

Celia Barreiro Obregón

**PROCESO DE SELECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE
DIFERENTES CEPAS DE *LACTIPLANTIBACILLUS PLANTARUM*
COMO CULTIVO INICIADOR DE FERMENTACIÓN
MALOLÁCTICA**

TRABAJO FINAL DE MÁSTER

dirigido por:

Cristina Reguant Miranda

Imma Andorrà Solsona

Daniel Fernández Vázquez

Máster en BEBIDAS FERMENTADAS

Facultat d'Enologia



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Tarragona

12/06/24

**PROCESO DE SELECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE DIFERENTES CEPAS DE
LACTIPLANTIBACILLUS PLANTARUM COMO CULTIVO INICIADOR DE
FERMENTACIÓN MALOLÁCTICA**

Autor: Celia Barreiro Obregón

Tutor académico: Cristina Reguant Miranda

Tutores de empresa: Imma Andorrà Solsona, Daniel Fernández Vázquez

Dirección: Parc Tecnològic del Vi – VITEC. Carretera Porrera, Km 1, 43730 – Falset, Tarragona.

E-mail: celia.barreiro@estudiants.urv.cat

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	4
1.1 Generalidades de la fermentación maloláctica	4
1.2 Condiciones óptimas para la fermentación maloláctica	4
1.3 Monitorización de la fermentación maloláctica	6
1.1.1 Herramientas genéticas para la identificación de cepas de interés	6
1.4 Estrategias de inoculación	6
1.5 Candidatos utilizados como iniciadores de cultivo	6
1.6 Producción de biomasa en biorreactor	7
MATERIAL Y MÉTODOS	9
2.1 Aislamiento de las cepas	9
2.2 Identificación y tipificación de BAL mediante métodos moleculares	9
2.2.1 Identificación de especies de BAL	9
2.2.2 Tipificación de especies de BAL	10
2.3 Fermentación a escala de laboratorio	10
2.3.1 Evaluación de la resistencia de las BAL al etanol y pH	11
2.3.2 Evaluación de la influencia de la concentración de incóculo	11
2.3.3 Microvinificaciones en tubos de 50 mL	11
2.4 Multiplicación de BAL candidata en Biorreactor	12
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	13
3.1 Identificación y tipificación de cepas	13
3.2 Evaluación de la resistencia de las BAL al etanol y pH	16
3.3 Evaluación de la influencia de la concentración de incóculo	17
3.4 Microvinificaciones en tubos de 50 mL	18
3.5 Multiplicación en Biorreactor	20
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	23
AGRADECIMIENTOS	24
BIBLIOGRAFÍA	25
ANEXO	27

RESUMEN

La fermentación maloláctica consiste en la descarboxilación del ácido L-málico y su transformación en ácido L-láctico y dióxido de carbono. En los vinos es realizada por bacterias ácido-lácticas de distintos géneros como *Lactiplantibacillus*, *Oenococcus*, *Pediococcus*. Actualmente existe una mayor demanda de cultivos iniciadores para bodegas. Por otro lado, el perfil de los vinos a nivel mundial está cambiando y se necesita una búsqueda activa de nuevas cepas capaces de adaptarse y vinificarse en condiciones más duras de pH, etanol y acidez. En este contexto, se aislaron colonias de diferentes denominaciones españolas para su identificación y caracterización mediante 16S-ARDRA PCR a nivel de especie y rep-PCR a nivel de cepa utilizando el cebador GTG₅ para cepas de *L. plantarum*. Las muestras se cultivaron en medio MRS y se evaluaron su morfología y carácter grampositivo. Posteriormente, se realizaron ensayos en microplacas de 96 pocillos (250 µL) para evaluar su crecimiento y capacidad fermentativa en diferentes rangos de combinaciones de pH (3-3,6) y etanol (13-16%). También se realizaron fermentaciones a escala de laboratorio en tubos de 50 mL en vinos de Garnacha Blanca, de donde se seleccionó el mejor inóculo para su posterior crecimiento en un biorreactor de 60 L. Las fermentaciones a escala de laboratorio produjeron cepas capaces de consumir 2 g/L en 24 - 72 h y con una implantación comparable a la de los inóculos comerciales actuales. Se obtuvo un cultivo iniciador en 48 h con poblaciones superiores a 10⁸ células/mL. En ensayos de microplacas se obtuvieron cepas que son capaces de consumir 4 g/L a pH 3,6 pero toleran hasta un 15% v/v de grado alcohólico.

Palabras clave: bacterias acidolácticas, biorreactor, cultivo iniciador, ácido málico, tipificación

ABSTRACT

Malolactic fermentation consists of the decarboxylation of L-malic acid and its transformation into L-lactic acid and carbon dioxide. In wines, it is carried out by acid lactic bacteria of different genera such as *Lactiplantibacillus*, *Oenococcus*, *Pediococcus*. Currently, there is a greater demand for starter cultures for wineries. On the other hand, the profile of wines globally is changing and an active search for new strains able to adapt and vinify under more harsh conditions of pH, ethanol and acidity is needed. In this context, colonies were isolated from different Spanish appellations for identification and characterization by 16S-ARDRA PCR at the species level and rep-PCR at the strain level using the GTG₅ primer for *L. plantarum* strains. Samples were cultured on MRS medium and assessed for morphology and Gram-positive character. Subsequently, 96-well microplate assays (250 µL) were performed to evaluate their growth and fermentative capacity at different ranges of pH (3-3.6) and ethanol (13-16%) combinations. Laboratory-scale fermentations were also carried out in falcon tubes (50 mL) in Grenache Blanc must, from which the best inoculum was selected for subsequent growth in a 60 L bioreactor. Laboratory-scale fermentations yielded strains capable of consuming 2 g/L in 24 - 72 h and with an implantation comparable to that of current commercial inocula. A starter culture was obtained in 48h with populations above 10⁸ cells/mL. In microplate assays, strains were obtained that are able to consume 4 g/L at pH 3.6 but tolerate up to 15% v/v alcoholic strength.

Keywords: lactic acid bacteria, bioreactor, starter culture, malic acid, typification

INTRODUCCIÓN

1.1 Generalidades de la fermentación maloláctica

El proceso de elaboración de vino consiste en una fermentación alcohólica (FAL) llevada a cabo por levaduras, las cuales principalmente convierten los azúcares en etanol. En algunos vinos, se lleva a cabo una segunda fermentación que sigue a la fermentación alcohólica conocida como fermentación maloláctica (FML), llevada a cabo por bacterias acidolácticas (BAL).

La FML se lleva a cabo en la mayoría de los casos en vinos tintos, aportando cambios en el perfil organoléptico del vino, suavizando la acidez y mejorando la estabilidad microbiológica; y de forma menos común en vinos blancos de climas más fríos que presentan una acidez más elevada. Se ha observado que esta fermentación se lleva a cabo de manera espontánea, con algunas especies de bacterias presentes en el propio vino (López-Seijas et al., 2020), por lo que muchos productores optan por utilizar BAL indígenas y controlar el proceso, aunque otros optan por el uso de cultivos iniciadores.

Esta fermentación consiste en la descarboxilación del ácido L-málico y su transformación en ácido L-láctico y dióxido de carbono gracias a la enzima maloláctica (Du Plessis et al., 2002), presente en las BAL. La capacidad de reducción de la acidez varía en función de la concentración de ácido L-málico presente, que en mostos puede variar entre 0,3-7,0 g/L (Vicente et al., 2022).

Los efectos en el vino de esta segunda fermentación son la reducción de la acidez total del vino, la mejora de la estabilidad biológica y la modificación del perfil aromático del vino (Bravo-Ferrada et al., 2013). Un buen ejemplo es la producción de ésteres, alcoholes y otros compuestos que da como resultado notas mantecosas, afrutadas, especiadas, de vainilla y un aumento de la suavidad en boca (Sumbly et al., 2014).

1.2 Condiciones óptimas para la fermentación maloláctica

Varias especies de BAL son capaces de convertir el ácido L-málico en ácido L-láctico, pertenecientes a géneros como *Lactiplantibacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* y *Oenococcus*, siendo la especie seleccionada como cultivo iniciador disponible en el mercado, principalmente *Oenococcus oeni* (Pannella et al., 2020) debido a su capacidad de adaptación a las condiciones del vino, tolerando el grado alcohólico que habitualmente se observa en el vino pero a su vez es sensible a concentraciones de etanol superiores

a 15% (v/v) y concentraciones de SO₂ libres superiores a 10 mg/L. Además de *O. oeni* también *L. plantarum* presenta potencial como cultivo iniciador (Vicente et al., 2022).

Aunque esta fermentación se pueda llevar a cabo de forma espontánea, este no es siempre el caso y no siempre se consigue finalizar consumiéndose todo el ácido L-málico. Además, la diversidad de cepas que están presentes en el vino no siempre permite que se realice la FML más adecuada por defectos que se puedan producir como el incremento de la acidez volátil y la formación de metabolitos no deseables (López-Seijas et al., 2020), como el diacetilo. El diacetilo un compuesto producto de la metabolización del ácido cítrico presente en el mosto y vino que provoca el aroma a mantequilla y que a partir de 5 mg/L es considerado un defecto, pudiendo enmascarar también otros aromas positivos del vino. Otro es la producción de aminas biógenas volátiles entre las que se encuentran la cadaverina y la putrescina producidas por la descarboxilación de aminoácidos, que generan aromas muy desagradables y dolor de cabeza (Smit et al., 2008). Por último, la producción de carbamato de etilo, que es un potencial carcinógeno (Gowd et al., 2018). Las BAL producen precursores de este compuesto como la citrulina, reacciona con el etanol para formar el carbamato de etilo (Gowd et al., 2018). Estos son más destacables en destilados, pudiendo afectar a vinos que se someten a destilación. Algunas especies del género *Pediococcus* son las que presentan mayor capacidad estos defectos ya mencionados en el vino, por lo que son considerados contaminantes del proceso (Gowd et al., 2018).

Otro de los problemas que se presenta para realizar la FML son las condiciones de estrés variables como pueden ser el pH, el etanol, la temperatura, los niveles de dióxido de azufre (SO₂) tanto por la adición en el proceso de vinificación como el producido por las levaduras durante la FAL, las elevadas concentraciones de etanol, la accesibilidad de nutrientes que influenciarán a las BAL y, por consiguiente, a la efectividad del proceso fermentativo (Du Plessis et al., 2002). Otros factores menos estudiados a día de hoy pero que también afectan son: el consumo de nutrientes, la producción de toxinas por parte de las levaduras que afectarán a las BAL como respuesta al estrés del medio durante la FAL; la inhibición de la FML por producción de ácido L-láctico pues presenta capacidad inhibitoria (Krieger-Weber et al., 2020).

En los últimos años se han realizado múltiples estudios tanto genéticos como funcionales para aumentar el conocimiento de este proceso para saber cuál es el mejor procedimiento para garantizar el éxito de la FML y obtener buenas cepas que además de consumir completamente el ácido L-málico presente en el vino, sean capaces de proveer al vino de un buen perfil aromático.

1.2 Monitorización de la fermentación maloláctica

1.1.1 Herramientas genéticas para la identificación de cepas de interés

Dentro de las herramientas genéticas para la realización de un seguimiento de la fermentación, se incluye la técnica de 16S-ARDRA (Restriction analysis of the amplified 16S-rDNA) que amplifica el ADN de la región 16S presente en el ribosoma bacteriano (Rodas et al., 2003) o la implantación de técnicas efectivas para la tipificación como la técnica de VNTRs (Variable number of tandem repeats) utilizada en el proyectos posteriores (Claisse & Lonvaud-Funel, 2012). Otras dos técnicas para tipificación que se han utilizado en trabajos anteriores son la RAPD-PCR (randomly amplified polymorphic DNA) o la rep-PCR (PCR amplification of repetitive bacterial DNA elements)(Reguant & Bordons, 2003; Gevers et al., 2001). Estas dos últimas técnicas no son tan utilizadas en favor a la técnica de VNTRs debido a menor fiabilidad de la técnica. La RAPD-PCR además es una técnica que carece de reproducibilidad.

1.4 Estrategias de inoculación

Se ha visto en estudios anteriores que el tiempo de inoculación de las BAL para la realización de la FML es de vital importancia para que ésta pueda llevarse a cabo por completo. Dependiendo de la estrategia, ya sea coinoculación o inoculación secuencial con la levadura puede conllevar en algunos casos a que no termine, e incluso dependiendo del momento de la FAL en el que se inoculen las BAL (Knoll et al., 2012).

Además de estos estudios, ya se comercializan cepas que presentan BAL iniciadoras que han sido cuidadosamente seleccionadas pudiendo obtenerse en cultivo líquido, congeladas o liofilizadas (Lucio et al., 2017). Las dos especies principales son: *O. oeni* y *L. plantarum*. Los atributos específicos de las cepas de BAL consideradas más importantes son la baja producción de ácido acético, la mejora de la sensación en boca del vino, la neutralidad en el perfil aromático y en menor medida la capacidad de ensalzar el color del vino y la contribución al perfil aromático (Sumbly et al., 2014) más allá de la reducción de la sensación de acidez en boca.

1.5 Candidatos utilizados como iniciadores de cultivo

A las condiciones presentes en el vino ya mencionadas, que dificultan el éxito de la FML, se suman las complicaciones que están causadas por el cambio climático como es la producción de vinos con niveles más elevados de etanol modificando el hábitat de las

BAL y la disminución de la acidez que supone menos estrés para realizar la FML, pero favorece el desarrollo de BAL consideradas contaminantes (Fu et al., 2022).

Recientemente, los estudios sobre capacidades fermentativas para la obtención de nuevas cepas para FML han aumentado, planteando no solamente el uso de especies como *L. plantarum*, sino otras especies del género *Pediococcus*, que se ha observado que en vinos con pH elevado permite la disminución de la concentración de SO₂ (Krieger-Weber et al., 2020). Dentro de estas nuevas opciones entran con más protagonismo las cepas de *L. plantarum*, puesto que, con el aumento gradual del pH del vino debido al cambio climático, superiores a 3,5-3,6 pueden realizar correctamente la FML. Esta especie ha mostrado previamente resultados interesantes gracias a la presencia de un perfil enzimático más complejo y un metabolismo distinto en comparación con *O. oeni* (Krieger-Weber et al., 2020).

1.6 Producción de biomasa en biorreactor

Para algunas bodegas es conveniente la capacidad de multiplicación tanto de levaduras como de bacterias evitando el uso de microorganismos comerciales con el objetivo de potenciar los microorganismos autóctonos (Schnierda et al., 2014). Para la producción de biomasa de BAL lo primero que se requiere es de un medio económico y que sea rico en nutrientes y otros factores de crecimiento (Úbeda et al., 2013). Para asegurar el éxito de esta producción es necesario el control de parámetros tales como la temperatura y el pH (Lisci et al., 2021).

Dentro del proceso de comercialización de cepas para FML, es importante evaluar su capacidad de crecimiento celular, y tenerlo en cuenta como otro de los parámetros que ayuden a seleccionarla. Una buena cepa candidata para cultivo comercial es aquella con la que obtendremos un consumo rápido de ácido L-málico y no producción de defectos aromáticos. Igualmente, necesitamos que presenten un crecimiento rápido y que lleguen a poblaciones elevadas para asegurar las probabilidades de imposición del inóculo y su rentabilidad a nivel comercial.

Otro de los intereses para la producción de inóculo es por la diferencia de costes económicos que existen entre la inoculación con una cepa comercial con su previo acondicionamiento y la inoculación con una cepa propia. Por ejemplo, con cepas comerciales de *O. oeni* como la VP41 (Lallemand Enología) en la que se requieren de 100 g para inocular 100 hL de vino. Este sobre de 100 gramos tiene un precio de €217.82 (Lallemand Enología). Para el productor, comprar inóculo de bacteria líquida a gran escala en comparación del equivalente en bacteria liofilizada, permite ahorrar dinero

durante la campaña de vendimia. Un crecimiento elevado en un biorreactor reduciría costes y dependiendo de la concentración se podrían inocular volúmenes mayores, controlándose en la propia bodega o centro (Ziadi et al., 2020).

El objetivo final del presente trabajo es seleccionar, tipificar y caracterizar cepas de *L. plantarum* para obtener potenciales cultivos iniciadores. Para ello se aíslan cepas de diferentes zonas geográficas las cuales se identificaron, tipificaron genéticamente. Estas cepas se sometieron a ensayos de resistencia a condiciones restrictivas de pH y etanol, se inocularon para realizar microvinificaciones y se sometieron a una prueba de producción de biomasa en un biorreactor.

MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 Aislamiento de las cepas

Las cepas utilizadas en este estudio pertenecen a la librería de VITEC, conteniendo aislados procedentes de muestras de vinos de diferentes zonas geográficas de la península. A partir de estos aislados, se realizó un crecimiento en estría en placa de MRS modificado con medio MRS (PanReac, Barcelona, Spain), enriquecido con 3 g/L de ácido L-málico, 5,0 g/L de fructosa y con zumo de tomate a 100 mL/L (zumo de tomate caniles El Corte inglés selection, dilución 1:10, centrifugado 5 minutos a 10.000 rpm), y posteriormente un crecimiento en medio líquido para su uso, garantizando así la pureza del inóculo. Se incubaron en condiciones de anaerobiosis a 30 °C.

El aislamiento de cepas que no pertenecían a la librería de VITEC se realizó en base a diferentes morfologías observadas en placa, se picaron las colonias y se sembraron en dos tubos de 1,5 mL con 1 mL de MRS modificado: uno de ellos se almacenó a -80°C en glicerol (1 mL medio de cultivo + 500 µL de glicerol); y el otro se centrifugó para aislar el pellet y se extrajo su ADN para el análisis genético posterior mediante metodología descrita por Querol et al. (1992), un método que habitualmente es utilizado para levaduras pero se puso a punto para ser utilizado en las BAL.

2.2 Identificación y tipificación de BAL mediante métodos moleculares

2.2.1 Identificación de especies de BAL

Primeramente, se crecieron los aislados en medio MRS líquido, se centrifugaron y se descartó el sobrenadante. Con los pellets obtenidos se realizaron las extracciones de ADN de las bacterias utilizando un protocolo de extracción manual (Querol et al., 1992). La identificación se llevó a cabo mediante la técnica de PCR 16S-ARDRA utilizando el protocolo descrito por Rodas et al., (2003) en el termociclador del modelo T100™ Thermal Cycler (Bio-Rad, Hércules, California. Los reactivos se especifican en la Tabla 1 del anexo. Se separaron los productos de PCR en un gel de agarosa al 1,5% con el marcador Hyperladder 1kb (Bioline, London, UK). A continuación, se sometieron los amplificados a una digestión mediante la enzima de restricción *Bfal* y en casos de resultados dudosos la enzima de restricción *MseI*, siguiendo el protocolo también de Rodas et al., (2003). Se incubaron a 37°C overnight en una estufa. Se separaron los productos de PCR en un gel de agarosa al 3% con el marcador Hyperladder 100 pb

(Bioline, London, UK). Las imágenes fueron digitalizadas mediante un transiluminador Gel Doc™ XR (Bio-Rad, Hércules, California).

Los perfiles se compararon con otros resultados bibliográficos previos para identificar la especie según el perfil de bandas que presente (Rodas et al., 2003).

2.2.2 Tipificación de especies de BAL

Para la tipificación a nivel de cepa se utilizó una técnica u otra en función de la especie: se realizó una PCR utilizando el primer M13 para cepas de *O. oeni* con el protocolo descrito por (Reguant & Bordons, 2003) y reactivos especificados en la Tabla 2 del anexo; y por otro lado una rep-PCR para cepas de *L. plantarum* utilizando para ello el primer GTG₅ utilizando el protocolo descrito por Gevers et al., 2001. Los reactivos se detallan en la Tabla 3 del anexo. Para realizar la PCR se utilizó el termociclador T100™ Thermal Cycler (Bio-Rad, Hércules, California). Se separaron los productos de PCR en un gel de agarosa al 1,5% utilizando en el mismo gel los marcadores de 100 pb y de 1kb Hyperladder (Bioline, London, UK). La metodología mencionada de visualización de los amplificados es la misma para los dos procedimientos de tipificación.

2.3 Fermentación a escala de laboratorio

Se realizaron diferentes fermentaciones en diferentes matrices vínicas para evaluar la capacidad fermentativa de las cepas seleccionadas. Para ello, primero se seleccionaron cepas que se guardaron en glicerol a -80°C, principalmente especies de *Lactiplantibacillus plantarum* y *Oenococcus oeni*, que se cultivaron en 30 mL de medio MRS líquido, que se incubaron en una estufa a 30°C.

Para el cálculo de la concentración a inocular en las fermentaciones se realizaron recuentos en la cámara de Neubauer de profundidad de 0,2 mm³. Se inoculó una concentración de 10⁷ cél. /mL para las cepas de *O. oeni* y una concentración de 10⁸ cél. /mL para las cepas de *L. plantarum*. Esto se debe a que los fabricantes de cultivos iniciadores sugieren concentraciones de inoculación más elevadas.

El seguimiento de la FML se realizó mediante mediciones de málico y del crecimiento de las BAL. La concentración de ácido L-málico se midió a partir de métodos enzimáticos con un analizador automático (Random Access Analyzer Y15) con sus correspondientes kits enzimáticos (BioSystems S.A., Barcelona, España). Todos estos análisis se realizaron siguiendo el protocolo establecido por el *Compendium of International Methods of Wine and Must Analysis* OIV (2024).

2.3.1 Evaluación de la resistencia de las BAL al etanol y pH

Se procedió a evaluar la resistencia de las BAL a distintas condiciones de grado alcohólico y de pH. Para ello se realizaron fermentaciones en microplacas de 96 pocillos de 250 µl (Brand Microplates) de un vino tranquilo de la variedad Loureiro a diferentes grados alcohólicos: 13, 14, 15 y 16 % v/v, y cada uno de ellos a diferentes pH: 3; 3,2; 3,4; y 3,6; todas con una concentración de ácido L- málico de 4,1 g/L. Se analizaron 5 cepas. Se midió cada media hora la turbidimetría a 600 nm, posteriormente se incubó en una estufa a 30°C y pasados 7 días se juntaron los quintuplicados y se analizaron concentraciones de ácido L-málico, ácido L-láctico y poblaciones de BAL.

2.3.2 Evaluación de la influencia de la concentración de incóculo

Se realizó un ensayo en una microplaca estéril de 24 pocillos (Brand Microplates), en un volumen de 1,5 mL, utilizando vino blanco de la variedad de Loureiro que presentaba un grado alcohólico de 12,5% v/v, un pH de 2,98 y una concentración de 4,1 g/L de ácido L-málico. En esta prueba se utilizaron cepas de *O. oeni* y de *L. plantarum* a diferentes concentraciones con el objetivo de observar la influencia de la concentración en el consumo del ácido L-málico. Entre las cepas se incluyó la cepa comercial *O. oeni*, VP41 (Lallemand) como control. Se realizaron curvas de crecimiento con el equipo Varioskan Lux (Termofisher Scientific), leyendo la longitud de onda a 600 nm para medir la turbidez, procedimiento similar al utilizado en la incubación en microplaca, basado en el proyecto de Lucio et al., (2017) durante 7 días a 30°C.

2.3.3 Microvinificaciones en tubos de 50 mL

En posteriores ensayos, se evaluaron cepas viables en una fermentación a escala de laboratorio. Para ello se fermentó un vino tranquilo de la variedad garnacha blanca con un grado alcohólico de 13% (v/v), 3,2 de pH, y se suplementó a 2,0 g/L de ácido L-málico. Se analizaron 11 cepas por triplicado incluyendo entre ellas la cepa VP41 como control comercial. Para ello, se repartió el vino en tubos de 50 mL e inoculando la cepa correspondiente a una concentración de 10^8 cel/mL para las cepas de *L. plantarum* y 10^7 cel/mL para las cepas de *O. oeni*. Esta diferencia responde a las indicaciones de fabricantes de cultivos iniciadores, que especifican que la concentración celular de *L. plantarum* a inocular es mayor.

En las muestras que finalizaron la FML se midió la concentración de ácido L-láctico, el pH, la acidez total tartárica (ATT), la acidez volátil (AV), azúcares residuales (D-Glucosa/D-fructosa), el grado alcohólico (GAV) y el sulfuroso (SO₂) libre y total.

El grado alcohólico, la acidez total y el pH se determinaron mediante espectroscopía de infrarrojo transformado de Fourier (FTIR) con un equipo WineScan FT120 (Foss Eléctrico, Barcelona, España). Las concentraciones de azúcares residuales, sulfuroso libre y total, ácido L-málico y ácido L-láctico se midieron a partir de métodos enzimáticos o colorimétricos con un analizador automático (Random Access Analyzer Y15) con sus correspondientes kits enzimáticos (BioSystems S.A., Barcelona, España). Todos estos análisis se realizaron siguiendo el protocolo establecido por el *Compendium of International Methods of Wine and Must Analysis* OIV (2024).

2.4 Multiplicación de BAL candidata en Biorreactor

Se realizó una prueba de crecimiento en el bioreactor LEV2050 (Aizoáin, Navarra), de la cepa con mejor capacidad fermentativa en los diferentes ensayos anteriores. Ésta se sembró en 2 L de MRS líquido modificado como inóculo previo para el biorreactor. Previamente a la inoculación, se limpió el reactor con agua ozonizada con un potencial redox de 750 mV, recomendación del fabricante a partir del cual ya tiene capacidad esterilizante. El agua ozonizada con capacidad desinfectante fue producida *in situ* mediante equipos de ASP ASEPSIA (Pinto, Madrid).

Posteriormente se preparó el medio de cultivo utilizando para ello el medio Multilev, proporcionado por la casa comercial del bioreactor, diluyendo 0,88 g/L en un volumen final de 60,0 L de agua. Previamente a la inoculación se pasteurizó a 60°C durante 30 min. A partir de ese momento se inocularon los dos litros de medio MRS que presentaba una concentración de $1,7 \times 10^9$ cel/mL. Al momento de inocular se procedió a realizar mediciones de seguimiento, primero cada media hora y después cada hora. La monitorización del proceso se realizó a través del pH con un pHmetro CRISON GLP 21 (Hospitalet de Llobregat, España), la turbidez realizando diluciones 1:20 con un turbidímetro Hach TL2310 (Düsseldorf, Alemania), y sembrando viables en placa MRS modificado y YPD.

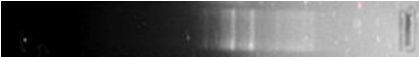
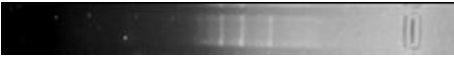









RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Identificación y tipificación de cepas

A partir de las muestras de la librería de VITEC y de las muestras nuevas se identificaron 60 aislados, como se detalla en la Tabla 1. De estos 60 aislados, en la Tabla 2 aparecen agrupados en función a la especie de BAL con la que se identificaron. La especie con más aislados identificados fue *L. plantarum* y la especie con menos aislados fue *Lactobacillus helveticus*. Después del trabajo de identificación realizado, se ha podido identificar nuevamente algunos aislados que se creían puros pero que estaban contaminados.

Gracias a este trabajo se actualizó la librería de BAL de VITEC para su mantenimiento. Además, hubo nuevas especies de BAL que se añadieron a la librería, procedentes de muestras internas que se analizaron durante este periodo de prácticas. En concreto, se obtuvieron 3 aislados de *L. helveticus*, 8 de *Lacticaseibacillus casei*, 13 de *Levilactobacillus brevis* y 10 de *O. oeni*.

Tabla 1: Cepas identificadas de la librería, con su perfil de cepa mediante foto del gel de agarosa.

Nombre	Especie previamente	Especie ahora	Perfil de cepa
LBC1.1	<i>O. oeni</i>	<i>L. plantarum</i>	
LBC1.2	<i>O. oeni</i>	<i>L. plantarum</i>	
LBC2.1	<i>L. plantarum</i>	<i>L. plantarum</i>	
LBC2.2	<i>L. plantarum</i>	<i>L. plantarum</i>	
LBC3.1	<i>O. oeni</i>	<i>O. oeni</i>	
LBC3.2	<i>O. oeni</i>	<i>L. plantarum</i>	
LBC4.1	<i>L. plantarum</i>	<i>L. plantarum</i>	
LBC7	<i>L. plantarum</i>	<i>O. oeni</i>	
LBC8	<i>O. oeni</i>	<i>O. oeni</i>	
LBC9.1	<i>O. oeni</i>	<i>O. oeni</i>	
LBC9.2	<i>O. oeni</i>	<i>L. plantarum</i>	

LBC10	<i>L. mali</i>	<i>L. plantarum</i>	
LBC11	<i>L. mali</i>	<i>L. plantarum</i>	
LBC12	<i>L. mali</i>	<i>L. plantarum</i>	
LBC13	<i>O. oeni</i>	<i>L. plantarum</i>	
LBC15	<i>O. oeni</i>	<i>O. oeni</i>	
LBC17	<i>O. oeni</i>	<i>O. oeni, comercial</i>	
LBC18	<i>O. oeni</i>	<i>L. plantarum</i>	
LBC19.1	<i>L. plantarum</i>	<i>L. plantarum</i>	
LBC19.2	<i>L. plantarum</i>	<i>O. oeni</i>	
LBC20	<i>O. oeni</i>	<i>L. plantarum</i>	
LBC21	<i>L. mali</i>	<i>L. plantarum</i>	
LBC22.1	<i>O. oeni</i>	<i>O. oeni</i>	
LBC28	<i>L. plantarum</i>	<i>L. plantarum</i>	
LBC29	<i>O. oeni</i>	<i>L. plantarum</i>	
LBC32.4		<i>L. plantarum</i>	
LBC32.5		<i>L. plantarum</i>	
LBC33.2		<i>O. oeni</i>	
LBC36.1		<i>L. plantarum</i>	
		Marcador molecular 100pb	
		Marcador molecular 1Kb	

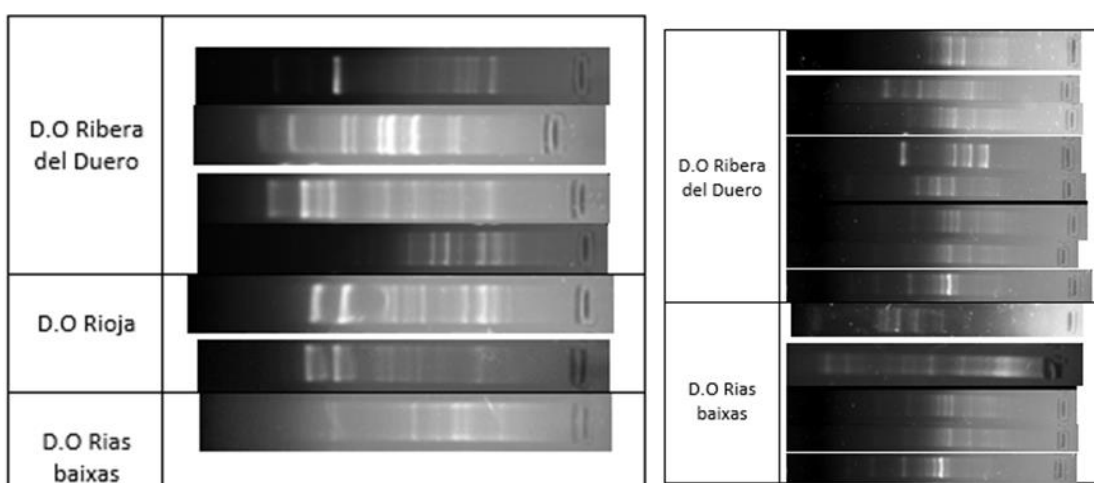
Tabla 2: Resumen de los aislados en función de la especie

<i>O. oeni</i>	<i>L. plantarum</i>	<i>L. casei</i>	<i>L. brevis</i>	<i>L. helveticus</i>
10	26	8	13	3

De las cepas analizadas mediante las técnicas genéticas de tipificación se han observado varias situaciones que se detallan en la Tabla 3. Se observan perfiles específicos de cada una de las D.O: Ribera del Duero, Rioja y Ribeira Sacra, de donde

pertenecen los aislados con los que se ha trabajado. En las cepas analizadas de *O. oeni* no existen perfiles que sean comunes en las diferentes zonas geográficas, observándose más variedad de cepas dentro de la D.O de Ribera del Duero y solo una de las cepas pertenece a la D.O de Rías Baixas. En las cepas de *L. plantarum* la situación es distinta, no se han aislado ninguna cepa que pertenezca a la D.O Rioja, pero la D.O Rías Baixas tiene una mayor representación. En las cepas de *L. plantarum* sí que se observan perfiles que se encuentran en las D.O de Ribera del Duero y Rias Baixas.

Tabla 3: Perfiles de cepas de *O. oeni* (izquierda) y *L. plantarum* (derecha) distribuidas según la zona geográfica a la que pertenece la cepa.



Este trabajo ha permitido poner a punto en el centro, técnicas de identificación de BAL a nivel de cepa de *L. plantarum* y *O. oeni*; y la optimización del método de extracción de ADN de BAL, prolongando con una incubación overnight en frío en el paso de la precipitación del ADN, siendo técnicas que no estaban implementadas previamente en el centro.

La técnica de rep-PCR utilizada para la tipificación de *L. plantarum* en este trabajo ha sido utilizada anteriormente en otros trabajos previos como los de Gevers et al., (2001) y Tamang et al., (2005), en el cual no solo es utilizado para *L. plantarum* sino que la utilizan para otras especies. En este trabajo ha interesado la tipificación de aislados de especies potencialmente comerciales como *L. plantarum* y *O. oeni*. Por ello, algunas de las especies encontradas durante la identificación por medio de la PCR 16S como *L. casei*, *L. helveticus* han quedado relegadas a una identificación posterior a este trabajo. En el caso de *L. brevis*, esta técnica presenta alguna complicación para su tipificación pues no se ha conseguido diferenciar incluso entre subespecies, tanto la rep-PCR como la PCR utilizando el primer M13.

En otra especie como *O. oeni*, se utilizó esta técnica usando el primer M13 como el de Marques et al., (2011) para tipificar *O. oeni*. En este trabajo se priorizó esta técnica frente a otras más actuales como los VNTRs para la tipificación de *O. oeni* ya que resultaba una opción más económica para el centro. Además, el centro ha adquirido un equipo de electroforesis capilar para poder poner a punto la técnica de tipificación mediante VNTRs recientemente, pero ha estado utilizándose en otros proyectos que están en marcha actualmente.

3.2 Evaluación de la resistencia de las BAL al etanol y pH

Se realizaron ensayos con 2 cepas distintas de *L. plantarum* (LBC20, LBC18), y una cepa de *O. oeni* (LBC3.1) resumidos en la Tabla 3. El criterio de selección de las cepas fue el origen, pues las cepas de *L. plantarum* fueron aisladas de vinos finales y la cepa de *O. oeni* aislada de un vino inicial.

De las tres cepas evaluadas, solamente una de ellas (LBC20) dio buenos resultados en porcentaje de realización de la FML a los siete días de ensayo. Las otras dos cepas restantes no llegaron a valores superiores a un 25 % de consumo de ácido L-málico. Los mejores condiciones fermentativas para esta cepa fueron de un pH de 3,6 y 13% de etanol, pero llegando a consumir casi 2 g de ácido L-málico en condiciones de 3,4 y 15 % (v/v) de etanol. Si bien, no resultó una buena cepa para fermentar a pH extremos de 3,0 y más de 14 % (v/v) de etanol donde no superó un consumo del 10 % del ácido L-málico presente. En comparación, las otras dos cepas (LBC3.1, LBC18) incluso en unas condiciones de pH más favorables de 3,4 y 3,6 presentaron menor capacidad fermentativa que la cepa LBC20.

Estos resultados coinciden con trabajos previos como en el de Berbegal et al., (2016) en el que se evaluó la resistencia a un pH de 3,5 con diferentes grados alcohólicos diferentes cepas *L. plantarum*, observando que el pH es determinante para la supervivencia, incluso más que el grado alcohólico (Chen et al., 2022; Sun et al., 2022). La *O. oeni* que se utilizó, siendo la cepa LBC3.1 no fue apta, pues no fue capaz de consumir prácticamente el ácido L-málico, que no coincide con otros estudios pues *O. oeni* se caracteriza por ser una cepa que es capaz de tolerar el pH entre otras cosas por la capacidad de activación de del sistema ATPasa de la membrana plasmática y mutaciones en los genes de la enzima *mleA* (Chen et al., 2022).

Estas pruebas se realizaron también para evaluar el crecimiento de las cepas en placa. Debido a la puesta a punto reciente del equipo, no se han obtenido resultados concluyentes de crecimiento celular, producto de una condensación excesiva que

comprometía la lectura. Se está trabajando en ello y por ello no se han realizado más pruebas.

Tabla 4: Concentración de ácido L-málico (g/L) final y porcentaje de FML realizada por las cepas seleccionadas, en las diferentes condiciones de pH y etanol en todas las condiciones experimentales.

Condiciones		% FML			Ácido L-málico (g/L) final		
pH	Etanol % (v/v)	LBC20	LBC3.1	LBC18	LBC20	LBC3.1	LBC18
3	13	21,74	13,77	18,60	3,24	3,57	3,37
3	14	11,35	14,01	19,57	3,67	3,56	3,33
3	15	7,25	12,08	19,81	3,84	3,64	3,32
3	16	5,31	17,39	19,81	3,92	3,42	3,32
3,2	13	36,23	20,05	18,36	2,64	3,31	3,38
3,2	14	25,12	14,01	18,36	3,10	3,56	3,38
3,2	15	18,60	12,56	17,63	3,37	3,62	3,41
3,2	16	11,11	13,77	17,63	3,68	3,57	3,41
3,4	13	45,41	14,98	23,43	2,26	3,52	3,17
3,4	14	53,14	17,63	21,26	1,94	3,41	3,26
3,4	15	47,83	16,18	17,63	2,16	3,47	3,41
3,4	16	26,81	18,36	19,08	3,03	3,38	3,35
3,6	13	91,79	20,77	19,08	0,34	3,28	3,35
3,6	14	79,71	17,15	15,46	0,84	3,43	3,50
3,6	15	84,06	19,81	18,36	0,66	3,32	3,38
3,6	16	69,57	19,57	19,81	1,26	3,33	3,32

3.3 Evaluación de la influencia de la concentración de inóculo

En este ensayo se analizaron diferentes cepas para observar un efecto de la concentración en el consumo de ácido L-málico. Se inocularon en un vino de la variedad Loureiro en las mismas condiciones de pH y etanol, sin utilizar condiciones restrictivas. La concentración inicial (1x) con la que se inoculó fue de 10^7 cel./mL o el doble de concentración (2x). Se observaron diferencias entre las cepas y en algunos casos entre las concentraciones de cepas. Solo dos cepas (LBC20, LBC9) consiguieron consumir algo de ácido L-málico y en estas cepas a mayor concentración celular del inóculo, mayor consumo de málico como se puede observar en la Tabla 4.

En la prueba anterior se observó que el pH bajo influye más que el grado alcohólico. En esta prueba después de 7 días de incubación se observan diferencias entre cepas y entre concentraciones.

El aislado LBC20 que consiguió consumir ácido L-málico durante ese tiempo, presenta diferencias en la viabilidad celular. A la concentración inicial consumió ácido L-málico pero la población acabó con todas las poblaciones muertas, a diferencia las muestras con el doble de concentración que todavía presentaba poblaciones viables y mayor consumo de málico, detallado en la Tabla 4.

En el resto de aislados a excepción de LBC3.1 donde no hay población viable ni consumo de ácido L-málico, todavía presentaban poblaciones viables sin consumo de ácido L-málico, pero sin diferencias entre la concentración inicial y a doble de concentración. Cuando se consume málico sí que parecen observarse diferencias entre concentración inicial del inóculo.

Tabla 5: Concentraciones ácido L-málico, ácido L-láctico y recuento celular de las cepas, inoculadas a concentración inicial (1x) y el doble de concentración (2x)

Cepas	Ácido L-málico (g/L)	Ácido L-Láctico (g/L)	Recuento celular (cel/mL)
LBC17 X1	4,64±0,07	0,23±0,00	7,0E+05 ± 2,8E+05
LBC17 X2	4,35±0,04	0,53±0,07	9,5E+05 ± 4,9E+05
LBC 3.1 X1	4,70±0,16	0,13±0,02	N.D
LBC 3.1 X2	4,77±0,05	0,27±0,00	N.D
LBC20 X1	3,83±0,03	0,81±0,04	N.D
LBC20 X2	2,86±0,08	1,48±0,14	5E+05 ± 7E+04
LBC1.1 X1	4,77±0,15	0,23±0,01	3E+05 ± 2E+05
LBC1.1 X2	4,54±0,16	0,51±0,08	8,5E+05 ± 7,1E+04
LBC9.1 X1	4,51±0,16	0,46±0,08	1,15E+06 ± 3,5E+05
LBC9.1 X2	3,84±0,10	1,18±0,06	3,9E+06 ± 8,89E+05

3.4 Microvinificaciones en tubos de 50 mL

En las curvas de fermentación que aparecen en la Figura 1 se observan los diferentes comportamientos de las cepas a la hora de realizar la FML. Las cepas que consiguieron finalizar la FML fueron de la especie *L. plantarum*, mientras que las cepas de *O.oeni* y el control de *O.oeni* VP41 se estancaron y no pudieron finalizar en el tiempo del ensayo. La cepa LBC20 fue capaz de realizar la FML de 50 mL en 24 horas, seguida de LBC1.1, LBC18 y LBC9.2, que realizaron la fermentación en 2-3 días. La cepa LBC17 se observa que aun no ha acabado inicia con el consumo de ácido L-málico.

Se evaluaron las poblaciones de BAL para aquellas fermentaciones que no consumían ácido L-málico. Se ha observado anteriormente que poblaciones inferiores a 10⁵ UFC/mL no comienzan la FML (Reguant et al., 2005), por lo que las fermentaciones que presentaron poblaciones inferiores a 10⁴ UFC/ml se decidieron abortar pasados los 30 días por presentar un periodo de adaptación de las cepas al medio demasiado largo. Esto confirma que con el recuento de la población de BAL vemos que estas no están viables y por este motivo la FML no ha funcionado.

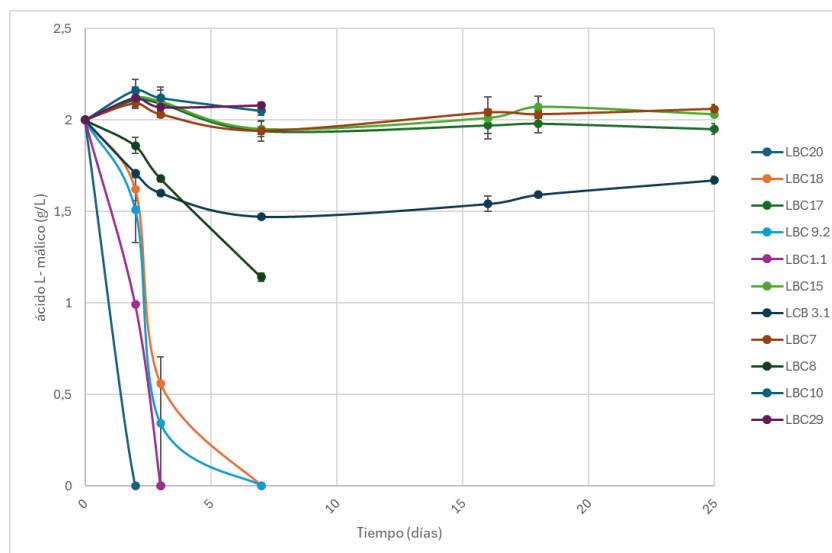


Figura 1: Seguimiento periódico del consumo del ácido L-málico (g/L) durante la FML de las diferentes cepas evaluadas.

En las analíticas de vino final que se observan en la Tabla 5 la cepa de *L. plantarum* más rápida presenta un incremento de la acidez volátil llegando hasta 0,73 g/L, valores similares a trabajos anteriores (Knoll et al., 2012). Este carácter de aumento de la acidez volátil se ha observado en todas aquellas cepas estudiadas que han finalizado la FML. Se observan diferencias significativas en el grado alcohólico, pH y acidez volátil, detallado en la Tabla 6, especialmente entre las distintas cepas de *L. plantarum* que son las que finalizaron. La cepa LBC20 es la más distinta del resto, pues es la que más aumentó la acidez volátil con 0,73 g/L.

Este aumento de la acidez volátil se observa en aquellas cepas que han finalizado de forma rápida la FML, observándose también una reducción en el contenido alcohólico final de los vinos, puesto que a partir de etanol las bacterias acéticas que puedan estar presentes son capaces de producir acetaldehído gracias a la enzima alcohol deshidrogenasa y a partir de ahí mediante una serie de reacciones posteriores producir ácido acético (Ribéreau-Gayon et al. 2000).

Tabla 6: Parámetros de vinos finales de ácido L-málico (AM) (g/L), ácido L-láctico (AL) (g/L), grado alcohólico (GAV) % (v/v), acidez volátil (AV) (g/L), acidez total (ATT) (g/L), pH, azúcares residuales (g/l).

Cepa	AM	AL	GAV	AV	ATT	pH	Glu/Fru
LCB20	0,00±0,00	1,91±0,03	11,81±0,07	0,73±0,02	6,54±0,16	3,39±0,00	1,81±0,12
LCB18	0,00±0,00	1,51±0,01	13,24±0,01	0,54±0,01	5,21±0,02	3,29±0,01	1,63±0,07
LCB17	1,95±0,00	0,13±0,02	13,24±0,07	0,43±0,02	5,67±0,02	3,20±0,01	1,57±0,08
LCB 9.2	0,00±0,00	1,54±0,09	12,82±0,10	0,53±0,03	5,26±0,13	3,30±0,02	1,56±0,05
LCB1.1	0,00±0,00	1,68±0,01	12,55±0,06	0,57±0,01	5,62±0,02	3,31±0,00	1,57±0,19
LCB15	2,03±0,00	0,03±0,00	13,30±0,00	0,43±0,00	5,70±0,04	3,19±0,01	1,60±0,06
LCB 3.1	1,67±0,00	0,36±0,00	13,26±0,02	0,44±0,01	5,52±0,02	3,22±0,01	1,62±0,12
LBC7	2,06±0,00	0,06±0,00	13,31±0,02	0,43±0,01	5,69±0,01	3,21±0,01	1,51±0,15

LA FML es llevada a cabo principalmente por *L. plantarum* y por *O. oeni*, razón por la que se han utilizado inóculos de estas dos especies. Al contrario que otros estudios las cepas de *O. oeni* principalmente finalizan la FML, gracias a su tolerancia a las condiciones más restrictivas (Vigentini et al., 2016).

Las cepas de *L. plantarum* que finalizaron la FML se contemplaron como candidatas para posible cultivo comercial y de todas ellas se escogió la LBC20 por ser la que presentó un mayor consumo.

3.5 Multiplicación en Biorreactor

A partir de las pruebas anteriores se escogió una cepa potencial, que fue la LBC20, que se inoculó en el medio comercial Multilev (Lev2050, Navarra) para comprobar la capacidad de producción de biomasa. En la Figura 2 se observa las poblaciones de BAL a lo largo del ciclo que duró 51 horas.

Las poblaciones de levaduras presentes, en el medio no sufrieron un desarrollo muy elevado, aunque a tiempo final de la producción de inóculo sí que aumentaron iniciando con una población de 5×10^3 cel/mL y finalizando el ciclo con una población de 1×10^4 cel/mL. Por el contrario, en las BAL se observa desarrollo de la población, llegando a poblaciones de 10^9 UFC/mL.

La aparición de levaduras en las etapas finales de la producción del inóculo se debe principalmente a que el medio no es estéril, se realizó una pasteurización previa a la inoculación de LBC20 con las condiciones indicadas por el fabricante, posterior a una limpieza del biorreactor con ozono.

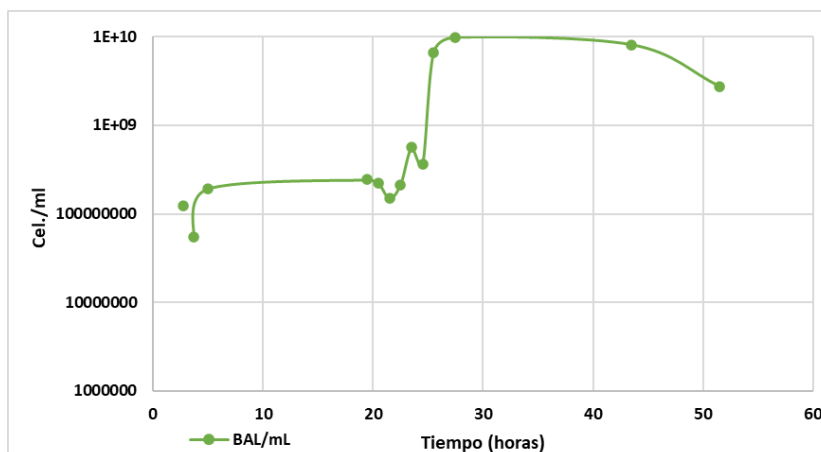


Figura 2: Seguimiento de poblaciones de BAL a lo largo del ciclo del biorreactor

Como seguimiento del crecimiento se utilizaron los parámetros de turbidez y de pH como indicadores. En ambos casos, sirvieron para monitorizar el proceso durante el ciclo de 51h. En el caso del pH, se observó una disminución desde el inicio del ciclo con un pH de 4,49 hasta el final a 3,41 detallado en la Figura 3. En cuanto a la turbidez, se observó un crecimiento hasta las 1780 NTUs a las 51 horas también detallado en la Figura 3, y a partir de entonces se mantuvo, indicando un crecimiento estable del lote. La medida de la turbidez se realiza por recomendación del fabricante para medir del desarrollo de las poblaciones.

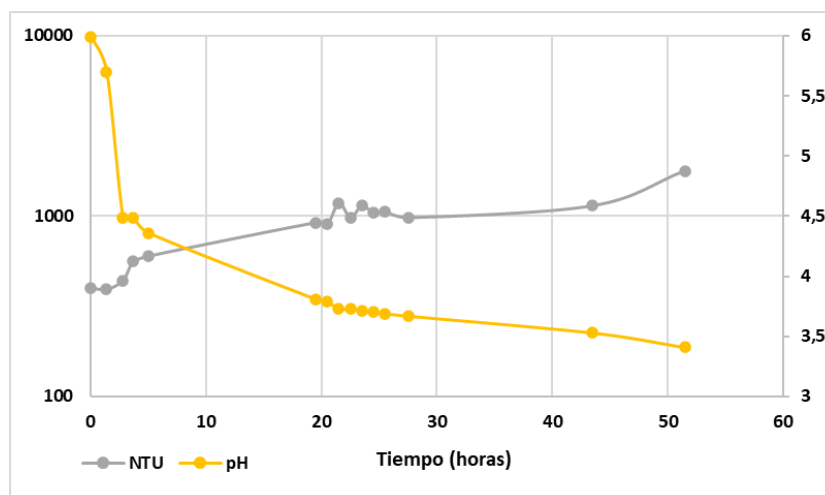


Figura 3: Seguimiento de pH y turbidez a lo largo del ciclo del biorreactor

El medio Multilev es un medio deshidratado que se utiliza para la producción de levaduras en el biorreactor. A pesar de ser un medio utilizado para la producción de biomasa de levaduras también se ha observado un aumento de la biomasa de las BAL, debido a su contenido en azúcares utilizables por las bacterias. En la Tabla 8 se resume su composición. Es un medio más barato que el Lactilev (Lev2050, Navarra), un medio

preparado para la producción de BAL en un biorreactor, por lo que interesan otras opciones viables.

Tabla 8: Parámetros resumidos del medio comercial Multilev rehidratado a 88 g/L.

Densidad	Azúcares (g/L)	Acidez total tartárica (g/l)	pH	NFA (mg/l)	Ácido L-málico (g/L)
1058,0	109,2	2,42	5,5	3090,5	2,7

La elección del medio Multilev fue por la disponibilidad en el centro. Igualmente, vistos los resultados de estudios anteriores como el de Śliżewska & Chlebicz-Wójcik, 2020, se quiso evaluar su potencial. En este estudio, se evalúa la viabilidad de cepas del género *Lactiplantibacillus* en diferentes medios, que incluyen harinas comerciales de varios cereales como el trigo, cebada, maíz y centeno, con carbohidratos esenciales para el crecimiento celular mezclado con agua destilada. En este trabajo se comparó este medio con el medio convencional MRS, observando que el crecimiento era ligeramente mayor que el medio MRS, aunque a diferencia del medio MRS requiere de un periodo de adaptación previo. Siendo un medio que contiene harinas vegetales comerciales no presenta grandes costes.

No solo en medios con base de cereales son funcionales, sino que existen otros componentes testados con los que se han obtenidos buenos resultados como el suero de queso y el licos de maceración de maíz, dos opciones también económicas (Manzoor et al., 2017).

La próxima prueba por realizar para un cultivo comercial serían las pruebas de liofilización y su capacidad para realizar la FML de forma posterior a la liofilización y reinoculación.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Como conclusiones de este trabajo se podrían diferenciar los siguientes apartados:

- Se ha optimizado técnicas de tipificación de bacterias acidolácticas.
- Se han identificado 60 cepas de las cuales la mayoría pertenecen a *L. plantarum*, seguido de *L. brevis* y *O. oeni*, que ya estaban presentes en la librería.
- Se ha ampliado la colección de especies añadiendo las especies *L. helveticus* y *L. casei* cepas disponibles en la librería del centro que servirán como reservorio para futuras experimentaciones.
- Las fermentaciones con *L. plantarum* fueron las que mejor funcionaron de las cuales la cepa LCB20 consume casi 4 g/L en condiciones de pH y etanol de 3,6 y 16 % (v/v).
- Se han obtenido cepas de *L. plantarum* capaces de consumir 2 g/L de ácido L-málico en 24h (LBC20) y otras que han tenido consumos similares en hasta 3 días (LBC18 y LBC3.1).
- En cuanto al biorreactor, usando el Multilev no es un medio útil el crecimiento de LBC20 siguiendo el procedimiento porque las levaduras aumentan durante el ciclo. La cepa elegida (LBC20) fue capaz de adaptarse y producir biomasa.

Finalmente, como continuación de este trabajo están planteados ensayos para evaluar la capacidad de producción de aminas biógenas como carácter negativo para la selección de estas cepas como inóculo comercial.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo no puede finalizar sin los respectivos agradecimientos a la gente de a continuación.

A Daniel por haber estado desde el primer día apoyándome, enseñándome y rezándole al Dios Oenococcus para que nos diese suerte durante todo el proceso, no habría podido pedir a alguien mejor para trabajar codo a codo. A Cristina e Imma por toda la orientación y por haberme ayudado a descubrir el mundo de las bacterias lácticas. También a Mercè, Sandra, Mar y Alba por proporcionarme ayuda cuando me encontraba perdida y abrirme las puertas del laboratorio. A mis profesores del máster por hacerme amar más aun el maravilloso mundo del vino más y a mis compañeros por acompañarme y sufrir todos para poder seguir adelante. Muchas gracias a mis amigas por su paciencia cuando me pongo a hablar de vino continuamente y aun así escucharme con alegría. Por último, muchas gracias a mis padres y hermano por apoyarme en mi camino hasta aquí y animarme siempre a perseguir mis sueños.

Sin todos vosotros no habría llegado hasta aquí.

Muchas gracias de verdad

Celia

BIBLIOGRAFÍA

- Berbegal, C., Peña, N., Russo, P., Grieco, F., Pardo, I., Ferrer, S., Spano, G., & Capozzi, V. (2016). Technological properties of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from grape must fermentation. *Food Microbiology*, 57, 187–194. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.03.002>
- Bravo-Ferrada, B. M., Hollmann, A., Delfederico, L., Valdés La Hens, D., Caballero, A., & Semorile, L. (2013). Patagonian red wines: Selection of *Lactobacillus plantarum* isolates as potential starter cultures for malolactic fermentation. In *World Journal of Microbiology and Biotechnology* (Vol. 29, Issue 9, pp. 1537–1549). <https://doi.org/10.1007/s11274-013-1337-x>
- Chen, Q., Hao, N., Zhao, L., Yang, X., Yuan, Y., Zhao, Y., Wang, F., Qiu, Z., He, L., Shi, K., & Liu, S. (2022). Comparative functional analysis of malate metabolism genes in *Oenococcus oeni* and *Lactiplantibacillus plantarum* at low pH and their roles in acid stress response. *Food Research International*, 157. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111235>
- Claisse, O., & Lonvaud-Funel, A. (2012). Development of a multilocus variable number of tandem repeat typing method for *Oenococcus oeni*. *Food Microbiology*, 30(2), 340–347. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.01.001>
- Du Plessis, H. W., Steger, C. L. C., Du Toit, M., & Lambrechts, M. G. (2002). *The occurrence of malolactic fermentation in brandy base wine and its influence on brandy quality*.
- Fu, J., Wang, L., Sun, J., Ju, N., & Jin, G. (2022). Malolactic Fermentation: New Approaches to Old Problems. In *Microorganisms* (Vol. 10, Issue 12). MDPI. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10122363>
- Gevers, D., Huys, G., & Swings, J. (2001). Applicability of rep-PCR fingerprinting for identification of *Lactobacillus* species. *FEMS Microbiology Letters*, 205(1), 31–36. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2001.tb10921.x>
- Gowd, V., Su, H., Karlovsky, P., & Chen, W. (2018). Ethyl carbamate: An emerging food and environmental toxicant. In *Food Chemistry* (Vol. 248, pp. 312–321). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.12.072>
- International Organisation of Vine and Wine (OIV). (2024). *Compendium of international methods of wine and must analysis*. Edition 2011. Paris (France): International Organisation of Vine and Wine.
- Knoll, C., Fritsch, S., Schnell, S., Grossmann, M., Krieger-Weber, S., du Toit, M., & Rauhut, D. (2012). Impact of different malolactic fermentation inoculation scenarios on Riesling wine aroma. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(3), 1143–1153. <https://doi.org/10.1007/s11274-011-0917-x>
- Krieger-Weber, S., Heras, J. M., & Suarez, C. (2020). *Lactobacillus plantarum*, a new biological tool to control malolactic fermentation: A review and an outlook. In *Beverages* (Vol. 6, Issue 2, pp. 1–23). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/beverages6020023>
- Lisci, S., Grosso, M., & Tronci, S. (2021). Different control strategies for a yeast fermentation bioreactor. *IFAC-PapersOnLine*, 54(3), 306–311. <https://doi.org/10.1016/j.ifacol.2021.08.259>

- López-Seijas, J., García-Fraga, B., da Silva, A. F., Zas-García, X., Lois, L. C., Gago-Martínez, A., Leão-Martins, J. M., & Sieiro, C. (2020). Evaluation of malolactic bacteria associated with wines from Albariño variety as potential starters: Screening for quality and safety. *Foods*, 9(1). <https://doi.org/10.3390/foods9010099>
- Lucio, O., Pardo, I., Heras, J. M., Krieger-Weber, S., & Ferrer, S. (2017). Use of starter cultures of *Lactobacillus* to induce malolactic fermentation in wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 23(1), 15–21. <https://doi.org/10.1111/ajgw.12261>
- Manzoor, A., Qazi, J. I., Haq, I. U., Mukhtar, H., & Rasool, A. (2017). Significantly enhanced biomass production of a novel bio-therapeutic strain *Lactobacillus plantarum* (AS-14) by developing low cost media cultivation strategy. *Journal of Biological Engineering*, 11(1). <https://doi.org/10.1186/s13036-017-0059-2>
- Marques, A. P., Duarte, A. J., Chambel, L., Teixeira, M. F., Romão, M. V. S., & Tenreiro, R. (2011). Genomic diversity of *Oenococcus oeni* from different winemaking regions of Portugal. *International Microbiology*, 14(3), 155–162. <https://doi.org/10.2436/20.1501.01.144>
- Pannella, G., Lombardi, S. J., Coppola, F., Vergalito, F., Iorizzo, M., Succi, M., Tremonte, P., Iannini, C., Sorrentino, E., & Coppola, R. (2020). Effect of biofilm formation by *Lactobacillus plantarum* on the malolactic fermentation in model wine. *Foods*, 9(6). <https://doi.org/10.3390/foods9060797>
- Querol, A., Barrio, E., & Ramón, D. (1992). A Comparative Study of Different Methods of Yeast Strain Characterization. *Systematic and Applied Microbiology*, 15(3), 439–446. [https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(11\)80219-5](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(11)80219-5)
- Reguant, C., & Bordons, A. (2003). *Typification of Oenococcus oeni strains by multiplex RAPD-PCR and study of population dynamics during malolactic fermentation*. <http://www.fut.es/debb/UPGMA/>
- Reguant, C., Carreté, R., Constantí, M., & Bordons, A. (2005). Population dynamics of *Oenococcus oeni* strains in a new winery and the effect of SO₂ and yeast strain. *FEMS Microbiology Letters*, 246(1), 111–117. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.03.045>
- Ribéreau-Gayon P, Dubourdieu D, Doneche B, Lonvaud A. (2000). Biochemistry of alcoholic fermentation and metabolic pathways of wine yeasts. *Handbook of Enology* 1:51–74. <https://doi.org/10.1002/0470010363.ch2>
- Rodas, A. M., Ferrer, S., & Pardo, I. (2003). 16S-ARDRA, a tool for identification of lactic acid bacteria isolated from grape must and wine. *Systematic and Applied Microbiology*, 26(3), 412–422. <https://doi.org/10.1078/072320203322497446>
- Schnierda, T., Bauer, F. F., Divol, B., van Rensburg, E., & Görgens, J. F. (2014). Optimization of carbon and nitrogen medium components for biomass production using non-*Saccharomyces* wine yeasts. *Letters in Applied Microbiology*, 58(5), 478–485. <https://doi.org/10.1111/lam.12217>
- Ślizewska, K., & Chlebicz-Wójcik, A. (2020). Growth kinetics of probiotic *Lactobacillus* strains in the alternative, cost-efficient semi-solid fermentation medium. *Biology*, 9(12), 1–13. <https://doi.org/10.3390/biology9120423>

- Smit, A. Y.; du Toit, W. J.; du Toit, M., 2008: Biogenic amines in wine: Understanding the headache. *South African Journal of Enology and Viticulture.*, **29**, 109–127.
- Sumby, K. M., Grbin, P. R., & Jiranek, V. (2014). Implications of new research and technologies for malolactic fermentation in wine. In *Applied Microbiology and Biotechnology* (Vol. 98, Issue 19, pp. 8111–8132). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5976-0>
- Sun, J., Ge, Y., Gu, X., Li, R., Ma, W., & Jin, G. (2022). Identification and Characterization of Malolactic Bacteria Isolated from the Eastern Foothills of Helan Mountain in China. *Foods*, *11*(16). <https://doi.org/10.3390/foods11162455>
- Tamang, J. P., Tamang, B., Schillinger, U., Franz, C. M. A. P., Gores, M., & Holzapfel, W. H. (2005). Identification of predominant lactic acid bacteria isolated from traditionally fermented vegetable products of the Eastern Himalayas. *International Journal of Food Microbiology*, *105*(3), 347–356. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.04.024>
- Úbeda, J., Barrajón, N., & Briones, A. (2013). Optimizing small-scale production of fresh wine yeast biomass. *Journal of Food Process Engineering*, *36*(5), 686–693. <https://doi.org/10.1111/jfpe.12032>
- Vicente, J., Baran, Y., Navascués, E., Santos, A., Calderón, F., Marquina, D., Rauhut, D., & Benito, S. (2022). Biological management of acidity in wine industry: A review. In *International Journal of Food Microbiology* (Vol. 375). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2022.109726>
- Vigentini, I., Praz, A., Domeneghetti, D., Zenato, S., Picozzi, C., Barmaz, A., & Foschino, R. (2016). Characterization of malolactic bacteria isolated from Aosta Valley wines and evidence of psychrotrophy in some strains. *Journal of Applied Microbiology*, *120*(4), 934–945. <https://doi.org/10.1111/jam.13080>
- Ziadi, M., M’Hir, S., Aydi, A., Hamdi, M., & Al Loman, A. (2020). Bioreactor Scale-Up and Kinetic Modeling of Lactic Acid and Biomass Production by *Enterococcus faecalis* SLT13 during Batch Culture on Hydrolyzed Cheese Whey. *Journal of Chemistry*, *2020*. <https://doi.org/10.1155/2020/1236784>

ANEXO

Tabla 1: reactivos y protocolo de PCR 16S (Rodas et al., 2003)

Primer/cebador	F (labA): 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG- 3' R (labB): 5'- AAGGAGGTGATCCAGCCGCA- 3'
Mezcla de reacción PCR	Volumen final: 50 µl 1x Tampón PCR (Meridian Bioscience) 0,2 mM dNTPs 1 U taq polimerasa (Meridian Bioscience) 2 mM MgCl ₂ (Meridian Bioscience) 1 µM Cebador F 1 µM Cebador R 1% Formamida 2 µl ADN Ajustar a 50 µl con H ₂ O
Protocolo de amplificación	5 minutos, 94°C / 35 ciclos: 30 segundos, 94°C; 30 segundos, 56°C; 1 minuto, 72°C/ 5 minutos, 72°C

Tabla 2: reactivos y protocolo de rep-PCR (Gevers et al., 2001)

Primer/cebador	GTG ₅ 5'-GTGGTGGTGGTGGT-3'
Mezcla de reacción PCR	Volumen final: 50 µl 1x Tampón PCR (Meridian Bioscience) 200 µM dNTPs 1 U taq polimerasa (Meridian Bioscience) 1,5 mM MgCl ₂ (Meridian Bioscience) 2 µM Cebador GTG ₅ 2 µl ADN Ajustar a 50 µl con H ₂ O
Protocolo de amplificación	5 minutos, 94°C / 35 ciclos: 1 minuto, 94°C; 20 segundos, 40°C; 2 minutos, 65°C/ 5 minutos, 65°C

Tabla 3: reactivos y protocolo de PCR con el primer M13 (Reguant & Bordons, 2003)

Primer/cebador	M13: 5'-GAGGGTGGCGGTTCT-3'
Mezcla de reacción PCR	Volumen final: 20 µl 1x Tampón PCR (Meridian Bioscience) 0,1 mM dNTPs 0,5 U taq polimerasa (Meridian Bioscience) 4mM MgCl ₂ (Meridian Bioscience) 4 µM Cebador M13 2 µl ADN Ajustar a 20 µl con H ₂ O
Protocolo de amplificación	5 minutos, 94°C / 40 ciclos: 1 minuto, 94°C; 20 segundos, 45°C; 2 minutos, 72°C/ 5 minutos, 72°C