



EFFECTO ANTIMICROBIANO DE LA NISINA SOBRE LA POBLACIÓN DE BACTERIAS LÁCTICAS Y ACÉTICAS DE UN VINO DURANTE SU CONSERVACIÓN

Yolanda Sáenz, Lorena Díez, Cauré B. Portugal, Beatriz Rojo-Bezares, Myriam Zarazaga, Carmen Torres, Fernanda Ruiz-Larrea

Departamento de Agricultura y Alimentación. Universidad de La Rioja.
c/ Madre de Dios 51. 26006 Logroño. Teléfono: 941 299 749. e-mail: fernanda.ruiz@unirioja.es

Resumen:

El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de la bacteriocina nisina en combinación con metabisulfito sobre el crecimiento de una población residual de bacterias y levaduras de un vino tinto conservado en botella. Se utilizaron combinaciones binarias de metabisulfito (en el rango de 28 a 100 mg/l) con nisina en grado alimentario, Nisaplina (Danisco) (rango de 0 a 50 mg/l). Los resultados mostraron un efecto inhibitorio sinérgico de ambos antimicrobianos sobre la población de bacterias acéticas, y se comprobó la resistencia de las levaduras del género *Saccharomyces* al efecto inhibitorio de la nisina. También se determinó la actividad antimicrobiana de varias cepas productoras de las bacteriocinas Pediocina PA-1, Lactocina y Nisina Z frente a bacterias lácticas y acéticas de origen enológico. La cepa de *Lactococcus lactis* productora de nisina Z fue la más activa inhibiendo el crecimiento de las 70 bacterias lácticas estudiadas y cepas de bacterias acéticas del género *Gluconobacter*.

Palabras clave: Nisina, metabisulfito, bacteriocina, conservación del vino.

1. INTRODUCCIÓN

La fermentación maloláctica es un proceso de transformación que sufren los vinos tintos de alta calidad, proporciona características positivas tales como la desacidificación o la estabilización microbiológica, e incrementa la complejidad aromática y de sabor del vino. Este proceso consiste en la descarboxilación del ácido málico en ácido láctico y se lleva a cabo por bacterias lácticas (LAB), principalmente por la especie *Oenococcus oeni*. Si la fermentación maloláctica no se controla correctamente y las LAB crecen de manera inapropiada, la calidad del vino disminuye e incluso llega a perderse [1]. De forma similar, el crecimiento de bacterias acéticas (AAB), capaces de oxidar el etanol a ácido acético, tiene consecuencias nefastas sobre la calidad del vino. Por lo tanto, el control de un crecimiento bacteriano apropiado durante la elaboración y conservación del vino es de suprema importancia para obtener vinos de alta calidad. Actualmente durante el proceso de elaboración del vino, se adiciona anhídrido sulfuroso a la uva prefermentada y al producto final, lo que previene el crecimiento de microorganismos indeseados, actúa como antioxidante y mantiene los beneficios de los polifenoles del vino [2; 3]. Sin embargo, por sus posibles riesgos en la salud humana, los organismos internacionales (OMS, FAO, OIV) han establecido límites máximos de anhídrido sulfuroso en los vinos y recomiendan su reducción en bebidas y alimentos. Por otra parte, la nisina es una bacteriocina producida por una LAB calificada con la categoría de GRAS ("Generally Recognized As Safe") por la FDA y está aprobada en más de 40 países como conservante en alimentos [4]. Este antibiótico de 35 aminoácidos y propiedades catiónicas, se produce de manera natural por cepas específicas de la especie *Lactococcus lactis*. Asimismo la pediocina

PA-1/AcH producida por cepas del género *Pediococcus*, también se comercializa para emplearse en alimentación. En la actualidad no se autoriza todavía la adición de ninguna de estas bacteriocinas en vino.

El objetivo de este trabajo fue favorecer la conservación de un vino tinto mediante el empleo combinado de los agentes antimicrobianos metabisulfito y nisina, controlando el crecimiento de bacterias lácticas, acéticas y levaduras de origen enológico.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Condiciones de cultivo y crecimiento de bacterias

La Tabla 1 muestra la colección de microorganismos incluida en este trabajo: 70 bacterias lácticas (LAB) y 23 bacterias acéticas (AAB). Las cepas de *O. oeni* se cultivaron durante 3-4 días en placas de MLO agar a 30°C y bajo condiciones estrictas de anaerobiosis (concentración final de CO₂ del 7-10%), mientras que el resto de LAB se cultivaron durante 48h en placas de MRS agar a 30°C en una atmósfera con un 5% de CO₂. Las AAB se incubaron a 30°C en placas de manitol agar durante 48h.

2.2. Detección de actividad antimicrobiana de distintas bacteriocinas

Se estudió la actividad de *Pediococcus acidilactici* C652, *Lactobacillus sakei* C654 y *Lactococcus lactis* C144 productoras de las bacteriocinas pediocina PA-1, lactocina S y nisina Z, respectivamente, frente a las distintas cepas indicadoras de origen enológico (Tabla 1), empleando el método "spot-on-the-lawn" en placas de TSA [9].

2.3. Trabajo en bodega

Un vino tinto acabado se analizó química y microbiológicamente y se sometió a la acción combinada de distintas concentraciones de metabisulfito (28, 50 y 100 mg/L) y de nisina (0, 3, 6.25, 20 y 50 mg/L; Nisaplina, Danisco) en colaboración con una bodega de la región. Estos vinos se embotellaron, realizándose los ensayos por triplicado para cada condición estudiada. Después de cuatro meses de conservación se tomaron muestras homogéneas de todos los vinos sometidos a la acción antimicrobiana y se realizó el seguimiento de la población microbiana mediante siembras de alícuotas de estas muestras en medios de cultivo específicos para LAB y AAB.

La presencia de levaduras *Brettanomyces* se determinó tras sembrar las muestras en YPD agar con bromocresol e incubadas durante una semana a 30°C, y el resto de levaduras en YPD agar a 30°C durante 48h. Se realizaron recuentos y aislamientos de cepas resistentes a la acción de ambos antimicrobianos solos o en combinación. La identificación de géneros y especies microbianas se llevó a cabo mediante métodos bioquímicos tradicionales (tinción de Gram,...) y de biología molecular: PCR universales para levaduras y para bacterias, con posterior secuenciación automática [5, 6] y PCR específicas para identificar *Brettanomyces* y *Saccharomyces* [7, 8].

3. RESULTADOS

3.1. Efecto de bacterias productoras de bacteriocinas sobre las bacterias del vino

La mayor actividad antimicrobiana se detectó con la cepa productora de nisina Z, muy activa frente a todas las BAL estudiadas y algunas *Gluconobacter*. Los halos de inhibición del crecimiento de las 23 cepas de la especie *O. oeni* fueron muy superiores a los del resto de LAB de origen enológico estudiadas. La cepa productora de pediocina PA-1 fue activa frente a todas las cepas de *O. oeni* y a 14 de las otras 47 BAL.

La cepa productora de lactocina S produjo halo de inhibición sólo en dos de las 70 BAL, siendo inactiva frente al resto de bacterias estudiadas (Tabla 1).

3.2. Efecto combinado de metabisulfito y nisina en la conservación de un vino

El vino de partida presentaba una baja carga bacteriana y a lo largo de los cuatro meses que duró el estudio no se detectó crecimiento de LAB en las muestras de vino. Por otra parte, la población de AAB cultivables era significativa, y en la Fig. 1 se observa que existen reducciones en la población de AAB al aumentar la concentración de nisina en combinación con las distintas concentraciones de metabisulfito. Se comprobó la resistencia de las levaduras *Saccharomyces* y *Brettanomyces* al efecto inhibitorio de la nisina.

4. CONCLUSIONES

- Se observó que la cepa *Lactococcus lactis* C144 productora de nisina Z fue muy activa frente a las 70 LAB estudiadas, siendo especialmente sensibles las cepas de la especie *O. oeni*.
- Se detectó un efecto sinérgico entre el metabisulfito y la nisina en el crecimiento de las AAB enológicas, lo cual indica que la combinación de ambos antimicrobianos puede constituir un nuevo método de conservación del vino que permitiría la utilización de menores concentraciones de metabisulfito que las empleadas en la actualidad.

5. BIBLIOGRAFÍA

1. BARTOWSKY, E. J. AND HENSCHKE, P. A. 2004. **The 'buttery' attribute of wine-diacetyl-desirability, spoilage and beyond.** *Int. J. Food Microbiol.* 96:235-252.
2. FACIO, T. AND WARNER, C. R. 1990. **A review of sulphites in foods: analytical methodology and reported findings.** *Food Addit. Contam.* 7: 433-454.
3. OLIVEIRA, C. M., SILVA FERREIRA, A. C., GUEDES DE PINHO, P. AND HOGG, T. A. 2002. **Development of a potentiometric method to measure the resistance to oxidation of white wines and the antioxidant power of their constituents.** *J. Agric. Food Chem.* 50:2121-2124.
4. TWOMEY, D., ROSS, R.P., RYAN, M., MEANEY, B. AND HILL, C. 2002. **Lantibiotics produced by lactic acid bacteria: structure, function and applications.** *Antonie van Leeuwenhoek* 82: 165-185.
5. KURTZMAN, C.P. AND ROBNETT, C.J. 1998. **Identification and phylogeny of ascomycetous yeast from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences.** *Antonie van Leeuwenhoek* 73: 331-371.
6. LÓPEZ, I., RUIZ-LARREA, F., COCOLIN, L., ORR, E., PHISTER, T., MARSHALL, M., VANDERGHEYNST, J., AND MILLS, D.A. 2003. **Design and evaluation of PCR primers for analysis of bacterial populations in wine by denaturing gradient gel electrophoresis.** *Appl. Environ. Microbiol.* 69:6801-6807.
7. IBEAS, J. I., LOZANO, I., PERDIGONES, F., AND JIMÉNEZ, J. 1996. **Detection of *Dekkera-Brettanomyces* strains in sherry by a nested PCR method.** *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 998-1003.
8. FERNÁNDEZ-ESPINAR, M.T., ESTEVE-ZARZOSO, B., QUEROL, A., AND BARRIO, E. 2000. **RFLP análisis of the ribosomal internal transcribed spacers and the 5.8S rRNA gene region of the genus *Saccharomyces*: a fast method for species identification and the differentiation of flor yeast.** *Antonie van Leeuwenhoek* 78: 87-97.
9. ROJO-BEZARES, B., YOLANDA SAENZ, LAURA NAVARRO, MYRIAM ZARAZAGA, FERNANDA RUIZ-LARREA, CARMEN TORRES. 2007. **Coculture-inducible bacteriocin activity of *Lactobacillus plantarum* strain J23 isolated from grape must.** *Food Microbiol.* 24: 482-491



Fig. 1. Poblaciones de AAB (log UFC/ml) detectadas en las botellas de vino sometidas a la acción de metabisulfito y nisina después de cuatro meses de conservación. Muestras: El número indica concentración de metabisulfito (1: 18; 2: 50 y 3: 100 mg/L) y la letra señala la concentración de nisina (A: 0, B: 3, C: 6.25, D: 20, y E: 50 mg/L).

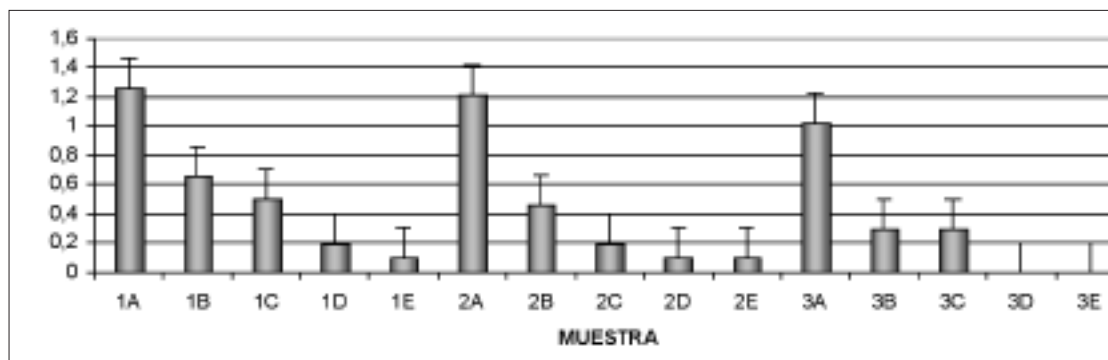


Tabla 1. Actividad antimicrobiana de cepas productoras de Pediocina PA-1, Lactocina y Nisina Z frente a bacterias lácticas y acéticas según el método de "spot-on-the-lawn".

Bacteria indicadora (Nº de cepas)	Inhibición del crecimiento producido por ^a :					
	<i>P. acidilacti</i> C652 Pediocina PA-1		<i>L. sakei</i> C654 Lactocina		<i>L. lactis</i> C144 Nisina Z	
	+	-	+	-	+	-
<i>O. oeni</i> (23)	23	0	0	23	23	0
<i>P. pentosaceus</i> (5)	5	0	1	4	5	0
<i>P. acidilactici</i> (3)	1	2	0	3	3	0
<i>P. parvulus</i> (2)	2	0	0	2	2	0
<i>L. plantarum</i> (22)	2	20	0	22	22	0
<i>L. hilgardii</i> (2)	0	2	0	2	2	0
<i>L. paracasei</i> (2)	0	2	0	2	2	0
<i>L. brevis</i> (1)	0	1	0	1	1	0
<i>L. fermentum</i> (1)	0	1	0	1	1	0
<i>L. pentosus</i> (1)	1	0	0	1	1	0
<i>L. sakei</i> (1)	1	0	0	1	1	0
<i>L. lactis</i> (3)	0	3	0	3	3	0
<i>L. mesenteroides</i> (3)	3	0	1	2	3	0
<i>Acetobacter</i> spp. (13)	0	13	0	13	0	13
<i>Gluconobacter</i> spp. (10)	0	10	0	10	6	4

^a (+) inhibición del crecimiento, (-) ausencia de inhibición del crecimiento.