

TRABAJO FIN DE MÁSTER

Máster en Microbiota, Probióticos y Prebióticos

EVALUACIÓN IN VITRO DEL IMPACTO DE LOS SULFITOS DEL VINO EN LA MICROBIOTA Y LA SALUD INTESTINAL HUMANA. IMPORTANCIA DE LOS POLIFENOLES Y SU PAPEL PROTECTOR

Autor/es: **Andrea Mariana Bugli**

Villaviciosa de Odón, *Octubre 2025*



Título del Trabajo: **“Evaluación in vitro del impacto de los sulfitos del vino en la microbiota y la salud intestinal humana. Importancia de los polifenoles y su papel protector”**

Este trabajo ha sido realizado en el **Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación (CIAL), CSIC –UAM** en el grupo de investigación **Microbioma, Alimentación y Salud (BEA)**.



Tutor externo: Dra. M. Victoria Moreno Arribas

Tutor interno: Dra. Natalia Molinero García

INDICE:

RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
1.1. SO ₂ como aditivo alimentario.....	2
1.2. La microbiota intestinal y su papel en nuestra salud.....	4
1.3. Modelos <i>in vitro</i> de simulación de la digestión gastrointestinal y sus aplicaciones.	7
2. OBJETIVOS DEL ESTUDIO.....	8
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	9
3.1. Vinos blancos.....	9
3.2. Determinación de sulfitos en los vinos.....	10
3.3. Determinación de concentración de polifenoles totales.....	10
3.4. Ensayos de simulación de digestión gastrointestinal y fermentación colónica....	11
3.4.1 <i>Simulación de la digestión gastrointestinal</i>	11
3.4.2. <i>Simulación de la fermentación colónica en estático</i>	12
3.4.2.1 <i>Selección de donantes y preparación de inóculo fecal</i>	12
3.4.2.2 <i>Fermentación colónica en estático o batch</i>	13
3.5. Análisis de la composición microbiana.....	14
3.5.1 <i>Recuentos microbianos en medios de cultivo</i>	14
3.5.2. <i>Extracción de ADN y secuenciación del gen ARN ribosomal 16S</i>	14
3.6. Análisis de datos de secuenciación.....	15
3.7. Evaluación de la producción de metabolitos microbianos durante la fermentación colónica en estático.....	16
3.7.1. <i>Análisis de producción de ión amonio</i>	16
3.7.2. <i>Análisis de ácidos grasos de cadena corta</i>	16
3.8. Análisis del perfil fenólico.....	16
3.9. Análisis estadístico.....	16
4. RESULTADOS.....	17
4.1. Caracterización inicial de los vinos utilizados en el estudio.....	17
4.2. Cambios en el perfil de compuestos fenólicos del vino durante la digestión gastrointestinal.....	18

4.3. Impacto de la digestión y fermentación colónica del vino blanco dependiendo de su contenido en alcohol sobre la composición de la microbiota colónica.....	18
<i>4.3.1. Evaluación mediante recuentos microbianos.....</i>	18
<i>4.3.2 Perfil metataxonómico de la microbiota colónica.....</i>	19
4.4. Efecto de la fermentación de VBA y VBD sobre la microbiota colónica a nivel funcional.....	22
<i>4.4.1 Producción de ácidos grasos de cadena corta y media.....</i>	22
<i>4.4.2. Producción de ión amonio.....</i>	23
5. DISCUSIÓN.....	24
CONCLUSIONES.....	27
BIBLIOGRAFÍA.....	28
ANEXOS.....	35

RESUMEN

Los sulfitos son aditivos ampliamente utilizados en la industria alimentaria, por sus propiedades antimicrobianas y antioxidantes. En el vino, el dióxido de azufre molecular (SO₂), es la forma más comúnmente empleada. A pesar de sus ventajas tecnológicas, el uso de sulfitos es cuestionado debido a sus posibles efectos sobre la salud humana. En este trabajo, se ha evaluado el impacto de los sulfitos presentes en el vino blanco sobre la composición y funcionalidad de la microbiota intestinal humana. Para ello, se simuló la ingesta de SO₂ presente en el vino blanco, con y sin alcohol, empleando el simulador gastrointestinal simgi[®] y modelos de fermentación colónica en *batch*.

Los resultados del análisis metataxonómico mostraron una elevada variabilidad interindividual en los efectos de estos aditivos en la microbiota, aunque se identificaron patrones comunes, destacando un aumento de patobiontes o patógenos oportunistas, como *Escherichia-Shigella* y *Klebsiella*, junto con la reducción de géneros comensales como *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Ruminococcus* y *Faecalibacterium*. Además, se observaron cambios funcionales, con una reducción del metabolismo proteico y un incremento de la producción de ácidos grasos de cadena corta, especialmente el ácido acético. Estos efectos fueron más acusados en el vino blanco desalcoholizado, probablemente debido a una mayor proporción de SO₂ libre en esta matriz. Además, la baja concentración de polifenoles característica del vino blanco podría limitar su potencial efecto protector frente a los sulfitos, a diferencia de lo descrito en la bibliografía para los vinos tintos.

En conjunto, estos resultados sugieren que los sulfitos presentes en el vino blanco pueden alterar la composición y la funcionalidad de la microbiota colónica, lo que pone de relieve la necesidad de estudios adicionales, especialmente, para comprender sus posibles implicaciones en la salud intestinal.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. SO₂ como aditivo alimentario

Los aditivos alimentarios son sustancias que habitualmente no se encuentran de forma natural en los alimentos, y que se añaden intencionalmente en cualquiera de las etapas de su producción con fines tecnológicos, principalmente para la conservación, y la mejora del sabor o el aspecto (1,2). Entre los aditivos alimentarios más utilizados, destacan los sulfitos, un grupo de compuestos químicos identificados por la Unión Europea bajo un número E (E220-E228), que comprenden al dióxido de azufre (SO₂) y diversas sales sulfitadas de sodio, potasio y calcio. Estos compuestos actúan como conservantes y antioxidantes, y están presentes en una amplia gama de alimentos y bebidas, destacando su presencia en productos procesados, mariscos y crustáceos, y zumos embotellados, entre otros. Además, se emplean en ciertos medicamentos y cosméticos, y se ha documentado exposición laboral. Por ello, su utilización y concentración están estrictamente reguladas por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) (3).

En el ámbito de las bebidas, el vino, particularmente el blanco, es uno de los productos en los que más frecuentemente se emplean sulfitos, cuyo uso se encuentra regulado por la Organización Internacional de la Viña y el Vino (OIV) (4) (**Tabla A1**). Durante el proceso de vinificación, los sulfitos, principalmente en forma de SO₂, se adiciona con fines de preservación en distintas etapas, destacando el final de la fermentación maloláctica. Debido a sus propiedades antimicrobianas, fundamentalmente dirigidas a bacterias ácido-lácticas, permiten controlar este proceso y evitar el deterioro del vino por producción de compuestos que alteran el aroma o incluso pueden implicar un riesgo en la salud del consumidor (5). Además, los sulfitos presentan actividad antioxidante, protegiendo al vino frente a la oxidación y preservando sus características organolépticas, especialmente los aromas naturales (5). En la matriz vínica, el SO₂ total se encuentra repartido en dos fracciones: SO₂ libre y SO₂ combinado. La fracción combinada se encuentra unida a azúcares y otros compuestos carbonílicos del vino (cetonas, aldehídos), por lo que no está disponible para cumplir las funciones protectoras de la matriz. La fracción libre, en cambio, es la responsable de la conservación activa del vino siempre que se encuentre como SO₂ molecular, lo cual depende, fundamentalmente, del pH del medio (4). Sin embargo, a pesar de cumplir funciones tecnológicas relevantes, la cantidad de sulfitos que se agregan al vino se encuentra

estrictamente controlado porque el empleo en exceso del aditivo puede provocar alteraciones organolépticas en el producto, y por los efectos perjudiciales sobre la salud del consumidor (5,6). En la sección **Anexo** se exponen las concentraciones permitidas en vino blanco tanto en la Unión Europea como en otros países (**Tabla A1**).

La evidencia toxicológica disponible ha llevado a que organismos internacionales continuamente reevalúen su seguridad como aditivo para la salud humana y medioambiental. En este sentido, el Comité Unido de FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios (JECFA), ha establecido desde hace años una ingesta diaria admitida (IDA) de 0,7mg de equivalentes de SO₂/kg de peso corporal/día (7). Por otro lado, la EFSA, si bien en 2016 estableció la misma IDA que la JECFA, concluyó que esta debería revisarse una vez se dispusiera de información más completa sobre los posibles efectos para la salud (8). Es así como en 2022 este organismo decide adoptar una posición precautoria, retirando la IDA por no contar con datos suficientes para sostener dicho límite como seguro. Esto se debió, en parte, a los resultados obtenidos mediante la metodología de margen de exposición (MOE), que mostraron valores bajos para la mayoría de las estimaciones, indicando que la exposición alimentaria actual es alta y generando preocupación por los posibles riesgos para la salud (3).

Se han descrito distintos grados de sensibilidad frente a los sulfitos, que pueden provocar diversos síntomas como dermatitis, urticaria, angioedema, dolor abdominal, diarrea, broncoconstricción y, en casos graves, anafilaxis (6). Las manifestaciones más frecuentes son las dermatológicas y respiratorias, destacando a los individuos asmáticos como un grupo significativamente vulnerable. Además, se ha visto que la localización de las manifestaciones no está determinada por la vía de exposición y, de hecho, puede ocurrir más de un tipo de manifestación de forma simultánea. Sin embargo, los mecanismos moleculares y bioquímicos responsables de la aparición de estos síntomas aún no se conocen con exactitud (3,9). Considerando la relevancia clínica que conlleva la exposición a estos compuestos, las autoridades internacionales han establecido como obligatorio declarar la presencia de sulfitos en el etiquetado de los productos alimentarios, en los que el empleo de este aditivo está permitido. En concreto, el Reglamento (UE) n° 1169/2011 sobre la información alimentaria facilitada al consumidor obliga a declarar la presencia de dióxido de azufre y sulfitos en la etiqueta de alimentos y bebidas siempre que su concentración supere los 10 mg/kg o 10 mg/L de SO₂ total, expresados sobre el producto listo para el consumo (10).

Algunas de las manifestaciones clínicas asociadas a la exposición a estos aditivos incluyen también síntomas intestinales, aunque aún se desconoce el mecanismo que los desencadena y su frecuencia real en la población. Entre las hipótesis propuestas, es plausible pensar en un posible impacto en la microbiota intestinal, debido por un lado a las propiedades antimicrobianas de los sulfitos y, por otro, a que una alteración en este complejo ecosistema microbiano puede influir significativamente en la salud digestiva y en la respuesta inmunológica del huésped. Sin embargo, actualmente el conocimiento sobre cómo afecta la exposición a los sulfitos a la microbiota intestinal es muy limitado y solo unos pocos estudios han investigado este aspecto. Irwin et al. en un estudio *in vitro* empleando cultivos aislados de cuatro especies de la microbiota intestinal (*Lactobacillus casei*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus*, *Streptococcus thermophilus*) observaron un efecto bacteriostático por la exposición a sulfitos (250-500 mg/L) y un efecto bactericida (1000-3780 mg/L sobre todas las especies de *Lactobacillus*, y a 2000 mg/L de bisulfito de sodio sobre *S. thermophilus*), sugiriendo que los sulfitos podrían afectar a la microbiota intestinal (11). Otro estudio realizado en saliva de donantes humanos planteó que la abundancia relativa y la riqueza de la microbiota oral (evaluada mediante secuenciación del gen ARNr 16s y viabilidad celular) se vería afectada por la exposición a sulfito de sodio y bisulfito de sodio (12). Más recientemente, un estudio *in vitro* ha evaluado el efecto de los sulfitos en la digestión simulada del consumo de vino tinto con dosis del aditivo dentro de las autorizadas, concluyendo que los sulfitos presentes en el vino pueden alterar la composición y funcionalidad de la microbiota colónica humana (13). Sin embargo, hoy en día, se desconoce en gran medida el impacto que la exposición a este tipo de aditivos tiene en las comunidades microbianas intestinales, así como la implicación que otros componentes alimentarios podrían ejercer en esta interacción.

1.2. La microbiota intestinal y su papel en nuestra salud

La teoría endosimbiótica propuesta por Lynn Margulis cambió nuestra visión de los seres vivos, mostrando que no constituimos entidades aisladas, sino el resultado de una compleja red de interacciones simbióticas entre nuestras células y microorganismos que nos cohabitan (14). De hecho, esta relación se estima cercana al 1:1, dado que se ha calculado que una persona tipo de 70kg tendría alrededor de 3.0×10^{13} células somáticas y 3.9×10^{13} células

bacterianas, de las cuales 3.8×10^{13} estarían en el colon (15). El conjunto de microorganismos (bacterias, arqueas, levaduras y hongos, protozoos, virus) que residen en un nicho ecológico específico se conoce como **microbiota**, mientras que la definición de **microbioma** abarca tanto la microbiota, sus genomas y las condiciones ambientales circundantes (16).

De todos los ecosistemas, la microbiota colónica ha sido una de las más estudiadas por la fácil obtención de las muestras de heces, su elevada carga microbiana y además por ser el tracto gastrointestinal una de las superficies más grandes del cuerpo humano que toma contacto con el exterior (17). Se sabe que la colonización por esta comunidad microbiana compleja y diversa se inicia en el momento del nacimiento (18) y su composición no es estática, viéndose influenciada por factores intrínsecos (como la edad) y extrínsecos (como la dieta o el uso de antibióticos), coevolucionando con nosotros a lo largo de nuestra vida. En la etapa adulta, el 90% de la composición bacteriana pertenece fundamentalmente a miembros de dos filos: *Bacillota* (antes denominado *Firmicutes*) y *Bacteroidota* (antes denominado *Bacteroidetes*), aunque la proporción exacta de cada uno varía significativamente entre individuos. El 10% restante está representado por miembros de los filos *Actinobacteriota*, *Pseudomonadota* (antes *Proteobacteria*), *Fusobacteriota* y *Verrucomicrobiota*. En menor proporción también se incluyen levaduras, hongos, fagos y protozoos (19). Cada individuo tiene un patrón de composición diferente, existiendo una gran variabilidad interindividual, y a su vez, también hay cambios intraindividuales a lo largo del tiempo. La microbiota intestinal presenta una serie de funciones indispensables para el estado de salud y homeostasis, entre las que destacan: i) su capacidad de degradación de carbohidratos complejos y la producción de metabolitos beneficiosos, principalmente ácidos grasos de cadena corta (AGCCs), vitaminas del grupo B y vitamina K; ii) regulación del almacenamiento de lípidos; iii) desarrollo y función del sistema inmunológico; iv) síntesis de compuestos con funciones neuroendocrinas; v) mantenimiento de la homeostasis e integridad de la barrera intestinal; vi) regulación de la producción de mucus; vii) producción de péptidos antimicrobianos; viii) protección contra colonización por patógenos, etc. (19). Una de las propiedades más importantes que presenta es la resiliencia, que se define como la capacidad de la comunidad microbiana de volver a su composición taxonómica y/o funciones iniciales manteniendo un balance entre las especies microbianas (eubiosis) tras una perturbación del ecosistema (20). Cuando estas alteraciones persisten o se tornan

irreversibles, la comunidad microbiana sufre un desequilibrio composicional y funcional, denominado disbiosis, que en el caso de la microbiota intestinal, suele caracterizarse por un aumento de patobiontes (microorganismos comensales que forman parte de la microbiota normal que bajo determinadas condiciones pueden actuar como patógenos), disminución de la abundancia de microorganismos beneficiosos y una reducción de la diversidad. Un estado de disbiosis se asocia con efectos perjudiciales en la salud del hospedador, pudiendo ser causa o consecuencia de patologías (20), especialmente se ha asociado con enfermedades de naturaleza inflamatoria, autoinmune, metabólica, neoplásica e incluso trastornos de la conducta (19). En este contexto, resulta importante señalar que los conceptos de “microbioma sano” y “disbiosis” se encuentran actualmente en revisión por parte de la comunidad científica, en gran medida debido a la elevada variabilidad interindividual observada en la composición y funcionalidad microbiana (21,22). A ello se suman los retos metodológicos asociados al estudio del microbioma mediante técnicas metagenómicas, que incluyen sesgos en la obtención y análisis de datos, así como limitaciones en la interpretación funcional. Todo ello dificulta la traslación clínica de los hallazgos y plantea la necesidad de enfoques más integrativos y estandarizados (23).

La dieta constituye uno de los principales moduladores de la microbiota intestinal. Cambios o alteraciones sostenidas en los patrones alimentarios pueden influir en la composición y funcionalidad de la microbiota y, en consecuencia, sobre el estado de salud y enfermedad (24,25). Entre los componentes dietéticos más relevantes se encuentran los polifenoles, un grupo de compuestos bioactivos presentes en frutas, vegetales, té, cacao o vino. Estos compuestos se caracterizan por su baja absorción en el tracto gastrointestinal superior, lo que hace que una fracción muy elevada ($\approx 90\text{--}95\%$) alcance intacta el colon (26,27). En esta región, los polifenoles interactúan con la microbiota intestinal, favoreciendo su metabolismo colónico y dando lugar a metabolitos derivados con potencial relevancia biológica. Además, se han relacionado con efectos positivos como el aumento de la biodiversidad microbiana, la estimulación del crecimiento de especies beneficiosas (*Lactobacillus*, *Bifidobacterium*) y la producción de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) (26,28). Más allá de este efecto potencialmente ‘prebiótico’, estudios recientes han planteado un posible papel protector de los polifenoles del vino tinto frente a los efectos negativos de los sulfitos en la microbiota colónica (13). No obstante, persisten interrogantes sobre los

mecanismos implicados, en particular si estas interacciones dependen de la dosis de sulfitos, de la concentración total de polifenoles o del tipo específico de compuestos fenólicos.

1.3. Modelos *in vitro* de simulación de la digestión gastrointestinal y sus aplicaciones

En los últimos años ha habido un creciente interés por comprender las interacciones de la dieta con el microbioma intestinal, y su impacto en la salud humana. Sin embargo, esto implica entender el proceso de digestión que sufren los alimentos y la compleja red de interacciones a nivel fisiológico. Si bien los ensayos clínicos serían la aproximación ideal, muchas veces no son posibles por limitaciones fundamentalmente éticas, económicas y metodológicas, dado el carácter invasivo de la obtención de muestras representativas. Por otro lado, el uso de modelos animales también presenta algunas limitaciones, tanto por la dificultad para acceder a las muestras del tracto gastrointestinal, principios bioéticos y de gasto económico y de tiempo, y la cuestionada validez de la extrapolación de sus resultados a la digestión de alimentos en humanos. Por ello, los modelos *in vitro* cada vez son más utilizados y reconocidos en la simulación de las condiciones fisiológicas del proceso de digestión en el tracto gastrointestinal de forma controlada y reproducible (29,30).

Estos modelos se pueden trabajar en estático o en dinámico, y en ambos casos es indispensable tener en cuenta que la simulación gastrointestinal no se produce en un único paso, sino que incluye varias etapas con distintas condiciones y que es importante recrear los aspectos anatómicos, fisicoquímicos y microbianos de cada una de ellas (31). Los modelos estáticos son los más simples y simulan un número limitado de parámetros fisiológicos en biorreactores independientes, no siendo capaces de reproducir los parámetros físico-mecánicos o los cambios de las condiciones a lo largo del proceso (32). En estos modelos se establecen valores fijos para las principales condiciones en las distintas etapas, incluyendo fundamentalmente temperatura, enzimas, pH y sales biliares, sin presentar intercambio de fluidos ni variaciones graduales de las condiciones entre etapas. Frente a la gran variedad de modelos en estático existentes y la necesidad de armonizar las metodologías para la obtención de resultados reproducibles y comparables, surgió el protocolo INFOGEST, desarrollado en el marco de la red internacional que lleva el mismo nombre, con el objetivo de establecer protocolos consensuados y normalizados de trabajo que permitan la comparativa de resultados y así establecer conclusiones sólidas (29). De esta forma, se han estandarizado una

serie de parámetros para la simulación en estático del proceso de digestión gastrointestinal de alimentos en adultos, aunque ya existen variantes adaptadas para otras edades (33).

Los modelos en estático se han aplicado de forma exitosa en el estudio de la interacción de numerosos componentes alimentarios y la microbiota colónica humana, especialmente enfocados en compuestos bioactivos, incluidos los polifenoles (13,34–36), así como contaminantes alimentarios (37,38). No obstante, si bien los métodos estáticos muestran una buena correlación con los puntos finales de las fases de digestión y son adecuados para investigaciones preliminares y desarrollo de hipótesis, no permiten reproducir la cinética de las distintas etapas de la digestión (29,39). Por ello, se han desarrollado modelos dinámicos que introducen parámetros de variación en el tiempo, como el pH, y la simulación de la segregación gradual de enzimas digestivas, además de la peristalsis y vaciado gástrico e intestinal. Además, su mayor complejidad permite ajustar las condiciones de simulación de acuerdo con los objetivos del ensayo, e incluso, adaptarse a las características fisiológicas de distintos grupos poblacionales. Dentro de esta clasificación, se han desarrollado modelos monocompartimentales como DGM (Dynamic Gastric Model), que simula el proceso gástrico, o ARCOL (Artificial Colon) que reproduce las fermentaciones colónicas. También existen modelos multicompartimentales como SHIME®, sistema TIM (TIM-1 que simula el tracto gastrointestinal superior y TIM-2 que simula las condiciones colónicas) o Simgi® (SIMulador GastroIntestinal dinámico) (30,39). El modelo simgi®, desarrollado por investigadores del CIAL-CSIC, permite simular las condiciones del tracto gastrointestinal humano de forma continua o individual, y consta de cinco compartimentos gobernados por un autómeta que representan el estómago, intestino delgado, colon ascendente, transversal y descendente, incluyendo la microbiota adaptada a las condiciones de estas distintas localizaciones (40–42).

2. OBJETIVOS DEL ESTUDIO

Los sulfitos son aditivos ampliamente empleados en la industria alimentaria, especialmente durante la vinificación. Aunque su uso está autorizado y regulado, su impacto sobre la salud intestinal y la microbiota permanece poco explorado, así como las posibles interacciones con otros componentes alimentarios o condiciones de la matriz. En este marco, el grupo de investigación ‘Microbioma, Alimentación y Salud’ (CIAL-CSIC) estudia los

efectos de los sulfitos presentes en el vino sobre el microbioma humano y su relación con reacciones adversas. Un trabajo previo del grupo sugirió un posible papel protector de los polifenoles del vino tinto frente a los efectos negativos de los sulfitos, lo que plantea la hipótesis de que estas interacciones podrían depender tanto de la concentración y perfil fenólico como de otros componentes de la matriz vínica.

Con este propósito, el **objetivo general** del presente estudio fue evaluar in vitro el impacto de los sulfitos sobre la composición y actividad metabólica de la microbiota colónica humana, utilizando como modelo vino blanco joven, caracterizado por su bajo contenido fenólico y una concentración definida de SO₂. Asimismo, se compararon el vino blanco con y sin alcohol para explorar el papel del etanol en estas interacciones. Para ello, se empleó la simulación de la digestión gastrointestinal mediante el sistema simgi®, seguida de fermentaciones colónicas estáticas con microbiota *ex vivo* de donantes sanos. Como **objetivos específicos** de este estudio se han planteado los siguientes:

- Simular in vitro la digestión gastrointestinal de un vino blanco joven y del mismo vino sin etanol (vino blanco desalcoholizado) en el sistema simgi®, monitorizando los cambios en el perfil fenólico en relación con la presencia de SO₂.
- Simular el proceso de fermentación colónica estática a partir de los digeridos gastrointestinales utilizando microbiota fecal de tres donantes sanos.
- Evaluar el impacto de los sulfitos sobre la composición de la microbiota colónica en función de la presencia o ausencia de alcohol en el vino, mediante métodos de cultivo y técnicas de secuenciación de nueva generación.
- Analizar la actividad metabólica microbiana a través de la producción de metabolitos clave (ion amonio y AGCC).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Vinos blancos

Para este estudio se utilizó un vino blanco de la variedad Verdejo procedente de la vendimia de 2024 y elaborado en una bodega de la D.O. Ribera de Duero. Los parámetros enológicos convencionales fueron proporcionados por la bodega, y se muestran en la **Tabla 1**. El contenido de etanol del vino (13%v/v), y la concentración de SO₂ libre (28,1 mg/L) se

encuentran entre los rangos de vinos blancos. A partir de este vino blanco con alcohol (VBA), se elaboró en la misma bodega el vino blanco desalcoholizado (VBD) (**Tabla 1**).

Tabla 1. Parámetros enológicos convencionales de los vinos utilizados en el estudio, determinados en la bodega. Az. Red (Azúcares reductores), ATT (Acidez total titulable, g ácido tartárico por litro), AV (Acidez volátil).

Muestra	Grado (%vol)	Az red. (g/L)	pH	ATT (gth2/L)	AV (g/L)	SO2 libre (mg/L)	SO2 total (mg/L)
Vino Blanco (VBA)	13,65	1,23	3,39	5,02	0,2	28,1	136
Vino Blanco Desalcoholizado (VBD)	0,32	1,8	2,89	4,8	0,11	11,2	86,4

3.2. Determinación de sulfitos en los vinos

La concentración de sulfitos totales en el vino blanco alcoholizado (VBA) y en el desalcoholizado (VBD) se determinó mediante el método de Paul-Rankine, reconocido como método oficial por la Organización Internacional de la Viña y el Vino (Método OIV-MA-AS323-04A) (43). En primer lugar, se cuantificó el SO₂ libre. Para ello se colocó la muestra en un matraz conectado a un sistema de adición de ácido ortofosfórico al 25% (v/v) que redujo el pH de la muestra, formando SO₂ molecular. Este se arrastró con una corriente de N₂ a través de un condensador para ser burbujeadado en un matraz corazón que contenía una trampa de solución de H₂O₂ 0,3% (v/v) con indicador mixto (0,1g de rojo de metilo, 0,05g de azul de metileno en 50% etanol/agua (v/v)). La difusión del SO₂ en la trampa produjo la formación de H₂SO₄ y el viraje del indicador a violeta. Tras 15 minutos de reacción, se valoró con NaOH 0,01 M hasta viraje a verde oliva. Posteriormente, para determinar el SO₂ combinado, se calentó la muestra acidificada de la primera etapa a 100 °C con el fin de liberar el SO₂ unido a compuestos orgánicos de la matriz vínica, repitiendo el procedimiento anteriormente descrito. El sistema de refrigeración empleado permitió garantizar la selectividad del método.

La suma de las dos fracciones permitió calcular el SO₂ total (44). Finalmente, el VBD se dopó con K₂S₂O₅ hasta alcanzar la concentración de sulfitos del VBA, repitiéndose el ensayo para confirmar la concentración de SO₂ libre y total en el VBD dopado (sección 4.1 de Resultados).

3.3. Determinación de concentración de polifenoles totales

Se evaluó la concentración de polifenoles totales en ambos vinos (VBA y VBD) mediante el método de Folin-Cicalteau, empleando un lector de placas BioTek Cytation 5 Imaging

Reader (Agilent, Santa Clara, California, EE.UU). Todos los análisis se realizaron por triplicado.

3.4. Ensayos de simulación de digestión gastrointestinal y fermentación colónica

Se llevaron a cabo las digestiones gástrica e intestinal de los vinos de estudio (VBA y VBD) en dinámico en la plataforma simgi® (CIAL-CSIC), utilizando los compartimentos del estómago y del intestino delgado (**Figura 1**). La fermentación colónica se realizó en estático, simulando las condiciones del colon descendente. Estos experimentos se llevaron a cabo con supervisión de los investigadores responsables.

3.4.1 Simulación de la digestión gastrointestinal

Se prepararon en condiciones de esterilidad los fluidos de simulación gástrico (SGF) e intestinal (SIF) basados en el protocolo INFOGEST 2.0 (29) adaptado a las condiciones del simulador simgi®. Se utilizó pepsina comercial de mucosa gástrica porcina (Sigma-Aldrich, MERCK, USA) a concentración de 2000 U/mL que fue disuelta en el SGF dando lugar al jugo gástrico. El jugo pancreático se preparó con 12,5g/L NaHCO₃, 6g/L de sales biliares (Difco™ BD, USA) y 0,9g/L de pancreatina porcina (Sigma-Aldrich, MERCK, EE.UU.). En ambos casos fueron esterilizados por filtración con filtro de 0,45µm (45) y atemperados a 37°C previo a su uso.

Para la digestión en los compartimentos del estómago e intestino delgado se utilizaron los parámetros establecidos previamente por el grupo de investigación para estudios sobre vino y otras matrices alimentarias complejas (45). Se preconditionó el estómago con 120mL de SGF a pH 2, y el intestino delgado con 150mL de SIF a pH 7. El volumen de alimento (VBA o VBD) bombeado al estómago en cada digestión fue de 100mL. Una vez allí, con los movimientos peristálticos se mezcló con el SGF y 15mL de jugo gástrico. El pH del estómago se fue disminuyendo progresivamente con adición de HCl 1M hasta 1,8. Tras el vaciado gástrico, el digerido se mezcló gradualmente en el intestino delgado con 40mL de jugo pancreático y se incubó durante 2 horas en agitación constante (150 rpm), a pH 7 (ajustado con NaOH 1M) y 37°C en condiciones anaerobias (logradas con flujo constante de nitrógeno). Se tomaron muestras al finalizar la digestión gástrica e intestinal que fueron conservadas a -20°C ó -80°C (según el caso) para posteriores análisis (**Figura 2**).



Figura 1. Imagen del simgi® (CIAL-CSIC) y la disposición de sus distintos componentes y reactores. Estómago (A), bomba de flujo (B), baño de agua (C), intestino delgado (D), colon ascendente (E), colon transverso (F), colon descendente (G) y las cajas de los controladores de pH, temperatura y nitrógeno (H). Figura tomada de Cueva et al., 2019 (46).

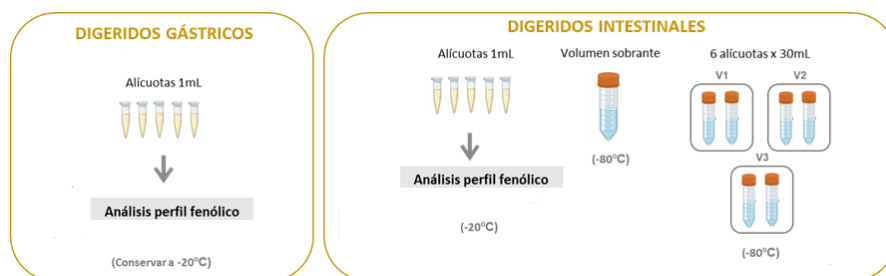


Figura 2. Tomas de muestra de las etapas de digestión gástrica e intestinal llevadas a cabo en este estudio.

3.4.2. Simulación de la fermentación colónica en estático

El ensayo de fermentación colónica en estático fue realizado utilizando microbiota fecal *ex vivo* de 3 voluntarios sanos, realizando 2 réplicas por cada uno de ellos por digerido intestinal de VBA y VBD. En total se emplearon 12 matraces.

3.4.2.1 Selección de donantes y preparación de inóculo fecal

Se seleccionaron 3 donantes (25-40 años) que cumplieran con los criterios de inclusión: ausencia de enfermedades o síntomas gastrointestinales, no haber utilizado antibióticos en los 6 meses previos al estudio y que no tuvieran adherencia a patrones dietéticos restrictivos o con probióticos. La muestra de materia fecal fresca del día se recogió en un recipiente estéril, que fue cerrado parcialmente y colocado en una bolsa de cierre hermético que contenía un sobre de generación de atmósfera anaerobia BD GasPak™ Anaerobe Container System (BD, Maryland, EE. UU.). La muestra fue transportada al laboratorio en las

siguientes 4 horas en condiciones de refrigeración. Se preparó cada inóculo fecal a una concentración final 10% m/v con solución PBS 0,1M pH 7 estéril previamente reducida, utilizando un Stomacher® 400 Circulator (Seward, Reino Unido) durante 3 minutos a 300rpm para su homogenización. Para una caracterización inicial, se separaron 3 alícuotas de 2mL de inóculo fecal de cada donante que se centrifugaron en centrifuga Hettich® Universal 320R (Sigma-Aldrich, EE.UU.) a 10.000rpm 4°C durante 10 minutos. Los sobrenadantes se filtraron con filtros PVDF 13m, 0,22µm (Symta SLL, España) y se conservaron a -20°C para el análisis de metabolitos. Los pellets se conservaron a -80°C para la posterior extracción de ADN y estudio de la composición microbiana. El protocolo experimental con muestras fecales humanas fue aprobado por el Comité de Ética del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), evaluado bajo el código de registro interno PID2019-108851RB-C21, y cumplió con lo establecido en la Declaración de Helsinki.

3.4.2.2 Fermentación colónica en estático o batch

Se empleó un medio nutritivo (Colon Nutrient Medium, CNM) estéril compuesto de agua de peptona (2g/L), extracto de levadura (2g/L), NaCl (0,1g/L), K₂HPO₄ (0,04g/L), KH₂PO₄ (0,04g/L), MgSO₄•7H₂O (0,01g/L), CaCl₂•6H₂O (0,01g/L), NaHCO₃ (2g/L), Tween 80 (2mL/L), hemina (0,05g/l), vitamina K (10µL /l), L-cisteína HCl (0,5g/L) y sales biliares (0,5g/L). Se ajustó el pH a 6,8 con soluciones de HCl 1M y NaOH 10M. Para la fermentación en estático, en cada matraz previamente esterilizado se mezclaron 30mL del digerido intestinal correspondiente, 24mL de CNM (46) y 6mL de inóculo fecal. El proceso de fermentación colónica se llevó a cabo para cada donante de forma independiente, y en duplicado. Se colocaron los matraces en incubadora con agitación orbital (Orbital Infors HT Multitron Standard Incubation Shaker, Suiza), en condiciones de anaerobiosis, temperatura fisiológica (37°C), y agitación constante (150rpm) (**Figura 3**). Se recogieron muestras en distintos tiempos del experimento. Por un lado, se tomaron muestras de 1mL a las 0h, 24h y 48h de fermentación, que se destinaron al análisis microbiano mediante recuentos en medios generales y selectivos. Por otro lado, se recogieron 3 alícuotas por matraz de 2mL cada una y se centrifugaron en centrifuga Hettich® Universal 320R (Sigma-Aldrich, EE. UU.) a 10.000rpm 4°C durante 10 minutos.

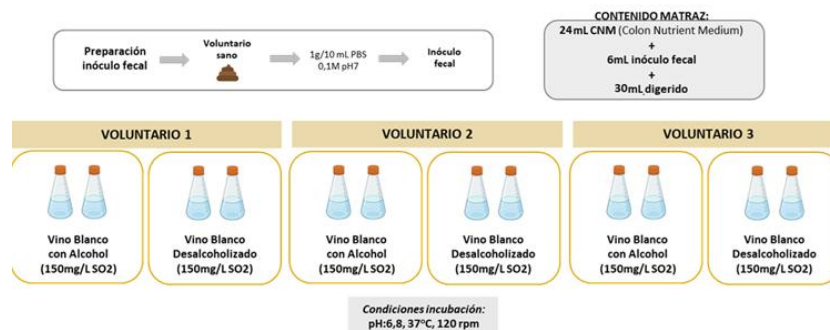


Figura 3. Disposición de los matrazes y esquema de trabajo seguido para la fermentación colónica en estático.

3.5. Análisis de la composición microbiana

3.5.1 Recuentos microbianos en medios de cultivo

Inmediatamente después de la recogida, se realizaron diluciones seriadas de cada muestra colónica en un factor de diez, y se sembraron en diferentes tipos de medio de cultivo, empleando las condiciones que se muestran en la **Tabla 2**. Se empleó la cabina de anaerobiosis (BACTRON Anaerobic/Environmental Chamber, SHELLAB) a 37°C para los medios que requirieron esta condición de incubación. Cumplido el tiempo de incubación, se realizó el recuento de las colonias con el contador SC6PLUS (Stuart, UK), expresando el resultado en log UFC/mL. El análisis se llevó a cabo en triplicado para cada dilución.

Tabla 2. Condiciones de incubación utilizadas según el medio de cultivo.

Medio de cultivo	Microorganismo	Tiempo y T° de incubación
Ambiente aerobio		
Tryptic Soy Agar (TSA)	Aerobios totales	24h, 37°C
BBL CHROMAgar	<i>Staphylococcus</i> spp.	48h, 37°C
Ambiente anaerobio		
Wilkins-Chalgren (WC)	Anaerobios totales	24°C, 37°C
MacConkey Agar	Enterobacterias totales	24h, 37°C
Reinforced Clostridial Medium Agar (RCM)	<i>Clostridium</i> spp.	48h, 37°C
MRS Agar (pH 5,4)	Bacterias ácido lácticas	48h, 37°C
<i>Enterococcus</i> Agar	<i>Enterococcus</i> spp.	48h, 37°C
LAMVAB	<i>Lactobacillus</i> intestinales	72h, 37°C
<i>Bifidobacterium</i> Agar Modified by Beerens	<i>Bifidobacterium</i> spp.	72h, 37°C

3.5.2. Extracción de ADN y secuenciación del gen ARN ribosomal 16S

La extracción del ADN total de las muestras tomadas a los distintos tiempos de fermentación (0h, 24h, 48h) y de los inóculos fecales iniciales de los 3 donantes, se llevó a cabo utilizando el pellet bacteriano obtenido tras la centrifugación, y el kit comercial Qiagen Fast DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Hilden, Alemania) siguiendo un protocolo optimizado por el grupo de investigación (47). Brevemente, el pellet de muestra fue resuspendido en buffer de lisis preparado en el momento y se incubó 1h a 37°C en baño termostático

Memmert (Schwabach, Alemania). Posteriormente, se añadió buffer Inhibitex del kit comercial templado a 37°C, pasando el contenido a un eppendorf de rosca estéril que contenía 1 perla de vidrio (~5mm de diámetro) y arena de vidrio (~100mg, 0.1mm de diámetro). Se llevó a cabo la lisis mecánica en el sistema homogeneizador de muestras Fast Prep (FastPrep-24™, MP Biomedicals). Se centrifugó 1 minuto a 13000rpm y 4°C (Biofuge pico, Heraeus, Alemania). Se recogió el sobrenadante resultante y se añadió proteinasa K y buffer AL, llevándose al baño 15 minutos a 70°C. Se añadió etanol de grado molecular y se continuó con el protocolo de purificación utilizando las columnas del kit de extracción y los buffers de lavado según las recomendaciones del fabricante. El ADN se eluyó en 50µL de agua Sigma (Sigma-Aldrich) atemperada, se incubó 1 minuto a temperatura ambiente y se centrifugó 1 minuto a máxima velocidad a 4°C. La concentración e integridad del ADN total extraído se midió en el Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, EE.UU.) y mediante fluorimetría utilizando el Qubit 4 y el kit de detección dsDNA High Sensitivity (Invitrogen, ThermoFisher Scientific). Las muestras se normalizaron a una concentración de 5ng/µL y se conservaron a -20°C hasta su análisis. Para la secuenciación del ADNr 16S se empleó el protocolo de dos pasos de generación de librerías recomendado por la empresa Illumina®, que consta de dos pasos de PCR: en una primera reacción de PCR se amplifica parte de la región V3-V4 del ADNr 16s, y en una segunda etapa se realizó una PCR para la unión de los índices que permiten posteriormente identificar correctamente las muestras de estudio. Se llevó a cabo la secuenciación en el equipo Illumina® MiSeq (Illumina®, San Diego, California, EE.UU.), mediante una aproximación “paired-end” con lecturas 2x300 pb (13). Este equipo está disponible en el CIAL (CSIC-UAM) en el servicio de la plataforma simgi-Metagenómica, donde se llevaron a cabo estos análisis por personal especializado.

3.6. Análisis de datos de secuenciación

El análisis bioinformático de las secuencias obtenidas en Illumina MiSeq se realizó en RStudio utilizando el paquete DADA2 para el filtrado de calidad, eliminación de quimeras, ensamblaje de lecturas y generación de variantes de secuencia de amplicón (ASVs) (48,49). La asignación taxonómica se llevó a cabo con el clasificador bayesiano de DADA2 empleando la base de datos Silva v.138.2 ((50), identificándose un total de 4875 ASVs. La diversidad alfa se estimó con los índices Observados, Shannon y Simpson, y la diversidad

beta mediante disimilitud de Bray-Curtis y análisis NMDS, evaluándose los resultados a nivel de filo y género bacteriano.

3.7. Evaluación de la producción de metabolitos microbianos durante la fermentación colónica en estático

3.7.1. Análisis de producción de ión amonio

La producción de ión amonio se llevó a cabo empleando el kit Spectroquant Ammonium Test (Merck, Alemania) (45). Los análisis se hicieron por duplicado.

3.7.2. Análisis de ácidos grasos de cadena corta

El análisis de ácidos grasos de cadena corta y media (AGCC y AGCM), acético, propiónico, butírico, isobutírico, valérico, isovalérico, caproico y caprílico, se llevó a cabo por UPLC/MSTQD (Acquity™ UPLC, Waters Corporation, EE. UU.), previa derivatización con 3-nitrofenilhidrazina (3-NPH), siguiendo un protocolo adaptado de Han et al. (51) Las determinaciones se realizaron por duplicado, en las muestras recogidas a 0, 24 y 48 h de fermentación colónica derivadas de cada uno de los vinos de estudio. Este análisis, al igual que el del perfil de compuestos fenólicos (sección 3.8.), se llevó a cabo por miembros del grupo de investigación.

3.8. Análisis del perfil fenólico

Se analizó el perfil de compuestos fenólicos en los vinos de partida (VBA y VBD), en las muestras digeridas, y en los distintos tiempos de fermentación colónica, mediante UPLC/MS de acuerdo con metodologías del grupo de investigación (42,52). Los análisis se realizaron por duplicado.

3.9. Análisis estadístico

Se llevó a cabo el análisis estadístico utilizando el software XLSTAT Statistic para Microsoft Excel, 2022.3.1 (Addisoft-SARL, EEUU). Se utilizó el análisis de varianza (ANOVA) de dos vías, con una corrección posterior de Games-Howell, para estudiar las diferencias entre VBA y VBD para los distintos tiempos en relación con los recuentos bacterianos, producción de ión amonio, y producción de AGCC y AGCM. Este método se

utilizó también para analizar las diferencias en la abundancia relativa de los taxones obtenidos mediante secuenciación del ADN r16S a nivel de filo y género. Además, en el caso de los recuentos microbiológicos se consideraron únicamente las diferencias que, además de ser significativas estadísticamente, eran igual o superior a una unidad logarítmica (≥ 1 log UFC/mL), debido a las fluctuaciones propias de la evolución microbiana durante la fermentación colónica.

4. RESULTADOS

4.1. Caracterización inicial de los vinos utilizados en el estudio

Previo a la simulación de la digestión, se llevó a cabo la caracterización de los vinos objeto de estudio en relación al contenido de SO₂. Teniendo en cuenta las diferencias en la concentración de partida de sulfitos (**Tabla 3**), esperada por tratarse de vinificaciones diferentes, y que el objetivo de este trabajo es poder comparar el efecto del SO₂ dependiendo de la matriz del vino, tal y como se indicó en la sección 3.2. de M&M, se llevó a cabo el dopaje del vino blanco desalcoholizado (VBD) siguiendo la estequiometría de reacción con K₂S₂O₅. Las concentraciones obtenidas se indican en la **Tabla 3**. Se observa una concentración similar de SO₂ total entre los vinos de estudio (144 mg/L para el VBA y 137 mg/L para el VBD), si bien el vino desalcoholizado (VBD) presentó una concentración ligeramente superior de SO₂ libre (59 mg/L) en comparación con su homólogo con alcohol (42 mg/L)

Tabla 3. Concentración de SO₂ libre, combinado y total en mg/L en los vinos de partida, y el VBD dopado.

Concentración de SO ₂ (mg/L)	Vino Blanco Alcoholizado (VBA)	Vino Blanco Desalcoholizado (VBD)	Vino Blanco Desalcoholizado (VBD) dopado
SO ₂ libre	42	24	59
SO ₂ combinado	102	79	78
SO ₂ total	144	103	137

Posteriormente, se analizó la concentración de polifenoles totales en ambos vinos de partida, que se expresó en equivalentes de ácido gálico (**Tabla 4**), con valores similares para ambos tipos de vino, que además se encuentran dentro de los rangos generales de polifenoles totales en vinos blancos.

Tabla 4: Concentración de polifenoles totales (mg/mL) en el vino de partida VBA y el VBD.

Vino	Equivalentes de ácido gálico (mg/mL) \pm Desviación estándar
Vino Blanco Alcoholizado (VBA)	0,50 \pm 0,01
Vino Blanco Desalcoholizado (VBD)	0,47 \pm 0,01

4.2. Cambios en el perfil de compuestos fenólicos del vino durante la digestión gastrointestinal

Por otro lado, se analizaron los cambios en las principales familias de compuestos fenólicos (flavan-3-oles, ácidos hidroxicinámicos y ácidos hidroxibenzoicos) presentes en los VBA y VBD, tanto en los vinos originales de partida, como en los digeridos gástricos e intestinales obtenidos durante la digestión en el simgi®. Como se aprecia en la **Figura 4**, los ácidos hidroxibenzoicos fueron los que se encontraron en mayor cantidad en ambos vinos (VBA: 36,06±14,97ppm; VBD: 37,35±17,22ppm), seguidos por cantidades mucho menores de ácidos hidroxicinámicos (VBA: 6,42±1,16ppm; VBD: 5,77±0,99ppm) y flavan-3-oles (VBA: 5,11±0,71ppm; VBD: 4,36±0,77ppm) La concentración de estos compuestos fue disminuyendo de forma progresiva a lo largo de la digestión gastrointestinal, de forma que su concentración al final de este proceso y antes de la fermentación colónica resultó muy baja. En el caso de los flavan-3-oles, no se detectaron en el VBD al final de este proceso (**Figura 4A**). Sin embargo, tras la fermentación colónica se observó un incremento del metabolismo fenólico, especialmente de los ácidos 4-hidroxifenilacético, 3-(3-hidroxifenilpropiónico), y 3,4-dimetoxifenilacético, con resultados dependientes del voluntario (**Figura A1**).

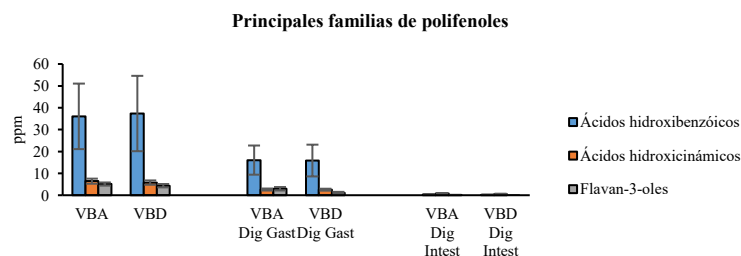


Figura 4. Concentración (partes por millón, ppm) de las principales familias de polifenoles presentes en los vinos del estudio, y su modulación a lo largo de la digestión gastrointestinal en el simgi®.

4.3. Impacto de la digestión y fermentación colónica del vino blanco dependiendo de su contenido en alcohol sobre la composición de la microbiota colónica

4.3.1. Evaluación mediante recuentos microbianos

En primer lugar, se analizaron mediante métodos dependientes de cultivo los posibles cambios en la microbiota colónica tras la fermentación colónica con ambos vinos (VBA y VBD) a la misma concentración de sulfitos. Para ello, se llevaron a cabo recuentos microbianos en distintos medios de cultivo generales y selectivos. Esto permitió tener una

primera aproximación de la evolución de las comunidades bacterianas a lo largo del ensayo teniendo en cuenta la fracción de estas que es cultivable. El análisis de los resultados para cada voluntario mostró cambios en la microbiota colónica en función de cada donante, aunque con algunas similitudes (**Tabla A2**). En general, en todos los voluntarios se observa un incremento mantenido durante la fermentación (24h y 48h) de aerobios totales y *Enterobacteriaceae* en presencia de VBD. En los voluntarios 1 y 3, además el VBD promueve un aumento de *Clostridium* spp. Para el VBA, se observa un incremento de estos grupos a las 24h, sin embargo, a las 48h de fermentación los niveles disminuyen o vuelven a su estado inicial. Ambas matrices vínicas promueven un aumento de *Staphylococcus* spp. a partir de las 24h, y de *Enterococcus* spp. especialmente a las 48h, sin embargo, no se observan diferencias significativas de $>1\log$ UFC/ml entre ambas matrices. De forma aislada, en el voluntario 1 y 3 se observa un aumento de bacterias del ácido láctico en presencia de ambos vinos, y en el 3, se observa un aumento de los recuentos de *Bifidobacterium* spp. (**Tabla A2**).

4.3.2 Perfil metataxonómico de la microbiota colónica

Si bien los recuentos por técnicas de cultivo microbiológico son un método validado y que de forma rutinaria y sencilla permite monitorizar el proceso de fermentación colónica *in vitro*, presentan ciertas limitaciones, ya que aproximadamente el 75% de los microorganismos de la microbiota intestinal no son cultivables, debido a sus estrictos requerimientos (53). Por este motivo, se realizó el análisis metataxonómico de las muestras obtenidas en este estudio, permitiendo acceder no sólo a aquellas especies cultivables en condiciones de laboratorio, sino también a la amplia diversidad microbiana no cultivable.

En cuanto a la biodiversidad microbiana, los resultados muestran cambios dependientes del tipo de vino, así como del voluntario (**Figura A2**). El VBA promueve un incremento de los niveles de cepas distintas observadas o “Observed ASVs” para los voluntarios 1 y 2, mientras que estos niveles se mantienen constantes durante la fermentación en el voluntario 3. Por el contrario, el VBD conduce hacia un descenso en los ASVs observados en los voluntarios 1 y 3 (**Figura A2**). Los gráficos de diversidad beta indican también una modulación diferencial dependiendo del tipo de vino y del voluntario (**Figura A3**).

A nivel de filo, se detectaron en las muestras del voluntario 1 hasta 9 filos bacterianos distintos, mientras que en los voluntarios 2 y 3 se detectaron 7 filos (**Figura 5, Tabla A3**).

En general, en los tres voluntarios ambos vinos aumentaron la abundancia relativa del filo *Pseudomonadota*, siendo este efecto significativamente mayor en presencia del VBD, condición que también disminuyó en mayor proporción los niveles de los filos *Bacteroidota* y *Actinomycetota*. Además, ambas matrices disminuyeron los niveles del filo *Bacillota* en las primeras 24h en los voluntarios 1 y 3, y a las 48h en el voluntario 2, siendo mayor este efecto también en presencia de VBD. Respecto a filos con menor abundancia relativa, los resultados mostraron un incremento en los niveles de *Thermosulfobacterota* y *Verrucomicrobiota* en presencia de ambas matrices, que fue menor en presencia de VBD en el voluntario 2; y en los voluntarios 1 y 3, respectivamente (**Figura 5, Tabla A3**).

En relación a los resultados a nivel de género, los tres voluntarios mostraron una respuesta similar a la fermentación en presencia de VBA y VBD, aunque con un perfil dependiente de cada voluntario y de su microbiota colónica inicial. En términos generales, tanto el VBA y VBD promovieron un aumento en los niveles de *Escherichia-Shigella*, *Enterococcus*, *Alistipes*, *Klebsiella* y *Sellimonas*, entre otros, y un descenso en numerosos taxones destacando *Bacteroides*, *Fusicatenibacter*, *Ruminococcus* y *Coprococcus* (**Tabla 6, Tabla A4**). Si nos centramos en las diferencias entre vinos para cada voluntario, en el primero, se observó un incremento en los niveles de *Escherichia-Shigella* y *Klebsiella* más evidente en presencia de VBD. Por el contrario, la fermentación de VBD promovió un descenso en las proporciones de numerosos taxones, destacando comensales y microorganismos beneficiosos como *Bifidobacterium*, *Dorea*, *Bacteroides*, *Streptococcus*, *Ruminococcus* y *Coprococcus*, entre otros (**Tabla 6, Tabla A4**). En el voluntario 2, se observaron resultados similares en relación al incremento en los niveles de *Escherichia-Shigella* y *Klebsiella* en presencia del VBD, acompañados además en este caso por un incremento importante en los niveles de *Dorea* y la disminución de numerosos géneros microbianos, que además de los ya observados en el voluntario 1, se acompañaron por *Collinsella*, *Enterococcus*, *Blautia*, *Bilophila* y *Parasutterella*. En este caso, los niveles de *Bacteroides* se mantuvieron relativamente durante la fermentación, aunque fueron menores en presencia del VBD (**Tabla 6, Tabla A4**). Finalmente, en el voluntario 3 se observaron también mayores niveles de *Escherichia-Shigella* en presencia del VBD, así como una disminución en numerosos grupos ya visualizados en los voluntarios 1 y 2, y destacando en particular *Faecalibacterium*, *Acidaminococcus* y *Lachnoclostridium* (**Tabla 6, Tabla A4**).

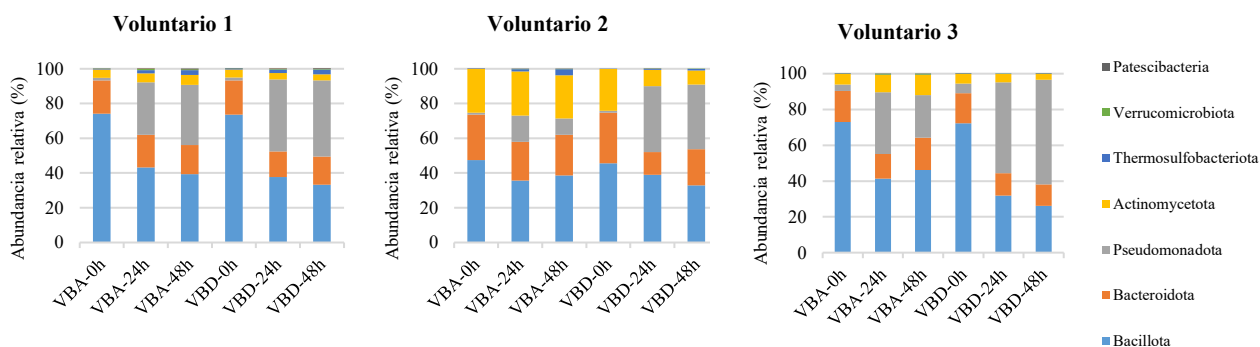


Figura 5. Evolución de la abundancia relativa a nivel de filo bacteriano en cada voluntario del estudio en los distintos tiempos de toma de muestra (0, 24 y 48h) de las fermentaciones con VBA y VBD.

Tabla 6. Evolución de la abundancia relativa a nivel de género para cada voluntario en los distintos tiempos de toma de muestra de las fermentaciones con VBA y VBD. Se muestran los géneros con una abundancia relativa media >1% en al menos un punto. En naranja claro se marcan aquellos géneros que presentan diferencias significativas entre condiciones (VBA y VBD).

Voluntario 1	VBA*0h	VBD*0h	VBA*24h	VBD*24h	VBA*48h	VBD*48h
<i>Escherichia-Shigella</i>	0.60 ± 0.06 c	0.86 ± 0.07 b	25.47 ± 1.50 a	30.83 ± 5.66 a	29.80 ± 2.48 a	34.15 ± 4.50 a
<i>Bifidobacterium</i>	0.34 ± 0.03 d	0.36 ± 0.04 d	1.02 ± 0.04 b	0.67 ± 0.09 c	1.60 ± 0.09 a	0.86 ± 0.05 c
<i>Bacteroides</i>	15.84 ± 0.26 a	16.31 ± 0.65 a	15.02 ± 0.67 a	10.84 ± 0.54 c	12.57 ± 0.08 b	12.04 ± 1.61 bc
<i>Streptococcus</i>	2.75 ± 0.07 b	2.84 ± 0.16 b	2.71 ± 0.13 b	2.53 ± 0.16 b	3.40 ± 0.18 a	2.33 ± 0.50 b
<i>Fusicatenibacter</i>	5.84 ± 0.09 a	5.38 ± 0.34 a	1.01 ± 0.09 b	0.75 ± 0.06 c	0.55 ± 0.03 d	0.61 ± 0.07 cd
<i>Dorea</i>	3.46 ± 0.16 ab	3.71 ± 0.13 ab	4.13 ± 0.59 a	1.29 ± 1.10 bc	0.71 ± 0.21 c	0.42 ± 0.46 c
<i>Phascolarctobacterium</i>	1.56 ± 0.04 b	1.56 ± 0.12 b	2.46 ± 0.38 ab	3.09 ± 0.04 a	0.49 ± 0.19 c	1.92 ± 0.16 b
<i>Ruminococcus</i>	8.62 ± 0.48 a	8.55 ± 0.22 a	3.44 ± 0.27 b	2.37 ± 0.27 c	4.04 ± 0.41 b	2.42 ± 0.29 c
<i>Klebsiella</i>	0.00 ± 0.00 b	0.00 ± 0.01 b	0.03 ± 0.02 b	5.36 ± 0.88 a	0.00 ± 0.01 b	4.37 ± 2.17 ab
<i>Parabacteroides</i>	0.41 ± 0.04 c	0.49 ± 0.03 c	1.30 ± 0.05 b	1.09 ± 0.14 b	2.04 ± 0.18 a	1.51 ± 0.16 b
<i>Gemmiger</i>	2.10 ± 0.07 a	2.00 ± 0.06 a	0.63 ± 0.04 bc	0.46 ± 0.05 d	0.80 ± 0.08 b	0.53 ± 0.08 cd
<i>Clostridium</i>	0.06 ± 0.01 a	0.05 ± 0.01 a	1.93 ± 0.64 a	5.29 ± 2.05 a	0.19 ± 0.06 a	0.93 ± 0.27 a
<i>Coprococcus</i>	2.27 ± 0.12 a	2.22 ± 0.04 a	0.67 ± 0.07 b	0.47 ± 0.03 c	0.61 ± 0.03 b	0.41 ± 0.12 c
<i>Erysipelotrichaceae UCG-003</i>	1.53 ± 0.10 a	1.60 ± 0.11 a	0.46 ± 0.06 bc	0.37 ± 0.06 bc	0.47 ± 0.03 b	0.36 ± 0.03 c
<i>Sellimonas</i>	0.00 ± 0.00 d	0.00 ± 0.00 e	0.76 ± 0.04 b	0.24 ± 0.08 c	1.74 ± 0.12 a	0.67 ± 0.16 b
<i>Holdemania</i>	1.01 ± 0.06 a	1.01 ± 0.09 a	0.68 ± 0.13 ab	0.38 ± 0.11b	1.11 ± 0.19 a	0.47 ± 0.09 b
<i>Veillonella</i>	0.06 ± 0.02 c	0.06 ± 0.01 c	1.74 ± 0.41 a	0.62 ± 0.18 b	0.31 ± 0.13 bc	0.23 ± 0.08 bc
Voluntario 2	VBA*0h	VBD*0h	VBA*24h	VBD*24h	VBA*48h	VBD*48h
<i>Escherichia-Shigella</i>	0.13 ± 0.02 c	0.21 ± 0.04 c	8.67 ± 0.49 a	6.98 ± 1.35 a	2.02 ± 0.24 b	7.39 ± 1.80 a
<i>Collinsella</i>	4.13 ± 0.10 b	3.90 ± 0.34 b	4.75 ± 0.28 b	1.32 ± 0.57 c	5.78 ± 0.09 a	0.95 ± 0.46 c
<i>Bifidobacterium</i>	20.73 ± 0.65 a	19.85 ± 0.45 a	20.25 ± 1.19 a	7.96 ± 0.30 c	18.36 ± 0.35 b	6.83 ± 1.71 c
<i>Enterococcus</i>	0.25 ± 0.04 e	0.39 ± 0.03 d	5.86 ± 0.55 b	3.08 ± 0.84 c	10.75 ± 0.61 a	5.03 ± 1.34 bc
<i>Bacteroides</i>	6.12 ± 0.27 d	7.80 ± 0.30 c	11.13 ± 0.36 a	6.47 ± 0.26 d	9.16 ± 0.24 b	8.89 ± 0.76 bc
<i>Streptococcus</i>	0.15 ± 0.01 c	0.20 ± 0.05 c	0.90 ± 0.15 a	0.35 ± 0.08 bc	1.01 ± 0.12 a	0.36 ± 0.02 b
<i>Fusicatenibacter</i>	2.17 ± 0.14 a	2.13 ± 0.03 a	0.40 ± 0.05 b	0.25 ± 0.01 c	0.34 ± 0.03 b	0.18 ± 0.04 c
<i>Alistipes</i>	2.08 ± 0.06 c	2.22 ± 0.08 c	4.35 ± 0.15 b	2.31 ± 0.12 c	5.31 ± 0.16 a	4.08 ± 0.15 b
<i>Dorea</i>	3.03 ± 0.08 c	2.92 ± 0.03 c	1.51 ± 0.06 d	20.79 ± 2.01 a	0.41 ± 0.07 e	8.67 ± 0.44 b
<i>Blautia</i>	9.65 ± 0.04 a	8.51 ± 0.49 a	3.53 ± 0.38 b	1.55 ± 0.15 c	3.33 ± 0.12 b	1.28 ± 0.25 c
<i>Klebsiella</i>	0.00 ± 0.00 e	0.00 ± 0.00 d	1.15 ± 0.01 b	28.24 ± 1.31 a	0.67 ± 0.10 c	26.64 ± 1.03 a
<i>Oscillibacter</i>	0.14 ± 0.02 d	0.17 ± 0.03 d	1.42 ± 0.09 a	0.49 ± 0.04 c	0.48 ± 0.01 c	0.80 ± 0.08 b
<i>Parabacteroides</i>	2.10 ± 0.05 d	2.39 ± 0.13 d	5.21 ± 0.33 b	2.72 ± 0.40 d	7.53 ± 0.25 a	4.12 ± 0.32 c
<i>Bilophila</i>	0.00 ± 0.00 d	0.00 ± 0.00 d	1.39 ± 0.16 b	0.48 ± 0.23 cd	3.32 ± 0.15 a	0.86 ± 0.18 c
<i>Clostridium</i>	0.07 ± 0.01 b	0.06 ± 0.03 bc	0.01 ± 0.01 c	1.20 ± 0.21 a	0.01 ± 0.01 c	0.01 ± 0.01 c
<i>Enterocloster</i>	0.61 ± 0.02 d	0.61 ± 0.07 d	3.23 ± 0.16 a	1.53 ± 0.06 c	2.56 ± 0.07 b	1.50 ± 0.12 c
<i>Dialister</i>	3.06 ± 0.15 a	2.96 ± 0.18 a	0.48 ± 0.04 c	0.78 ± 0.08 b	0.23 ± 0.03 d	0.37 ± 0.08 cd
<i>Parasutterella</i>	0.91 ± 0.02 d	0.92 ± 0.04 d	5.07 ± 0.09 b	2.51 ± 0.15 c	6.56 ± 0.14 a	2.88 ± 0.13 c
<i>Lachnoclostridium</i>	0.38 ± 0.02 b	0.44 ± 0.04 b	1.14 ± 0.09 a	0.14 ± 0.01 c	1.70 ± 0.22 a	0.16 ± 0.01 c
<i>Flavonifractor</i>	0.05 ± 0.01 e	0.04 ± 0.01 e	1.04 ± 0.03 b	0.35 ± 0.03 d	1.71 ± 0.09 a	0.53 ± 0.03 c
<i>UCG-002</i>	1.30 ± 0.07 a	1.26 ± 0.03 a	0.37 ± 0.05 b	0.18 ± 0.03 c	0.54 ± 0.08 b	0.35 ± 0.10 bc
<i>Sellimonas</i>	0.28 ± 0.04 c	0.30 ± 0.05 c	1.43 ± 0.02 a	0.20 ± 0.03 c	1.26 ± 0.06 b	0.19 ± 0.07 c

Tabla 6 (Continuación). Evolución de la abundancia relativa a nivel de género para cada voluntario en los distintos tiempos de toma de muestra de las fermentaciones con VBA y VBD. Se muestran los géneros con una abundancia relativa media >1% en al menos un punto. En naranja claro se marcan aquellos géneros que presentan diferencias significativas entre condiciones (VBA y VBD).

Voluntario 3	VBA*0h	VBD*0h	VBA*24h	VBD*24h	VBA*48h	VBD*48h
<i>Escherichia-Shigella</i>	3.14 ± 0.33 f	4.71 ± 0.31 e	31.70 ± 1.26 c	48.65 ± 1.55 b	20.13 ± 0.67 d	56.16 ± 1.75 a
<i>Collinsella</i>	2.99 ± 0.06 c	2.79 ± 0.05 d	4.80 ± 0.13 b	2.16 ± 0.26 de	6.66 ± 0.05 a	1.88 ± 0.19 e
<i>Bifidobacterium</i>	2.47 ± 0.04 b	2.29 ± 0.10 bc	4.62 ± 0.12 a	2.13 ± 0.10 c	4.01 ± 0.35 a	0.75 ± 0.02 d
<i>Enterococcus</i>	0.11 ± 0.01 d	0.13 ± 0.01 d	3.38 ± 0.13 b	2.51 ± 0.09 c	5.36 ± 0.54 a	2.31 ± 0.20 c
<i>Bacteroides</i>	12.57 ± 0.22 a	12.12 ± 0.20 a	7.06 ± 0.38 b	3.79 ± 0.14 c	7.93 ± 0.30 b	3.46 ± 0.24 c
<i>Agathobacter</i>	6.89 ± 0.25 a	7.18 ± 0.20 a	0.13 ± 0.01 c	0.17 ± 0.02 b	0.02 ± 0.02 d	0.02 ± 0.02 d
<i>Alistipes</i>	2.83 ± 0.20 c	2.88 ± 0.05 c	3.91 ± 0.31 b	7.04 ± 0.37 a	6.68 ± 0.11 a	6.55 ± 0.45 a
<i>Blautia</i>	4.47 ± 0.16 a	4.58 ± 0.06 a	1.48 ± 0.15 c	0.85 ± 0.09 d	2.23 ± 0.26 b	0.68 ± 0.02 d
<i>Faecalibacterium</i>	18.62 ± 0.21 a	18.58 ± 0.27 a	4.11 ± 0.28 b	3.01 ± 0.19 c	3.02 ± 0.19 c	1.83 ± 0.26 d
<i>Phascolarctobacterium</i>	0.47 ± 0.05 c	0.48 ± 0.00 c	4.40 ± 0.11 b	6.30 ± 0.28 a	4.00 ± 0.53 b	4.58 ± 0.15 b
<i>Oscillibacter</i>	0.21 ± 0.04 c	0.19 ± 0.02 c	2.44 ± 0.11 a	1.39 ± 0.09 b	2.06 ± 0.31 ab	1.65 ± 0.14 b
<i>Parabacteroides</i>	1.19 ± 0.10 cd	1.16 ± 0.06 d	2.40 ± 0.18 a	1.42 ± 0.05 c	2.96 ± 0.23 a	1.82 ± 0.08 b
<i>Acidaminococcus</i>	0.04 ± 0.01 d	0.03 ± 0.01 d	2.50 ± 0.10 b	1.67 ± 0.11 c	5.34 ± 0.31 a	2.43 ± 0.11 b
<i>Coproccoccus</i>	1.39 ± 0.12 a	1.33 ± 0.12 a	0.12 ± 0.02 b	0.03 ± 0.02 c	0.08 ± 0.03 bc	0.01 ± 0.01 c
<i>Parasutterella</i>	0.25 ± 0.03 d	0.22 ± 0.03 d	1.16 ± 0.07 b	0.65 ± 0.07 c	1.68 ± 0.07 a	0.84 ± 0.11 c
<i>Lachnoclostridium</i>	0.29 ± 0.06 c	0.33 ± 0.04 bc	1.13 ± 0.08 a	0.48 ± 0.07 b	1.25 ± 0.02 a	0.34 ± 0.05 bc
UCG-002	1.48 ± 0.15 a	1.31 ± 0.08 a	0.34 ± 0.04 b	0.17 ± 0.04 c	0.30 ± 0.03 b	0.22 ± 0.05 bc
<i>Mediterraneibacter</i>	2.11 ± 0.06 a	2.12 ± 0.03 a	1.14 ± 0.05 b	0.44 ± 0.06 c	0.61 ± 0.06 c	0.17 ± 0.03 d
<i>Sutterella</i>	0.23 ± 0.02 d	0.22 ± 0.02 d	1.56 ± 0.05 ab	1.24 ± 0.18 bc	1.81 ± 0.19 a	1.23 ± 0.09 c
<i>Sellimonas</i>	0.01 ± 0.02 d	0.01 ± 0.01 d	0.93 ± 0.03 b	0.48 ± 0.03 c	1.32 ± 0.04 a	0.42 ± 0.09 c
[<i>Eubacterium</i>] <i>eligens group</i>	1.27 ± 0.07 a	1.30 ± 0.07 a	0.21 ± 0.03 bc	0.14 ± 0.03 c	0.26 ± 0.03 b	0.18 ± 0.02 c
<i>Extibacter</i>	0.13 ± 0.00 cd	0.09 ± 0.02 d	0.93 ± 0.04 a	0.31 ± 0.05 b	1.11 ± 0.10 a	0.24 ± 0.04 bc

4.4. Efectos sobre la microbiota colónica a nivel funcional

4.4.1 Producción de ácidos grasos de cadena corta y media

En relación con el estado funcional de la microbiota colónica, medido en función de su capacidad para producir metabolitos como AGCC y AGCM, en todos los casos se observa que la fermentación en presencia de ambos vinos (VBA y VBD) produce un incremento importante en la producción de AGCC a partir de las 24h, un efecto esperado teniendo en cuenta el proceso de la fermentación colónica. Si nos centramos en las diferencias entre vinos, el vino desalcoholizado (VBD) promueve una mayor producción de ácido acético por parte de la microbiota colónica en los tres voluntarios (**Figura 6, Tabla A5**). Los resultados en el caso de los ácidos butírico y propiónico son dependientes del donante, de forma que se observa una mayor producción para el VBD en los voluntarios 1 y 2, mientras que en el 3 estos niveles varían dependiendo del tiempo de fermentación, observándose menores niveles a las 48h en comparación con el VBA (**Figura 6**). El isobutirato y 2-metil butirato se encontraron en concentraciones menores frente a ambos tratamientos, como puede observarse en la **Tabla A5 (Anexo)**.

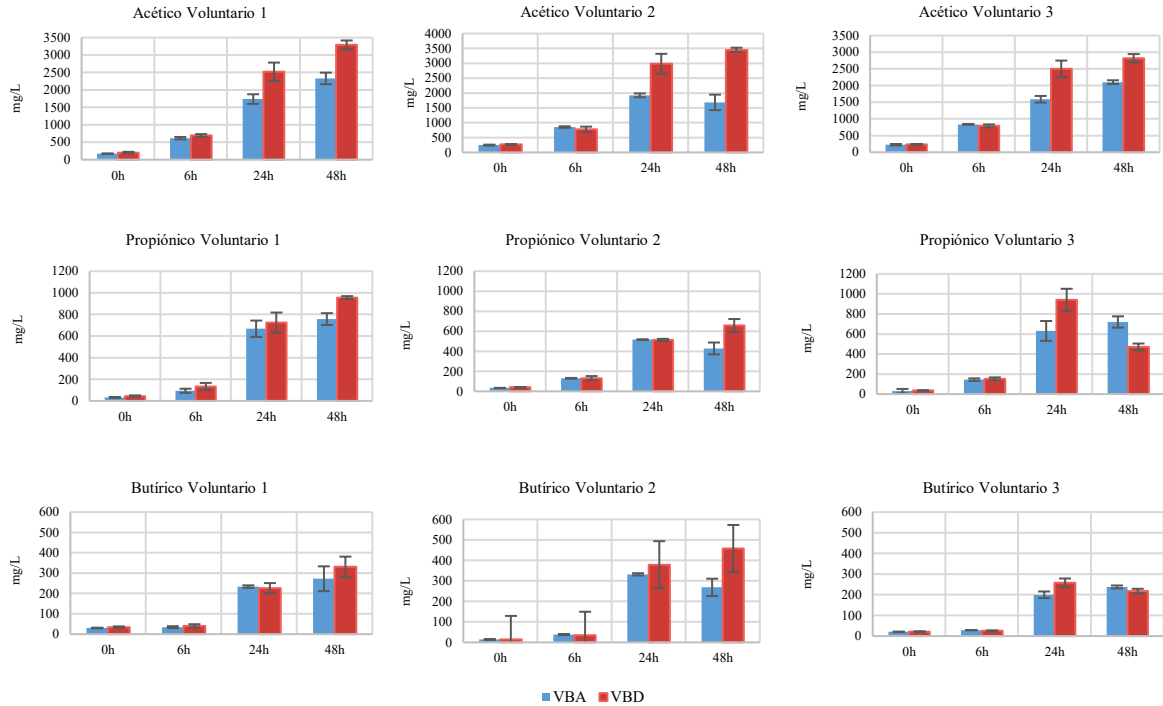


Figura 6. Concentraciones de ácidos acético, propiónico y butírico (mg/L) para cada voluntario en los distintos tiempos de toma de muestra de la fermentación con digerido de VBA y VBD.

4.4.2. Producción de ión amonio

Los resultados mostraron que la fermentación en presencia de ambos vinos produce un aumento sostenido y similar de la producción de amonio a partir de las 24h, excepto en el voluntario 3, en el que se observa un ligero descenso a las 48h en presencia de VBA. En los tres voluntarios, la producción de amonio parece ser mayor en respuesta a la presencia de VBA en comparación con el VBD (**Figura 7**) (**Tabla A6**).

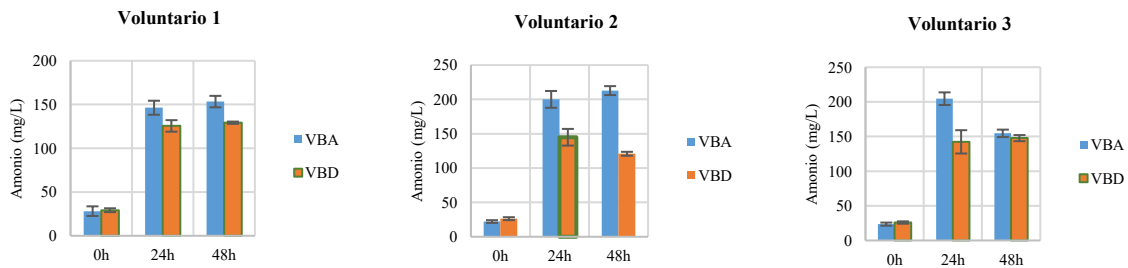


Figura 7. Concentración de amonio evaluada en cada voluntario a las 0h, 24h y 48h de fermentación con VBA y VBD.

5. DISCUSIÓN

Los sulfitos se emplean tradicionalmente como aditivos con el fin de prevenir el deterioro de alimentos por microorganismos indeseados y favorecer su conservación gracias a sus efectos antimicrobianos y antioxidantes. Con el avance de la industrialización, la exposición a los sulfitos ha incrementado notablemente, y en ciertos individuos se ha descrito sensibilidad y manifestaciones clínicas asociadas a estos aditivos (3,8,54). Sin embargo, los mecanismos responsables de estas reacciones no se conocen completamente, y específicamente el estudio de la interacción de los sulfitos con la microbiota intestinal humana, es un aspecto necesario en la investigación científica. En este contexto, el vino representa un modelo de especial interés. Es una de las bebidas en las que el uso de sulfitos resulta indispensable para su conservación, a la vez que es una matriz compleja que combina etanol y compuestos bioactivos con potencial efecto a nivel intestinal. Basándonos en un trabajo reciente del grupo de investigación en el que se empleó vino tinto como modelo (13), y puesto que no existen antecedentes que analicen los efectos del vino blanco sobre la microbiota intestinal, ha surgido el diseño del presente estudio *in vitro*, en el que hemos evaluado el impacto de la digestión gastrointestinal de los sulfitos presentes en el vino blanco sobre la microbiota intestinal humana, considerando la influencia de la presencia o ausencia de alcohol en la matriz y utilizando una dosis equivalente de sulfitos totales.

La caracterización en bodega de los vinos utilizados en el estudio mostró que el vino desalcoholizado presentaba una menor concentración de SO₂ libre y total. El proceso de desalcoholización del vino puede modificar, entre otros parámetros, el contenido de SO₂, dependiendo de las técnicas utilizadas, el grado de reducción de alcohol, la variedad de vino y el contenido inicial de SO₂ en la matriz. De hecho, se ha descrito que la desalcoholización de vinos de la variedad Verdejo puede reducir significativamente el contenido de SO₂ total en el vino (55). Esto coincide con lo observado en nuestro estudio, en el que la concentración inicial de sulfitos en el vino desalcoholizado era aproximadamente la mitad en comparación con su homólogo con alcohol.

Para poder comparar ambas matrices, se igualó la concentración de sulfitos totales dopando el vino desalcoholizado. Aunque el ajuste fue exitoso en términos de concentración global, la adición de sulfitos provocó un incremento de la fracción libre de SO₂, sin modificar

la fracción combinada. Este efecto se relaciona con el equilibrio químico del SO_2 en el vino, presente en tres formas: molecular (SO_2), bisulfito (HSO_3^-) y sulfito (SO_3^{2-}), siendo la molecular o “libre” la más activa desde el punto de vista antimicrobiano y antioxidante (56). La proporción de estas formas depende del pH y de la capacidad de la matriz para reaccionar con compuestos como aldehídos y azúcares. Sin embargo, dicha capacidad es limitada: una vez saturados los sitios de unión, el SO_2 adicional permanece principalmente en su forma libre (57). En consecuencia, tras el dopaje se observó un aumento de la fracción libre sin cambios en la combinada. Esta diferencia es relevante, dado que la fracción libre de SO_2 es más reactiva y biodisponible, lo que podría explicar y potenciar los efectos observados durante la fermentación colónica del vino desalcoholizado (56). Además, a concentraciones similares de SO_2 total, la fracción libre fue ligeramente superior en el vino desalcoholizado, debido probablemente a diferencias en la matriz vínica, que también podrían marcar un efecto diferente sobre la microbiota.

Por otro lado, y como era de esperar, ambos vinos blancos presentaron una concentración inicial de polifenoles relativamente baja en comparación con la encontrada en vinos tintos, lo que se explica por las diferencias en el proceso de elaboración: en los vinos blancos no se realiza una maceración prolongada con la piel de la uva, lo que limita la extracción de compuestos fenólicos (58). Tras la simulación de la digestión gastrointestinal, la concentración de polifenoles disminuyó significativamente en ambos vinos blancos, en concordancia con estudios previos en el simgi[®], donde este efecto se atribuyó en parte a la dilución del proceso (35,45). Resultados similares también se observaron en el estudio de Relaño de la Guía et al., (13) en el que la simulación de la presencia de SO_2 en el vino tinto en condiciones comparables también reportó un descenso, si bien una fracción importante y diversa de polifenoles alcanzó la etapa de fermentación colónica, debido a la mayor concentración inicial de estos compuestos en el vino tinto (13). Por otro lado, en el presente estudio, los polifenoles que alcanzaron la etapa de fermentación colónica fueron convertidos a metabolitos fenólicos de bajo peso molecular, aunque en comparación con el trabajo de Relaño-de la Guía (13), las concentraciones detectadas fueron mucho menores, sin diferencias claras aparentes entre las dos matrices de vino blanco.

En relación a los cambios en la microbiota, durante la fermentación colónica en presencia de vino blanco con alcohol (VBA) y desalcoholizado (VBD) (ambos con dosis similares de

SO₂ total) se observó un impacto diferencial en la composición microbiana intestinal, condicionado en parte por el estado basal de cada voluntario. Esto concuerda con la elevada variabilidad inter- e intraindividual descrita en la literatura, que explica las diferencias observadas entre participantes y la diversidad de respuestas ante intervenciones dietéticas (59,60). No obstante, de forma general, se observó una tendencia común en los tres donantes. Los análisis de recuento microbiano y metataxonómicos, evidenciaron un aumento de patobiontes y microorganismos asociados a efectos negativos, principalmente del filo *Pseudomonadota* (géneros *Escherichia-Shigella* y *Klebsiella*), acompañado de un descenso de comensales y taxones beneficiosos como *Bacteroides*, *Ruminococcus* y *Coprococcus*. Estos hallazgos concuerdan con estudios previos en los que se empleó vino tinto con bajo contenido en polifenoles (45) e incluso vino sintético con SO₂ (13). A concentraciones similares de SO₂ total, el efecto fue más acusado en el vino blanco desalcoholizado (VBD), donde se detectó un descenso de la biodiversidad microbiana y un incremento más pronunciado de *Escherichia-Shigella* y *Klebsiella*, géneros vinculados con procesos inflamatorios y diversas patologías intestinales y extraintestinales (61). Paralelamente, se observó una reducción más marcada de Bacteroidota y Bacillota, junto con una disminución de múltiples géneros asociados a efectos beneficiosos, entre ellos *Bacteroides*, *Blautia*, *Faecalibacterium*, *Ruminococcus*, *Coprococcus* y *Dorea*. Sin embargo, estos efectos fueron más evidentes en el caso del vino blanco desalcoholizado, en el que los resultados mostraron un impacto aparentemente más negativo sobre la microbiota intestinal.

En cuanto a los efectos funcionales sobre la microbiota colónica, ambos vinos blancos promovieron un aumento de la producción de AGCC durante la fermentación, en línea con lo descrito previamente para el vino tinto (13,35,45), aunque en niveles más bajos debido a la menor concentración de polifenoles, considerados los principales precursores en estas condiciones (26,62). Este incremento fue especialmente notable en la producción de ácido acético en el vino desalcoholizado, mientras que no se observaron diferencias relevantes en el resto de AGCC. Como marcador adicional de la actividad metabólica microbiana, se evaluó la producción de amonio, metabolito derivado del catabolismo proteico, cuyo aumento se asocia con desequilibrio microbiano, proliferación de patobiontes y efectos inflamatorios o nocivos sobre la salud (63–65). En nuestro estudio, ambos vinos blancos incrementaron la producción de amonio, lo que era esperable dado que en las fermentaciones

en *batch* las fuentes de carbohidratos fermentables suelen agotarse entre las 24–48 h, favoreciendo el metabolismo proteico. No obstante, la producción de amonio fue menor en el vino desalcoholizado, posiblemente debido a diferencias en su composición y a los cambios asociados en la microbiota que condicionaron la transición al metabolismo proteico.

Teniendo en cuenta el conjunto de resultados, la fermentación colónica de los vinos blancos, con y sin alcohol, produjo cambios en la composición y funcionalidad de la microbiota intestinal humana, en parte, dependiente del tipo de vino. Una posible explicación es la concentración ligeramente mayor de SO₂ libre observada tras el dopaje en el vino desalcoholizado, en comparación con su homólogo con alcohol. Dado que el SO₂ libre es la fracción responsable de la acción antimicrobiana (56), su mayor disponibilidad podría justificar el impacto diferencial sobre la microbiota. Aunque en el trabajo previo se sugirió que los polifenoles del vino tinto ejercen papel protector frente a los efectos negativos de los sulfitos, probablemente mediante su interacción con el SO₂ (13), la menor concentración y diversidad fenólica en el vino blanco limitaría esta capacidad de combinación con el SO₂ y favorecería una mayor proporción de fracción libre, capaz de interactuar directamente con la microbiota y ejercer efectos bacteriostáticos o bactericidas (56). Además, los polifenoles también se han asociado con un posible efecto protector frente al alcohol en el vino tinto (66). En este contexto, la menor presencia de polifenoles junto con la mayor proporción de SO₂ libre en el vino blanco desalcoholizado podrían explicar los efectos observados en la fermentación colónica de esta matriz. Sin embargo, hay que tener en cuenta que este estudio se ha realizado con un modelo de simulación *in vitro* que, aunque reproducible y controlado, no puede reproducir por completo la complejidad del entorno intestinal humano. Es por ello que los datos obtenidos deben considerarse preliminares y requerirán ser confirmados mediante nuevos ensayos *in vivo* para validar su relevancia fisiológica. Aún así, este estudio representa la primera aproximación de este tipo aplicada a vinos blancos, lo que refuerza su interés en la investigación sobre la sensibilidad a los sulfitos.

CONCLUSIONES

1. El uso combinado del simulador gastrointestinal dinámico simgi® y fermentaciones colónicas en estático, permitió reproducir el proceso de digestión y fermentación intestinal de la presencia de SO₂ en dos matrices vínicas, vino blanco con alcohol y su

homólogo desalcoholizado. En general, la presencia de sulfitos se asoció con una disminución de la biodiversidad microbiana y una modulación diferencial de las comunidades bacterianas dependiente tanto de la matriz vínica como del donante.

2. El estudio reveló una fuerte variabilidad interindividual en la respuesta microbiana al SO₂, tanto en términos de biodiversidad alfa y beta como en la abundancia relativa de filos y géneros bacterianos. No obstante, se observaron patrones comunes, como el aumento de taxones oportunistas o patobiontes (por ejemplo, *Escherichia-Shigella*, *Klebsiella*, *Enterococcus*) y la reducción de géneros beneficiosos (*Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Ruminococcus*, *Faecalibacterium*), efectos que fueron más pronunciados en la matriz desalcoholizada.
3. Las diferencias observadas entre las dos matrices vínicas sugieren que el vino desalcoholizado genera un impacto microbiano más profundo, que podría estar relacionado con una mayor proporción de SO₂ libre en esta matriz, derivada de las reacciones químicas en ausencia de etanol, lo que a su vez podría influir en la interacción con la microbiota.
4. La baja concentración de polifenoles en ambas matrices puede limitar su posible efecto protector frente al impacto de los sulfitos, lo que explicaría las diferencias observadas respecto a estudios previos con vinos tintos, en los que estos compuestos atenúan los efectos negativos del SO₂ sobre la microbiota.
5. Junto con los cambios en la composición microbiana, ambas matrices modificaron la funcionalidad de la microbiota intestinal, promoviendo un aumento global en la producción de ácidos grasos de cadena corta (AGCC), en particular ácido acético, y una reducción del metabolismo proteico, reflejada en menores niveles de producción de amonio en presencia de vino desalcoholizado. Estos efectos funcionales también mostraron variabilidad interindividual y una dependencia del tipo de vino.

BIBLIOGRAFÍA

1. Parlamento Europeo y Consejo de la Unión Europea. Reglamento (CE) n° 1333/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 16 de diciembre de 2008, sobre aditivos alimentarios (Texto pertinente a efectos del EEE) [Internet]. dic 16, 2008. Disponible en: <http://data.europa.eu/eli/reg/2008/1333/oj/spa>

2. FAO/OMS. Codex General Standard for Food Additives (CXS 192-1995) [Internet]. 1995. Disponible en: https://www.fao.org/gsfonline/docs/CXS_192s.pdf
3. EFSA Panel on Food Additives and Flavourings (FAF), Younes M, Aquilina G, Castle L, Engel K, Fowler PJ, et al. Follow-up of the re-evaluation of sulfur dioxide (E 220), sodium sulfite (E 221), sodium bisulfite (E 222), sodium metabisulfite (E 223), potassium metabisulfite (E 224), calcium sulfite (E 226), calcium bisulfite (E 227) and potassium bisulfite (E 228). *EFSA Journal* [Internet]. noviembre de 2022;20(11). Disponible en: <https://data.europa.eu/doi/10.2903/j.efsa.2022.7594>
4. OIV. SO₂ and Wine: A Review [Internet]. París, Francia: OIV - International Organisation of Vine and Wine; 2021. Disponible en: https://www.oiv.int/sites/default/files/2022-09/oiv-collective-expertise-document-so2-and-wine-a-review_en.pdf
5. Moreno-Arribas MV, Polo MC, editores. *Wine Chemistry and Biochemistry* [Internet]. New York, NY: Springer New York; 2009. Disponible en: <http://link.springer.com/10.1007/978-0-387-74118-5>
6. Guerrero RF, Cantos-Villar E. Demonstrating the efficiency of sulphur dioxide replacements in wine: A parameter review. *Trends in Food Science & Technology*. marzo de 2015;42(1):27-43.
7. Evaluation of certain food additives: fifty-first report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives [Internet]. [citado 29 de septiembre de 2025]. Disponible en: <https://iris.who.int/items/6bda4f2d-03d5-421f-b0d0-da57e2796683>
8. EFSA Panel on Food additives and Nutrient Sources added to Food (ANS). Scientific Opinion on the re-evaluation of sulfur dioxide (E 220), sodium sulfite (E 221), sodium bisulfite (E 222), sodium metabisulfite (E 223), potassium metabisulfite (E 224), calcium sulfite (E 226), calcium bisulfite (E 227) and potassium bisulfite (E 228) as food additives. *EFSA Journal*. 2016;14(4):4438.
9. Vally H, Misso NLA, Madan V. Clinical effects of sulphite additives. *Clinical & Experimental Allergy*. noviembre de 2009;39(11):1643-51.
10. Parlamento Europeo y Consejo de la Unión Europea. Reglamento (UE) n.º 1169/2011 sobre la información alimentaria facilitada al consumidor [Internet]. Luxemburgo: Diario Oficial de la Unión Europea; 2011. Disponible en: <https://www.boe.es/doue/2011/304/L00018-00063.pdf>
11. Irwin SV, Fisher P, Graham E, Malek A, Robidoux A. Sulfites inhibit the growth of four species of beneficial gut bacteria at concentrations regarded as safe for food. *PLoS ONE*. 18 de octubre de 2017;12(10):e0186629.
12. Irwin SV, Deardorff LM, Deng Y, Fisher P, Gould M, June J, et al. Sulfite preservatives effects on the mouth microbiome: Changes in viability, diversity and composition of microbiota. *PLoS ONE*. 7 de abril de 2022;17(4):e0265249.

13. Relaño De La Guía E, Cueva C, Molinero N, Ruano A, Motilva MJ, Bartolomé B, et al. May Sulfites in Wine Affect Gut Microbiota? An In Vitro Study of Their Digestion and Interplay with Wine Polyphenols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 6 de agosto de 2025;73(31):19397-409.
14. Gilbert SF, Sapp J, Tauber AI. A Symbiotic View of Life: We Have Never Been Individuals. *The Quarterly Review of Biology*. diciembre de 2012;87(4):325-41.
15. Sender R, Fuchs S, Milo R. Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. *PLOS Biology*. 19 de agosto de 2016;14(8):e1002533.
16. Marchesi JR, Ravel J. The vocabulary of microbiome research: a proposal. *Microbiome*. diciembre de 2015;3(1):31, s40168-015-0094-5.
17. Thursby E, Juge N. Introduction to the human gut microbiota. *Biochemical Journal*. 1 de junio de 2017;474(11):1823-36.
18. Suárez-Martínez C, Santaella-Pascual M, Yagüe-Guirao G, Martínez-Graciá C. Infant gut microbiota colonization: influence of prenatal and postnatal factors, focusing on diet. *Frontiers in Microbiology*. 22 de agosto de 2023;14:1236254.
19. Álvarez J, Fernández Real JM, Guarner F, Gueimonde M, Rodríguez JM, Saenz De Pipaon M, et al. Microbiota intestinal y salud. *Gastroenterología y Hepatología*. agosto de 2021;44(7):519-35.
20. Safarchi A, Al-Qadami G, Tran CD, Conlon M. Understanding dysbiosis and resilience in the human gut microbiome: biomarkers, interventions, and challenges. *Frontiers in Microbiology*. 4 de marzo de 2025;16:1559521.
21. Cantón R, De Lucas Ramos P, García-Botella A, García-Lledó A, Hernández-Sampelayo T, Gómez-Pavón J, et al. Human intestinal microbiome: Role in health and disease. *Revista Española de Quimioterapia*. 5 de noviembre de 2024;37(6):438-53.
22. Joos R, Boucher K, Lavelle A, Arumugam M, Blaser MJ, Claesson MJ, et al. Examining the healthy human microbiome concept. *Nature Reviews Microbiology*. 1 de marzo de 2025;23(3):192-205.
23. Jiménez-Arroyo C, Molinero N, Campo R, Delgado S, Moreno-Arribas MV. Estudio del microbioma intestinal humano mediante metagenómica: avances recientes y desafíos para su implementación clínica. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. julio de 2025;
24. Hills R, Pontefract B, Mishcon H, Black C, Sutton S, Theberge C. Gut Microbiome: Profound Implications for Diet and Disease. *Nutrients*. 16 de julio de 2019;11(7):1613.
25. Perler BK, Friedman ES, Wu GD. The Role of the Gut Microbiota in the Relationship Between Diet and Human Health. *Annual Review of Physiology*. 10 de febrero de 2023;85(1):449-68.

26. Cueva C, Gil-Sánchez I, Ayuda-Durán B, González-Manzano S, González-Paramás A, Santos-Buelga C, et al. An Integrated View of the Effects of Wine Polyphenols and Their Relevant Metabolites on Gut and Host Health. *Molecules*. 6 de enero de 2017;22(1):99.
27. Tamayo M, Olivares M, Ruas-Madiedo P, Margolles A, Espín JC, Medina I, et al. How Diet and Lifestyle Can Fine-Tune Gut Microbiomes for Healthy Aging. *Annual Review of Food Science and Technology*. 28 de junio de 2024;15(1):283-305.
28. Perrone P, D'Angelo S. Gut Microbiota Modulation Through Mediterranean Diet Foods: Implications for Human Health. *Nutrients*. 8 de marzo de 2025;17(6):948.
29. Brodkorb A, Egger L, Alming M, Alvito P, Assunção R, Ballance S, et al. INFOGEST static in vitro simulation of gastrointestinal food digestion. *Nature Protocols*. abril de 2019;14(4):991-1014.
30. Bartolome B, Moreno-Arribas MV. Dynamic simulation of food protein digestion and bioactive peptide release. En: *Protein Digestion-Derived Peptides*. Elsevier; 2024. p. 79-114.
31. Dixit Y, Kanojiya K, Bhingardev N, Ahire JJ, Saroj D. In Vitro Human Gastrointestinal Tract Simulation Systems: A Panoramic Review. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*. abril de 2024;16(2):501-18.
32. Alegría A, Garcia-Llatas G, Cilla A. Static Digestion Models: General Introduction. En: Verhoeckx K, Cotter P, López-Expósito I, Kleiveland C, Lea T, Mackie A, et al., editores. *The Impact of Food Bioactives on Health: in vitro and ex vivo models* [Internet]. Cham: Springer; 2015. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29787074/>
33. Ménard O, Bourlieu C, Oliveira SCD, Dellarosa N, Laghi L, Carrière F, et al. A first step towards a consensus static in vitro model for simulating full-term infant digestion. *Food Chemistry*. 2018;240:338-45.
34. Gil-Sánchez I, Ayuda-Durán B, González-Manzano S, Santos-Buelga C, Cueva C, Martín-Cabrejas MA, et al. Chemical characterization and in vitro colonic fermentation of grape pomace extracts. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2017;97(10):3433-44.
35. Tamargo A, De Llano DG, Cueva C, Del Hierro JN, Martín D, Molinero N, et al. Deciphering the interactions between lipids and red wine polyphenols through the gastrointestinal tract. *Food Research International*. marzo de 2023;165:112524.
36. Rodríguez-Saavedra M, Tamargo A, Molinero N, Relano De La Guía E, Jiménez-Arroyo C, Bartolomé B, et al. Simulated gastrointestinal digestion of beer using the simgi® model. Investigation of colonic phenolic metabolism and impact on human gut microbiota. *Food Research International*. noviembre de 2023;173:113228.
37. Tamargo A, Molinero N, Reinos JJ, Alcolea-Rodríguez V, Portela R, Bañares MA, et al. PET microplastics affect human gut microbiota communities during simulated

- gastrointestinal digestion, first evidence of plausible polymer biodegradation during human digestion. *Scientific Reports*. 11 de enero de 2022;12(1):528.
38. Jiménez-Arroyo C, Tamargo A, Molinero N, Reinos JJ, Alcolea-Rodríguez V, Portela R, et al. Simulated gastrointestinal digestion of polylactic acid (PLA) biodegradable microplastics and their interaction with the gut microbiota. *Science of The Total Environment*. diciembre de 2023;902:166003.
 39. Dupont D, Alric M, Blanquet-Diot S, Bornhorst G, Cueva C, Deglaire A, et al. Can dynamic *in vitro* digestion systems mimic the physiological reality? *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 31 de mayo de 2019;59(10):1546-62.
 40. Barroso E, Cueva C, Peláez C, Martínez-Cuesta MC, Requena T. Development of human colonic microbiota in the computer-controlled dynamic SIMulator of the GastroIntestinal tract SIMGI. *LWT - Food Science and Technology*. mayo de 2015;61(2):283-9.
 41. Tamargo García A, Gil Sánchez I, Miralles Buraglia B, Martín García D, Rodríguez García Risco M, Fornari Reale T, et al. Simulador gastrointestinal dinámico (simgi®): una herramienta potencialmente útil en nutrición clínica. *Nutrición Hospitalaria* [Internet]. 17 de noviembre de 2017; Disponible en: <http://revista.nutricionhospitalaria.net/index.php/nh/article/view/1207>
 42. Cueva C, Jiménez-Girón A, Muñoz-González I, Esteban-Fernández A, Gil-Sánchez I, Dueñas M, et al. Application of a new Dynamic Gastrointestinal Simulator (SIMGI) to study the impact of red wine in colonic metabolism. *Food Research International*. 2015;72:149-59.
 43. OIV. Compendium of International Methods of Wine and Must Analysis [Internet]. 2025. Disponible en: <https://www.oiv.int/sites/default/files/publication/2025-03/Compendium%20of%20MA%20Wine%20Completo%202025.pdf>
 44. Guerrero, R.F.; Cantos-Villar, E.; Puertas, B.; Ortiz Somovilla, V. Sulfuroso en la Elaboración de Vinos. *Alternativas | SERVIFAPA - Plataforma de asesoramiento y transferencia del conocimiento agrario y pesquero en andalucía* [Internet]. Disponible en: <https://www.juntadeandalucia.es/agriculturaypesca/ifapa/servifapa/registro-servifapa/0fbb0bb4-261a-4c19-97d4-6e8ba8dafeb4>
 45. Tamargo A, Cueva C, Silva M, Molinero N, Miralles B, Bartolomé B, et al. Gastrointestinal co-digestion of wine polyphenols with glucose/whey proteins affects their bioaccessibility and impact on colonic microbiota. *Food Research International*. mayo de 2022;155:111010.
 46. Cueva C, Gil-Sánchez I, Tamargo A, Miralles B, Crespo J, Bartolomé B, et al. Gastrointestinal digestion of food-use silver nanoparticles in the dynamic SIMulator of the GastroIntestinal tract (simgi®). Impact on human gut microbiota. *Food and Chemical Toxicology*. 2019;132:110657.

47. Jiménez-Arroyo C, Molinero N, Sabater C, Margolles A, Terrón-Camero LC, Andrés-León E, et al. Gut microbiome and clinical and lifestyle host factors associated with recurrent positive RT-PCR for SARS-CoV-2. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 18 de diciembre de 2024;14:1494193.
48. Callahan BJ, Sankaran K, Fukuyama JA, McMurdie PJ, Holmes SP. Bioconductor Workflow for Microbiome Data Analysis: from raw reads to community analyses. *F1000 Research*. 2016;5:1492.
49. Callahan BJ, McMurdie PJ, Rosen MJ, Han AW, Johnson AJA, Holmes SP. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods*. julio de 2016;13(7):581-3.
50. Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P, et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Research*. 27 de noviembre de 2012;41(D1):D590-6.
51. Han J, Lin K, Sequeira C, Borchers CH. An isotope-labeled chemical derivatization method for the quantitation of short-chain fatty acids in human feces by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*. enero de 2015;854:86-94.
52. Muñoz-González I, Jiménez-Girón A, Martín-Álvarez PJ, Bartolomé B, Moreno-Arribas MV. Profiling of microbial-derived phenolic metabolites in human feces after moderate red wine intake. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2013;61(39):9470-9.
53. Duncan SH, Louis P, Flint HJ. Cultivable bacterial diversity from the human colon. *Letters in Applied Microbiology*. abril de 2007;44(4):343-50.
54. Vally H, Misso NL. Adverse reactions to the sulphite additives. *Gastroenterology and hepatology from bed to bench*. 2012;5(1):16-23.
55. Kumar Y, Ricci A, Parpinello GP, Versari A. Dealcoholized Wine: A Scoping Review of Volatile and Non-Volatile Profiles, Consumer Perception, and Health Benefits. *Food and Bioprocess Technology*. noviembre de 2024;17(11):3525-45.
56. Feng X, Dong Y, Feng Y, Zhang A, Huang Z, Wang S, et al. Recent advances in physical/chemical methods as alternatives to SO₂ for winemaking: Principles, challenges and perspectives. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* [Internet]. 2024; Disponible en: <https://api.semanticscholar.org/CorpusID:273282646>
57. Sacks GL, Howe PA, Standing MJ, Danilewicz JC. Free, Bound, and Total Sulfur Dioxide (SO₂) during Oxidation of Wines. *American Journal of Enology and Viticulture*. 2020;71:266-77.
58. Arranz S, Chiva-Blanch G, Valderas-Martínez P, Medina-Remón A, Lamuela-Raventós RM, Estruch R. Wine, Beer, Alcohol and Polyphenols on Cardiovascular Disease and Cancer. *Nutrients*. 10 de julio de 2012;4(7):759-81.

59. Lavelle A, Hoffmann TW, Pham HP, Langella P, Guédon E, Sokol H. Baseline microbiota composition modulates antibiotic-mediated effects on the gut microbiota and host. *Microbiome*. diciembre de 2019;7(1):111.
60. Rashidi A, Ebadi M, Rehman TU, Elhousseini H, Nalluri H, Kaiser T, et al. Gut microbiota response to antibiotics is personalized and depends on baseline microbiota. *Microbiome*. diciembre de 2021;9(1):211.
61. Rizzatti G, Lopetuso LR, Gibiino G, Binda C, Gasbarrini A. Proteobacteria: A Common Factor in Human Diseases. *BioMed Research International*. 2017;2017:1-7.
62. Frolova MS, Suvorova IA, Iablokov SN, Petrov SN, Rodionov DA. Genomic reconstruction of short-chain fatty acid production by the human gut microbiota. *Frontiers in Molecular Biosciences*. 11 de agosto de 2022;9:949563.
63. Richardson AJ, McKain N, Wallace RJ. Ammonia production by human faecal bacteria, and the enumeration, isolation and characterization of bacteria capable of growth on peptides and amino acids. *BMC Microbiology*. diciembre de 2013;13(1):6.
64. Frame LA, Costa E, Jackson SA. Current explorations of nutrition and the gut microbiome: a comprehensive evaluation of the review literature. *Nutrition Reviews*. 1 de octubre de 2020;78(10):798-812.
65. Yokoo K, Yamamoto Y, Suzuki T. Ammonia impairs tight junction barriers by inducing mitochondrial dysfunction in Caco-2 cells. *The FASEB Journal*. 2021;35(11):e21854.
66. Queipo-Ortuño MI, Boto-Ordóñez M, Murri M, Gomez-Zumaquero JM, Clemente-Postigo M, Estruch R, et al. Influence of red wine polyphenols and ethanol on the gut microbiota ecology and biochemical biomarkers. *The American Journal of Clinical Nutrition*. junio de 2012;95(6):1323-34.

ANEXOS

Tabla A1. Límites de presencia de SO₂ para vino blanco convencional establecidos en la UE y países externos.

Región/ País	Límite de SO ₂ total (mg/L)	Fuente
UE	- 200 mg/L (si el contenido de sustancias reductoras <4g/L) - 300 mg/L (si el contenido de sustancias reductoras >4g/L) - 400mg/L excepcionalmente en vinos blancos dulces	OIV, Compendium of international methods of wine and must analysis (2025)
Estados Unidos	350 mg/L	Alcohol and Tobacco Tax and Trade Bureau (TTB)
Canadá	350 mg/L	Canadian Food Inspection Agency (CFIA)
Australia y Nueva Zelanda	250 mg/L	Food Standards Australia New Zealand (FSANZ)
Chile	300 mg/L	Servicio Agrícola y Ganadero (SAG)
Argentina	210 mg/L	Instituto Nacional de la Vitivinicultura
Sudáfrica	200-250 mg/L	Department of Agriculture
China	200-300 mg/L	GB Standards
Japón	350 mg/L	Japanese Food Sanitation Act

Figura A1. Concentración (partes por millón, ppm) de los principales metabolitos de polifenoles en los distintos tiempos de fermentación para cada voluntario.

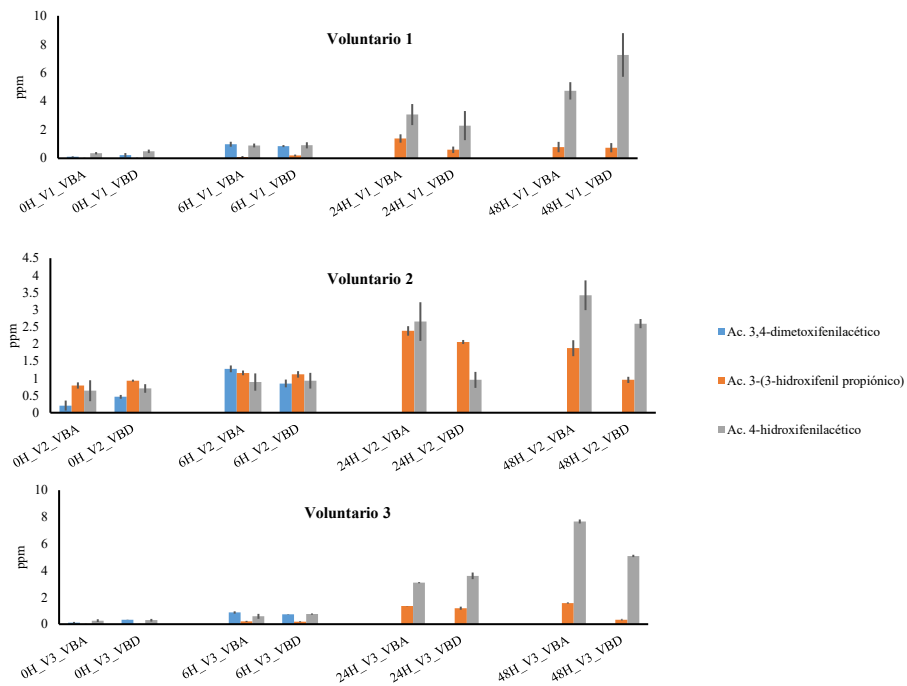


Tabla A2. Diferencias observadas en los recuentos microbianos en placa para cada voluntario (V1, V2, V3) en los distintos tiempos de fermentación. En verde se señalan los resultados que muestran diferencias significativas y un $\Delta\log(\text{UFC}/\text{mL}) \geq 1$ respecto a la otra matriz vínica en el mismo tiempo; y en rosa aquellos resultados que muestran diferencias significativas, pero sin $\Delta\log \geq 1$.

V1	Aerobios totales	<i>Enterobacteriaceae</i>	Anaerobios totales	<i>Enterococcus</i> spp	Bacterias ácido-lácticas	<i>Clostridium</i> spp	<i>Staphylococcus</i> spp	<i>Lactobacillus</i> spp	<i>Bifidobacterium</i> spp
VBA*0h	6.18 ± 0.04 d	6.74 ± 0.05 d	8.27 ± 0.08 bc	4.77 ± 0.05 d	4.85 ± 0.16 c	7.71 ± 0.06 c	4.97 ± 0.01 c	4.25 ± 0.04 a	6.32 ± 0.09 ab
VBA*24h	8.51 ± 0.10 a	8.46 ± 0.05 a	8.45 ± 0.07 a	5.56 ± 0.07 c	6.35 ± 0.08 a	8.67 ± 0.12 a	6.43 ± 0.05 a	4.35 ± 0.06 a	6.41 ± 0.04 a
VBA*48h	6.35 ± 0.09 c	6.39 ± 0.25 d	7.92 ± 0.08 d	6.31 ± 0.10 a	6.36 ± 0.06 a	7.54 ± 0.10 a	6.33 ± 0.13 ab	4.11 ± 0.04 b	6.36 ± 0.03 ab
VBD*0h	6.44 ± 0.08 c	6.49 ± 0.11 d	8.17 ± 0.05 c	4.73 ± 0.05 d	4.82 ± 0.14 c	7.60 ± 0.04 d	4.80 ± 0.02 d	4.35 ± 0.05 a	6.43 ± 0.07 a
VBD*24h	8.37 ± 0.05 ab	8.54 ± 0.05 a	8.37 ± 0.06 ab	5.56 ± 0.10 c	6.22 ± 0.17 ab	8.60 ± 0.11 a	6.36 ± 0.19 ab	4.34 ± 0.05 a	6.39 ± 0.05 ab
VBD*48h	8.38 ± 0.03 b	8.20 ± 0.07 b	8.31 ± 0.06 b	6.12 ± 0.05 b	6.10 ± 0.11 b	8.19 ± 0.04 b	6.20 ± 0.10 b	3.17 ± 0.07 c	6.29 ± 0.06 b
V2	Aerobios totales	<i>Enterobacteriaceae</i>	Anaerobios totales	<i>Enterococcus</i> spp	Bacterias ácido-lácticas	<i>Clostridium</i> spp	<i>Staphylococcus</i> spp	<i>Lactobacillus</i> spp	<i>Bifidobacterium</i> spp
VBA*0h	5.93 ± 0.04 e	5.39 ± 0.04 e	8.27 ± 0.08 a	5.29 ± 0.04 c	7.44 ± 0.04 a	8.15 ± 0.11 b	5.67 ± 0.05 c	2.97 ± 0.08 b	7.65 ± 0.08 a
VBA*24h	7.14 ± 0.05 c	6.77 ± 0.06 c	8.28 ± 0.04 a	5.12 ± 0.12 c	6.56 ± 0.04 d	7.57 ± 0.08 c	6.87 ± 0.05 a	3.04 ± 0.15 ab	7.42 ± 0.03 b
VBA*48h	6.80 ± 0.08 d	5.09 ± 0.23 e	7.46 ± 0.04 b	6.85 ± 0.04 a	6.80 ± 0.06 b	7.28 ± 0.12 d	6.92 ± 0.06 a	2.81 ± 0.13 b	7.19 ± 0.03 d
VBD*0h	6.00 ± 0.10 e	5.95 ± 0.05 d	8.44 ± 0.06 a	5.27 ± 0.02 c	7.53 ± 0.10 a	8.31 ± 0.24 ab	5.92 ± 0.12 b	2.98 ± 0.10 b	7.71 ± 0.06 a
VBD*24h	8.19 ± 0.10 a	7.93 ± 0.01 a	8.46 ± 0.12 a	5.52 ± 0.09 b	6.60 ± 0.09 cd	8.39 ± 0.07 a	6.92 ± 0.09 a	3.23 ± 0.12 a	7.41 ± 0.12 bc
VBD*48h	7.51 ± 0.05 b	7.63 ± 0.01 b	8.25 ± 0.09 a	6.88 ± 0.03 a	6.72 ± 0.03 bc	8.37 ± 0.05 a	6.95 ± 0.08 a	3.03 ± 0.13 ab	7.27 ± 0.07 cd
V3	Aerobios totales	<i>Enterobacteriaceae</i>	Anaerobios totales	<i>Enterococcus</i> spp	Bacterias ácido-lácticas	<i>Clostridium</i> spp	<i>Staphylococcus</i> spp	<i>Lactobacillus</i> spp	<i>Bifidobacterium</i> spp
VBA*0h	7.01 ± 0.09 e	6.73 ± 0.05 d	8.18 ± 0.06 b	5.54 ± 0.06 bc	5.78 ± 0.06 c	7.28 ± 0.08 c	5.44 ± 0.06 d	3.40 ± 0.11 c	6.57 ± 0.06 d
VBA*24h	7.44 ± 0.04 c	7.18 ± 0.14 c	8.17 ± 0.08 bc	5.57 ± 0.06 bc	6.58 ± 0.08 a	7.75 ± 0.08 b	6.53 ± 0.04 a	3.67 ± 0.03 b	7.42 ± 0.06 b
VBA*48h	7.35 ± 0.04 d	7.34 ± 0.20 c	8.02 ± 0.06 c	6.43 ± 0.06 a	6.45 ± 0.08 ab	7.59 ± 0.08 b	6.50 ± 0.03 a	2.15 ± 0.25 e	7.29 ± 0.02 c
VBD*0h	7.10 ± 0.04 e	6.79 ± 0.02 d	8.14 ± 0.06 bc	5.54 ± 0.04 c	5.70 ± 0.07 c	7.30 ± 0.05 c	5.58 ± 0.07 c	3.53 ± 0.07 c	6.47 ± 0.07 d
VBD*24h	8.65 ± 0.03 a	8.58 ± 0.05 a	8.61 ± 0.02 a	5.63 ± 0.05 b	6.24 ± 0.13 b	8.77 ± 0.08 a	6.27 ± 0.15 b	4.02 ± 0.11 a	7.55 ± 0.04 a
VBD*48h	8.40 ± 0.04 b	8.38 ± 0.08 b	8.58 ± 0.02 a	6.18 ± 0.15 a	6.26 ± 0.15 b	8.72 ± 0.05 a	6.30 ± 0.08 b	3.01 ± 0.07 d	7.41 ± 0.03 b

Tabla A3. Evolución a nivel de filo de la abundancia relativa para cada voluntario en los distintos tiempos de toma de muestra (0h, 24h, 48h) en respuesta al VBA y VBD. Los datos se expresan en forma de media y desviación estándar en %.

Voluntario 1	VBA*0h	VBD*0h	VBA*24h	VBD*24h	VBA*48h	VBD*48h
Pseudomonadota	1.50 ± 0.10 c	1.77 ± 0.11 c	30.33 ± 1.72 b	41.34 ± 4.54 ab	34.69 ± 2.65 b	43.84 ± 1.96 a
Actinomycetota	4.75 ± 0.22 b	4.53 ± 0.24 bc	5.10 ± 0.38 ab	3.83 ± 0.30 c	5.60 ± 0.25 a	3.52 ± 0.94 c
Bacillota	74.15 ± 0.33 a	73.61 ± 0.82 a	43.15 ± 0.57 b	37.74 ± 4.61 c	39.28 ± 2.63 c	33.29 ± 2.31 d
Bacteroidota	19.19 ± 0.30 a	19.68 ± 0.75 a	18.82 ± 0.94 ab	14.72 ± 0.47 c	16.86 ± 0.27 b	16.12 ± 2.02 bc
Thermodesulfobacteriota	0.34 ± 0.03 c	0.32 ± 0.06 c	1.87 ± 0.15 b	2.00 ± 0.14 b	2.88 ± 0.07 a	2.86 ± 0.28 a
Verrucomicrobiota	0.05 ± 0.00 c	0.06 ± 0.02 c	0.65 ± 0.07 a	0.34 ± 0.08 b	0.53 ± 0.06 ab	0.32 ± 0.10 bc
Synergistota	0.00 ± 0.00 b	0.00 ± 0.00 b	0.00 ± 0.00 b	0.00 ± 0.00 b	0.03 ± 0.01 a	0.00 ± 0.00 b
Fusobacteriota	0.00 ± 0.00 a	0.00 ± 0.00 a	0.08 ± 0.06 a	0.01 ± 0.01 a	0.13 ± 0.06 a	0.03 ± 0.04 a
Patescibacteria	0.01 ± 0.01 a	0.01 ± 0.01 a	0.00 ± 0.00 a	0.00 ± 0.00 a	0.00 ± 0.00 a	0.00 ± 0.01 a
Voluntario 2	VBA*0h	VBD*0h	VBA*24h	VBD*24h	VBA*48h	VBD*48h
Pseudomonadota	1.04 ± 0.02 d	1.14 ± 0.04 d	15.06 ± 0.59 b	38.00 ± 2.60 a	9.32 ± 0.10 c	37.25 ± 2.01 a
Actinomycetota	25.27 ± 0.63 a	24.15 ± 0.76 a	25.37 ± 1.26 a	9.44 ± 0.88 b	24.92 ± 0.37 a	8.05 ± 2.13 b
Bacillota	47.46 ± 0.70 a	45.67 ± 0.63 a	35.72 ± 0.28 bc	38.98 ± 1.51 b	38.69 ± 0.24 b	32.83 ± 3.39 c
Bacteroidota	26.21 ± 0.46 b	29.01 ± 0.53 a	22.25 ± 0.79 c	13.03 ± 0.19 d	23.39 ± 0.45 c	20.89 ± 2.61 c
Thermodesulfobacteriota	0.01 ± 0.00 d	0.02 ± 0.00 d	1.41 ± 0.16 b	0.49 ± 0.23 cd	3.38 ± 0.17 a	0.89 ± 0.20 c
Verrucomicrobiota	0.00 ± 0.00 a	0.00 ± 0.00 a	0.18 ± 0.18 a	0.05 ± 0.06 a	0.27 ± 0.20 a	0.08 ± 0.05 a
Patescibacteria	0.01 ± 0.00 a	0.00 ± 0.00 a	0.00 ± 0.00 a	0.00 ± 0.00 a	0.01 ± 0.01 a	0.00 ± 0.00 a
Voluntario 3	VBA*0h	VBD*0h	VBA*24h	VBD*24h	VBA*48h	VBD*48h
Pseudomonadota	3.71 ± 0.35 f	5.26 ± 0.29 e	34.46 ± 1.17 c	50.78 ± 1.40 b	23.76 ± 0.70 d	58.48 ± 1.76 a
Actinomycetota	5.88 ± 0.09 c	5.45 ± 0.13 d	9.91 ± 0.21 b	4.65 ± 0.34 d	11.56 ± 0.25 a	3.10 ± 0.22 e
Bacillota	72.97 ± 0.50 a	72.35 ± 0.46 a	41.33 ± 0.60 c	31.86 ± 0.69 d	46.16 ± 0.22 b	26.08 ± 1.16 e
Bacteroidota	17.30 ± 0.17 ab	16.79 ± 0.25 b	13.75 ± 0.73 c	12.50 ± 0.40 c	18.05 ± 0.43 a	12.13 ± 0.73 c
Thermodesulfobacteriota	0.00 ± 0.00 a	0.01 ± 0.00 a	0.01 ± 0.01 a	0.00 ± 0.01 a	0.01 ± 0.00 a	0.01 ± 0.01 a
Verrucomicrobiota	0.13 ± 0.02 b	0.13 ± 0.03 b	0.53 ± 0.04 a	0.20 ± 0.04 b	0.46 ± 0.13 ab	0.20 ± 0.03 b
Patescibacteria	0.00 ± 0.00 a	0.00 ± 0.00 a	0.00 ± 0.00 a	0.00 ± 0.00 a	0.00 ± 0.00 a	0.00 ± 0.00 a

Tabla A4. Evolución a nivel de género de la abundancia relativa para cada voluntario en los distintos tiempos de toma de muestra (0h, 24h, 48h) en respuesta al VBA y VBD. Los datos se expresan en forma de media y desviación estándar en %.

Voluntario I	VBA*0h	VBD*0h	VBA*24h	VBD*24h	VBA*48h	VBD*48h
<i>Escherichia-Shigella</i>	0.60 ± 0.06 d	0.86 ± 0.07 d	25.47 ± 1.50 c	30.83 ± 5.66 b	29.80 ± 2.48 b	34.15 ± 4.50 a
<i>Collinsella</i>	2.44 ± 0.16 a	2.31 ± 0.19 a	2.85 ± 0.19 a	2.15 ± 0.28 a	2.13 ± 0.15 a	1.48 ± 0.62 a
<i>Bifidobacterium</i>	0.34 ± 0.03 d	0.36 ± 0.04 d	1.02 ± 0.04 b	0.67 ± 0.09 c	1.60 ± 0.09 a	0.86 ± 0.05 c
<i>Enterococcus</i>	0.01 ± 0.02 b	0.00 ± 0.00 b	0.71 ± 0.16 a	0.78 ± 0.15 a	1.18 ± 0.22 a	1.07 ± 0.19 a
<i>Bacteroides</i>	15.84 ± 0.26 a	16.31 ± 0.65 a	15.02 ± 0.67 a	10.84 ± 0.54 c	12.57 ± 0.08 b	12.04 ± 1.61 bc
<i>Agathobacter</i>	13.38 ± 0.32 a	13.07 ± 0.42 a	1.87 ± 0.42 b	1.20 ± 0.31 bc	0.75 ± 0.14 c	0.70 ± 0.25 c
<i>Streptococcus</i>	2.75 ± 0.07 b	2.84 ± 0.16 b	2.71 ± 0.13 b	2.53 ± 0.16 b	3.40 ± 0.18 a	2.33 ± 0.50 b
<i>Fusicatenibacter</i>	5.84 ± 0.09 a	5.38 ± 0.34 a	1.01 ± 0.09 b	0.75 ± 0.06 c	0.55 ± 0.03 d	0.61 ± 0.07 cd
<i>Alistipes</i>	1.70 ± 0.06 a	1.69 ± 0.13 a	2.32 ± 0.27 a	2.62 ± 0.39 a	1.92 ± 0.11 a	2.32 ± 0.22 a
<i>Dorea</i>	3.46 ± 0.16 ab	3.71 ± 0.13 ab	4.13 ± 0.59 a	1.29 ± 1.10 bc	0.71 ± 0.21 c	0.42 ± 0.46 c
<i>Blautia</i>	4.90 ± 0.37 a	5.21 ± 0.21 a	1.65 ± 0.09 b	1.30 ± 0.22 bc	1.20 ± 0.15 c	1.08 ± 0.23 c
<i>Faecalibacterium</i>	6.87 ± 0.14 a	6.68 ± 0.28 a	2.05 ± 0.55 b	2.22 ± 0.83 b	1.50 ± 0.42 b	1.73 ± 0.37 b
<i>Phascolarctobacterium</i>	1.56 ± 0.04 b	1.56 ± 0.12 b	2.46 ± 0.38 ab	3.09 ± 0.04 a	0.49 ± 0.19 c	1.92 ± 0.16 b
<i>Ruminococcus</i>	8.62 ± 0.48 a	8.55 ± 0.22 a	3.44 ± 0.27 b	2.37 ± 0.27 c	4.04 ± 0.41 b	2.42 ± 0.29 c
<i>Klebsiella</i>	0.00 ± 0.00 b	0.00 ± 0.01 b	0.03 ± 0.02 b	5.36 ± 0.88 a	0.00 ± 0.01 b	4.37 ± 2.17 a
<i>Oscillibacter</i>	0.30 ± 0.03 b	0.29 ± 0.04 b	1.48 ± 0.49 ab	0.94 ± 0.41 ab	2.43 ± 0.65 a	1.59 ± 0.16 a
<i>Parabacteroides</i>	0.41 ± 0.04 c	0.49 ± 0.03 c	1.30 ± 0.05 b	1.09 ± 0.14 b	2.04 ± 0.18 a	1.51 ± 0.16 b
<i>Gemmiger</i>	2.10 ± 0.07 a	2.00 ± 0.06 a	0.63 ± 0.04 bc	0.46 ± 0.05 d	0.80 ± 0.08 b	0.53 ± 0.08 cd
<i>Bilophia</i>	0.32 ± 0.03 c	0.31 ± 0.05 c	1.78 ± 0.14 b	1.94 ± 0.15 b	2.41 ± 0.05 a	2.64 ± 0.25 a
<i>Clostridium</i>	0.06 ± 0.01 c	0.05 ± 0.01 c	1.93 ± 0.64 b	5.29 ± 2.05 a	0.19 ± 0.06 c	0.93 ± 0.27 c
<i>Enterocloster</i>	0.17 ± 0.02 b	0.15 ± 0.03 b	3.22 ± 0.34 a	5.05 ± 1.92 a	3.35 ± 0.12 a	6.14 ± 1.16 a
<i>Anaerobutyricum</i>	0.57 ± 0.13 a	0.51 ± 0.08 a	0.07 ± 0.02 b	0.04 ± 0.01 b	0.05 ± 0.01 b	0.02 ± 0.02 b
<i>Coprococcus</i>	2.27 ± 0.12 a	2.22 ± 0.04 a	0.67 ± 0.07 b	0.47 ± 0.03 c	0.61 ± 0.03 b	0.41 ± 0.12 c
<i>Parasutterella</i>	0.13 ± 0.02 b	0.14 ± 0.01 b	2.71 ± 0.59 a	1.81 ± 0.31 a	2.64 ± 0.60 a	1.69 ± 0.23 a
<i>Lachnoclostridium</i>	0.31 ± 0.05 c	0.31 ± 0.05 c	0.83 ± 0.09 ab	0.58 ± 0.12 bc	0.94 ± 0.05 a	0.80 ± 0.28 abc
<i>Ruthenibacterium</i>	0.02 ± 0.01 c	0.01 ± 0.01 c	0.37 ± 0.07 b	0.34 ± 0.06 b	0.69 ± 0.03 a	0.42 ± 0.05 b
<i>Erysipelotrichaceae UCG-003</i>	1.53 ± 0.10 a	1.60 ± 0.11 a	0.46 ± 0.06 bc	0.37 ± 0.06 bc	0.47 ± 0.03 b	0.36 ± 0.03 c
<i>Flavonifractor</i>	0.03 ± 0.01 c	0.04 ± 0.00 c	0.41 ± 0.12 ab	0.33 ± 0.03 b	0.54 ± 0.05 a	0.38 ± 0.08 ab
UCG-002	1.73 ± 0.13 a	1.73 ± 0.09 a	0.52 ± 0.19 b	0.83 ± 0.52 ab	1.25 ± 0.82 ab	1.19 ± 0.52 ab
<i>Mediterraneibacter</i>	1.46 ± 0.05 a	1.52 ± 0.04 a	0.54 ± 0.16 b	0.44 ± 0.30 b	0.35 ± 0.02 b	0.14 ± 0.06 b
<i>Roseburia</i>	2.68 ± 0.09 a	2.63 ± 0.10 a	0.00 ± 0.00 b	0.00 ± 0.00 b	0.00 ± 0.00 b	0.00 ± 0.00 b
<i>Sutterella</i>	0.47 ± 0.03 a	0.46 ± 0.04 a	0.92 ± 0.40 a	1.13 ± 0.45 a	1.20 ± 0.55 a	0.93 ± 0.28 a
<i>Sellimonas</i>	0.00 ± 0.00 d	0.00 ± 0.00 e	0.76 ± 0.04 b	0.24 ± 0.08 c	1.74 ± 0.12 a	0.67 ± 0.16 b
<i>Senegalimassilia</i>	0.67 ± 0.04 a	0.61 ± 0.05 ab	0.35 ± 0.01 c	0.29 ± 0.02 d	0.51 ± 0.03 b	0.34 ± 0.10 cd
<i>[Ruminococcus] gauvreauii group</i>	0.60 ± 0.01 a	0.57 ± 0.05 a	0.05 ± 0.01 b	0.04 ± 0.03 bc	0.00 ± 0.01 c	0.00 ± 0.00 c
<i>Akkermansia</i>	0.05 ± 0.00 c	0.06 ± 0.02 c	0.65 ± 0.02 a	0.34 ± 0.08 b	0.53 ± 0.06 ab	0.32 ± 0.10 bc
<i>Lachnospiraceae NK4A136 group</i>	0.68 ± 0.03 a	0.67 ± 0.02 a	0.03 ± 0.02 b	0.02 ± 0.02 b	0.00 ± 0.00 b	0.00 ± 0.00 b
<i>Holdemanella</i>	1.01 ± 0.06 a	1.01 ± 0.09 a	0.68 ± 0.13 ab	0.38 ± 0.11 b	1.11 ± 0.19 a	0.47 ± 0.09 b
<i>Massilibrevotella</i>	0.99 ± 0.01 a	0.95 ± 0.05 a	0.00 ± 0.01 b	0.01 ± 0.01 b	0.00 ± 0.00 b	0.00 ± 0.01 b
<i>Lachnospira</i>	1.02 ± 0.07 a	1.09 ± 0.08 a	0.23 ± 0.03 b	0.20 ± 0.01 b	0.16 ± 0.03 b	0.16 ± 0.04 b
<i>Intestinimonas</i>	0.08 ± 0.02 c	0.09 ± 0.01 c	0.45 ± 0.04 b	0.27 ± 0.10 bc	0.73 ± 0.06 a	0.39 ± 0.15 bc
<i>Extibacter</i>	0.00 ± 0.00 e	0.00 ± 0.00 f	0.32 ± 0.02 b	0.10 ± 0.03 d	0.56 ± 0.08 a	0.22 ± 0.04 c
<i>Lachnospiraceae UCG-010</i>	0.15 ± 0.01 c	0.15 ± 0.01 c	0.52 ± 0.12 ab	0.76 ± 0.12 a	0.32 ± 0.07 bc	0.23 ± 0.10 bc
<i>Veillonella</i>	0.06 ± 0.02 c	0.06 ± 0.01 c	1.74 ± 0.41 a	0.62 ± 0.18 b	0.31 ± 0.13 bc	0.23 ± 0.08 bc
<i>Colidextribacter</i>	0.06 ± 0.01 b	0.06 ± 0.02 b	0.70 ± 0.21 a	0.22 ± 0.06 ab	0.45 ± 0.06 a	0.07 ± 0.01 b
<i>Megasphaera</i>	0.00 ± 0.00 a	0.00 ± 0.00 a	0.01 ± 0.01 a	0.03 ± 0.01 a	0.00 ± 0.00 a	0.71 ± 0.82 a

Tabla A4. (Continuación). Evolución a nivel de género de la abundancia relativa para cada voluntario en los distintos tiempos de toma de muestra (0h, 24h, 48h) en respuesta al VBA y VBD. Los datos se expresan en forma de media y desviación estándar en %.

Voluntario 2	VBA*0h	VBD*0h	VBA*24h	VBD*24h	VBA*48h	VBD*48h
<i>Escherichia-Shigella</i>	0.13 ± 0.02 c	0.21 ± 0.04 c	8.67 ± 0.49 a	6.98 ± 1.35 a	2.02 ± 0.24 b	7.39 ± 1.80 a
<i>Collinsella</i>	4.13 ± 0.10 b	3.90 ± 0.34 b	4.75 ± 0.28 b	1.32 ± 0.57 c	5.78 ± 0.09 a	0.95 ± 0.46 c
<i>Bifidobacterium</i>	20.73 ± 0.65 a	19.85 ± 0.45 a	20.25 ± 1.19 a	7.96 ± 0.30 c	18.36 ± 0.35 b	6.83 ± 1.71 c
<i>Enterococcus</i>	0.25 ± 0.04 e	0.39 ± 0.03 d	5.86 ± 0.55 b	3.08 ± 0.84 c	10.75 ± 0.61 a	5.03 ± 1.34 bc
<i>Bacteroides</i>	6.12 ± 0.27 d	7.80 ± 0.30 c	11.13 ± 0.36 a	6.47 ± 0.26 d	9.16 ± 0.24 b	8.89 ± 0.76 bc
<i>Agathobacter</i>	0.69 ± 0.04 a	0.90 ± 0.11 a	0.11 ± 0.01 b	0.06 ± 0.02 c	0.12 ± 0.01 b	0.08 ± 0.02 bc
<i>Streptococcus</i>	0.15 ± 0.01 c	0.20 ± 0.05 c	0.90 ± 0.15 a	0.35 ± 0.08 bc	1.01 ± 0.12 a	0.36 ± 0.02 b
<i>Fuscatenibacter</i>	2.17 ± 0.14 a	2.13 ± 0.03 a	0.40 ± 0.05 b	0.25 ± 0.01 c	0.34 ± 0.03 b	0.18 ± 0.04 c
<i>Alistipes</i>	2.08 ± 0.06 c	2.22 ± 0.08 c	4.35 ± 0.15 b	2.31 ± 0.12 c	5.31 ± 0.16 a	4.08 ± 0.15 b
<i>Dorea</i>	3.03 ± 0.08 c	2.92 ± 0.03 c	1.51 ± 0.06 d	20.79 ± 2.01 a	0.41 ± 0.07 e	8.67 ± 0.44 b
<i>Blautia</i>	9.65 ± 0.04 a	8.51 ± 0.49 a	3.53 ± 0.38 b	1.55 ± 0.15 c	3.33 ± 0.12 b	1.28 ± 0.25 c
<i>Faecalibacterium</i>	12.67 ± 0.38 a	11.91 ± 0.38 a	2.09 ± 0.12 b	1.95 ± 0.24 b	1.60 ± 0.13 b	2.10 ± 0.38 b
<i>Ruminococcus</i>	0.00 ± 0.00 a	0.06 ± 0.05 a	0.01 ± 0.01 a	0.16 ± 0.18 a	0.02 ± 0.01 a	4.93 ± 2.25 a
<i>Klebsiella</i>	0.00 ± 0.00 e	0.00 ± 0.00 d	1.15 ± 0.01 b	28.24 ± 1.31 a	0.67 ± 0.10 c	26.64 ± 1.03 a
<i>Oscillibacter</i>	0.14 ± 0.02 d	0.17 ± 0.03 d	1.42 ± 0.09 a	0.49 ± 0.04 c	0.48 ± 0.01 c	0.80 ± 0.08 b
<i>Parabacteroides</i>	2.10 ± 0.05 d	2.39 ± 0.13 d	5.21 ± 0.33 b	2.72 ± 0.40 d	7.53 ± 0.25 a	4.12 ± 0.32 c
<i>Gemmiger</i>	0.88 ± 0.01 a	0.92 ± 0.07 a	0.39 ± 0.02 b	0.10 ± 0.02 d	0.49 ± 0.04 b	0.25 ± 0.03 c
<i>Bilophila</i>	0.00 ± 0.00 d	0.00 ± 0.00 d	1.39 ± 0.16 b	0.48 ± 0.23 cd	3.32 ± 0.15 a	0.86 ± 0.18 c
<i>Clostridium</i>	0.07 ± 0.01 b	0.06 ± 0.03 bc	0.01 ± 0.01 c	1.20 ± 0.21 a	0.01 ± 0.01 c	0.01 ± 0.01 c
<i>Enterocloster</i>	0.61 ± 0.02 d	0.61 ± 0.07 d	3.23 ± 0.16 a	1.53 ± 0.06 c	2.56 ± 0.07 b	1.50 ± 0.12 c
<i>Dialister</i>	3.06 ± 0.15 a	2.96 ± 0.18 a	0.48 ± 0.04 c	0.78 ± 0.08 b	0.23 ± 0.03 d	0.37 ± 0.08 cd
<i>Parasutterella</i>	0.91 ± 0.02 d	0.92 ± 0.04 d	5.07 ± 0.09 b	2.51 ± 0.15 c	6.56 ± 0.14 a	2.88 ± 0.13 c
<i>Lachnoclostridium</i>	0.38 ± 0.02 b	0.44 ± 0.04 b	1.14 ± 0.09 a	0.14 ± 0.01 c	1.70 ± 0.22 a	0.16 ± 0.01 c
<i>Erysipelotrichaceae</i> UCG-003	0.93 ± 0.05 a	0.93 ± 0.07 a	0.07 ± 0.02 b	0.04 ± 0.01 bc	0.11 ± 0.03 b	0.02 ± 0.01 c
<i>Anaerostipes</i>	1.62 ± 0.03 a	1.41 ± 0.10 a	0.01 ± 0.02 b	0.01 ± 0.01 b	0.00 ± 0.00 b	0.00 ± 0.00 b
<i>Flavonifractor</i>	0.05 ± 0.01 e	0.04 ± 0.01 e	1.04 ± 0.03 b	0.35 ± 0.03 d	1.71 ± 0.09 a	0.53 ± 0.03 c
UCG-002	1.30 ± 0.07 a	1.26 ± 0.03 a	0.37 ± 0.05 b	0.18 ± 0.03 c	0.54 ± 0.08 b	0.35 ± 0.10 bc
<i>Seggella</i>	15.12 ± 0.10 a	15.69 ± 0.43 a	0.67 ± 0.03 b	0.79 ± 0.15 b	0.06 ± 0.02 b	2.54 ± 2.10 b
<i>Sellimonas</i>	0.28 ± 0.04 c	0.30 ± 0.05 c	1.43 ± 0.02 a	0.20 ± 0.03 c	1.26 ± 0.06 b	0.19 ± 0.07 c
<i>Barnesiella</i>	0.50 ± 0.01 a	0.54 ± 0.07 a	0.51 ± 0.01 a	0.36 ± 0.03 b	0.54 ± 0.02 a	0.55 ± 0.03 a
<i>Faecalimonas</i>	0.09 ± 0.01 c	0.08 ± 0.01 c	0.68 ± 0.03 a	0.48 ± 0.05 b	0.53 ± 0.06 b	0.20 ± 0.15 bc
<i>Intestinimonas</i>	0.23 ± 0.02 b	0.23 ± 0.02 b	0.90 ± 0.02 a	0.39 ± 0.10 b	0.66 ± 0.11 ab	0.82 ± 0.23 ab

Tabla A4. (Continuación). Evolución a nivel de género de la abundancia relativa para cada voluntario en los distintos tiempos de toma de muestra (0h, 24h, 48h) en respuesta al VBA y VBD. Los datos se expresan en forma de media y desviación estándar en %.

Voluntario 3	VBA*0h	VBD*0h	VBA*24h	VBD*24h	VBA*48h	VBD*48h
<i>Escherichia-Shigella</i>	3.14 ± 0.33 f	4.71 ± 0.31 e	31.70 ± 1.26 c	48.65 ± 1.55 b	20.13 ± 0.67 d	56.16 ± 1.75 a
<i>Collinsella</i>	2.99 ± 0.06 c	2.79 ± 0.05 c	4.80 ± 0.13 b	2.16 ± 0.26 cd	6.66 ± 0.05 a	1.88 ± 0.19 d
<i>Bifidobacterium</i>	2.47 ± 0.04 b	2.29 ± 0.10 bc	4.62 ± 0.12 a	2.13 ± 0.10 c	4.01 ± 0.35 a	0.75 ± 0.02 d
<i>Enterococcus</i>	0.11 ± 0.01 d	0.13 ± 0.01 d	3.38 ± 0.13 b	2.51 ± 0.09 c	5.36 ± 0.54 a	2.31 ± 0.20 c
<i>Bacteroides</i>	12.57 ± 0.22 a	12.12 ± 0.20 a	7.06 ± 0.38 b	3.79 ± 0.14 c	7.93 ± 0.30 b	3.46 ± 0.24 c
<i>Agathobacter</i>	6.89 ± 0.25 a	7.18 ± 0.20 a	0.13 ± 0.01 c	0.17 ± 0.02 b	0.02 ± 0.02 d	0.02 ± 0.02 d
<i>Fusicatenibacter</i>	5.51 ± 0.14 a	5.57 ± 0.03 a	0.97 ± 0.06 b	0.83 ± 0.03 b	0.62 ± 0.06 b	0.48 ± 0.05 b
<i>Alistipes</i>	2.83 ± 0.20 c	2.88 ± 0.05 c	3.91 ± 0.31 b	7.04 ± 0.37 a	6.68 ± 0.11 a	6.55 ± 0.45 a
<i>Dorea</i>	1.65 ± 0.08 a	1.60 ± 0.06 a	0.73 ± 0.06 b	1.06 ± 0.31 ab	0.27 ± 0.02 b	0.30 ± 0.13 b
<i>Blautia</i>	4.47 ± 0.16 a	4.58 ± 0.06 a	1.48 ± 0.15 c	0.85 ± 0.09 d	2.23 ± 0.26 b	0.68 ± 0.02 d
<i>Faecalibacterium</i>	18.62 ± 0.21 a	18.58 ± 0.27 a	4.11 ± 0.28 b	3.01 ± 0.19 c	3.02 ± 0.19 c	1.83 ± 0.26 d
<i>Phascolarctobacterium</i>	0.47 ± 0.05 c	0.48 ± 0.00 c	4.40 ± 0.11 b	6.30 ± 0.28 a	4.00 ± 0.53 b	4.58 ± 0.15 b
<i>Ruminococcus</i>	3.94 ± 0.10 a	3.69 ± 0.17 a	0.05 ± 0.01 b	0.10 ± 0.02 b	0.08 ± 0.06 b	0.06 ± 0.02 b
<i>Oscillibacter</i>	0.21 ± 0.04 c	0.19 ± 0.02 c	2.44 ± 0.11 a	1.39 ± 0.09 b	2.06 ± 0.31 ab	1.65 ± 0.14 b
<i>Parabacteroides</i>	1.19 ± 0.10 cd	1.16 ± 0.06 d	2.40 ± 0.18 a	1.42 ± 0.05 c	2.96 ± 0.23 a	1.82 ± 0.08 b
<i>Gemmiger</i>	0.97 ± 0.03 a	0.95 ± 0.02 a	0.31 ± 0.04 b	0.16 ± 0.04 c	0.42 ± 0.05 b	0.19 ± 0.04 c
<i>Clostridium</i>	0.20 ± 0.01 b	0.20 ± 0.01 b	0.10 ± 0.01 c	0.63 ± 0.07 a	0.07 ± 0.01 d	0.15 ± 0.03 bc
<i>Acidaminococcus</i>	0.04 ± 0.01 d	0.03 ± 0.01 d	2.50 ± 0.10 b	1.67 ± 0.11 c	5.34 ± 0.31 a	2.43 ± 0.11 b
<i>Enterocloster</i>	0.11 ± 0.01 b	0.13 ± 0.02 b	0.89 ± 0.05 a	1.20 ± 0.14 a	0.96 ± 0.09 a	1.09 ± 0.11 a
<i>Dialister</i>	0.87 ± 0.03 a	0.84 ± 0.10 a	0.15 ± 0.02 b	0.12 ± 0.02 b	0.15 ± 0.01 b	0.10 ± 0.01 b
<i>Coprococcus</i>	1.39 ± 0.12 a	1.33 ± 0.12 a	0.12 ± 0.02 b	0.03 ± 0.02 c	0.08 ± 0.03 bc	0.01 ± 0.01 c
<i>Parasutterella</i>	0.25 ± 0.03 d	0.22 ± 0.03 d	1.16 ± 0.07 b	0.65 ± 0.07 c	1.68 ± 0.07 a	0.84 ± 0.11 c
<i>Lachnoclostridium</i>	0.29 ± 0.06 c	0.33 ± 0.04 bc	1.13 ± 0.08 a	0.48 ± 0.07 b	1.25 ± 0.02 a	0.34 ± 0.05 bc
<i>Erysipelotrichaceae</i> UCG-003	0.93 ± 0.08 a	0.83 ± 0.02 a	0.20 ± 0.03 b	0.14 ± 0.01 b	0.26 ± 0.04 b	0.16 ± 0.03 b
<i>Flavonifractor</i>	0.02 ± 0.01 d	0.01 ± 0.01 d	0.39 ± 0.03 b	0.22 ± 0.04 c	0.55 ± 0.04 a	0.21 ± 0.03 c
UCG-002	1.48 ± 0.15 a	1.31 ± 0.08 a	0.34 ± 0.04 b	0.17 ± 0.04 c	0.30 ± 0.03 b	0.22 ± 0.05 bc
<i>Mediterraneibacter</i>	2.11 ± 0.06 a	2.12 ± 0.03 a	1.14 ± 0.05 b	0.44 ± 0.06 c	0.61 ± 0.06 c	0.17 ± 0.03 d
<i>Roseburia</i>	0.97 ± 0.05 a	0.97 ± 0.06 a	0.01 ± 0.01 b	0.01 ± 0.01 b	0.00 ± 0.00 b	0.00 ± 0.00 b
<i>Sutterella</i>	0.23 ± 0.02 d	0.22 ± 0.02 d	1.56 ± 0.05 ab	1.24 ± 0.18 bc	1.81 ± 0.19 a	1.23 ± 0.09 c
<i>Sellimonas</i>	0.01 ± 0.02 d	0.01 ± 0.01 d	0.93 ± 0.03 b	0.48 ± 0.03 c	1.32 ± 0.04 a	0.42 ± 0.09 c
<i>Faecalimonas</i>	0.05 ± 0.01 c	0.05 ± 0.01 c	0.50 ± 0.04 b	0.74 ± 0.06 a	0.04 ± 0.03 cd	0.01 ± 0.02 d
<i>Akkermansia</i>	0.08 ± 0.02 c	0.09 ± 0.01 bc	0.50 ± 0.04 a	0.19 ± 0.04 b	0.39 ± 0.11 ab	0.15 ± 0.03 bc
<i>Lachnospiraceae</i> NK4A136 group	2.35 ± 0.08 a	2.37 ± 0.09 a	0.27 ± 0.02 b	0.31 ± 0.07 b	0.28 ± 0.06 b	0.16 ± 0.02 b
<i>Turicibacter</i>	0.51 ± 0.04 a	0.52 ± 0.04 a	0.17 ± 0.02 b	0.09 ± 0.02 c	0.27 ± 0.04 b	0.08 ± 0.02 c
<i>Lachnospira</i>	0.71 ± 0.03 a	0.76 ± 0.04 a	0.08 ± 0.01 b	0.04 ± 0.02 bc	0.05 ± 0.03 bc	0.04 ± 0.01 c
<i>Intestinimonas</i>	0.09 ± 0.01 d	0.10 ± 0.02 d	0.60 ± 0.04 b	0.43 ± 0.02 c	0.89 ± 0.08 a	0.62 ± 0.05 b
[<i>Eubacterium</i>] <i>eligens</i> group	1.27 ± 0.07 a	1.30 ± 0.07 a	0.21 ± 0.03 bc	0.14 ± 0.03 c	0.26 ± 0.03 b	0.18 ± 0.02 c
Family XIII AD3011 group	0.18 ± 0.02 c	0.15 ± 0.04 c	0.64 ± 0.02 b	0.20 ± 0.04 c	0.73 ± 0.03 a	0.25 ± 0.03 c
<i>Extibacter</i>	0.13 ± 0.00 cd	0.09 ± 0.02 d	0.93 ± 0.04 a	0.31 ± 0.05 b	1.11 ± 0.10 a	0.24 ± 0.04 bc
<i>Lachnospiraceae</i> UCG-010	0.16 ± 0.01 b	0.14 ± 0.00 b	0.73 ± 0.05 a	0.71 ± 0.05 a	0.21 ± 0.01 b	0.53 ± 0.28 ab
<i>Christensenellaceae</i> R-7 group	0.75 ± 0.06 a	0.77 ± 0.01 a	0.25 ± 0.03 c	0.16 ± 0.03 d	0.47 ± 0.02 b	0.22 ± 0.02 cd

Tabla A5. Concentraciones medias detectadas (en mg/L) y desviación estándar de ácidos grasos de cadena corta y media en los distintos tiempos de fermentación con VBA y VBD. Los datos se muestran para cada voluntario (V1, V2 y V3). En rosa se marcan los resultados que presentan diferencias significativas respecto al tiempo anterior.

V1	VBA*0	VBD*0	VBA*24	VBD*24	VBA*48	VBD*48
Acético	172.46 ± 2.63 e	204.41 ± 20.91 e	1737.83 ± 137.86 c	2517.60 ± 265.47 b	2329.42 ± 166.19 b	3290.96 ± 126.53 a
Propiónico	31.91 ± 0.51 c	44.78 ± 6.27 c	667.68 ± 75.65 b	724.37 ± 93.16 b	756.74 ± 54.80 b	955.96 ± 13.24 a
Iso-Butírico	4.48 ± 0.18 e	4.80 ± 0.29 e	37.66 ± 4.10 b	18.07 ± 2.03 c	85.26 ± 4.58 a	47.63 ± 2.06 b
Butírico	30.24 ± 1.51 b	34.59 ± 3.44 b	233.81 ± 6.16 a	226.10 ± 24.96 a	272.48 ± 61.01 a	330.74 ± 50.45 a
2-metil-butirato	2.26 ± 0.14 e	2.80 ± 0.38 e	39.91 ± 4.61 b	21.13 ± 1.44 c	66.74 ± 5.39 a	43.43 ± 0.71 b
Iso-Valérico	1.73 ± 0.11 e	2.22 ± 0.27 e	28.11 ± 3.68 b	11.18 ± 1.59 c	54.67 ± 4.91 a	31.37 ± 3.06 b
Valérico	3.69 ± 0.19 c	4.10 ± 0.50 c	31.84 ± 29.00 bc	15.95 ± 11.86 c	141.34 ± 13.48 a	102.4 ± 11.08 b
Iso-caproico	0.00 ± 0.00 c	0.00 ± 0.00 c	2.41 ± 0.60 b	5.28 ± 1.44 ab	2.86 ± 0.20 b	6.40 ± 0.95 a
Caproico	4.98 ± 0.19 a	5.75 ± 0.46 a	5.31 ± 0.55 a	4.79 ± 0.64 a	6.24 ± 0.63 a	6.24 ± 0.53 a
Caprílico	0.50 ± 0.04 a	0.68 ± 0.04 a	0.44 ± 0.04 a	0.50 ± 0.04 a	0.59 ± 0.04 a	1.11 ± 0.63 a
V2	VBA*0	VBD*0	VBA*24	VBD*24	VBA*48	VBD*48
Acético	245 ± 17.63 d	267.17 ± 5.91 d	1921.84 ± 64.91 b	2983.41 ± 335.40 a	1684.49 ± 260.47 b	3452.32 ± 71.86 a
Propiónico	33.04 ± 1.45 e	39.71 ± 1.90 d	516.21 ± 3.84 ab	513.85 ± 10.69 ab	428.04 ± 59.58 b	657.91 ± 64.30 a
Iso-Butírico	3.79 ± 0.19 b	3.72 ± 0.13 b	74.16 ± 1.63 a	61.31 ± 14.50 a	62.86 ± 9.82 a	76.40 ± 5.38 a
Butírico	14.04 ± 0.92 d	14.34 ± 0.20 d	331.83 ± 5.76 b	378.98 ± 27.06 ab	268.31 ± 42.40 b	457.83 ± 34.21 a
2-metil-butirato	1.68 ± 0.09 b	1.79 ± 0.06 b	51.92 ± 0.40 a	44.71 ± 11.01 a	43.81 ± 6.26 a	53.64 ± 5.33 a
Iso-Valérico	1.25 ± 0.14 b	1.11 ± 0.06 b	46.04 ± 0.28 a	36.96 ± 9.43 a	39.13 ± 5.65 a	43.5 ± 5.93 a
Valérico	2.18 ± 0.06 b	2.31 ± 0.10 b	59.32 ± 3.05 b	92.53 ± 36.36 ab	57.66 ± 5.10 b	131.05 ± 2.47 a
Iso-caproico	0.00 ± 0.00 a	0.00 ± 0.00 a	1.88 ± 0.12 a	1.92 ± 0.62 a	1.45 ± 0.37 a	2.41 ± 1.15 a
Caproico	0.86 ± 0.13 b	0.97 ± 0.06 b	1.21 ± 0.05 b	1.62 ± 0.52 ab	0.87 ± 0.16 b	2.57 ± 0.09 a
Caprílico	0.46 ± 0.08 bc	0.54 ± 0.03 b	0.31 ± 0.06 c	0.36 ± 0.06 c	0.27 ± 0.03 c	1.35 ± 0.09 a
V3	VBA*0	VBD*0	VBA*24	VBD*24	VBA*48	VBD*48
Acético	224.38 ± 22.20 e	234.97 ± 5.79 e	1588.54 ± 99.15 c	2499.72 ± 249.84 ab	2102.20 ± 56.28 b	2818.87 ± 124.68 a
Propiónico	29.16 ± 5.25 e	35.05 ± 0.74 e	630.32 ± 54.06 b	941.72 ± 109.61 a	719.83 ± 58.85 ab	469.73 ± 35.06 c
Iso-Butírico	4.93 ± 0.27 e	4.96 ± 0.13 e	19.71 ± 1.69 c	23.10 ± 2.34 c	33.93 ± 3.05 b	46.42 ± 2.16 a
Butírico	20.41 ± 1.44 c	21.48 ± 0.40 c	199.83 ± 16.02 a	257.40 ± 21.30 a	237.96 ± 7.08 a	217.62 ± 11.27 a
2-metil-butirato	2.68 ± 0.10 d	2.81 ± 0.10 d	23.43 ± 1.86 b	26.24 ± 2.73 b	40.94 ± 4.80 a	46.34 ± 1.11 a
Iso-Valérico	1.80 ± 0.12 d	1.99 ± 0.09 d	12.93 ± 0.91 b	13.21 ± 1.47 b	23.79 ± 2.97 a	25.55 ± 0.38 a
Valérico	3.62 ± 0.16 d	3.79 ± 0.15 d	115.39 ± 9.49 b	128.93 ± 11.76 b	187.21 ± 42.73 b	357.61 ± 10.05 a
Iso-caproico	0.00 ± 0.00 d	0.00 ± 0.00 d	2.61 ± 0.15 c	6.84 ± 0.41 a	3.24 ± 0.10 b	7.76 ± 0.54 a
Caproico	6.08 ± 0.25 b	6.40 ± 0.23 b	10.48 ± 1.56 b	17.68 ± 0.35 b	61.06 ± 46.56 b	349.92 ± 3.88 a
Caprílico	1.13 ± 0.09 b	1.32 ± 0.05 b	0.79 ± 0.05 b	0.91 ± 0.14 b	2.18 ± 1.33 b	34.76 ± 2.77 a

Tabla A6. Concentraciones de amonio (en mg/L y mg totales) y desviación estándar detectados en los distintos tiempos de fermentación en presencia de VBA y VBD. Los datos se muestran para cada voluntario por separado (V1,V2,V3). En rosa se marcan los resultados que presentan diferencias significativas entre presencia de VBA y VBD para el mismo tiempo.

V1	VBA*0h	VBD*0h	VBA*24h	VBD*24h	VBA*48h	VBD*48h
Amonio (mg/L)	28.15 ± 5.51 c	29.24 ± 2.20 c	146.35 ± 8.03 ab	125.56 ± 6.59 b	153.37 ± 6.55 a	129.26 ± 1.30 b
Amonio (mg)	1.62 ± 0.24 c	1.75 ± 0.13 c	7.61 ± 0.42 a	6.53 ± 0.34 ab	6.90 ± 0.29 a	5.82 ± 0.06 b
V2	VBA*0h	VBD*0h	VBA*24h	VBD*24h	VBA*48h	VBD*48h
Amonio (mg/L)	22.19 ± 1.95 c	26.37 ± 2.14 c	200.03 ± 12.23 a	144.90 ± 12.90 b	212.83 ± 6.50 a	120.86 ± 2.86 b
Amonio (mg)	1.33 ± 0.12 d	1.58 ± 0.13 d	10.40 ± 0.64 a	7.54 ± 0.63 b	9.58 ± 0.29 a	5.44 ± 0.13 c
V3	VBA*0h	VBD*0h	VBA*24h	VBD*24h	VBA*48h	VBD*48h
Amonio (mg/L)	23.55 ± 2.26 c	25.89 ± 1.68	204.56 ± 9.12 a	142.31 ± 16.83 b	154.58 ± 5.37 b	147.69 ± 4.40 b
Amonio (mg)	1.41 ± 0.14 c	1.55 ± 0.10 c	10.64 ± 0.47 a	7.40 ± 0.87 b	6.96 ± 0.24 b	6.65 ± 0.20 b

Figura A2. Cambios en los índices de alpha-diversidad durante la fermentación colónica en presencia de VBA y VBD para los tres voluntarios. A) Voluntario 1. B) Voluntario 2. C) Voluntario 3.

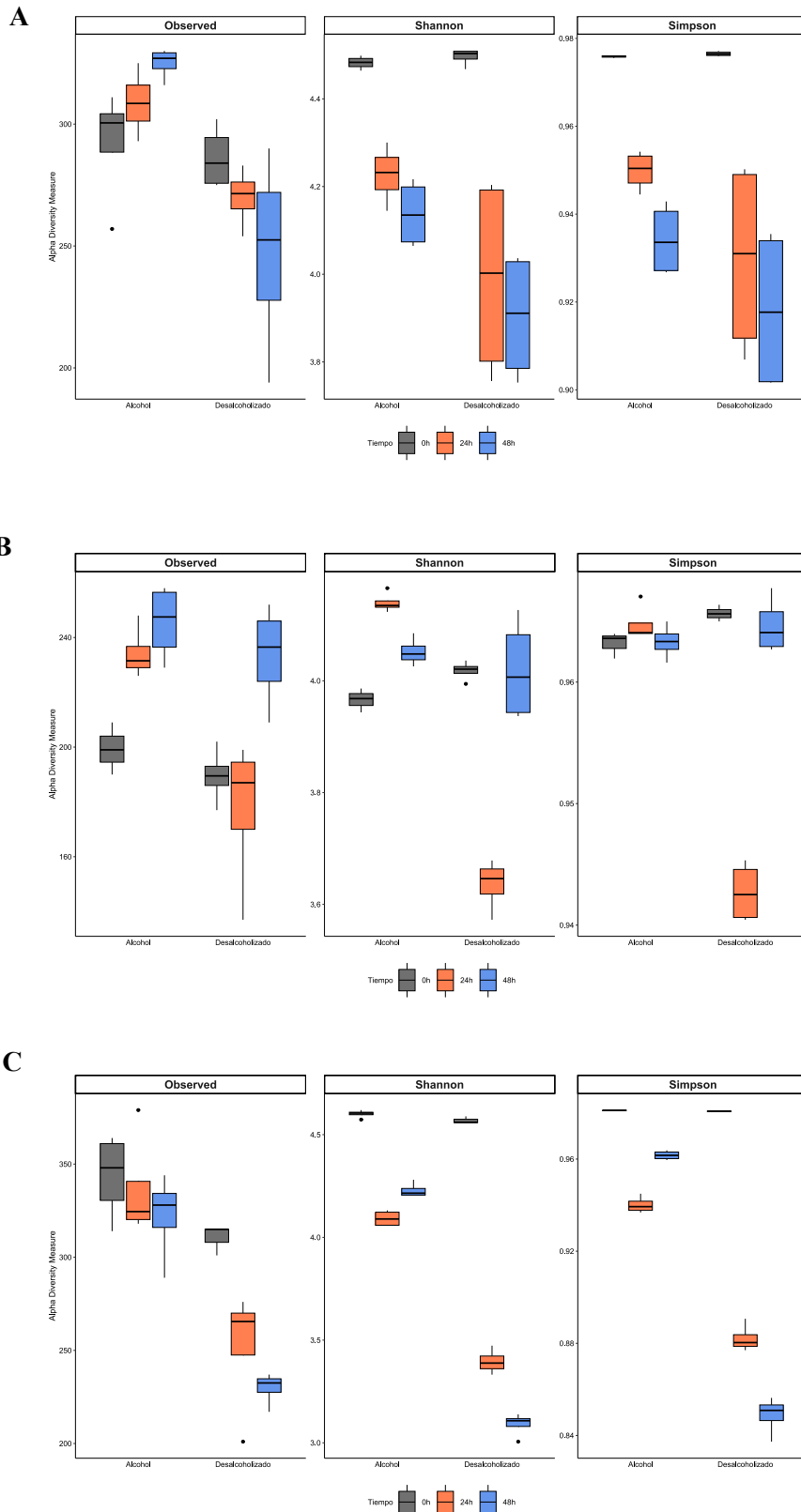


Figura A3. Cambios en los índices de beta-diversidad (representados por NMDS) durante la fermentación colónica en presencia de VBA y VBD para los tres voluntarios. A) Voluntario 1. B) Voluntario 2. C) Voluntario 3.

