínas o glicoproteínas (peso molecular entre 30 y 70 kDa) que son letales para células sensibles taxonómicamente relacionadas o no. Se demostró que la acción de estos compuestos está mediada por la presencia de dos tipos de receptores específicos en la pared celular de los microorganismos sensibles (Mehlomakulu et al., 2015; Pinto et al., 2020; Gianvito et al., 2022).

Desde que fueron descubiertas por primera vez en *S. cerevisiae* en 1963, las toxinas killer también se han identificado en los géneros *Candida, Cryptococcus, Debaryomyces, Hanseniaspora, Hansenula, Kluyveromyces, Metschnikowia, Pichia, Ustilago, Torulopsis, Williopsis, Zygosaccharomyces, Aureobasidium, Zygowilliopsis* y *Mrakia.* Lo que indica que el fenómeno killer está realmente extendido entre las levaduras (Liu et al., 2015; Gianvito et al., 2022).

Se ha indicado que las toxinas killer producidas por levaduras *Saccharomyces* y no-*Saccharomyces* controlan cepas silvestres de *S. cerevisiae* y levaduras apiculadas, aumentan la autólisis, inhiben el desarrollo del carácter Brett y el crecimiento de levaduras alterantes y hongos filamentosos. La acción de las toxinas está directamente relacionada con la concentración inicial, la susceptibilidad microbiana y el tratamiento del mosto. *T. delbrueckii y Kluyveromyces wickerhamii* también son levaduras utilizadas

para controlar el deterioro del vino. Respecto a *T. delbrueckii*, su tolerancia al etanol permite su presencia en estados avanzados de fermentación, por lo que sus toxinas son de interés para el biocontrol de levaduras alterantes, mientras que *K. wickerhamii* es eficaz en el control de *Brettanomyces/Dekkera* debido a su acción fungicida a bajas concentraciones. Por tanto, el uso de ambos microorganismos resulta prometedor durante el proceso de fermentación, crianza y almacenamiento del vino (Bullé et al., 2022; Gianvito et al., 2022).

Diversos estudios han demostrado que más especies de *Pichia* pueden producir toxinas killer que las de cualquier otro género de levadura. Dentro del género *Pichia*, *P. acaciae, P. anómala* (actualmente *Wickerhamomyces anomalus*), *P. farinosa*, *P. inositovora*, *P. kluyveri* y *P. membranifaciens* producen diferentes toxinas killer (Liu et al., 2015; Gianvito et al., 2022).

T. delbrueckii y Kluyveromyces wickerhamii son también levaduras utilizadas para controlar el deterioro del vino. Respecto a *T. delbrueckii*, su tolerancia al etanol permite su presencia en estados avanzados de fermentación, por lo que sus toxinas son de interés para el biocontrol de levaduras alterantes, mientras que *K. wickerhamii* es eficaz en el control de *Brettanomyces/Dekkera* debido a su acción fungicida a bajas concentraciones. Por tanto, el uso de ambos microorganismos resulta prometedor durante el proceso de fermentación, crianza y almacenamiento del vino (Bullé et al., 2022; Gianvito et al., 2022).

Las toxinas killer a menudo se clasifican según su objetivo celular. Esencialmente, existen cuatro categorías: (a) T1, toxinas capaces de generar poros de membrana seguidos de lisis celular (; (b) T2, toxinas que muestran actividad glucanasa, lo que eventualmente resulta en la destrucción de la pared celular y la lisis de las células diana; (c) T3, toxinas que perturban las funciones nucleares al bloquear la replicación; y (d) T4, toxinas que se dirigen a los ARN celulares, como los ARNt o ARNr específicos (Díaz et al., 2020).

Los tipos de toxina T1 y T2 utilizan β-1,6-glucano como receptor primario de la pared celular y luego ejercen su acción bien sobre la pared celular o sobre la membrana. Las toxinas de tipo T1, como K1, K2 y PMKT, producidas por *S. cerevisiae*, se unen a un receptor de membrana e inducen la formación de poros de membrana. Las toxinas de

tipo T2, ampliamente reconocidas en el género *Wickerhamomyces*, actúan como glucanasas. Los tipos de toxina T3 y T4 tienen dianas intracelulares. K28 codificada por *S. cerevisiae* es un ejemplo de toxina T3, que utiliza manoproteínas como receptor primario, llega al núcleo mediante transporte retrógrado (desde la periferia al núcleo) e inhibe la síntesis de ADN. Las toxinas de tipo T4, como la micozima, PaT y PiT de *Pichia anómala* (*W. anomalus*) y *P. inositovora*, respectivamente, se unen primero a un receptor de quitina en la pared celular. Subsecuentemente, se necesita un receptor de membrana para la captación celular de la subunidad tóxica que separa el ARN diana correspondiente (ARNt glu, ARNt gln y ARNr) (Mehlomakulu et al., 2015; Anke & Schüffler, 2018; Díaz et al., 2020).

La toxina killer KTCf20 tipo T2 producida de la cepa Cf20 de *W. anomalus* se ha descrito como glucanasa que interactúa con los β-1,3 y β-1,6 glucano de la pared celular inhibiendo el crecimiento de las levaduras alterantes *Dekkera/Brettanomyces*, *P. guilliermondii* y *P. membranifaciens*. La actividad óptima, la estabilidad y las condiciones de producción de KTCf20 sugieren que *W. anomalus* Cf20 puede ser un buen agente de biocontrol para ser usado en los procesos de vinificación (De Ullivarri et al., 2018).

También la actividad de biocontrol de algunas levaduras del vino como *W. anomalus, M. pulcherrima*, *S. cerevisiae* y *A. pullulans* se atribuyó en gran medida a la producción de compuestos volátiles orgánicos (Parafati et al., 2017). Los compuestos orgánicos volátiles (COV) son moléculas pequeñas (normalmente < 300 Da) con baja solubilidad en agua y alta presión de vapor. Los COV incluyen una variedad de clases moleculares, que incluyen hidrocarburos, alcoholes, tioalcoholes, aldehídos, cetonas, tioésteres, ciclohexanos, compuestos heterocíclicos, fenoles, (Freimoser et al., 2019). Generalmente la eficacia de los COV no depende de la actividad de un solo componente, sino que parece estar correlacionada con el efecto sinérgico de una gran cantidad de compuestos (Parafati et al., 2017). Sin embargo, los COV son efectivos solo contra hongos, protegiendo a las uvas de su ataque, y no parecen tener efecto en los propios procesos de vinificación.

Respecto a la capacidad de las bacterias, sólo dos especies han sido descritas como agentes de biocontrol en vinificación. Por un lado, *Oenococcus oeni* quien a través de la

producción de sustancias inhibitorias como las bacteriocinas (BLIS), ácidos orgánicos y peróxido de hidrogeno puede inhibir el crecimiento de algunas bacterias alterantes como *Leuconostoc mesenteroides* y *Pediococcus pentosaceus* y a la vez impedir la proliferación de *Brettanomyces* posiblemente debido a la competición por nutrientes (Gianvito et al., 2022).

Por otro lado, *Lactobacillus plantarum* muestra actividad antagonista frente a las bacterias del ácido acético de los géneros *Acetobacter* y *Gluconobacter* y también *Brettanomyces* (Gianvito et al., 2022). Su actividad antiproliferativa se asocia a la producción de ácidos orgánicos, de los cuales destaca el ácido láctico.

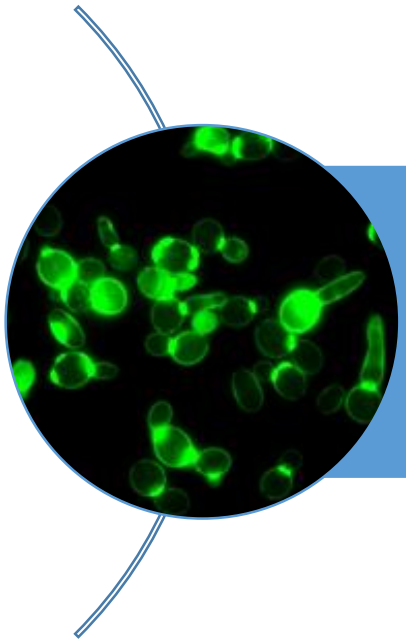
Recientemente el grupo de expertos en microbiología de la OIV ha realizado una revisión para definir las aplicaciones de bioprotección en la fermentación de los mostos de los diferentes agentes de biocontrol hasta ahora descritos (OIV, 2024). Sin embargo, dada la gran diversidad microbiana específica de cada viñedo, como está evidenciando la tecnología de secuenciación de última generación (NGS), parece poco probable que las levaduras o bacterias que no forman parte de la propia microbiota de la bodega sean eficaces para el biocontrol de los posibles alterantes que puedan surgir en cada vendimia (Iorizzo et al., 2024).

En esta línea y con el objetivo de mantener la identidad que caracteriza a los vinos elaborados por Bodega Matarromera S.L[2] (Valladolid, España) surgió el proyecto de investigación colaborativo INNOMICROVIN (RTC-2017-6163-2), del cual forma parte este trabajo de tesis doctoral.

El proyecto a desarrollar consistía en buscar soluciones biotecnológicas proporcionadas por microorganismos del entorno de las bodegas, para minimizar el impacto negativo que la aparición recurrente de la levadura *Brettanomyces* y, en menor medida, de bacterias acéticas, podrían tener en la calidad del vino a elaborar. En concreto se trataba de buscar herramientas biológicas, microorganismos y/o sustancias producidas de ellos, efectivas contra microorganismos alterantes que pudiesen contribuir al deterioro de los vinos.

[2] https://corporativo.matarromera.es/

En la primera parte del proyecto, se aislaron e identificaron los microorganismos cultivables obtenidos de muestras representativas de los procesos de vinificación, la identificación se realizó mediante el análisis de los perfiles de proteínas ribosomales utilizando espectrometría de masas (MALDI-TOF MS). Cuando no fue posible utilizar esta técnica, se recurrió a la amplificación y secuenciación de los genes marcadores ARNr *16S* para bacterias y ARNr *5.8S* para levaduras.



Objetivos

OBJETIVOS

Basado en los antecedentes recogidos en la parte final de la introducción surge este trabajo, cuyo objetivo principal es desarrollar agentes de biocontrol de los microorganismos responsables del deterioro del vino. Estos agentes permitirán reemplazar o reducir el dióxido de azufre hasta niveles seguros para los consumidores, sin que se pierdan las propiedades organolépticas propias y distintivas de las añadidas.

Para conseguir este objetivo, se establecieron los siguientes objetivos específicos:

1. Identificar y seleccionar en una colección representativa de microorganismos de vinificación aquellos con actividad antagonista frente a los organismos alterantes asociados a la bodega.
2. Evaluar la capacidad de los microorganismos seleccionados para controlar la proliferación de los alterantes con mayor incidencia en el deterioro del vino y valorar su efecto en el producto final.
3. Determinar las sustancias implicadas en la acción antiproliferativa mediante aproximaciones complementarias, análisis de metabolitos producidos y expresión génica.
4. Establecer las posibles dianas y mecanismos de acción de las sustancias implicadas en el biocontrol y, en base a ello, valorar su aplicabilidad al proceso de vinificación.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Aislamiento de microorganismos de muestras de vino alterado

1.1. Microorganismos empleados

Los microorganismos empleados, levaduras y bacterias para este estudio proceden de muestras de vino alterado, mosto, de diferentes etapas de la fermentación alcohólica (FAI, FAE, FAM), vino y fermentación Maloláctica (FML) de diferentes bodegas de la empresa Matarromera S.L., (**Tabla 5)**.

Tabla 5. Colección INNOMICROVIN (CINNOM)

Especie	Número de cepas	Muestra	Procedencia*
Levaduras			
Candida solani	1	Mosto	D.O. Ribera de Duero
Hanseniaspora vineae	3	Mosto, FAI	D.O. Ribera de Duero
Hanseniaspora meyeri	2	Mosto, FAI	D.O. Ribera de Duero
Hanseniaspora uvarum	48	Mosto, FAI	D.O. Ribera de Duero
Hanseniaspora valbyensis	2	Mosto, FAI	D.O. Ribera de Duero
Hyphopichia pseudoburtonii	1	Mosto	D.O. Ribera de Duero
Kluyveromyces dobzhanskii	1	FAI	D.O. Ribera de Duero
Lachancea thermotolerans	17	Mosto, FAI	D.O. Ribera de Duero
Metschnikowia pulcherrima	14	Mosto, FAI	D.O. Ribera de Duero
Meyerozyma guilliermondii	4	FML	D.O. Ribera de Duero
Nakazawaea ishiwadae	5	Mosto-FAI	D.O. Ribera de Duero
Pichia manshurica	4	FML	D.O. Ribera de Duero
Rhodotorula mucilaginosa	1	Vino	D.O. Rioja
Roseomonas mucosa	1	FAM	D.O. Ribera de Duero
Saccharomyces bayanus	5	Mosto	D.O. Ribera de Duero
Saccharomyces cerevisiae	165	FAI, FAF, FML, Vino	D.O. Ribera de Duero, Toro
Saccharomyces cerevisiae	1	Agrovin	Matarromera S.L.
Saccharomyces sp. 'boulardii'	1	Vino	D.O. Ribera de Duero
Saccharomyces uvarum	1	Mosto	D.O. Ribera de Duero
Starmerella bacillaris	2	FAI	D.O. Ribera de Duero
Torulaspora delbrueckii	47	Mosto, FAI, FAM	D.O. Ribera de Duero
Wickerhamomyces anomalus	4	Mosto, FAI, Vino	D.O. Rioja
Zygosaccharomyces bailii	2	FML	D.O. Ribera de Duero
Bacterias			
Acetobacter pasteurianus	1	FA	D.O. Ribera de Duero
Bacillus aryabhattai	2	Vino	D.O. Ribera de Duero
Bacillus cereus	1	Mosto	D.O. Ribera de Duero
Bacillus sonorensis	1	FML	D.O. Ribera de Duero
***Bacillus* sp.**	5	Mosto, Vino	D.O. Ribera de Duero, Toro
Gluconobacter cerinus	1	Mosto	D.O. Ribera de Duero

Gluconobacter oxydans	2	FA	D.O. Ribera de Duero
Gluconobacter saccharivorans	1	FA	D.O. Ribera de Duero
Oenococcus oeni	1	Vino	D.O. Ribera de Duero
Pseudomonas cedrina	2	Vino	D.O. Rioja
Pseudomonas monteilii	2	Vino	D.O. Rioja
Pseudomonas veronii	1	Vino	D.O. Rioja
Vino alterado			
Brettanomyces bruxellensis	9	Vino alterado	D.O. Rioja y D.O. Toro
Meyerozyma guilliermondii	3	Vino alterado	D.O. Rioja
Pichia manshurica	2	Vino alterado	D.O. Ribera de Duero
Pichia membranifaciens	11	Vino alterado	D.O. Ribera de Duero
Gluconobacter oxydans	1	Vino alterado	D.O. Ribera de Duero

Abreviaturas: FA, Fermentación Alcohólica, FAI, Fermentación Alcohólica inicial, FAM, Fermentación Alcohólica Media, FAF, Fermentación Alcohólica Final, FML, Fermentación Maloláctica.

Todos los microorganismos se manipularon en condiciones de esterilidad, en una campana de flujo laminar de seguridad microbiológica (safeFAST Classic 209, Faster).

1.2. Medios de cultivo

Los medios de cultivo utilizados fueron YPD, LB, YNB y GYC según los requerimientos de cada microorganismo. Para la siembra rutinaria de levaduras se utilizó YPD sólido y cuando se requirió se cultivó en medio YPD líquido.

La composición de los medios de cultivo empleados durante el desarrollo experimental del proyecto se describe a continuación:

YPD (Yeast Peptone Dextrose): 2% de glucosa, 2% de peptona, 1% de extracto de levadura. A los medios solidos se agregó 2% de agar. Este medio solido se utilizó para el mantenimiento de las cepas de levaduras.

YPDE: El medio contiene los mismos componentes que el medio YPD más un 2% de etanol. La finalidad de este medio fue para inhibir el crecimiento de hongos y favorecer el aislamiento de levaduras.

LB (Luria Bertani): 1% de Triptona, 0.5% de extracto de levadura, 1% de NaCl. Para medios solidos se añadió 1,5% de agar. Medio utilizado para la propagación de bacterias.

YNB (Yeast Nitrogen Base) sin aminoácidos): 2% de glucosa, 0.67% de base nitrogenada sin aminoácidos (Formedium™ Ibian Technologies, Zaragoza), el medio se ajustó a pH 4,4.

GYC: (10% glucosa, 1,0% extracto de levadura, 0,3% de peptona, 2% de $CaCO^3$ y 1.5% agar). Se utilizó este medio para la propagación de bacterias acido acéticas. Las bacterias acéticas como *Acetobacter* crecen de forma aerobia y producen halos claros al neutralizar el carbonato de calcio con el ácido que sintetizan.

Los medios se esterilizaron en autoclave a 121ºC durante 20 minutos para su posterior utilización.

Para su propagación rutinaria de las levaduras se utilizó medio sólido YPD, y la temperatura de incubación optima de crecimiento fue de 28ºC, cuando se obtuvo el crecimiento, las placas se mantuvieron a 4ºC hasta su uso y se realizaron resiembras para la realización de los ensayos. Para las bacterias el medio de rutina utilizado fue LB, y para las bacterias acido acéticas se utilizó medio GYC. Cuando se requirió el uso de cultivos en medio líquido, se utilizaron los medios adecuados para cada microorganismo, incubándose a 28ºC y en agitación constante a 150 r.p.m. (Environmental shaker-incubator ES-20, Biosan).

Para la preservación de cepas por largos periodos de tiempo se utilizó glicerol al 25% como crioprotector, los viales se guardaron a -80ºC hasta su uso.

1.3. Análisis microbiológico de muestras de vino alterado

En estudios previos en el laboratorio se realizó un análisis microbiológico de vino como parte inicial de un proyecto de colaboración con la empresa Bodega Matarromera S. L, bajo el proyecto denominado INNOMICROVIN **(**RTC-2017-6163-2). El análisis microbiológico consistió con la recepción de muestras de vino alterado procedente de bodegas Matarromera S.L de zonas con bodegas que cuentan con Denominación de Origen Rioja, Toro y Ribera de Duero.

Se inició con la recepción de muestras de vino, y se procedió a colocar en un tubo estéril 10 ml de vino alterado, posteriormente se centrifugo a 4,000 r.p.m (Eppendorf®

Centrifuge 5804R, Germany) por 10 min para recuperar las células. Del pellet recuperado se extendió una pequeña cantidad sobre una placa de agar YPD y LB para aislar e identificar los microorganismos presentes en las muestras.

Las placas se incubaron a 28ºC, el crecimiento se siguió diariamente para la observación del crecimiento. Se realizaron aislamientos de los diferentes microorganismos conforme a su morfología, color y tamaño, hasta obtener cultivos puros. La identidad de las colonias de la levadura se hizo mediante análisis de la morfología celular en el microscopio óptico manual (DM100 de Leica Mycrosystems). Una vez obtenidas las colonias puras, las placas se mantuvieron a 4ºC hasta su uso para la identificación de cada microorganismo.

1.4. Curva de crecimiento de *Brettanomyces bruxellensis*

La tasa de crecimiento o velocidad de crecimiento específica (μ) se define como la velocidad de aumento de la concentración celular por unidad de tiempo, para ello se realizó una cinética de crecimiento para las dos cepas de *Brettanomyces bruxellensis* (LR4L16, CYBI1) con el objetivo de conocer la tasa de crecimiento de cada cepa. Se preparó un preinóculo en medio liquido YPD y se incubo a 28ºC en agitación constante (150r.p.m.). Se realizaron mediciones a determinados tiempos utilizando un espectrofotómetro, hasta obtener una curva de crecimiento que llegara a la fase estacionaria. La tasa de crecimiento se determinó durante la fase exponencial de crecimiento de ambas levaduras aplicando la siguiente ecuación:

$$\mu = \frac{\mathrm{lnXn} - \mathrm{lnX0}}{\mathrm{t1} - \mathrm{t0}}$$

Donde: LnX_n corresponde a la biomasa del cultivo en el tiempo t_n de la curva de crecimiento; LnX_0 corresponde a es la biomasa inicial del cultivo; t_1: corresponde al tiempo 1 (t_n); t_0: corresponde al tiempo inicial

El tratamiento de datos, análisis estadístico y representaciones graficas se usó el programa Excel de Microsoft office.

1.5. Obtención de pre-inóculos

Para obtener colonias aisladas se estrió un volumen de 5 µl de cultivo guardado en glicerol en una placa de agar según los requerimientos de cada microorganismo. A partir de las colonias aisladas se inocularon tubos con medio liquido el necesario para cada

microorganismo, se tomó una pequeña cantidad de colonia y se resuspendio en el medio líquido, los tubos se incubaron en la mayoría de los casos a 28ºC durante 48 horas, para aquellas cepas con crecimiento lento se dejaron por más días hasta obtener un cultivo saturado de células, todas se mantuvieron en agitación constante a 150 r.p.m.

Desde los pre inóculos se inocularon volúmenes más grandes de cultivos para cuando se requirió obtener masas de células de los microorganismos utilizados y para obtener sobrenadante libre de células, en la realización de los siguientes protocolos.

1.6. Obtención de cultivo libre de células (CLC)

Para la obtención de sobrenadante libre de células (CLC) se trabajó con volúmenes de trabajo de 50 ml de medio YPD líquido, agregando 5µl de los pre-inóculos a una densidad óptica de 0,2 D.O. $_{(600nm)}$, los matraces se incubaron a 28°C durante 48 horas en agitación constante a 150 r.p.m. Cuando el cultivo alcanzo el tiempo idóneo para cada ensayo, se pasó a un tubo estéril 20 ml de cultivo saturado y se centrifugo por 15min a 5,000 r.p.m. (este paso se realizó 2 veces), el sobrenadante recuperado se pasó a través de filtros desechables con diámetro de poro de 0,22µm (Fisherbrand™ Syringe Filter), el CLC obtenido se dividió en alícuotas de 5 ml y se mantuvo a 4ºC hasta su uso.

Para posteriores análisis, se liofilizo el sobrenadante libre de células, la muestra liofilizada se preparó de la siguiente manera, se colocaron 2 ml de CLC en viales de cristal de 10 ml estériles y se mantuvieron a -80ºC durante 24 horas, una vez transcurrido este tiempo, las muestras se colocaron en un liofilizador (Liofilizador LyoAlfa™-6, TELSTAR®) durante 48 horas aproximadamente o hasta observar que la muestra estuviera totalmente liofilizada. Una vez obtenido el liofilizado se resuspendió con 200µl de agua ultrapura (Milli Q, Millipore Integral 5), cuando se requirió su aplicación.

1.7. Ensayos in vitro para la detección de la actividad antagonista

Los bioensayos de antagonismos se realizaron a partir de la colección de las cepas del laboratorio mencionadas anteriormente, se seleccionaron aquellos con posible actividad antagonista previa a una revisión bibliográfica realizada, la actividad inhibitoria se ensayó con los principales microorganismos alterantes de vino, procedentes de bodegas vinícolas y cepas pertenecientes a la CECT.

Los bioensayos consistieron en colocar 200 µl de cultivo saturado del microorganismo alterante en placas petri con medio YPD, se sembraron mediante extensión en superficie con perlas de vidrio, posteriormente se colocaron pozos de 7 mm de diámetro y en ellos se colocaron 100µl de SLC de los microorganismos antagonistas, las placas se dejaron reposar por unos minutos y se incubaron a 28ºC hasta el crecimiento y/o aparición de halos. La determinación cualitativa se realizó mediante la observación y medición de los halos de inhibición presentes en las placas los cuales fueron medidos en mm.

El análisis de los resultados de las cepas antagonistas utilizadas se realizó conforme a la inhibición producida sobre las cepas alterantes con medición de los halos de inhibición producidos los cuales se reportaron en mm y a partir de ello se realizó una selección de aquellos con mayor capacidad o actividad inhibitoria especialmente sobre las cepas de *B. bruxellensis*. Con estos resultados se seleccionaron las cepas antagonistas y las cepas alterantes que se utilizaron para los posteriores ensayos.

2. Identificación molecular de levaduras y bacterias

La identificación molecular se realizó obteniendo ADN de un cultivo saturado ya sea de levaduras o bacterias según lo requerido en el estudio, el procedimiento fue el siguiente:

2.1 Obtención de ADN genómico

En un tubo de PCR (0,2 ml) que contenía 25 µl de una solución de 20 mM de NaOH se resuspendió una pequeña cantidad de células tomadas de una colonia con una punta estéril de micropipeta, la muestra se incubo por 15 min en un termociclador (MultiGeneMini™, Labnet) a 95ºC para la lisis celular. Posteriormente, se agito vigorosamente en vórtex por 1 min y se centrifugo por 2 min a 10,000 r.p.m. en una microfuga (Mikro 200, Hettich). El sobrenadante se transfirió a un tubo eppendorf y el ADN obtenido se guardó a -20ºC hasta su uso.

2.2 Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos (liofilizados) utilizados se obtuvieron por la casa comercial Asensio (Bio Técnica), Integrated ADN Technologies (IDT). Los oligonucleótidos liofilizados se disolvieron en agua ultra pura (sistema Milli-Q® integral, Millipore) para obtener una solución stock 100 µM, la solución stock o diluciones se mantuvieron a -20ºC. Los oligonucleótidos utilizados en este estudio se muestran en la **tabla 6**.

Tabla 6. Oligonucleótidos utilizados

Oligonucleótido	Secuencia 5´- 3´	Referencia
ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	White et al., 1990
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	"
8F	ACGGCTACCTTGTTACGACTT	Magray et al., 2011
1492R	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	"
16SBz718F	GAGGAACACCAGTGGCGAAG	"
16SBz824R	GTTTACGGCGTGGACTACC	"
hisF-F	CGCGTCGTCAAAGGCATTCA	Este trabajo
hisF-R	CGGCCGCTGTATTAACGGAT	"
fadE-F	ACGCCGATCTCAAGCTTCAC	"
fadE-R	GCGAGCATTCAATCGCGTACT	"
hag- F	GGCAATGGAGATGCGCATCA	"
hag-R	GCCATGTCATCCAGCTTTTCGG	"
cccA-F	CGAGAAGGAAACTGCAAACGC	"
cccA-R	GCCATGTCATCCAGCTTTTCG	"

2.3 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La mezcla de reacción consistió en agregar en un tubo PCR (0,2 ml), 12,5 µl de DreamTaq Green PCR Master Mix (2X) (ThermoFisher Scientific), 0,5 µl de un stock de 10µM del oligonucleótido Forward a una concentración final de 0,2 µM, 0,5 µl de un stock de 10µM del oligonucleótido Reverse a una concentración final de 0,2 µM, 1 µl de ADN genómico (0,1 y 1µg) y 10,5 µl de agua destilada estéril hasta obtener un volumen final de 25µl. Las amplificaciones se realizaron en un termociclador MultiGeneMini^{MT}(Labnet).

Para la amplificación del gen ARNr *16S* de *Bacillus* sp. se utilizaron los oligonucleótidos 8F, 1492R amplificando un fragmento de 1,5 Kpb y primer internos 16SBz718F y 16SBz824R con un tamaño de fragmento esperado de 1,2 Kpb , las condiciones de reacción fueron las siguientes: 95ºC durante 4 min, seguido de 30 ciclos de desnaturalización a 94ºC (30 seg.), el anillamiento fue a 55ºC (1 min), una extensión a 72ºC (1 min), seguido de una extensión final de 72ºC (10 min) y mantenimiento a 4ºC hasta su análisis.

2.4 Electroforesis en gel de agarosa

Los productos de amplificación obtenidos por PCR (5µl) se mezclaron con 1µl de MaestroSafe™ Nucleic Acid Loading Dye y se cargaron directamente en un gel de agarosa al 1%; el gel de agarosa se obtuvo por gelificación de la disolución acuosa de 1% agarosa (Agarose D1 Low EEO-GQT, Pronadisa, Laboratorios Conda), TBE 1X (0,09 M Tris HCL, 0,09 M de ácido bórico y 0,002 M EDTA pH 8,0). La electroforesis se desarrolló a un voltaje constante de 100V en tampón TBE 1X durante 30-45 min, con el sistema de electroforesis minigel Owl™ B1(ThermoFisher Scientific).

Las muestras resueltas en el gel se visualizaron en el equipo de documentación de geles (Bio-Rad Gel Doc 2000). El tamaño de los fragmentos se evaluó de acuerdo a los marcadores de ADN de tamaño conocido. Se emplearon dos tipos de marcadores, los propios del laboratorio para el análisis de fragmento mayores que van desde 0,4-0,6 Kb (6,0, 2,4, 1,6, 0,9, 0,6 y 0,4 Kb) y los comerciales (GeneRuler 100pb Plus ADN Ladder, ThermoFisher Scientific) para el análisis de fragmentos menores de 0,4 -0,6 Kb.

2.5 Purificación de fragmentos de ADN

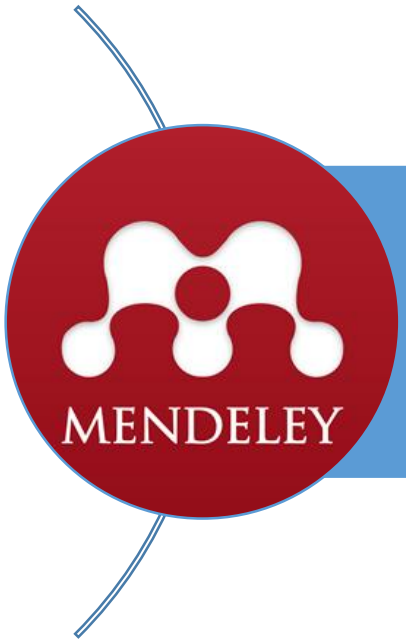
Para la purificación de los fragmentos de ADN obtenidos y tras ser visualizados en gel de agarosa, se utilizó el kit FavorPrep Gel/PCR (Favorgen, Biotech Corp.) siguiendo las siguientes especificaciones del fabricante. Transferir 100 µl del producto PCR a un tubo de microcentrífuga y se agregaron 5 volúmenes de FADF buffer y se mezclaron por vórtex. Colocar la columna FADF en un tubo de recolección y transferir la mezcla a la columna FADF. Centrifugar a 11, 000 r.p.m. por 30seg, y descartar el sobrenadante. A continuación, agregar 750µl de Wash buffer a la columna FADF y centrifugar a 11,000 r.p.m. por 30seg. Y descartar el sobrenadante. Realizar una centrifugación adicional por 3 min a máxima velocidad para secar la membrana. Colocar la columna FADF a un nuevo tubo y agregar 40 µl del buffer de elución o agua destilada al centro de la membrana y dejar reposar la columna FADF por 1min, posteriormente centrifugar a máxima velocidad por 1 min para eluir el ADN. La muestra purificada se guardó a -20ºC hasta su uso.

También cuando se requirió recuperar el fragmento de ADN a partir del gel de agarosa se utilizó el mismo kit siguiendo las indicaciones pertinentes para purificación a partir de gel, las cuales se indican a continuación, se cortaron los fragmentos de interés del gel con un bisturí, aproximadamente 300 mg y se depositaron en un tubo eppendorf, enseguida se agregaron 500 µl del buffer FADF a la muestra y se mezcló por vórtex. Enseguida incubar a 55ºC por 5-10 min y mezclar por vórtex el tubo cada 2-3 minutos hasta que el gel se disuelva por completo. Una vez pasado el tiempo enfriar a temperatura ambiente, transferir la columna FADF a un nuevo tubo de recolección y transferir 800µl de la mezcla de muestra a la columna FADF, y centrifugar a 11,000 r.p.m. por 30seg y descartar el sobrenadante, agregar 750µl de Wash buffer a la columna FADF y centrifugar a 11,000 r.p.m. por 30seg. y descartar el sobrenadante. Centrifugar nuevamente a máxima velocidad por 3 minutos adicionales para secar la columna. Transferir la columna FADF a un nuevo tubo de microcentrífuga. Agregar 40µl de buffer de elución o agua destilada al centro de la membrana y dejar reposar la columna FADF por 1min, posteriormente centrifugar a máxima velocidad por 1 min para eluir el ADN. La muestra purificada se guardó a -20ºC hasta su uso.

2.6 Secuenciación de los fragmentos de ADN

Los productos de amplificación obtenidos se secuenciaron directamente enviándose al servicio de Secuenciación de la Universidad de Salamanca (Nucleus) donde se determinó su secuencia mediante el método de las cadenas de terminación (Sanger et al., 1997). Como cebadores se emplearon los oligonucleótidos siguientes para las levaduras: ITS1 para secuenciar la hebra con sentido de los fragmentos y el cebador ITS4 para la hebra sin sentido de los fragmentos y para las bacterias se utilizó los primers 8F y 1492R.

Los cromatogramas recibidos del servicio de secuenciación se editaron con el programa Chromas lite (technelysium pty Ltd) con el programa SnapGene, se alinearon las secuencias de las dos hebras para obtener la secuencia consenso, una vez obtenida la secuencia, el análisis se realizó utilizando la base de datos NCBI del motor de búsqueda BLAST en Genebank (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) (NCBI, Bethesda, Estados Unidos), las secuencias de especies conocidas con mayor porcentaje de identidad se realizó aplicando el criterio de identificación de Vu et al,. 2019.



Bibliografía

BIBLIOGRAFÍA

Agnolucci, M., Tirelli, A., Cocolin, L., & Toffanin, A. (2017). *Brettanomyces bruxellensis* yeasts: impact on wine and winemaking. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *33*(10), 1–6. https://doi.org/10.1007/s11274-017-2345-z

Aguilar-Uscanga, B., & François, J. M. (2003). A study of the yeast cell wall composition and structure in response to growth conditions and mode of cultivation. *Letters in Applied Microbiology*, *37*(3), 268–274. https://doi.org/10.1046/j.1472-765X.2003.01394.x

Anke, T., & Schüffler, A. (2018). *Yeast Killer Toxins: Fundamentals and Applications* (A. Anke, T., Schüffler (ed.); The Mycota). Physiology and Genetics. http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-71740

Arbsuwan, N., Payoungkiattikun, W., Sirithorn, P., Daduang, S., Jangpromma, N., Dhiravisit, A., Hahm, Y. T., Neubert, L. K., & Klaynongsruang, S. (2018). Purificación y caracterización de macrolactinas y amicoumacinas procedentes de *Bacillus licheniformis* BFP011: una nueva fuente de sustancias antimicrobianas para los alimentos. *CYTA - Journal of Food*, *16*(1), 50–60. https://doi.org/10.1080/19476337.2017.1337047

Ast, J. C., & Dunlap, P. V. (2004). Phylogenetic analysis of the lux operon distinguishes two evolutionarily distinct clades of *Photobacterium leiognathi*. *Archives of Microbiology*, *181*(5), 352–361. https://doi.org/10.1007/s00203-004-0663-7

Balthazar, C., Novinscak, A., Cantin, G., Joly, D. L., & Filion, M. (2022). Biocontrol Activity of *Bacillus* spp. and *Pseudomonas* spp. Against *Botrytis cinerea* and Other Cannabis Fungal Pathogens. *Phytopathology*, *112*(3), 549–560. https://doi.org/10.1094/PHYTO-03-21-0128-R

Barata, A., Caldeira, J., Botelheiro, R., Pagliara, D., Malfeito-Ferreira, M., & Loureiro, V. (2008). Survival patterns of *Dekkera bruxellensis* in wines and inhibitory effect of sulphur dioxide. *International Journal of Food Microbiology*, *121*(2), 201–207. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.11.020

Barata, A., Malfeito-Ferreira, M., & Loureiro, V. (2012). The microbial ecology of wine grape berries. *International Journal of Food Microbiology*, *153*(3), 243–259. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.11.025

Bartowsky, E. (2017). Micobiology of winemaking. *Annual Review of Microbiology*, *22*, 323–358. https://doi.org/10.1146/annurev.mi.22.100168.001543

Bartowsky, E. J. (2008). Bacterial spoilage of wine and approaches to minimize it. *Letters in Applied Microbiology*, *48*(2), 149–156. https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2008.02505.x

Bartowsky, E. J., & Henschke, P. A. (2008). Acetic acid bacteria spoilage of bottled red wine-A review. *International Journal of Food Microbiology*, *125*(1), 60–70. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.10.016

Bartowsky, E. J., Xia, D., Gibson, R. L., Fleet, G. H., & Henschke, P. A. (2003). Spoilage of bottled red wine by acetic acid bacteria. *Letters in Applied Microbiology*, *36*(5), 307–314. https://doi.org/10.1046/j.1472-765X.2003.01314.x

Béchet, M., Caradec, T., Hussein, W., Abderrahmani, A., Chollet, M., Leclére, V., Dubois, T., Lereclus, D., Pupin, M., & Jacques, P. (2012). Structure, biosynthesis, and properties of kurstakins, nonribosomal lipopeptides from *Bacillus* spp. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *95*(3), 593–600. https://doi.org/10.1007/s00253-012-4181-2

Belda, I., Ruiz, J., Alonso, A., Marquina, D., & Santos, A. (2017). The biology of *Pichia membranifaciens* killer toxins. *Toxins*, *9*(4). https://doi.org/10.3390/toxins9040112

Belda, I., Zarraonaindia, I., Perisin, M., Palacios, A., & Acedo, A. (2017). From vineyard soil to wine fermentation: Microbiome approximations to explain the "terroir" Concept. *Frontiers in Microbiology*, *8*(MAY), 1–12. https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00821

Belleggia, L., & Osimani, A. (2023). Fermented fish and fermented fish-based products, an ever-growing source of microbial diversity: A literature review. *Food Research International*, *172*(March), 113112. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2023.113112

Berbegal, C., Garofalo, C., Russo, P., Pati, S., Capozzi, V., & Spano, G. (2017). Use of autochthonous yeasts and bacteria in order to control *Brettanomyces bruxellensis* in wine. *Fermentation*, *3*(4), 1–11. https://doi.org/10.3390/fermentation3040065

Berbegal, C., Spano, G., Fragasso, M., Grieco, F., Russo, P., & Capozzi, V. (2018). Starter cultures as biocontrol strategy to prevent *Brettanomyces bruxellensis* proliferation in wine. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *102*(2), 569–576. https://doi.org/10.1007/s00253-017-8666-x

Borneman, A. R., Schmidt, S. A., & Pretorius, I. S. (2013). At the cutting-edge of grape and wine biotechnology. *Trends in Genetics*, *29*(4), 263–271. https://doi.org/10.1016/j.tig.2012.10.014

Bullé Rêgo, E. S., Santos, D. L., Hernández-Macedo, M. L., Padilha, F. F., & López, J. A. (2022). Methods for the prevention and control of microbial spoilage and undesirable compounds in wine manufacturing. *Process Biochemistry*, *121*(July), 276–285. https://doi.org/10.1016/j.procbio.2022.07.016

Cachón, D. C. (2018). Estudio de la diversidad de levaduras en uva de cultivo ecológico y convencional en Galicia: patrones biogeográficos e influencia en las características químicas y sensoriales del vino. Universidad de León. Tesis doctoral.España

Campolongo, S., Rantsiou, K., Giordano, M., Gerbi, V., & Cocolin, L. (2010). Prevalence and biodiversity of *Brettanomyces bruxellensis* in wine from northwestern italy. *American Journal of Enology and Viticulture*, *61*(4), 486–491. https://doi.org/10.5344/ajev.2010.10034

Carocho, M., Barreiro, M. F., Morales, P., & Ferreira, I. C. F. R. (2014). Adding molecules to

food, pros and cons: A review on synthetic and natural food additives. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *13*(4), 377–399. https://doi.org/10.1111/1541-4337.12065

Chomczynski, P., & Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*, *162*(1), 156–159. https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90021-2

Cibrario, A., Miot-Sertier, C., Paulin, M., Bullier, B., Riquier, L., Perello, M. C., de Revel, G., Albertin, W., Masneuf-Pomarède, I., Ballestra, P., & Dols-Lafargue, M. (2020). *Brettanomyces bruxellensis* phenotypic diversity, tolerance to wine stress and wine spoilage ability. *Food Microbiology*, *87*(November 2019), 103379. https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.103379

Claussen, N. H. (1904). On a Method for the Application of Hansen's Pure Yeast System in the Manufacturing of Well-Conditioned English Stock Beers. *Journal of the Institute of Brewing*, *10*(4), 308–331. https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1904.tb04656.x

Combina, M., Elía, A., Mercado, L., Catania, C., Ganga, A., & Martinez, C. (2005). Dynamics of indigenous yeast populations during spontaneous fermentation of wines from Mendoza, Argentina. *International Journal of Food Microbiology*, *99*(3), 237–243. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.08.017

Comitini, F., Agarbati, A., Canonico, L., Galli, E., & Ciani, M. (2021). Purification and characterization of WA18, a new mycocin produced by *Wickerhamomyces anomalus* active in wine against *Brettanomyces bruxellensis* spoilage yeasts. *Microorganisms*, *9*(1), 1–14. https://doi.org/10.3390/microorganisms9010056

Comitini, F., Ingeniis De, J., Pepe, L., Mannazzu, I., & Ciani, M. (2004). *Pichia anomala* and *Kluyveromyces wickerhamii* killer toxins as new tools against Dekkera/Brettanomyces spoilage yeasts. *FEMS Microbiology Letters*, *238*(1), 235–240. https://doi.org/10.1016/j.femsle.2004.07.040

Cosme, F., Vilela, A., Filipe-ribeiro, L., Inês, A., & Nunes, F. M. (2018). wine microbial spoilage: advances in Defects Remediation. In *Microbial Contamination and Food Degradation*. Elsevier Inc. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811515-2/00009-3

Cronan, J. E. (2021). The Escherichia coli FadR transcription factor: Too much of a good thing? *Molecular Microbiology*, *115*(6), 1080–1085. https://doi.org/10.1111/mmi.14663

Curtin, C., Varela, C., & Borneman, A. (2015). Harnessing improved understanding of *Brettanomyces bruxellensis* biology to mitigate the risk of wine spoilage. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, *21*, 680–692. https://doi.org/10.1111/ajgw.12200

Da-Silva, E., Surribas, A., Gambari, C., Granès, D., Pic, L., & Barthelmebs, L. (2023). Development of a molecular diagnostic test for the specific detection of *Brettanomyces bruxellensis* in red wine. *International Journal of Food Microbiology*, *407*(September).

https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2023.110394

Dakalbab, S., Hamdy, R., Holigová, P., Abuzaid, E. J., Abu-Qiyas, A., Lashine, Y., Mohammad, M. G., & Soliman, S. S. M. (2024). Uniqueness of *Candida auris* cell wall in morphogenesis, virulence, resistance, and immune evasion. *Microbiological Research*, *286*(April). https://doi.org/10.1016/j.micres.2024.127797

De Ullivarri, F. M., Mendoza, L. M., & Raya, R. R. (2014). Killer activity of *Saccharomyces cerevisiae* strains: partial characterization and strategies to improve the biocontrol efficacy in winemaking. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, *106*(5), 865–878. https://doi.org/10.1007/s10482-014-0256-7

De Ullivarri Fernández, M., Mendoza, L. M., & Raya, R. R. (2018). Characterization of the killer toxin KTCf20 from *Wickerhamomyces anomalus*, a potential biocontrol agent against wine spoilage yeasts. *Biological Control*, *121*(March), 223–228. https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2018.03.008

Deleu, M., Paquot, M., & Nylander, T. (2005). Fengycin interaction with lipid monolayers at the air-aqueous interface - Implications for the effect of fengycin on biological membranes. *Journal of Colloid and Interface Science*, *283*(2), 358–365. https://doi.org/10.1016/j.jcis.2004.09.036

Díaz, M. A., Pereyra, M. M., Picón-Montenegro, E., Meinhardt, F., & Dib, J. R. (2020). Killer yeasts for the biological control of postharvest fungal crop diseases. *Microorganisms*, *8*(11), 1–14. https://doi.org/10.3390/microorganisms8111680

Ding, Y., Liu, F., Yang, J., Fan, Y., Yu, L., Li, Z., Jiang, N., An, J., Jiao, Z., & Wang, C. (2023). Isolation and identification of *Bacillus mojavensis* YL-RY0310 and its biocontrol potential against *Penicillium expansum* and patulin in apples. *Biological Control*, *182*(April), 105239. https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2023.105239

Du Toit, M., & Pretorius, I. S. (2000). Microbial Spoilage and Preservation of Wine: Using Weapons from Nature's Own Arsenal -A Review. *South African Journal of Enology & Viticulture*, *21*(1), 74–96. https://doi.org/10.21548/21-1-3559

Du Toit, W. J., & Lambrechts, M. G. (2002). The enumeration and identification of acetic acid bacteria from South African red wine fermentations. *International Journal of Food Microbiology*, *74*(1–2), 57–64. https://doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00715-2

Du Toit, W. J., Pretorius, I. S., & Lonvaud-Funel, A. (2005). The effect of sulphur dioxide and oxygen on the viability and culturability of a strain of Acetobacter pasteurianus and a strain of *Brettanomyces bruxellensis* isolated from wine. *Journal of Applied Microbiology*, *98*(4), 862–871. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02549.x

Ercole, T. G., Kava, V. M., Petters-Vandresen, D. A. L., Nassif Gomes, M. E., Aluizio, R., Ribeiro, R. A., Hungria, M., & Galli, L. V. (2024). Unlocking the growth-promoting and antagonistic power: A comprehensive whole genome study on *Bacillus velezensis* strains.

Gene, *927*(February). https://doi.org/10.1016/j.gene.2024.148669

Falardeau, J., Wise, C., Novitsky, L., & Avis, T. J. (2013). Ecological and Mechanistic Insights Into the Direct and Indirect Antimicrobial Properties of *Bacillus subtilis* Lipopeptides on Plant Pathogens. *Journal of Chemical Ecology*, *39*(7), 869–878. https://doi.org/10.1007/s10886-013-0319-7

Fan, B., Wang, C., Song, X., Ding, X., Wu, L., Wu, H., Gao, X., & Borriss, R. (2018). *Bacillus velezensis* FZB42 in 2018: The gram-positive model strain for plant growth promotion and biocontrol. *Frontiers in Microbiology*, *9*(OCT), 1–14. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02491

Fazle, R. M., Sarafat Ali, M., Choi, J., Hwang, B. S., Jeong, S. C., & Baek, K. hyun. (2019). *Bacillus velezensis*: A valuable member of bioactive molecules within plant microbiomes. *Molecules*, *24*(6), 1–13. https://doi.org/10.3390/molecules24061046

Fazle Rabbee, M., & Baek, K.-H. (2020). Antimicrobial Activities of Lipopeptides and Polyketides of *Bacillus velezensis* for Agricultural Applications. In *Molecules (Basel, Switzerland)* (Vol. 25, Issue 21). https://doi.org/10.3390/molecules25214973

Fleet, G. H. (2008). Wine yeasts for the future. *FEMS Yeast Research*, *8*(7), 979–995. https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2008.00427.x

Francis, F., & Chaudhary, N. (2022). Antimicrobial peptides: features and modes of action. In *Antimicrobial Peptides: Challenges and Future Perspectives*. INC. https://doi.org/10.1016/B978-0-323-85682-9.00016-7

Fredericks, I. N., du Toit, M., & Krügel, M. (2011). Efficacy of ultraviolet radiation as an alternative technology to inactivate microorganisms in grape juices and wines. *Food Microbiology*, *28*(3), 510–517. https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.10.018

Freimoser, F. M., Rueda-Mejia, M. P., Tilocca, B., & Migheli, Q. (2019). Biocontrol yeasts: mechanisms and applications. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *35*(10), 1–19. https://doi.org/10.1007/s11274-019-2728-4

Poblete, C., Peña-Moreno, I. C., de Morais, M. A., Moreira, S., & Ganga, M. A. (2020). Biodiversity among *Brettanomyces bruxellensis* strains isolated from different wine regions of Chile: Key factors revealed about its tolerance to sulphite. *Microorganisms*, *8*(4). https://doi.org/10.3390/microorganisms8040557

García-Gavín, J., Parente, J., & Goossens, A. (2012). Allergic contact dermatitis caused by sodium metabisulfite: A challenging allergen. A case series and literature review. *Contact Dermatitis*, *67*(5), 260–269. https://doi.org/10.1111/j.1600-0536.2012.02135.x

Geissler, M., Heravi, K. M., Henkel, M., & Hausmann, R. (2019). Lipopeptide Biosurfactants From *Bacillus* Species. In *Biobased Surfactants: Synthesis, Properties, and Applications* (Second Edi). Elsevier Inc. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812705-6.00006-X

Ghazala, I., Chiab, N., Saidi, M. N., & Gargouri-Bouzid, R. (2022). Volatile organic compounds

dothidea and the possible mechanisms of action. *International Journal of Food Microbiology*, *338*(May 2020), 108957. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108957

Iorizzo, M., Bagnoli, D., Vergalito, F., Testa, B., Tremonte, P., Succi, M., Pannella, G., Letizia, F., Albanese, G., Lombardi, S. J., & Coppola, R. (2024). Diversity of fungal communities on Cabernet and Aglianico grapes from vineyards located in Southern Italy. *Frontiers in Microbiology*, *15*(April), 1–14. https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1399968

Islam, T., Rabbee, M. F., Choi, J., & Baek, K. H. (2022). Biosynthesis, Molecular Regulation, and Application of Bacilysin Produced by *Bacillus* Species. *Metabolites*, *12*(5). https://doi.org/10.3390/metabo12050397

James, A., Yao, T., Ke, H., & Wang, Y. (2023). Food Science and Human Wellness Microbiota for production of wine with enhanced functional components. *Food Science and Human Wellness*, *12*(5), 1481–1492. https://doi.org/10.1016/j.fshw.2023.02.008

Jin, C., Parshin, A. V., Daly, I., Strich, R., & Cooper, K. F. (2013). The cell wall sensors Mtl1, Wsc1, and Mid2 are required for stress-induced nuclear to cytoplasmic translocation of cyclin C and programmed cell death in yeast. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2013*. https://doi.org/10.1155/2013/320823

Johnson, V. L., Ko, S. C. W., Holmstrom, T. H., Eriksson, J. E., & Chow, S. C. (2000). Effector caspases are dispensable for the early nuclear morphological changes during chemical-induced apoptosis. *Journal of Cell Science*, *113*(17), 2941–2953. https://doi.org/10.1242/jcs.113.17.2941

Junges, D. S. B., Delabeneta, M. F., Rosseto, L. R. B., Nascimento, B. L., Paris, A. P., Persel, C., Loth, E. A., Simão, R. C. G., Menolli, R. A., Paula, C. R., & Gandra, R. F. (2020). Antibiotic Activity of *Wickerhamomyces anomalus* Mycocins on Multidrug-Resistant Acinetobacter baumannii. *Microbial Ecology*, *80*(2), 278–285. https://doi.org/10.1007/s00248-020-01495-9

Kantor, A., Petrova, J., Hleba, L., Kluz, M., & Kacaniova, M. (2016). Determination of Spoilage Yeasts in Different Red and White Wines. *Animal Science and Biotechnologies*, *49*(2), 57–66.

Kim, P. Il, Ryu, J., Kim, Y. H., & Chi, Y. T. (2010). Production of biosurfactant lipopeptides iturin A, fengycin, and surfactin A from *Bacillus subtilis* CMB32 for control of *Colletotrichum gloeosporioides*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, *20*(1), 138–145. https://doi.org/10.4014/jmb.0905.05007

Koli, P., Agarwal, M., Kessell, D., Ren, Y., & Mckirdy, S. J. (2023). Chemical Ecology of *Rathayibacter toxicus* and Associated Bacteria : Profiling Volatile Compounds for Insights into Annual Ryegrass Toxicity Causative Agent. *Microchemical Journal*, *196*(September 2023), 109613. https://doi.org/10.1016/j.microc.2023.109613

Kollár, R., Petráková, E., Ashwell, G., Robbins, P. W., & Cabib, E. (1995). Architecture of the

10(November), 1–13. https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02679

Liu, G.-L., Chi, Z., Wang, G.-Y., Wang, Z.-P., Li, Y., & Chi, Z.-M. (2015). Yeast killer toxins, molecular mechanisms of their action and their applications. *Critical Reviews in Biotechnology*, *35*(2), 222–234. https://doi.org/10.3109/07388551.2013.833582

Liu, H., Zeng, Q., Yalimaimaiti, N., Wang, W., Zhang, R., & Yao, J. (2021). Comprehensive genomic analysis of *Bacillus velezensis* AL7 reveals its biocontrol potential against Verticillium wilt of cotton. *Molecular Genetics and Genomics*, *296*(6), 1287–1298. https://doi.org/10.1007/s00438-021-01816-8

Liu, Y., Teng, K., Wang, T., Dong, E., Zhang, M., Tao, Y., & Zhong, J. (2020). Antimicrobial *Bacillus velezensis* HC6: production of three kinds of lipopeptides and biocontrol potential in maize. *Journal of Applied Microbiology*, *128*(1), 242–254. https://doi.org/10.1111/jam.14459

Lleixà, J., Martínez-Safont, M., Masneuf-Pomarede, I., Magani, M., Albertin, W., Mas, A., & Portillo, M. C. (2021). Genetic and phenotypic diversity of *Brettanomyces bruxellensis* isolates from ageing wines. *Food Bioscience*, *40*(March 2020). https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.100900

Longin, C., Degueurce, C., Julliat, F., Guilloux-Benatier, M., Rousseaux, S., & Alexandre, H. (2016). Efficiency of population-dependent sulfite against *Brettanomyces bruxellensis* in red wine. *Food Research International*, *89*, 620–630. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.09.019

Loureiro, V., & Malfeito-Ferreira, M. (2003). Spoilage yeasts in the wine industry. *International Journal of Food Microbiology*, *86*(1–2), 23–50. https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00246-0

Medeot, D. B., Fernandez, M., Morales, G. M., & Jofré, E. (2020). Fengycins From *Bacillus amyloliquefaciens* MEP218 Exhibit Antibacterial Activity by Producing Alterations on the Cell Surface of the Pathogens *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* and *Pseudomonas aeruginosa* PA01. *Frontiers in Microbiology*, *10*(January), 1–12. https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.03107

Mehlomakulu, N. N., Setati, M. E., & Divol, B. (2015). Non-*Saccharomyces* killer toxins: Possible biocontrol agents against brettanomyces in wine? *South African Journal of Enology and Viticulture*, *36*(1), 1–11. https://doi.org/10.21548/36-1-939

Miranda, J., Miot-Sertier, C., Olazabal, L., Albertin, W., Richard, T., Da Costa, G., Rouger, C., & Dols-Lafargue, M. (2023). Bordeaux red wines display variable intrinsic ability to support *Brettanomyces bruxellensis* growth. *Food Control*, *155*(July 2023). https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2023.110067

Mondol, M. A. M., Kim, J. H., Lee, H. S., Lee, Y. J., & Shin, H. J. (2011). Macrolactin W, a new antibacterial macrolide from a marine *Bacillus* sp. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*

Parafati, L., Vitale, A., Restuccia, C., & Cirvilleri, G. (2017). Performance evaluation of volatile organic compounds by antagonistic yeasts immobilized on hydrogel spheres against gray, green and blue postharvest decays. *Food Microbiology*, *63*, 191–198. https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.11.021

Pastorkova, E., Zakova, T., Landa, P., Novakova, J., Vadlejch, J., & Kokoska, L. (2013). Growth inhibitory effect of grape phenolics against wine spoilage yeasts and acetic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, *161*(3), 209–213. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.12.018

Patel, P. S., Huang, S., Fisher, S., Pirnik, D., Aklonis, C., Dean, L., Meyers, E., Fernandes, P., & Mayerl, F. (1995). Bacillaene, a novel inhibitor of procaryotic protein synthesis produced by *Bacillus subtilis:* production, taxonomy, isolation, physico-chemical characterization and biological activity. *The Journal of Antibiotics*, *48*(9), 997–1003. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7592068

Perpetuini, G., Tittarelli, F., Battistelli, N., Suzzi, G., & Tofalo, R. (2020). Contribution of *Pichia manshurica* strains to aroma profile of organic wines. *European Food Research and Technology*, *246*(7), 1405–1417. https://doi.org/10.1007/s00217-020-03499-8

Piao, H., Markillie, L. M., Culley, D. E., Mackie, R. I., & Hess, M. (2013). Improved Method for Isolation of Microbial RNA from Biofuel Feedstock for Metatranscriptomics. *Advances in Microbiology*, *03*(01), 101–107. https://doi.org/10.4236/aim.2013.31016

Pinto, C., Pinho, D., Cardoso, R., Custódio, V., Fernandes, J., Sousa, S., Pinheiro, M., Egas, C., & Gomes, A. C. (2015). Wine fermentation microbiome: A landscape from different Portuguese wine appellations. *Frontiers in Microbiology*, *6*(SEP), 1–13. https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00905

Pinto, L., Baruzzi, F., Cocolin, L., & Malfeito-Ferreira, M. (2020). Emerging technologies to control *Brettanomyces* spp. in wine: Recent advances and future trends. *Trends in Food Science and Technology*, *99*(December 2019), 88–100. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.02.013

Portugal, C. B. (2012). Detección y caracterización de *Brettanomyces bruxellensis* y *Trigonopsis cantarellii* en el contexto enológico. In *Agroindústria y Alimentación*. UNIVERSIDAD DE LA RIOJA.Tesis doctoral.

Portugal, C., Pinto, L., Ribeiro, M., Tenorio, C., Igrejas, G., & Ruiz-Larrea, F. (2015). Potential spoilage yeasts in winery environments: Characterization and proteomic analysis of *Trigonopsis cantarellii*. *International Journal of Food Microbiology*, *210*, 113–120. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.06.005

Portugal, C., Sáenz, Y., Rojo-Bezares, B., Zarazaga, M., Torres, C., Cacho, J., & Ruiz-Larrea, F. (2014). *Brettanomyces* susceptibility to antimicrobial agents used in winemaking: In vitro and practical approaches. *European Food Research and Technology*, *238*(4), 641–652.

velezensis sp. nov., a surfactant-producing bacterium isolated from the river Vélez in Málaga, southern Spain. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *55*(1), 191–195. https://doi.org/10.1099/ijs.0.63310-0

Rump, L. V, Asamoah, B., & Gonzalez-Escalona, N. (2010). Comparison of commercial RNA extraction kits for preparation of DNA-free total RNA from *Salmonella* cells. *BMC Research Notes*, *3*, 2–6. https://doi.org/10.1186/1756-0500-3-211

Saez, J. S., Lopes, C. A., Kirs, V. E., & Sangorrín, M. (2011). Production of volatile phenols by *Pichia manshurica* and *Pichia membranifaciens* isolated from spoiled wines and cellar environment in Patagonia. *Food Microbiology*, *28*(3), 503–509. https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.10.019

Saikia, K., Belwal, V. K., Datta, D., & Chaudhary, N. (2019). Aromatic-rich C-terminal region of LCI is a potent antimicrobial peptide in itself. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *519*(2), 372–377. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.09.013

Sakajoh, M., Solomon, N. A., & Demain, A. L. (1987). Cell-free synthesis of the dipeptide antibiotic bacilysin. *Journal of Industrial Microbiology*, *2*(4), 201–208. https://doi.org/10.1007/BF01569541

Sam-on, M. F. S., Mustafa, S., Mohd Hashim, A., Yusof, M. T., Zulkifly, S., Malek, A. Z. A., Roslan, M. A. H., & Mohd Asrore, M. S. (2023). Mining the genome of *Bacillus velezensis* FS26 for probiotic markers and secondary metabolites with antimicrobial properties against aquaculture pathogens. *Microbial Pathogenesis*, *181*(May). https://doi.org/10.1016/j.micpath.2023.106161

Sandilya, S. P., Jeevan, B., Subrahmanyam, G., Dutta, K., Vijay, N., Bhattacharyya, N., & Chutia, M. (2022). Co-inoculation of native multi-trait plant growth promoting rhizobacteria promotes plant growth and suppresses *Alternaria* blight disease in castor (*Ricinus communis* L.). *Heliyon*, *8*(12), e11886. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e11886

Sandoval Pineda, J. F., Ochoa Corona, F., & Torres Rojas, E. (2017). Evaluación de diferentes métodos de extracción de ARN a partir del hongo nativo *Xylaria* sp. *Revista Colombiana de Biotecnología*, *19*(1), 42–52. https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v19n1.57114

Schöppner, P., Lutz, A. P., Lutterbach, B. J., Brückner, S., Essen, L. O., & Mösch, H. U. (2022). Structure of the Yeast Cell Wall Integrity Sensor Wsc1 Reveals an Essential Role of Surface-Exposed Aromatic Clusters. *Journal of Fungi*, *8*(4). https://doi.org/10.3390/jof8040379

Shin, I., Ryu, H. B., Yim, H. S., & Kang, S. O. (2005). Cytochrome c550 is related to initiation of sporulation in *Bacillus subtilis*. *Journal of Microbiology*, *43*(3), 244–250.

Simonin, S., Roullier-Gall, C., Ballester, J., Schmitt-Kopplin, P., Quintanilla-Casas, B., Vichi, S., Peyron, D., Alexandre, H., & Tourdot-Maréchal, R. (2020). Bio-Protection as an Alternative to Sulphites: Impact on Chemical and Microbial Characteristics of Red Wines. *Frontiers in*

Vater, J., Kablitz, B., Wilde, C., Franke, P., Mehta, N., & Cameotra, S. S. (2002). Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry of lipopeptide biosurfactants in whole cells and culture filtrates of Bacillus subtilis C-1 isolated from petroleum sludge. *Applied and Environmental Microbiology*, *68*(12), 6210–6219. https://doi.org/10.1128/AEM.68.12.6210-6219.2002

Veerabhadrappa, B., Subramanian, S., Sudharshan, S. J., & Dyavaiah, M. (2021). Evaluating the genetic basiss of anti-cancer property of Taxol in *Saccharomyces cerevisiae* model. *FEMS Microbiology Letters*, *368*(13), 1–10. https://doi.org/10.1093/femsle/fnab077

Verstrepen, K. J., & Klis, F. M. (2006). Flocculation, adhesion and biofilm formation in yeasts. *Molecular Microbiology*, *60*(1), 5–15. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05072.x

Vigentini, I., Romano, A., Compagno, C., Merico, A., Molinari, F., Tirelli, A., Foschino, R., & Volonterio, G. (2008). Physiological and oenological traits of different *Dekkera/Brettanomyces bruxellensis* strains under wine-model conditions. *FEMS Yeast Research*, *8*(7), 1087–1096. https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2008.00395.x

Villa Rodríguez, E., Ibarra Gámez, C., & de los Santos Villalobos, S. (2018). Extraction of high-quality RNA from *Bacillus subtilis* with a lysozyme pre-treatment followed by the Trizol method. *Journal of Microbiological Methods*, *147*(February), 14–16. https://doi.org/10.1016/j.mimet.2018.02.011

Villalba, M. L. (2019). *Caracterizacion de toxinas killer con potencial aplicacion en biocontrol de levaduras contaminantes de vinos*. https://rdu.unc.edu.ar/handle/11086/11619. Tesis doctoral. Universidad Nacional del Comahue, Argentina.

Wang, T., Liu, X. huan, Wu, M. Bin, & Ge, S. (2018). Molecular insights into the antifungal mechanism of bacilysin. *Journal of Molecular Modeling*, *24*(5), 1–9. https://doi.org/10.1007/s00894-018-3645-4

Weidenmaier, C., & Peschel, A. (2008). Teichoic acids and related cell-wall glycopolymers in Gram-positive physiology and host interactions. *Nature Reviews Microbiology*, *6*(4), 276–287. https://doi.org/10.1038/nrmicro1861

Wu, L., Wu, H., Chen, L., Lin, L., Borriss, R., & Gao, X. (2015). Bacilysin overproduction in *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 markerless derivative strains FZBREP and FZBSPA enhances antibacterial activity. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *99*(10), 4255–4263. https://doi.org/10.1007/s00253-014-6251-0

Wu, T., Xiao, F., & Li, W. (2021). Macrolactins: biological activity and biosynthesis. *Marine Life Science and Technology*, *3*(1), 62–68. https://doi.org/10.1007/s42995-020-00068-6

Xu, Y., Wang, L., Liang, W., & Liu, M. (2021). Biocontrol potential of endophytic *Bacillus velezensis* strain QSE-21 against postharvest grey mould of fruit. *Biological Control*, *161*(April), 104711. https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2021.104711

Yang, R., Lei, S., Xu, X., Jin, H., Sun, H., Zhao, X., Pang, B., & Shi, J. (2020). Key elements and

Gene, *927*(February). https://doi.org/10.1016/j.gene.2024.148669

Falardeau, J., Wise, C., Novitsky, L., & Avis, T. J. (2013). Ecological and Mechanistic Insights Into the Direct and Indirect Antimicrobial Properties of *Bacillus subtilis* Lipopeptides on Plant Pathogens. *Journal of Chemical Ecology*, *39*(7), 869–878. https://doi.org/10.1007/s10886-013-0319-7

Fan, B., Wang, C., Song, X., Ding, X., Wu, L., Wu, H., Gao, X., & Borriss, R. (2018). *Bacillus velezensis* FZB42 in 2018: The gram-positive model strain for plant growth promotion and biocontrol. *Frontiers in Microbiology*, *9*(OCT), 1–14. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02491

Fazle, R. M., Sarafat Ali, M., Choi, J., Hwang, B. S., Jeong, S. C., & Baek, K. hyun. (2019). *Bacillus velezensis*: A valuable member of bioactive molecules within plant microbiomes. *Molecules*, *24*(6), 1–13. https://doi.org/10.3390/molecules24061046

Fazle Rabbee, M., & Baek, K.-H. (2020). Antimicrobial Activities of Lipopeptides and Polyketides of *Bacillus velezensis* for Agricultural Applications. In *Molecules (Basel, Switzerland)* (Vol. 25, Issue 21). https://doi.org/10.3390/molecules25214973

Fleet, G. H. (2008). Wine yeasts for the future. *FEMS Yeast Research*, *8*(7), 979–995. https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2008.00427.x

Francis, F., & Chaudhary, N. (2022). Antimicrobial peptides: features and modes of action. In *Antimicrobial Peptides: Challenges and Future Perspectives*. INC. https://doi.org/10.1016/B978-0-323-85682-9.00016-7

Fredericks, I. N., du Toit, M., & Krügel, M. (2011). Efficacy of ultraviolet radiation as an alternative technology to inactivate microorganisms in grape juices and wines. *Food Microbiology*, *28*(3), 510–517. https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.10.018

Freimoser, F. M., Rueda-Mejia, M. P., Tilocca, B., & Migheli, Q. (2019). Biocontrol yeasts: mechanisms and applications. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *35*(10), 1–19. https://doi.org/10.1007/s11274-019-2728-4

Poblete, C., Peña-Moreno, I. C., de Morais, M. A., Moreira, S., & Ganga, M. A. (2020). Biodiversity among *Brettanomyces bruxellensis* strains isolated from different wine regions of Chile: Key factors revealed about its tolerance to sulphite. *Microorganisms*, *8*(4). https://doi.org/10.3390/microorganisms8040557

García-Gavín, J., Parente, J., & Goossens, A. (2012). Allergic contact dermatitis caused by sodium metabisulfite: A challenging allergen. A case series and literature review. *Contact Dermatitis*, *67*(5), 260–269. https://doi.org/10.1111/j.1600-0536.2012.02135.x

Geissler, M., Heravi, K. M., Henkel, M., & Hausmann, R. (2019). Lipopeptide Biosurfactants From *Bacillus* Species. In *Biobased Surfactants: Synthesis, Properties, and Applications* (Second Edi). Elsevier Inc. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812705-6.00006-X

Ghazala, I., Chiab, N., Saidi, M. N., & Gargouri-Bouzid, R. (2022). Volatile organic compounds