

# XIX CONGRESO NACIONAL DE MICROBIOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS

## AVANCES EN MICROBIOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS 2014

Santiago Condón, Diego García, Pilar Mañas, Javier Raso,  
Rafael Pagán e Ignacio Álvarez (Eds.)



1542

**Universidad**  
Zaragoza



© Los autores

Ilustración de la cubierta: Ignacio Álvarez Lanzarote

ISBN: 978-84-941181-7-3

Impreso en España

Imprime y edita: Gráficas Vela, S.L. | Reino · 38 | 50003 · Zaragoza

D.L.: Z-1336-2014

# Detección y cuantificación de células viables de *Brettanomyces bruxellensis* en vino por PMA-qPCR

Verónica Santos, Isabel Pardo y Sergi Ferrer

ENOLAB /ERI BioTecMed / IViSoCa Universitat de València, España  
 Verónica.Soares-Santos@uv.es; Sergi.Ferrer@uv.es

La contaminación del vino por *Brettanomyces* es actualmente uno de los problemas con mayor relieve en el sector enológico ya que se considera que la presencia de esta levadura conlleva el detrimento de las características organolépticas del vino. Los métodos microbiológicos clásicos para el recuento de células viables en mosto y en vino requieren al menos de 10 días. En el presente estudio, se ha desarrollado un método rápido y fiable para detectar y cuantificar células viables de *Brettanomyces bruxellensis* por la incorporación de monoazida de propidio (PMA) a la técnica de PCR cuantitativa: PMA-qPCR. Los ensayos realizados confirman que esta metodología es muy rápida, robusta y reproducible.

## INTRODUCCIÓN

*Brettanomyces bruxellensis* es una levadura contaminante aislada del vino y otras bebidas alcohólicas (Deak y col., 1996). En la industria vinícola esta descrita como la principal levadura responsable de la formación de fenoles volátiles en el vino y además contribuye a la producción de aminas biógenas (Chatonnet y col., 1992 y Caruso y col., 2002).

Los métodos tradicionales para identificar estas levaduras se basan en técnicas de cultivo en placa, que tienen el inconveniente de ser tediosas y de conducir a resultados inconsistentes, debido principalmente a la dependencia de la condición fisiológica de los microorganismos (Divol y col., 2005). Para la detección selectiva de células vivas, se utilizan agentes intercalantes del DNA como la monoazida de propidio (PMA) para tratar la muestra previamente a la PCR cuantitativa (PMA-qPCR) (Rawsthorne y col., 2009 y Elizaquível y col., 2012). Por esta razón nos hemos propuesto utilizar la técnica de PMA-qPCR para detectar y enumerar células vivas y totales de *B. bruxellensis* en muestras de vino, con la intención de poder realizar un rápido y eficiente control de posibles alteraciones.

## MATERIAL Y MÉTODOS

**Cepas utilizadas y preparación de las suspensiones celulares.** La cepa de *B. bruxellensis* DSMZ 70726 se cultivó hasta obtener una concentración final de  $1 \times 10^8$  células/mL en vino blanco y tinto previamente filtrados.

**Tratamiento con PMA.** Se utilizó una solución de PMA (Biotium) 20 Mm en dimetilsulfóxido (DMSO) (Panreac). El PMA se añadió a las diferentes suspensiones celulares a una concentración de 6  $\mu$ M. Las muestras se incubaron en oscuridad durante 10 min y a continuación se fotoactivaron con PhAST Blue (GenIUL) durante 15 min.

**Extracción de DNA.** La extracción de DNA de las suspensiones celulares se realizó con el kit de extracción Ultra Clean® Microbial DNA Isolation Kit (MO BIO).

**PCR Cuantitativa.** Se utilizaron los cebadores DBRUXF DBRUXR descritos por Phister y Miles (2003). La mezcla de reacción (20  $\mu$ L) contenía 0,2  $\mu$ M de cada cebador, 1 Hot FIREPol EvaGreen qPCR Mix Plus (Solis BioDyne) 2  $\mu$ L del DNA extraído. Para la amplificación se usó un termociclador C100™ Thermal Cycler, CFX96™ RealTime System (BioRad) con las siguientes condiciones: 50 °C durante 2 min, 95 °C durante 15 min, 39 ciclos de amplificación de 95 °C durante 30 s y 60 °C durante 1 min terminando con 60 °C durante 5 s y 95 °C durante 5 s. Las amplificaciones se realizaron por triplicado. Los valores de *cycle threshold* (Ct) se calcularon mediante el software BioRadCFX Manager (versión 2.1; BioRad).

**Construcción de rectas patrón.** A partir de los cultivos en vinos blanco y tinto filtrados, se realizaron diluciones seriadas para conseguir concentraciones de células vivas desde  $1 \times 10^2$  hasta  $1 \times 10^8$  células/mL. Algunas suspensiones realizadas del mismo modo se trataron a 100 °C durante 5 min para la obtención de células muertas. Todas las suspensiones se amplificaron mediante PMA-qPCR y construyeron rectas patrón.

**Aplicación de qPCR y PMA-qPCR en vinos reales.** Se inoculó la cepa de *B. bruxellensis* DSMZ 70726 en vinos reales tintos con 13 y 15 % de etanol (v/v) esterilizados por filtración, y se incubaron a 20 °C a lo largo de 20 días. Se evaluó la cinética de crecimiento de la levadura mediante recuento de totales y viables, usando las técnicas de qPCR PMA-qPCR respectivamente.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Comprobación de la validez del método.

Se evaluó la validez de la técnica de PMA-qPCR para identificar y cuantificar tanto células vivas como muertas de *B. bruxellensis* en muestras de vino blanco y tinto. Para ello, se construyeron rectas patrón aplicando esta técnica a suspensiones celulares

diferentes concentraciones de células, tanto vivas como muertas, y obteniendo el respectivo valor de Ct para las mismas (Figura 1).

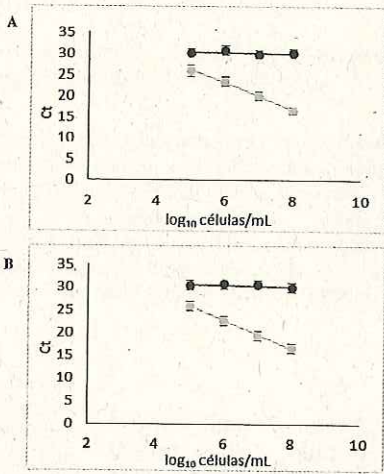


Figura 1 Rectas patrón generadas para evaluar la validez de la cuantificación de células vivas (puntos grises) y muertas (puntos negro) de *B. bruxellensis*, mediante PMA-qPCR, en vino blanco (A) y tinto (B). Los valores de Ct corresponden a la media de las 3 réplicas realizadas.

Para todas las suspensiones de células muertas, se obtuvo un Ct muy próximo a 30 (similar al obtenido para el control negativo), lo que indicó ausencia de amplificación en las mismas. Sin embargo, los valores de Ct para las diferentes suspensiones de células vivas oscilaron entre 15 y 27, obteniéndose una linealidad adecuada ( $R^2=0,99$ ) en la cuantificación de concentraciones celulares entre  $1 \times 10^5$  y  $1 \times 10^8$  células/mL, tanto para vino blanco como tinto.

Por tanto, las rectas patrón obtenidas para ambos tipos de vino confirman la posibilidad de discriminar entre células vivas y muertas mediante PMA-qPCR, y además demostraron que permiten una buena cuantificación entre  $1 \times 10^5$  y  $1 \times 10^8$  células/mL directamente en vino.

### Cinética de crecimiento de *B. bruxellensis* en vinos reales.

Las cinéticas de crecimiento obtenidas mediante qPCR y PMA-qPCR (Figura 2) revelaron que la concentración de células totales era superior a la de células viables en todos los casos. El crecimiento de *B. bruxellensis* resultó mayor en el vino con 13% de etanol que en el vino con 15%. En el vino con 13% la levadura comenzó a crecer a partir del tercer día mientras que en el vino con 15% no lo hizo hasta el noveno día. Además, en el vino con 13 °C la levadura logró alcanzar una población final diez veces mayor

que en el vino con 15% para el tiempo de incubación establecido.

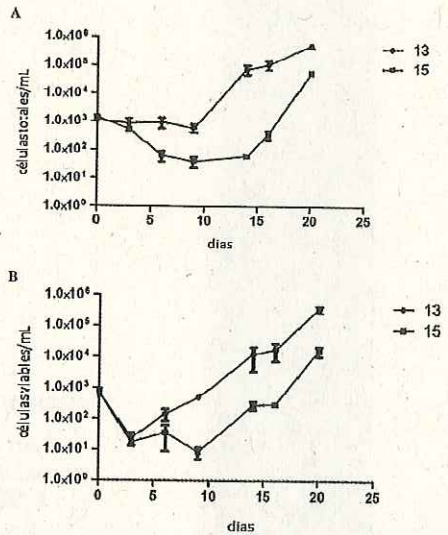


Figura 2 Cinética de crecimiento de *B. bruxellensis* en vino tinto con 13% y 15% de etanol (v/v), observada mediante qPCR (células totales) (A) y PMA-qPCR (células viables) (B).

Los resultados obtenidos confirman la efectividad de la técnica de PMA-qPCR para cuantificar al mismo tiempo células vivas y muertas de *B. bruxellensis* en vinos, resultando una excelente alternativa a los métodos clásicos (recuento en placa) por su rapidez y eficacia, permitiendo diferenciar las células realmente peligrosas (vivas) de las totales.

### BIBLIOGRAFÍA

- Caruso, M. Fiore, C. Contursi, M. Salzano, G. Paparella, A. Romano, P. 2002. Formation of biogenic amines as criteria for the selection of wine yeasts. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 18:159-163.
- Chatonnet, P. Dubourdieu, D. Boidron, J. N. 1995. The influence of *Brettanomyces/Dekkera* sp. yeasts and lactic acid bacteria on the ethylphenol content of red wines. *Am. J. Enol. Vitic.*, 46:463-468.
- Deak, T. Beuchat, L. 1996. Handbook of food spoilage yeasts. CRC Press, New York, N.Y.
- Divol, B. Lonvad-Funel, A. 2005. Evidence for viable but nonculturable yeasts in *Botrytis*-affected wine. *J. Appl. Microbiol.*, 99:85-93.
- Elizaquível, P. Sánchez, G. Aznar, R. 2012. Application of propidium monoazide quantitative PCR for selective detection of live *Escherichia coli* O157:H7 in vegetables after inactivation by essential oils. *Int. J. Food Microbiol.*, 159:115-906.
- Phister, T. G., Mills D. A. 2003. Real-Time PCR assay for detection and enumeration of *Dekkera bruxellensis* in wine. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69: 7430-7434.
- Rawsthorne, H. Dock, C.N. Jaykus, L.A. 2009. PCR-Based method using Propidium Monoazide to distinguish viable from nonviable *Bacillus subtilis* spores. *Appl. Environ. Microbiol.*, 75:293.

# Clonación y caracterización de la proteína D2EK17 de *Pediococcus acidilactici* CECT 5930 con actividad degradadora de tiramina.

Sara Callejón<sup>1</sup>, Ramón Sendra<sup>2</sup>, Sergi Ferrer<sup>1</sup> e Isabel Pardo<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ENOLAB, ERI BioTecMed / IviSoCa. Universitat de València, [Sara.Callejon@uv.es](mailto:Sara.Callejon@uv.es), [Isabel.Pardo@uv.es](mailto:Isabel.Pardo@uv.es)  
<sup>2</sup> Departament de Bioquímica, Universitat de València, España.

Las aminas biógenas (AB) son compuestos tóxicos que se encuentran en alimentos frescos y fermentados con alto contenido de proteínas. La proteína D2EK17 de *Pediococcus acidilactici* CECT 5930 se identificó y describió como una enzima tipo lacasa capaz de degradar AB. El gen codificante de la misma se obtuvo mediante amplificación con cebadores diseñados a partir de la secuencia publicada de esta enzima. El objetivo de este trabajo ha sido el clonaje y expresión en *Escherichia coli* del gen que codifica para esta enzima. La proteína recombinante se caracterizó bioquímicamente frente al sustrato canónico de las lacasas el ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS). Se obtuvieron las constantes cinéticas, el perfil térmico de esta enzima y se estudió el efecto del pH y de posibles inhibidores de la actividad enzimática de la misma. Además, se investigó la capacidad de degradación de tiramina que exhibía esta enzima en diferentes condiciones de pH, concentraciones de Cu, ABTS y diferentes temperaturas. La proteína recombinante exhibía un intenso color azul típico de los enzimas que contienen cobre. El análisis del espectro de absorción mostró el perfil característico de las lacasas azules, corroborando que la proteína D2EK17 es una lacasa.

## INTRODUCCIÓN

Hasta la fecha, se han estudiado sólo unas pocas lacasas bacterianas, a pesar de que estas enzimas están muy extendidas en las bacterias (Claus 2003). Recientemente, Callejón y col. (2014) demostraron que las bacterias de ácido láctico (BAL) del vino poseen lacasas de interés biotecnológico, ya que demostraron la capacidad de éstas para degradar las aminas biógenas (AB) en vino. Las AB son compuestos tóxicos para la salud humana, además de que deprecian la calidad del vino que las contiene. Están presentes en algunos alimentos frescos, pero también se producen durante la fermentación de los mismos por la descarboxilación de los aminoácidos precursores por los microorganismos. En el trabajo de Callejón y col. (2014) se describe el uso de células de *Pediococcus acidilactici* CECT 5930 para la degradación de AB en vino y se identifica la proteína responsable de ello. El objetivo de este trabajo ha sido la clonación del gen que codifica para esta proteína a fin de llevar a cabo su caracterización bioquímica y el estudio de su capacidad para degradar la tiramina en distintas condiciones.

## MATERIAL Y MÉTODOS

**Clonaje y expresión de D2EK17.** La proteína se clonó en células de *E. coli* BL21 (DE3) que poseían un plásmido de expresión pET28a y un plásmido para asistir el plegamiento (pGro7). La expresión se indujo a baja temperatura Koschorreck *et al.* (2008) añadiendo 1mM de IPTG a 1L del medio terrific broth (TB) suplementado con 2 mg/L de arabinosa, 1mM de CuCl<sub>2</sub> y 50 µg/mL de kanamicina. El extracto crudo se obtuvo por ruptura mecánica de las células con perlas de vidrio de 106 µm, en el tampón de equilibrado de la columna de purificación a pH 7,5 (tampón fosfato

sódico 50 mM, NaCl 300mM y 20 mM de Imidazol. La purificación de la proteína se realizó mediante cromatografía metálica de afinidad (Ni-NTA) para proteínas con colas de polihistidina, utilizando como eluyente tampón fosfato sódico 50 mM, NaCl 300 mM e Imidazol 250 mM.

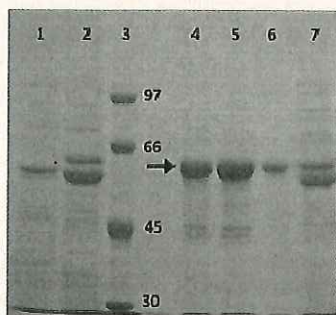
**Caracterización bioquímica.** Se determinó la masa molecular mediante electroforesis en 8% SDS-PAGE y espectro de la proteína registrando la absorción en intervalo de 300-800 nm en tampón fosfato sódico 50 mM. Se obtuvieron las constantes cinéticas de la enzima para sustrato ABTS, y se estudió el efecto de la temperatura, la adición de Cu (50-1000 µM), e inhibidores (1 mM durante 10 minutos) sobre la actividad enzimática. Los ensayos realizaron en microplaca tomando 1 µL de una dilución 1/1 de la enzima purificada en un volumen final de 100 µL. Tampón acetato 50 mM que contenía 5 mM ABTS, se midió el  $\Delta Abs_{420nm}$  durante 5 minutos. Para determinar el pH óptimo se usó el tampón citrato-fosfato (2,5-8). Los resultados se expresan como % de actividad enzimática relativa respecto al valor máximo encontrado. La actividad enzimática se calculó como  $\Delta Abs_{420nm} / \Delta t (V_0)$  excepto en caso de la temperatura que se tomó la  $Abs_{420nm}$  a los minutos de iniciada la reacción, y se normalizó frente al máximo obtenido.

**Ensayos de degradación de tiramina.** Se ensayó la capacidad de degradación de la tiramina usando 1 µL de enzima en un volumen final de 100 µL de tampón acetato 50 mM que contenía 150 mg/L de tiramina, 1 mM ABTS y 1 µM de CuCl<sub>2</sub>. Para el estudio del efecto del pH se usó el mismo tampón que para el sustrato anterior y además tampón carbonato-NaOH (9-10,5). Las reacciones incubaron durante 24 h a 28°C, posteriormente desproteinizaron por calor y se cuantificó la concentración de tiramina mediante LC-FLD siguiendo el procedimiento descrito en el trabajo de Callejón *et al.* (2014). Los resultados se expresan como porcentaje de degradación respecto a la mezcla de reacción sin enzima.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

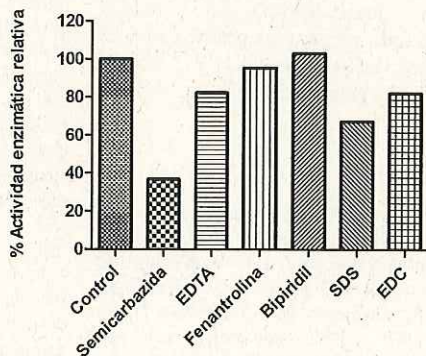
### Caracterización bioquímica.

La proteína purificada mostró un color azul intenso común a todas las enzimas que contienen cobre. El espectro de absorción UV-visible mostró una banda ancha a 575-600 nm con un pico a 590 nm y un ligero hombro a 330 nm (correspondientes a los centros de cobre T1 y T3 binuclear respectivamente), Xu *et al.* (2007). El tamaño de la enzima determinada por SDS-PAGE fue ~ 60 kDa (Figura 1).



**Figura 1:** Gel 8% SDS-PAGE. Carrera 1: extracto no inducido, 2: extracto inducido, 3: LMW marker (Amersham), 4-6: fracciones eluidas en la purificación, 7: extracto crudo antes de purificar.

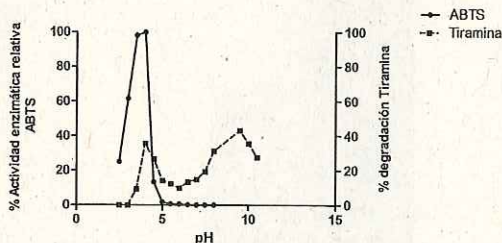
La  $K_m$  fue 4.22 mM y la  $V_{m\acute{a}x}$  obtenida fue 0.013 para el ABTS. El pH óptimo de actuación fue 4 y la temperatura óptima fue 28°C, la adición de Cu no aumentó la actividad de la proteína frente al ABTS. La proteína retenía al menos el 70% de su actividad después de 10 minutos de incubación a 65°C. La adición de inhibidores y quelantes metálicos produjo cambios en la actividad enzimática como se puede observar en la Figura 2.



**Figura 2:** Efecto de la adición de inhibidores sobre la actividad enzimática de la lacasa recombinante de *P. acidilactici* CECT 5930 frente al ABTS.

### Ensayos de degradación de tiramina.

La temperatura óptima de actuación de la enzima frente a la tiramina fue 28°C, temperatura a la cual se degradó el 70% de la misma, sorprendentemente fue capaz de degradar un 44% a 4°C. Se obtuvieron dos pH óptimos de actuación, 4 y 9,5 como se puede ver en la Figura 3.



**Figura 3:** Efecto del pH sobre el enzima recombinante frente a los dos sustratos analizados.

La adición de Cu aumentó la actividad del enzima en un 5% independientemente de la concentración ensayada, por lo que se añadieron 100  $\mu$ M en el tampón de reacción. La adición de ABTS a la mezcla de reacción aumentó la actividad enzimática considerablemente, ya que actúa como mediador, por lo que se añadió una concentración de 1 mM al tampón de reacción.

Este trabajo corrobora la actividad de la lacasa aislada de *P. acidilactici* CECT 5930 frente a la tiramina. Este hallazgo abre nuevas posibilidades para disminuir los niveles de tiramina en vino y posiblemente en otros alimentos, lo que supondría un mecanismo para la mejora de la salubridad y la calidad de éstos.

## BIBLIOGRAFÍA

- Callejón S, Sendra R, Ferrer S, Pardo I. 2014. Identification of a novel enzymatic activity from lactic acid bacteria able to degrade biogenic amines in wine. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98 (1): 185-198
- Claus H. 2003. Laccases and their occurrence in prokaryotes. *Arch. Microbiol.* 179 (3): 145-150.
- Koschorreck K, Richter S, Ene A, Roduner E, Schmid R, Urlacher V. 2008. Cloning and characterization of a new laccase from *Bacillus licheniformis* catalyzing dimerization of phenolic acids. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 79 (2): 217-224.
- Xu F, Damhus T, Danielsen S, Østergaard LH. 2007. Catalytic applications of laccase modern biooxidation. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 43-75.

**Agradecimientos.** Este trabajo fue parcialmente financiado por el Ministerio de Educación y Ciencia, España (Proyectos AGL2006-08495 y AGL2009-12167), los fondos FEDER y el Excmo. Ayuntamiento de Valencia.

# Interacciones entre *Saccharomyces cerevisiae* y *Lactobacillus plantarum* durante la vinificación

Olga Lucio<sup>1</sup>, Isabel Pardo<sup>1</sup>, Jose María Heras<sup>2</sup>, Sybille Krieger<sup>2</sup> y Sergi Ferrer<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ENOLAB- Departament de Microbiologia i Ecologia / ERI-ISIC BioTecMed / MCI IViSoCa. Universitat de València, Dr. Moliner, 50. E-46100, Burjassot, Valencia, Spain. [olga.lucio@uv.es](mailto:olga.lucio@uv.es); [sergi.ferrer@uv.es](mailto:sergi.ferrer@uv.es)

<sup>2</sup> Lallemand S.A.

La especie *Lactobacillus plantarum* se encuentra de manera natural en mostos y vinos y también puede ser inoculada durante la vinificación como cultivo iniciador para inducir la fermentación maloláctica o acidificación biológica en los vinos. Para la inoculación de bacterias lácticas en la vinificación es importante tener en cuenta las interacciones que pueden establecer éstas con las levaduras, especialmente con *Saccharomyces cerevisiae*. Estas interacciones pueden ser tanto de sinergia como de antagonismo y son altamente dependientes de las cepas de levaduras y bacterias lácticas envueltas. Por tanto, la elección de las cepas más compatibles es un factor determinante. En este estudio se ha confirmado la dependencia de cepa de este fenómeno y se ha demostrado la efectividad de la acidificación biológica mediante la inoculación de cepas de *L. plantarum* independientemente de la cepas de levadura y bacteria utilizadas en la vinificación.

## INTRODUCCIÓN

Como alternativa a la acidificación química y/o física de los vinos se ha desarrollado un método biológico basado en la inoculación en mosto de cepas seleccionadas de *L. plantarum*, productoras de elevadas cantidades de ácido láctico por fermentación láctica (FL) a partir de los azúcares del mosto (Lucio, 2014). Para la inoculación de bacterias lácticas (BL) durante la vinificación es importante tener en cuenta las interacciones que pueden tener lugar con las levaduras fermentativas, tanto de sinergia como de antagonismo, y que son altamente dependientes de las cepas implicadas (Boidron, 1969). El objetivo de este trabajo ha sido el estudio de la compatibilidad de 2 cepas de *L. plantarum*, previamente seleccionadas para inducir acidificación biológica en vinos, y 6 cepas comerciales de *S. cerevisiae*. Para ello se observó tanto la dinámica poblacional de levaduras y BL como la composición química de los vinos finales inoculados con todas las combinaciones de levadura/BL.

## MATERIAL Y MÉTODOS

**Cepas microbianas utilizadas.** Se utilizaron dos cepas de *L. plantarum*: E4607 y E4608, previamente seleccionadas para inducir acidificación biológica en vinos (Lucio, 2014) y seis cepas comerciales de *S. cerevisiae*: Uvaferm VN®, Uvaferm VRB®, Lalvin K1™, Enoferm M2™, Lalvin 4600® y Lalvin QA23™ (Lallemand).

**Microvinificaciones.** Se utilizó mosto blanco estéril suplementado con 0.3 g/L de Nutrient VitEnd®, pH 3.5. Dos matraces con 500 mL de mosto se inocularon con  $2 \times 10^6$  UFC/mL de las cepas E4607 y E4608 respectivamente y se incubaron a 28°C durante 3 días. Después, cada cultivo bacteriano se distribuyó en 7 matraces (50 mL/matraz). Seis

de éstos se inocularon con  $2 \times 10^6$  UFC/mL de las 6 cepas comerciales de levaduras, respectivamente. El matraz restante se utilizó como control de BL sin levaduras. Adicionalmente, otros 6 matraces con mosto se inocularon con las seis levaduras, sirviendo como control de levadura sin BL. Un matraz con mosto sin inocular sirvió como control adicional sin levaduras ni BL. Las microvinificaciones se realizaron por triplicado en matraces Erlenmeyer y fueron incubadas a 28°C durante 15 días.

**Análisis de la dinámica poblacional de los microorganismos.** Para el recuento de BL se utilizaron placas de MRS suplementado con cisteína (0.5 g/L) Actistab (0.15 g/L), y para el recuento de levaduras placas de YPD (20 g/L de glucosa, 20 g/L de peptona, 10 g/L de extracto de levadura y 20 g/L de agar). Las placas se incubaron a 28°C durante 6 días hasta observar colonias aisladas.

A partir de de las curvas de crecimiento de los microorganismos inoculados en las microvinificaciones se calculó el parámetro Área Bajo la Curva (ABC).

**Composición química de los vinos.** La composición química de las muestras extraídas al final de las microvinificaciones se analizó en un sistema HPLC (Agilent 1200) con el fin de obtener las concentraciones de azúcares, ácidos málico, láctico y cítrico, etanol y glicerol (Frayne, 1993). El pH de las muestras se midió con un electrodo Sentix81 (WTW) acoplado a un pHmetro pH331 (WTW).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Dinámica poblacional de los microorganismos

En cuanto a las BL, E4608 se mantuvo en mayor población en coexistencia con levaduras que E4607. Se observó una mayor población de ambas cepas en combinación con las levaduras Uvaferm VN® y Uvaferm VRB®. Ambas BL disminuyeron más

población en coexistencia con Lalvin K1™. La combinación mediante la cual se obtenía una mayor concentración de BL durante la vinificación era la de E4608 con Uvaferm VN® o con Uvaferm VRB® (Fig. 1A). La población de todas las levaduras se mantiene más baja en coexistencia con BL. Este efecto resulta más acusado en las levaduras Uvaferm VN®, Enoferm M2™ y Lalvin QA23™, y menos acusado en las levaduras Uvaferm VRB®, Lalvin K1™ y Lalvin 4600® (Fig. 1B).

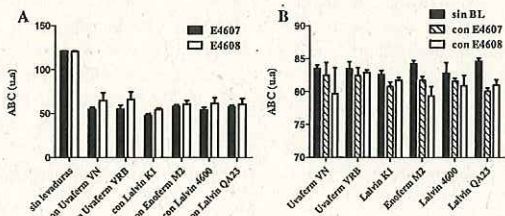


Figura 1. Representación del crecimiento de los microorganismos durante las vinificaciones, expresado en ABC, A) Bacterias lácticas inoculadas, B) Levaduras inoculadas.

### Composición de los vinos finales

La composición de los vinos no fue significativamente diferente dependiendo de las combinaciones de levadura/BL utilizadas, pero sí dependiendo de la inoculación de BL. Los vinos inoculados con BL mostraron elevadas cantidades de ácido láctico (10-12 g/L), menos ácido cítrico (0.2-0.3 g/L) (Figs. 2E y 2F) y menor pH (0.1-0.3 unidades) que los no inoculados (Fig. 3). Además, éstos completaron la FML, al contrario que los no inoculados (Figura 2D). La capacidad fermentativa de las levaduras no se vio afectada por la presencia de BL, ya que la concentración de azúcares residuales fue similar en todos los casos (Fig. 2A). En cambio, la concentración de etanol y glicerol resultó menor en estos vinos (Figs. 2B y 2C). Esto fue debido a que los azúcares metabolizados por las BL para la síntesis de ácido láctico no fueron utilizados por las levaduras para la formación de estos compuestos.

Estos resultados demostraron que los fenómenos de antagonismo entre BL y levaduras dependen de cepa. Sin embargo, la efectividad de la acidificación biológica mediante la inoculación de cepas de *L. plantarum* no resultó comprometida en ninguna combinación de cepas utilizada.

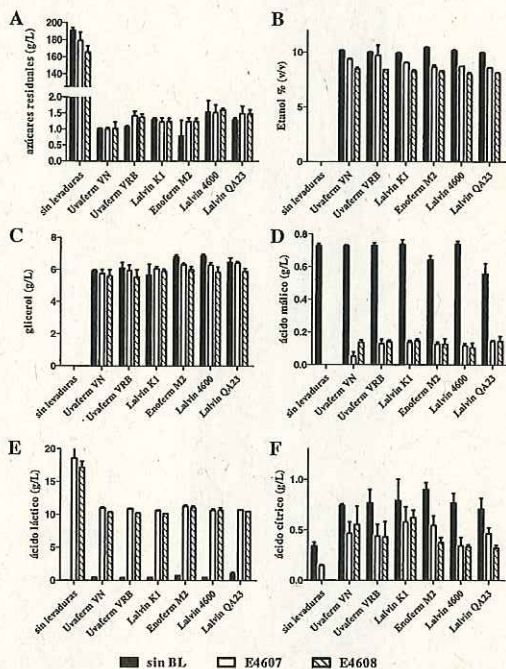


Figura 2. Composición química de los vinos obtenidos usando las diferentes combinaciones levadura/BL, A) azúcares residuales (g/L), B) etanol % (v/v), C) glicerol (g/L), D) ácido málico (g/L), E) ácido láctico (g/L), F) ácido cítrico (g/L).

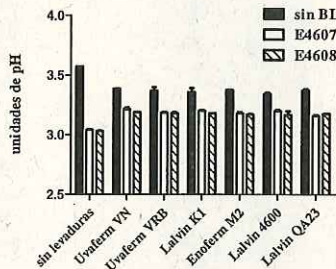


Figura 3. Valores de pH de los vinos finales obtenidos mediante las diferentes combinaciones de levadura/BL.

### BIBLIOGRAFÍA

- Boidron, A.M. 1969. Etude de l'antagonisme entre les levures et les bactéries du vin. *Conn. Vigne Vin.* 3: 315-378.
- Frayne, R. F. 1986. Direct analysis of the major organic components in grape must and wine using high performance liquid chromatography. *Am. J. Enol. Vitic.* 37: 281-287.
- Lucio, O. 2014. Acidificación biológica de vinos de pH elevado mediante la utilización de bacterias lácticas. Tesis Doctoral. Universidad de Valencia.



# Un nuevo medio de cultivo para la producción de cultivos iniciadores malolácticos de *O. oeni*

Carmen Berbegal, Yaiza Benavent-Gil, Isabel Pardo y Sergi Ferrer

ENOLAB. ERI BioTecMed/IVISoCa. Universitat de València, Dr. Moliner 50. Burjassot. Valencia  
[carmen.berbegal@uv.es](mailto:carmen.berbegal@uv.es); [Sergi.Ferrer@uv.es](mailto:Sergi.Ferrer@uv.es)

En este trabajo se presenta un medio de cultivo que permite obtener altos niveles de biomasa de *Oenococcus oeni* aclimatadas al vino. Para ello, se ensayaron 27 medios de cultivo de composición diferente. Todos contenían una base principal de mosto y vino, y complementos nutricionales con el fin de beneficiar el crecimiento bacteriano, como extracto de levadura, Tween 80, ácido málico y zumo de tomate, pero con diferentes valores de pH, niveles de etanol y concentración de mosto. Una vez desarrollada *O. oeni* en todos los medios de cultivo, se procedió a su inoculación en vino tinto y se estudió el consumo de ácido málico mediante cromatografía líquida. Los resultados mostraron que el medio de cultivo optimizado denominado OPM (*Oenococcus* Production Medium) permita la obtención de elevadas cantidades de biomasa de *O. oeni* ( $1 \times 10^9$  ufc/mL) y la adaptación de las bacterias a las condiciones del vino, consumiendo estas todo el ácido málico en 6 días a un nivel de inoculo de  $1 \times 10^6$  ufc/mL.

## INTRODUCCIÓN

La fermentación maloláctica (FML) es fundamental para la calidad del vino, especialmente para los vinos tintos. Se trata de la transformación del ácido L-málico procedente de las uvas, de un gusto fuerte y áspero, en ácido L-láctico, de gusto más agradable, liberándose además CO<sub>2</sub> (Kunkee, 1991). Una de las estrategias utilizadas para controlar la realización de la FML de forma adecuada, consiste en la inducción de ésta con cultivos iniciadores malolácticos, que en general consisten en cepas de *O. oeni*. Los medios de laboratorio utilizados para el crecimiento de esta bacteria suelen producir unas cantidades elevadas de biomasa, pero con una baja o nula capacidad de aclimatación al vino. El objetivo de este trabajo fue el desarrollo de un medio de cultivo líquido que consiguiera altas concentraciones de *O. oeni*, y que al mismo tiempo aclimatara las células a las condiciones del vino.

## MATERIAL Y MÉTODOS

**Microorganismos.** *O. oeni* E5003 (Colección ENOLAB, Universitat de València).

**Medios de cultivo y condiciones de crecimiento.** Se estudió el crecimiento de *O. oeni* E5003 en 27 medios de cultivo (Tabla 1). Todos ellos contenían de base: extracto de levadura (5 g/L), infusión de zumo de tomate (23 mL/L), Tween 80 (0.5 mL/L), ácido L-málico (3 g/L) y vino blanco concentrado reconstituido (400 mL/L). A la base se le añadió mosto blanco comercial concentrado, el cual se diluyó 4, 6 y 8 veces (576.5 mL/L), el pH se ajustó a 3.8, 4 y 4.5 y el grado de etanol a 4%, 6% y 8% (v/v). *O. oeni* E5003 se cultivó previamente en MLO (Zuñiga y col., 1993) hasta alcanzar la fase estacionaria y se inoculó en los 27 medios de cultivo a una concentración final de  $1 \times 10^6$  ufc/mL. El crecimiento bacteriano fue determinado

midiendo la densidad óptica a 600 nm durante 7 días a 28 °C. La curva de crecimiento fue transformada en un valor de área bajo la curva (ABC) (Gagnon y col., 1998) mediante el programa GraphPad Prism 5. El análisis estadístico de los datos fue llevado a cabo mediante el test ANOVA y *post-hoc* de Tukey con el programa SPSS Statistics 19.

**Tabla 1:** Combinación de factores (mosto, etanol y nivel de pH) de 27 los medios de cultivo utilizados para el cultivo de *O. oeni* E5003.

MEDIO	MOSTO	ETANOL	pH
1	1/4	4	3.8
2	1/4	4	4
3	1/4	4	4.5
4	1/4	6	3.8
5	1/4	6	4
6	1/4	6	4.5
7	1/4	8	3.8
8	1/4	8	4
9	1/4	8	4.5
10	1/6	4	3.8
11	1/6	4	4
12	1/6	4	4.5
13	1/6	6	3.8
14	1/6	6	4
15	1/6	6	4.5
16	1/6	8	3.8
17	1/6	8	4
18	1/6	8	4.5
19	1/8	4	3.8
20	1/8	4	4
21	1/8	4	4.5
22	1/8	6	3.8
23	1/8	6	4
24	1/8	6	4.5
25	1/8	8	3.8
26	1/8	8	4
27	1/8	8	4.5

**Fermentación maloláctica en vino.** Las células que alcanzaron un valor de ABC superior a 2 en los medios anteriores se inocularon en vino filtrado para determinar la

actividad maloláctica. Se inocularon a razón de  $1 \times 10^6$  ufc/mL. La composición del vino fue: 12% (v/v) de etanol,  $<1.0$  g/L de azúcares, 3.0 g/L de ácido málico y con un nivel de pH de 3.5. La FML se realizó a 28 °C y se monitorizó periódicamente a través de la cuantificación de ácido málico siguiendo la metodología descrita por (Frayne, 1986).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Efecto del nivel de pH, grado de etanol y concentración de mosto sobre el crecimiento

El crecimiento de la cepa *O. oeni* E5003 en los 27 medios de cultivo se muestra en la Figura 1. Se observó que cuando el mosto blanco concentrado se diluyó 4 veces (medios 1-9) el crecimiento era inferior que cuando se diluía 6 (medios 10-18) u 8 veces (medios 19-27). En todos los casos, el crecimiento a pH de 4.5 resultó en un mayor valor de ABC que a pH's inferiores. El mayor crecimiento se obtuvo con el medio 12, que contenía el mosto diluido 6 veces, un grado de etanol del 4% (v/v) y un nivel de pH de 4.5 y el menor desarrollo se obtuvo en el medio 7, con el mosto diluido 4 veces, un grado de etanol del 8% (v/v) y un nivel de pH de 3.8.

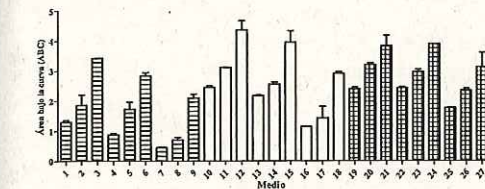


Figura 1: Valores de ABC de *O. oeni* E5003 en los 27 medios de cultivo tras la incubación 7 días de incubación a 28 °C.

El análisis de los datos mediante el test ANOVA mostró que las diferencias eran significativas ( $p < 0.05$ ) para para la dilución del mosto, la concentración de etanol y el nivel de pH y para las interacciones dilución de mosto-etanol y dilución de mosto-pH. Mediante el test *post-hoc* de Tukey se agruparon los medios en los que la bacteria presentaba un crecimiento similar. De todos ellos se descartaron aquellos que presentaron una ABC inferior a 2 (1, 2, 4, 5, 7, 8, 16, 17 y 25). Los 18 cultivos restantes se inocularon a vino tinto para determinar la actividad maloláctica.

### Actividad maloláctica en vino tinto

Se encontraron diferencias en la actividad maloláctica de *O. oeni* E5003 en los vinos inoculados con células procedentes de distintos medios de cultivo (Figura 2). Las diferencias en la actividad maloláctica dependían principalmente del valor de pH del medio

de cultivo de procedencia. Los cultivos procedentes de medios de pH de 4.5 presentaron un menor consumo de ácido málico. Por el contrario, los cultivos procedentes de un medio con un pH de 3.8 eran capaces de consumir el ácido málico en 6 días. Estos resultados pueden relacionarse con el hecho de que este pH es más similar al pH del vino en el que se inocularon y por tanto las células estaban más adaptadas. De los 18 cultivos, los procedentes de los medios 10, 13, 19, 22 y 26 (Figura 2) consumieron el 100% de ácido málico en 6 días.

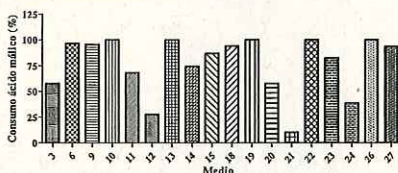


Figura 2: Consumo de ácido málico (%) a los 6 días en vino tinto por de *O. oeni* E5003 previamente cultivada en los distintos medios de cultivo.

## CONCLUSIONES

Aunque entre estos cultivos no se observó una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) en el crecimiento de *O. oeni* E5003 (Figura 1), se escogió el medio 10 por ser en el cual la bacteria presentó el mayor valor de ABC. Este medio de cultivo, denominado *Oenococcus* Production Medium (OPM) era el que contenía el mosto diluido 1/6, un grado de etanol de 4% y un nivel de pH de 3.8. El cultivo de las células en OPM permite obtener una población de *O. oeni* de  $1 \times 10^9$  ufc/mL en 7 días de incubación a 28 °C y una buena actividad maloláctica al ser inoculado en vino en una concentración final de  $1 \times 10^6$  ufc/mL, consumiendo el 100% de ácido málico en 6 días.

## BIBLIOGRAFÍA

- Frayne, R.F., 1986. Direct analysis of the major organic components in grape must and wine using high-performance liquid chromatography. *Am. J. Enol. Vitic.*, 37: 281-287.
- Gagnon, R., Peterson, J., 1998. Estimation of confidence intervals for area under the curve from destructively obtained pharmacokinetic data. *J. Pharmacokinet. Pharmacodyn.*, 26: 87-102.
- Kunkee, R.E., 1991. Some roles of malic acid in the malolactic fermentation in wine making. *FEMS Microbiol. Rev.*, 88: 55-72.
- Zúñiga, M., Pardo, I., Ferrer, S. 1993. An improved medium for distinguishing between homofermentative and heterofermentative lactic acid bacteria. *Int. J. Food. Microbiol.*, 18: 37-42.

# Efecto de distintos factores enológicos sobre el crecimiento de cepas de *Oenococcus oeni* aisladas de mostos y vinos

L.E. Cruz-Pio, Y. Benavent-Gil, S. Ferrer e I. Pardo

ENOLAB Departamento de Microbiología i Ecología, Universitat de València, España

[Liz.Cruz@uv.es](mailto:Liz.Cruz@uv.es), [Isabel.Pardo@uv.es](mailto:Isabel.Pardo@uv.es)

La especie que mejor tolera las condiciones estresantes del vino es *O. oeni* y por ello se ha empleado para la fabricación de cultivos malolácticos comerciales. Los objetivos del presente trabajo fueron 1) evaluar el efecto de distintos valores de pH, etanol y SO<sub>2</sub> sobre el crecimiento de 104 cepas de la colección ENOLAB aisladas de diversas etapas de la vinificación, y 2) establecer si existen relaciones entre la capacidad para crecer en condiciones enológicas y la fase de aislamiento de las mismas: del principio o del final de la vinificación. Se determinó la resistencia o sensibilidad de las cepas a estas condiciones mediante cuantificación del crecimiento como el valor de área bajo curva (ABC) y se llevó a cabo un análisis estadístico mediante ANOVA de una vía y un *post hoc* Tukey B. Las cepas 218, 219, 223, 225, 226SM y 504 aisladas de etapas tardías de vinificación, mostraron valores de ABC más altos que la media frente al pH, etanol y SO<sub>2</sub>. En general, las cepas aisladas de mosto mostraron menores ABC para los 3 factores ensayados. Se observó que existía una relación estadísticamente significativa entre la fase de aislamiento y la resistencia y/o sensibilidad de las cepas de *O. oeni* al pH, etanol y SO<sub>2</sub>.

## INTRODUCCIÓN

De todas las especies de bacterias lácticas asociadas a la vinificación, la especie que mejor tolera las condiciones estresantes del vino es *Oenococcus oeni* y por ello se ha empleado para la fabricación de cultivos malolácticos comerciales (Ribéreau-Gayon y col., 2006). Se ha demostrado que existe una sucesión de cepas de *O. oeni* a lo largo de la FA (Renouf y col., 2009) de manera que cepas que se hallan en mosto desaparecen en el vino y viceversa. Los principales factores que influyen en el desarrollo de *O. oeni* en vino son el pH, el etanol y el SO<sub>2</sub>, presente en el mismo (Britz y Tracey 1990).

Los objetivos del siguiente trabajo fueron 1) evaluar el efecto de distintos valores de pH, etanol y SO<sub>2</sub> sobre el crecimiento de 104 cepas de la colección ENOLAB aisladas de diversas etapas de la vinificación, y 2) establecer si existen relaciones entre la capacidad para crecer en condiciones enológicas y la fase de aislamiento de las mismas: del principio o del final de la vinificación.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Las 104 cepas de *O. oeni* estudiadas forman parte de la colección del grupo ENOLAB (Universidad de Valencia). Estas cepas proceden de mostos y de vinos. Para evaluar la capacidad de crecimiento a distintos valores de pH (2,9, 3,2, 3,5, 3,7 y 4,0), concentraciones de etanol (10, 12, 14, 15 %) y SO<sub>2</sub> (0, 30, 40, 50, 60 y 70 mg/L) se utilizó un vino sintético descrito por Cruz-Pio (2012). Previamente a la inoculación, las cepas se preadaptaron al vino creciéndolas en el medio descrito por Berbegal (2014). La condición estándar con la que se compararon los crecimientos en las condiciones de ensayo fue un vino con 10 % de etanol, pH

3,7 y 0 mg/L de SO<sub>2</sub>. El nivel del inóculo fue del 1 % y se incubaron a 28 °C durante 12 días. El crecimiento se cuantificó espectrofotométricamente a 600 nm cada 3 días. Los valores de D.O. obtenidos se transformaron en valores de Área Bajo la Curva (ABC) utilizando el software GraphPad Prism. Este método se basa en el cálculo del área total que hay debajo de la curva de crecimiento (Gagnon y Peterson 1998). Para el análisis estadístico, se utilizó el software IBM SPSS19. Las diferencias estadísticamente significativas ( $p = 0.05$ ) entre las medias de cada valor ABC en cada condición de estudio se corroboraron con un ANOVA y el *post hoc* Tukey B. Además, para conocer qué variables explican resultados, se utilizó el Análisis de Componentes Principales (ACP).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Existen diferencias importantes entre las cepas en la capacidad de crecimiento en etanol, pH y SO<sub>2</sub> de las cepas. La mayoría de ellas fueron capaces de crecer en todas las concentraciones de etanol ensayadas, aunque el valor de ABC disminuía conforme aumentaba la concentración del mismo. Un efecto similar encontraron García-Alegría y col. (2004) al estudiar cepas de la misma especie. En cuanto al efecto de SO<sub>2</sub> las cepas fueron capaces de crecer sólo hasta una concentración de 50 mg/L de SO<sub>2</sub>. Estos hallazgos coinciden con los obtenidos por Guzzo y col. (1998) quienes reportaron que *O. oeni* era capaz de sobrevivir a concentraciones de entre 30 y 50 mg/L de SO<sub>2</sub>. Además, a medida que la concentración de SO<sub>2</sub> se incrementaba se observó una disminución del valor de ABC de *O. oeni*. En cuanto al factor pH, nuestras cepas mostraron menores valores de ABC a los pH más ácidos. Nuestros resultados coinciden con los

obtenidos por Guzzo y col. (2002) y Guzzon y col. (2009) quienes observaron un crecimiento limitado de *O. oeni* a pH menores a 3.5. Las cepas que mostraron mayores valores de ABC frente al etanol, pH y SO<sub>2</sub> fueron la 219, 218, 226SM, 225, 223A y 504, procedentes de vino. Y la que exhibió menores valores de ABC fue la FS24, procedente de mosto.

A los valores de pH más bajos (2.9 y 3.2), concentraciones más altas de etanol (14 y 15 %) y SO<sub>2</sub> (60 y 70 mg/L) ejercen el efecto inhibitor sobre el crecimiento de las cepas aisladas de mostos (Los datos no se muestran). Los resultados del ACP observamos que los componentes 1, 2 y 3 explican conjuntamente el 95.5 % de la varianza total de los datos de ABC de las cepas de mosto, aunque la contribución de cada componente es diferente (Figura 1).

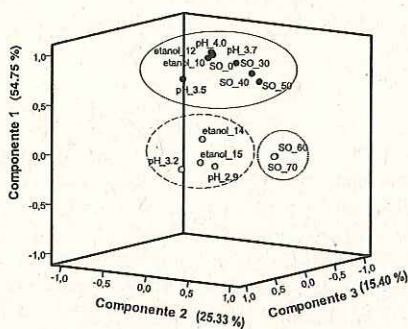


Figura 1: Representación gráfica del efecto de 15 condiciones de ensayo sobre las cepas de *O. oeni* procedentes de mostos en el espacio factorial rotado. Componente 1 (●); Componente 2 (○); Componente 3 (○).

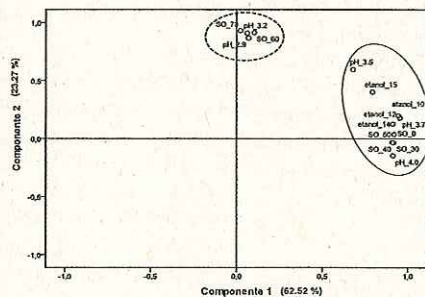


Figura 2: Gráfico de componentes rotados del efecto de 15 condiciones de ensayo sobre las cepas de *O. oeni* procedentes de vinos. Componente 1 (○); Componente 2 (○).

En cuanto a las cepas aisladas de vinos, el crecimiento se ve muy limitado a los valores más bajos de pH (2.9 y 3.2) y en las más altas concentraciones de SO<sub>2</sub> (60 y 70 mg/L). Además parece que el etanol compromete menos el

crecimiento de este grupo de cepas que el de las de mostos (los datos no se muestran). Los resultados del ACP observamos que los componentes 1 y 2 explican conjuntamente el 85.8 % de la varianza total de los datos de ABC (Figura 2).

En general las cepas más resistentes a los parámetros ensayados pertenecen al estadio tardío de la vinificación como se puede apreciar en la Figura 3, donde el ACP crea 2 nuevas variables que explican la variación de los valores de ABC de las cepas de *O. oeni* en las condiciones ensayadas. No existen cepas que resistan igualmente bien al etanol, pH bajos y al SO<sub>2</sub>. Ello se confirma porque en la Figura 3 aparece una zona (sombreada en la figura) vacía de cepas en los espacios que corresponden a pH bajos (valores altos del factor 2), altas concentraciones de etanol y SO<sub>2</sub> (valores altos del factor 1).

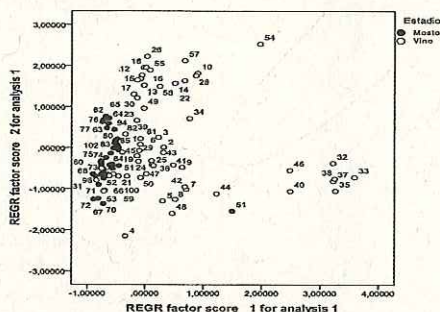


Figura 3: Representación gráfica de 2 nuevas variables creadas por el ACP que explican la variación en el crecimiento de las cepas de *O. oeni* procedentes de estadios tempranos (mostos) y tardíos (vinos).

**Agradecimientos.** Ministerio de Ciencia e Innovación proyecto RM2010-00001-00-00 y Generalitat Valenciana Programa Santiago Grisolfá/2011/001 por la financiación del presente trabajo.

## BIBLIOGRAFÍA

- Berbegal, C. 2014. Tesis Doctoral Universidad de Valencia.  
 Britz y Tracey 1990. J. Appl. Bact. 68: 23-31.  
 Cruz-Pio, L. E., 2012. Tesis de Máster en Biología Molecular Celular y Genética. Universidad de Valencia.  
 Gagnon, R. and J. Peterson. 1998. J. Pharm. Pharm. 26: 87-102.  
 García-Alegria y col., 2004. FEMS Microbiol. Lett. 230: 53-61.  
 Guzzo y col., 1998. FEMS Microbiol. Lett. 160: 143-147.  
 Guzzo y col., 2002. Sci. Alim. 22:107-111.  
 Guzzon y col., 2009. S. Afr. J. Enol. Vitic. 30: 133-141.  
 Reguant y col., 2005. FEMS Microbiol. Lett. 246: 111-117.  
 Renouf y col., 2009. Appl. Microbiol. Biotechnol. 83, 85-97.  
 Ribéreau-Gayon y col., 2006. En: Handbook of Enology. Vol. 1 (2<sup>da</sup> ed.) Wiley, England.

# Evaluación del efecto antimicrobiano de nanopartículas frente a levaduras enológicas

Lucía Polo, Anna Aguilar, Isabel Pardo y Sergi Ferrer

ENOLAB – Laboratorio de Microbiología Enológica.  
ERI BioTecMed / Microcluster IVISOCA. Universitat de València. España.

El objetivo del presente trabajo es evaluar la acción antimicrobiana de nanopartículas de diversos metales sobre levaduras asociadas en el proceso de vinificación y determinar la posibilidad de su utilización en mostos/vinos para controlar las poblaciones de este tipo de microorganismos. Se ha estudiado el efecto sobre el crecimiento de cuatro concentraciones de tres nanopartículas compuestas de zinc, plata y una mezcla de plata y cobre, respectivamente. Dado que los efectos de los antimicrobianos dependen de la concentración de microorganismos, se ha evaluado la acción de las nanopartículas sobre dos concentraciones de levaduras:  $10^3$  y  $10^7$  ufc/mL. Se ha observado que el tipo de nanopartícula que impide el crecimiento de la gran mayoría de las levaduras ensayadas es la que contiene los dos metales plata/cobre. Igualmente, se ha puesto en evidencia que el efecto de las nanopartículas depende de la concentración de células ensayadas y de la concentración de la nanopartícula ensayada. La nanopartícula de plata impide el crecimiento de la mayoría de las levaduras cuando se inoculan a bajas concentraciones de células, sin embargo, a la concentración de inóculo más elevada sólo se consigue controlar o minimizar el crecimiento cuando se emplean las concentraciones más altas (0.05 y 0.025  $\mu\text{g/mL}$ ). Las nanopartículas de zinc no tienen efecto antimicrobiano notable sobre el crecimiento de ninguna de las levaduras ensayadas a ninguna de las concentraciones probadas, ni a baja ni a alta concentración de células.

## INTRODUCCIÓN

La aplicación de la nanotecnología ha sido objeto de un amplio desarrollo principalmente en sectores como las telecomunicaciones, automoción, medicina, industria aeroespacial, etc., y actualmente en la industria alimentaria (FSAI, 2008; Uriarte y Bald, 2008). Estudios recientes han demostrado que las nanopartículas de plata, cobre y óxido de zinc tienen efecto antimicrobiano sobre un amplio espectro de bacterias Gram-negativas y Gram-positivas y que, además, presentan actividades antifúngicas y antivirales (Borkow y Gabbay, 2009; Marambio-Jones y Hoek, 2010).

## MATERIAL Y MÉTODOS

Se analizaron cuatro concentraciones de nanopartículas (Tabla 1) que contenían una concentración del metal correspondiente inferior o igual al permitido por la legislación.

NANOPARTICULAS	CONCENTRACIONES del metal ( $\mu\text{g/mL}$ )				
	0'	1	2	3	4
ZINC	0	5	25	1,25	0,25
PLATA/ COBRE	0	0,1	0,05	0,02	0,01
PLATA	0	0,05	0,025	0,01	0,005

Tabla 1. Concentraciones expresadas en  $\mu\text{g/mL}$  utilizadas en los ensayos de cada nanopartícula ensayadas. \* Códigos numéricos usados en la Tabla 2.

**Microorganismos testados.** Se ensayaron 2 cepas de las siguientes especies *Brettanomyces bruxelensis* (ENOLAB 4945, AQ928), *Zigosaccharomyces bailii* (ENOLAB 5205, ENOLAB 4975), *Hanseniopsis uvarum* (CECT 10389, CECT 1444), *Pichia anomala* (CECT 1114, AQ 2421) y *Saccharomyces cerevisiae* (ENOLAB 4404, ENOLAB 5019) y una cepa de las especies *Schizosaccharomyces pombe* (CECT 10685) y *Saccharomyces paradoxus* (AQ 2156).

**Medio y condiciones de crecimiento.** Las levaduras se crecieron en medio líquido YPD (glucosa 20 g, extracto de levadura 10 g, peptona micológica 20 g/por litro). Las nanopartículas procedían de la empresa Nanocustom. Los ensayos se realizaron en medio OPM (Bergeal, 2014). El medio con las nanopartículas se distribuyó a razón de 200  $\mu\text{L}$ /pocillo en microplacas de 96 pocillos. Las levaduras, precultivadas en YPD líquido, se inocularon a dos concentraciones:  $1 \times 10^3$  y  $1 \times 10^7$  ufc/mL) y se incubaron en agitación a  $28^\circ\text{C}$  durante 30 días. El crecimiento se determinó mediante lectura de la D.O.<sub>600nm</sub> dos veces al día. Para determinar si la D.O. del medio con nanopartícula evolucionaba con el tiempo se incluyeron en la microplaca pocillos con medio OPM con las diferentes concentraciones de nanopartícula pero sin inóculo de levaduras. A partir de las cinéticas de crecimiento obtenidas en cada caso, se determinó el Área Bajo Curva (Bergeal, 2014).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las nanopartículas de zinc no inhiben el crecimiento de ninguna de las levaduras a ninguna concentración de inóculo. Las nanopartículas de plata inhiben el crecimiento de todas las levaduras cuando la concentración del inóculo es de  $1 \times 10^3$  ufc/ mL, a

excepción de *Z. bailii* ENOLAB 4975 y *S. pombe* CECT 10685. *Z. bailii* ENOLAB 4975 sólo es capaz de crecer a una concentración de 0.005 µg/mL, aunque su crecimiento se reduce en un 57 %. *S. pombe* CECT 10685 crece en todas las concentraciones de plata ensayadas aunque experimenta una reducción del crecimiento del 40%. Cuando las células están a una concentración 10<sup>7</sup> ufc/mL, la plata no impide el crecimiento de ninguna cepa excepto el de *H. uvarum* CECT 10389. Las cepas de *P. anomala* y *S. cerevisiae*, *S. pombe* CECT 10685 y *Z. bailii* CECT 5205 crecen a todas las concentraciones ensayadas, mientras que *Z. bailii* ENOLAB 4975, *H. uvarum* CECT 1444 y ambas cepas de *B. bruxelensis* sólo crecen a 0.01 y 0.005 µg/mL.

Las nanopartículas de plata/cobre inhiben el crecimiento de todas las cepas cuando el inóculo es de 1x10<sup>3</sup> ufc/mL, excepto el de *S. pombe* CECT 10685 que consigue crecer a las dos concentraciones más bajas. Cuando se usa un inóculo de 1x10<sup>7</sup> ufc/mL, *P. anomala* CECT1114 y *Z. bailii* ENOLAB 4975 crecen en todas las concentraciones ensayadas, aunque el grado de inhibición del crecimiento es mayor a mayor concentración de nanopartícula. *S. cerevisiae* ENOLAB 4404, *Z. bailii* ENOLAB 5205 y *S. paradoxus* AQ 2156 son capaces de crecer con 0.01 y 0.02 µg/mL con este tipo de nanopartícula. *S. cerevisiae* ENOLAB 5019, *S. pombe* CECT 10685 y *P. anomala* AQ 2421 son capaces de crecer incluso a 0.05 µg/mL aunque su crecimiento se reduce en un 18%, 74% y 12% respectivamente. Ninguna de las cepas de *H. uvarum* ni de *B. bruxelensis* muestran crecimiento en presencia de esta nanopartícula a ninguna de las dos concentraciones de células ensayadas. En resumen, las nanopartículas de zinc apenas afectan al crecimiento, las de plata inhiben el crecimiento solo a bajas concentraciones de células, mientras que las de plata/cobre son las más efectivas a concentraciones altas de células.

**BIBLIOGRAFÍA**

Berbegal, C. 2014. Novel liquid starter cultures for malolactic fermentation in wine. Tesis doctoral. Universitat de Valencia.  
 Borkow G., Gabbay J. 2009. Current Chemistry Biological 3, 272-278.  
 FSAI. 2008. Food Safety Authority of Ireland. Food Additives, Chemical Contaminants & Residues, Dublin.  
 Marambio-Jones, C., Hoek, E. M. V. (2010). Journal of Nanoparticle Research, 12, 1531-1551.  
 Uriarte, M., Bald, C. (2008). Alimentación, equipos y tecnología, 27, 50-54.

CEPAS	PLATA		PLATA/COBRE		ZINC		
	1x10 <sup>3</sup>	1x10 <sup>7</sup>	1x10 <sup>3</sup>	1x10 <sup>7</sup>	1x10 <sup>3</sup>	1x10 <sup>7</sup>	
<i>B. bruxelensis</i> AQ928	0	58,3	60,1	49,0	49,8	44,7	46,6
	1	-	-	-	-	38,0	46,0
	2	-	-	-	-	45,4	46,3
	3	-	18,7	-	-	36,7	47,2
	4	-	50,7	-	-	40,0	49,5
<i>B. bruxelensis</i> ENOLAB 4945	0	61,4	64,8	46,7	57,0	46,9	52,7
	1	-	-	-	-	51,2	51,2
	2	-	-	-	-	49,3	53,3
	3	-	49,2	-	-	49,9	53,1
	4	-	52,5	-	-	49,9	53,0
<i>H. uvarum</i> CECT 10389	0	15,6	33,5	21,1	21,0	37,0	37,0
	1	-	-	-	-	30,3	33,1
	2	-	-	-	-	25,5	27,4
	3	-	-	-	-	39,1	37,9
	4	-	-	-	-	28,9	34,1
<i>H. uvarum</i> CECT 1444	0	28,5	21,9	32,7	29,8	31,0	20,7
	1	-	-	-	-	25,9	23,5
	2	-	-	-	-	26,2	20,5
	3	-	14,8	-	-	29,1	24,6
	4	-	16,4	-	-	27,3	21,7
<i>P. anomala</i> AQ2421	0	41,9	47,8	54,5	38,2	51,5	39,5
	1	-	25,3	-	-	57,7	40,0
	2	-	30,2	-	33,6	57,1	40,8
	3	-	44,1	-	35,8	56,2	40,0
	4	-	36,3	-	34,7	51,6	38,5
<i>P. anomala</i> CECT 1114	0	32,6	35,9	51,8	32,2	35,2	30,6
	1	-	15,9	-	14,1	35,1	29,2
	2	-	25,8	-	20,8	37,9	29,6
	3	-	32,8	-	23,6	33,9	29,2
	4	-	29,9	-	25,0	35,1	30,4
<i>S. cerevisiae</i> ENOLAB 4404	0	58,4	51,6	56,6	51,8	62,9	55,3
	1	-	24,9	-	-	60,5	57,5
	2	-	29,7	-	-	58,7	52,9
	3	-	38,3	-	37,5	59,4	53,7
	4	-	47,9	-	37,2	61,2	55,7
<i>S. cerevisiae</i> ENOLAB 5019	0	58,0	50,7	56,0	48,8	57,5	54,9
	1	-	21,7	-	-	55,2	48,2
	2	-	29,3	-	40,1	56,3	50,4
	3	-	43,4	-	39,8	55,9	48,3
	4	-	44,7	-	40,8	57,3	45,7
<i>S. paradoxus</i> AQ2156	0	54,8	45,7	54,5	44,3	51,3	36,3
	1	-	17,5	-	-	53,4	35,0
	2	-	21,2	-	-	53,1	32,9
	3	-	38,9	-	18,9	51,1	34,7
	4	-	39,2	-	38,4	52,2	34,8
<i>S. pombe</i> CECT 10685	0	51,1	48,9	54,5	48,0	54,0	48,6
	1	30,1	31,6	-	-	52,1	46,1
	2	32,6	35,9	-	12,3	51,5	45,4
	3	34,0	41,1	33,2	33,9	51,9	46,7
	4	32,5	47,5	35,5	40,3	54,2	45,4
<i>Z. bailii</i> ENOLAB 4975	0	45,4	42,1	54,2	43,1	55,0	47,3
	1	-	-	-	25,4	54,8	43,5
	2	-	-	-	28,9	52,4	40,7
	3	-	34,3	-	36,0	51,2	43,2
	4	19,5	39,0	-	38,8	50,8	43,9
<i>Z. bailii</i> ENOLAB 5205	0	53,9	48,7	56,0	49,7	54,5	44,1
	1	-	20,0	-	-	51,9	42,4
	2	-	24,6	-	-	49,7	39,9
	3	-	35,2	-	38,1	54,0	44,2
	4	-	46,1	-	37,1	49,8	45,7

Tabla 2. Datos de área bajo la curva que presentan las distintas levaduras al crecer en medio OPM con nanopartículas de plata, plata/cobre y zinc.

**Agradecimientos.** Los autores del trabajo agradecen a la empresa Nanocustom la cesión gratuita de las nanopartículas utilizadas en este estudio.