

DEPARTAMENT DE MEDICINA PREVENTIVA I SALUT
PÚBLICA, CIÈNCIES DE L' ALIMENTACIÓ,
TOXICOLOGIA I MEDICINA LEGAL

POTENCIAL DE PÉPTIDOS Y ENZIMAS CON CAPACIDAD
ANTIMICROBIANA PARA EL CONTROL DE
MICROORGANISMOS ALTERANTES DE VINO.

MARÍA ENRIQUE LÓPEZ

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA
Servei de Publicacions
2011

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 22 de juny de 2011 davant un tribunal format per:

- Dra. Amparo M. Querol Simón
- Dr. Albert Más Barón
- Dr. Jose Ignacio Ibeas Corcelles
- Dra. María Inmaculada Álvarez Cano
- Dra. María José Ocio Zapata

Va ser dirigida per:

Dra. Paloma Manzanares Mir

Dr. Jose Francisco Marcos López

©Copyright: Servei de Publicacions
María Enrique López

I.S.B.N.: 978-84-370-8520-3

Edita: Universitat de València

Servei de Publicacions

C/ Arts Gràfiques, 13 baix

46010 València

Spain

Telèfon:(0034)963864115



UNIVERSITAT
DE VALÈNCIA

DEPARTAMENTO DE MEDICINA PREVENTIVA Y SALUD
PÚBLICA, CIENCIAS DE LA ALIMENTACIÓN, TOXICOLOGÍA Y
MEDICINA LEGAL

"Potencial de péptidos y enzimas con capacidad antimicrobiana para
el control de microorganismos alterantes de vino"

Memoria presentada por
María Enrique López
Para optar al grado de Doctor
por la Universitat de València



INSTITUTO DE AGROQUÍMICA Y TECNOLOGÍA
DE ALIMENTOS

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS

La Dra. Paloma Manzanares Mir, Investigadora Científica del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) en el Departamento de Biotecnología de los Alimentos del Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA) y el Dr. Jose Fco. Marcos López, Investigador Científico del CSIC en el Departamento de Ciencia de los Alimentos del IATA:

CERTIFICAN: Que María Enrique López, Licenciada en Ciencia y Tecnología de Alimentos por la Universitat de València, ha realizado bajo su dirección el trabajo que con el título: " Potencial de péptidos y enzimas con capacidad antimicrobiana para el control de microorganismos alterantes de vino" presenta para optar al grado de Doctor.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firman el presente certificado en Valencia, a 3 de mayo de 2011.

Dra. Paloma Manzanares Mir

Dr. Jose Fco. Marcos López

A Juan José y María, mis padres

*Y ante la adversidad más oscura golpearé con mi alma,
pues mi afán es más fuerte que el desánimo...
Y en esta lucha que al fin hoy termina, una luz vislumbro,
con satisfacción, con ánimos renovados, con vida...*

L.M.S. 2011

En primer lugar quiero agradecer la excelente dirección de los Dres. Paloma Manzanares y Jose F. Marcos, los consejos y enseñanzas que durante todo este tiempo me han aportado, su esfuerzo y dedicación, además del enorme apoyo mostrado en tantas ocasiones, haciendo posible esta tesis doctoral. También deseo dar las gracias muy especialmente al Dr. Salvador Vallés, por la ayuda y entrañable dedicación que durante tantos años me ha prestado, convirtiéndose como en un padre para mí.

El trabajo que aquí se expone se ha realizado en el Grupo de Enzimas Vínicas del Departamento de Biotecnología de los Alimentos del IATA (CSIC) y ha sido posible gracias a la concesión de una beca I3P predoctoral del CSIC en líneas de investigación con interés para el sector industrial, cofinanciada por los fondos FEDER de la UE (Ref. I3P-BDP2003-1). Esta tesis doctoral se enmarca dentro de los proyectos VIN03-007-C2-1 del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) (Ministerio de Ciencia y Tecnología) y Fun-C-Food CSD2007-00063 de la convocatoria Consolider Ingenio 2010 (Ministerio de Educación y Ciencia).

He de agradecer especialmente la ayuda prestada durante estos años por mi tutor de doctorado, el Dr. Jose Vicente Gil (UV, Valencia), desde estas líneas, muchas gracias por todo.

Siguiendo con los agradecimientos a tanta gente que ha conseguido que mi tesis sea posible, no puedo olvidarme del Dr. Jose Gimeno, por su inestimable ayuda en el manejo del microscopio de epifluorescencia.

Gracias también de corazón a los Dres. Alberto Muñoz y Belén López por su ayuda y por todo aquello que me han enseñado durante el desarrollo de este trabajo.

Agradezco a la Dra. Amparo Querol y su grupo su ayuda en los estudios de identificación de levaduras. Quiero dar las gracias

especialmente a la Dra. Carmela Belloch que me ayudó en multitud de ocasiones en temas de microbiología.

Mención especial a las Bodegas Miguel Torres S.A. por su participación en el desarrollo de este proyecto. También agradecer al Dr. Braulio Esteve su colaboración en las etapas iniciales del presente trabajo de tesis. Gracias a la Dra. María Yuste y a Mireia Martínez por su grata acogida y el trato excepcional en mis cortas estancias en la bodega, así como su inestimable ayuda en cada momento que lo he necesitado durante estos años.

Al Dr. Daniel Ramón por permitirme compaginar el desarrollo de mi trabajo actual en Biópolis con la redacción de este manuscrito. Agradezco su preocupación en todo momento y sus palabras de ánimo.

También deseo agradecer a Marta Tortajada y Salvador Genovés su ayuda, su comprensión y sus ánimos durante estos años. Sois estupendos.

Un especial agradecimiento a mis compañeros de laboratorio, Aida, Fernando, Pedro y Encarna, por hacer mi estancia en el IATA realmente grata. A Pedro y Encarna, gracias por haberme ayudado siempre que lo he necesitado. Fernando, gracias por todo y ánimo en la recta final de tu tesis. Y a mi querida compañera Aida, mil gracias por tus constantes palabras de ánimo y tu gran ayuda en el desarrollo de este trabajo. Nunca olvidaré los momentos entrañables y divertidos que hemos pasado juntos.

Mencionar también a todas aquellas personas que han formado parte en algún momento del grupo de trabajo, en especial a Ana Muñoz, María Soriano y Jose María Centeno, ¡gracias por todo!. Y a todos los que formaban parte del Departamento de Biotecnología durante mi estancia en el IATA: Empar, Patricia, Rosa, Teresa, Patricia, Roseta, M^a José, Silvia, Amparo, Patricia, Juanan, Óscar, Adela, Marga, Andrew, Luisa, Josep Vicent, Pili, Pepa, Pedro y Estefanía. Espero no dejarme a nadie. Gracias a todos por los buenos momentos compartidos.

Ajo, agradezco todo tu apoyo y ayuda prestada durante este tiempo.

A todos mis compañeros de Biópolis, en especial de nuevo a Aida, por su amistad de tantos años, a Rosa por tan agradables almuerzos y su constante preocupación por mi, a Pepa y Bea por sus palabras de aliento. A Esther, ¡ánimo con tu tesis! ¡Mil gracias a todas por vuestro apoyo!

A mis “compis” de laboratorio: Alex y Diego (¡ánimo con vuestras tesis!), Antonia, Silvia, Dunja, Bea y Vero, por todos los buenos momentos que pasamos juntos y por animarme en todo momento durante la escritura de este trabajo. Y a mis compañeros a la hora de la comida: David, Javi, Jose y Bea. ¡Muchas gracias por hacerme reír!

Pasando del plano laboral al personal, agradezco a mis amigos todos esos momentos de risas, charlas y demás andanzas juntos, sin las cuales me hubiese resultado más complicado desconectar cuando más lo necesitaba.

A mi familia, sobre todo a mis padres por su eterna confianza en mí, por su comprensión en todo momento, sus palabras de ánimo y su cariño, preocupándose siempre por esta lucha que he mantenido durante tantos años. Gracias por estar ahí y luchar siempre por mí...

A mi hermano Juan y a mi cuñada Maite, sus palabras de apoyo siempre me han dado ánimo para seguir adelante, y a los peques Joaquín y Elena, que en los peores momentos han conseguido hacerme reír. Sin la ayuda que mi familia me ha prestado este trabajo no habría sido posible.

Y a ti Luis, que tantas horas has pasado junto a mí mientras escribía este manuscrito. Muchas gracias por tu cariño, tu eterna comprensión y tu optimismo, que me hace ver las cosas con otra perspectiva. Es una suerte poder estar a tu lado...

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN.....	5
1. Elaboración del vino	9
1.1. Materia prima: mosto de uva	9
1.1.1. Acondicionamiento	9
1.1.2. Composición del mosto	10
1.2. Fermentación alcohólica.....	12
1.3. Fermentación maloláctica.....	15
2. Microorganismos alterantes de vino	17
2.1. Levaduras.....	20
2.2. Bacterias.....	25
2.2.1. Bacterias del ácido láctico	25
2.2.2. Bacterias del ácido acético	29
2.3. Otros microorganismos alterantes.....	30
3. Conservantes empleados en enología	31
4. Agentes antimicrobianos de naturaleza proteica.....	36
4.1. Proteínas y péptidos antimicrobianos.....	37
4.1.1. Propiedades biofísicas y estructurales	39
4.1.2. Modo de acción antimicrobiano	40
4.1.3. Bacteriocinas	44
4.1.4. Proteínas “killer”.....	47

4.1.5. Péptidos derivados de proteínas	48
4.1.6. Diseño racional de nuevos péptidos antimicrobianos.....	54
4.2. Enzimas con capacidad antimicrobiana	57
4.2.1. Hidrolasas.....	58
4.2.2. Óxido-reductasas.....	63
4.3. Aplicaciones en enología.....	64
OBJETIVOS	69
MATERIALES Y MÉTODOS	73
1. Microorganismos	75
2. Medios de crecimiento y condiciones de cultivo.....	77
2.1. Levaduras.....	77
2.2. Bacterias.....	77
3. Mostos de uva y vinos.....	78
4. Compuestos antimicrobianos	78
4.1. Péptidos sintéticos.....	78
4.1.1. Propiedades.....	78
4.1.2. Cuantificación espectrofotométrica.....	81
4.2. Hidrolizado de lactoferrina bovina	82
4.3. Preparado enzimático rico en β -glucanasas	82
5. Estudios <i>in vitro</i> sobre microorganismos.....	83
5.1. Ensayos de inhibición del crecimiento en placas de microtítulo..	83
5.1.1. Condiciones del ensayo.....	83
5.1.2. Levaduras.....	85

Índice general

5.1.3. Bacterias lácticas.....	85
5.1.4. Determinación de los parámetros de actividad antimicrobiana	85
5.2. Ensayos de actividad microbicida de los péptidos	87
5.2.1. Levaduras.....	87
5.2.2. Bacterias lácticas.....	87
6. Ensayos de inoculación controlada en vino	88
7. Ensayos de inoculación controlada durante la fermentación alcohólica	89
7.1. Bacterias lácticas.....	89
7.2. Levaduras.....	90
7.3. Determinación de parámetros enológicos	91
8. Identificación de levaduras vínicas.....	91
8.1. Análisis de la región ITS del DNA ribosómico	92
8.2. Análisis mediante restricción del DNA mitocondrial	93
9. Estudios de localización celular del péptido LfcinB ₁₇₋₃₁ por microscopía	94
10. Análisis estadísticos	95
RESULTADOS	97
CAPÍTULO 1. Caracterización de la actividad antimicrobiana de péptidos derivados de la lactoferrina bovina frente a bacterias lácticas de interés enológico	99
1. Estudio comparado del efecto de LfcinB ₁₇₋₃₁ y HLF sobre el crecimiento bacteriano	101
2. Evaluación de la actividad bactericida de LfcinB ₁₇₋₃₁	104

3. Efecto antibacteriano de LfcinB ₁₇₋₃₁ durante el proceso de fermentación alcohólica.....	107
CAPÍTULO 2. Péptidos antimicrobianos frente a levaduras alterantes de vino.....	113
1. Sensibilidad de las levaduras alterantes frente a los péptidos antimicrobianos: selección de los péptidos más potentes.....	115
2. Caracterización de la actividad antimicrobiana de los péptidos seleccionados.....	121
2.1. Determinación de IC ₅₀ y MIC.....	121
2.2. Determinación de la actividad fungicida en distintos medios de crecimiento	123
2.3. Efecto antimicrobiano del péptido LfcinB ₁₇₋₃₁ frente a distintas cepas de <i>D. bruxellensis</i>	126
2.3.1. Determinación de IC ₅₀ y MIC.....	127
2.3.2. Determinación de la actividad fungicida en distintos medios de crecimiento	129
3. Estudio de la interacción péptido-microorganismo.....	132
3.1. Efecto de los componentes de la matriz de contacto	132
3.2. Estudios de microscopía	136
4. Aplicación en el proceso de vinificación	140
4.1. Efecto de LfcinB ₁₇₋₃₁ en vino acabado.....	141
4.2. Efecto de LfcinB ₁₇₋₃₁ durante la fermentación alcohólica.....	144
4.3. Efecto de un hidrolizado de LF en vino acabado	147
CAPÍTULO 3. β-Glucanasas frente a levaduras alterantes de vino	151

Índice general

1. Sensibilidad de las levaduras alterantes frente al preparado enzimático Glucanex	153
2. Aplicación del Glucanex en vino.....	156
DISCUSIÓN	165
1. Identificación de péptidos PAF frente a levaduras alterantes de vino	170
1.1. Efecto de la estereoisomería.....	176
2. Péptidos derivados de LfcinB frente a microorganismos alterantes de vino	178
2.1. LfcinB ₁₇₋₃₁ como antifúngico.....	178
2.2. LfcinB ₁₇₋₃₁ como antibacteriano.....	181
3. β -glucanasas frente a levaduras alterantes de vino	184
4. Aplicación en enología	186
4.1. Empleo de LfcinB ₁₇₋₃₁ para el control de las contaminaciones microbianas en vino.....	186
4.2. Potencial antifúngico de enzimas β -glucanasas en vino	191
5. Consideraciones prácticas de la aplicación de antimicrobianos en agroalimentación	194
CONCLUSIONES.....	199
DIFUSIÓN DE RESULTADOS	205
BIBLIOGRAFÍA	209

Índice de abreviaturas

AFP:	Proteína antifúngica
AMP:	Péptido antimicrobiano
BAL:	Bacterias lácticas
bLF:	Lactoferrina bovina
CECT:	Colección Española de Cultivos Tipo
DE:	Desviación estándar
DNA:	Ácido desoxirribonucleico
DO:	Densidad óptica
ϵ :	Coefficiente de extinción molar
FITC:	5-isotiocianato de fluoresceína
Fmoc:	N-(9-fluorenil)-metoxicarbonilo
GOX:	Glucosa oxidasa
ha:	Hectárea
hl:	Hectolitro
HLF:	Hidrolizado de lactoferrina con pepsina
IC ₅₀ :	Concentración inhibitoria del 50% del crecimiento
LF:	Lactoferrina
Lfcin:	Lactoferricina
LfcinB:	Lactoferricina bovina
LfcinH:	Lactoferricina humana
LP:	Lactoperoxidasa
LPS:	Lipopolisacárido
MIC:	Mínima concentración inhibitoria

Abreviaturas

MOPS:	3-(N-morfolino)-propanesulfónico
PAF:	Péptido AntiFúngico
Ufc:	Unidad formadora de colonia

Resumen

"Potencial de péptidos y enzimas con capacidad antimicrobiana para el control de microorganismos alterantes de vino"

Los problemas derivados del uso del anhídrido sulfuroso en vinificación, junto a la tendencia actual a reducir el empleo de aditivos en la industria alimentaria, justifican la búsqueda de nuevos compuestos activos y estrategias de control que lo sustituyan o minimicen su empleo, de una manera eficaz y segura para los consumidores. Dos alternativas prometedoras para el control de las contaminaciones microbianas de los vinos son el empleo de péptidos antimicrobianos y la utilización de preparados enzimáticos capaces de degradar la pared celular fúngica.

Durante el desarrollo de este trabajo hemos evaluado la actividad antimicrobiana de distintos péptidos y/o un preparado enzimático comercial rico en actividad β -glucanasa frente a las principales especies de levaduras y bacterias lácticas alterantes de vino. La caracterización de su actividad antimicrobiana *in vitro* reveló perfiles de actividad diferentes, dependiendo de la especie evaluada, e incluso a nivel de cepa, en el caso de la especie *Dekkera bruxellensis*. Además, a pesar de poseer diferente modo de acción el perfil de actividad de varios de los péptidos fue muy similar al correspondiente al preparado de β -glucanasas frente a varias levaduras alterantes, hecho que sugiere que la estructura y composición de la pared celular modula la acción de estos agentes antimicrobianos. Su aplicación en vino o mosto de uva reveló un significativo descenso en su eficacia antimicrobiana en estas matrices alimentarias. En las condiciones ensayadas el único péptido activo en vino fue el derivado de lactoferrina bovina LfcinB₁₇₋₃₁, frente a las especies *D. bruxellensis* y *Zygosaccharomyces bisporus*, hecho que sugiere su potencial aplicación en bodega para el control de las contaminaciones producidas por estas especies de levadura, tanto en vino embotellado como durante la fermentación alcohólica, dada su especificidad de acción antimicrobiana. Así mismo, su demostrada actividad antibacteriana durante el proceso fermentativo lo convierte también en una alternativa para el control de

bacterias lácticas alterantes durante la vinificación. Teniendo en cuenta que el único péptido activo en vino, LfcinB₁₇₋₃₁, es un derivado de la lactoferrina bovina, el empleo de hidrolizados de esta proteína se plantea como alternativa más económica y natural a la utilización de péptidos sintéticos. Por su parte, el preparado de β -glucanasas fue activo en vino frente a *D. bruxellensis* y también en el caso de *Z. bailii* y *S. cerevisiae*, especies sobre las que la alternativa de los péptidos sintéticos no había resultado eficaz para su control. Su demostrada eficacia, junto al hecho de que este tipo de preparados enzimáticos ya se utiliza en vinos con otros fines, los convierte en buenos candidatos para el control de levaduras alterantes en vinificación, en este caso con un exhaustivo control de la dosis para no alterar el correcto desarrollo de la fermentación alcohólica.

Introducción

La conservación de los alimentos ha sido siempre una de las principales preocupaciones del ser humano. Desde tiempos remotos existen referencias del empleo de diferentes técnicas, unas de carácter físico-químico como el secado, ahumado, curado, salado y la conservación por frío, junto con otras de carácter biológico como la fermentación. Con todas ellas se consigue mantener los alimentos durante más tiempo, pero también transformarlos en otros con propiedades diferentes tanto organolépticas como nutritivas, como es el caso del vino, la cerveza y el yogur entre otros.

Con el paso del tiempo se fueron perfeccionando estos métodos, a la vez que se empezaban a utilizar los conservantes. Es en la Edad Media cuando comienzan a emplearse productos tales como las especias para alargar la vida útil de los alimentos. Desde entonces hasta ahora han aparecido numerosos compuestos catalogados como conservantes, que se utilizan actualmente de forma rutinaria.

Uno de los productos fermentados más antiguo y de mayor aceptación es el vino. Los primeros indicios de actividad vitivinícola se remontan hacia el año 6000 A.C., en la región de Oriente Próximo, Mesopotamia y el Cáucaso, desde donde se expandió primero por el Viejo Mundo, y durante la colonización de América, Sudáfrica y Australia se extendió por nuevas regiones de clima templado. A finales del siglo XIX, una plaga de filoxera destruyó gran parte de las cepas cultivadas provocando una grave crisis en el sector vitivinícola a nivel mundial, siendo necesarios más de treinta años para conseguir superarla gracias al empleo de portainjertos de vid americana resistentes a dicha plaga.

Esta recuperación de la producción de la uva y el hecho de que en 1866 Pasteur demostrara la naturaleza biológica de las fermentaciones, permitió a los bodegueros controlar el proceso desde el viñedo hasta la planta embotelladora, consiguiendo mejorar tanto la calidad como la cantidad de vino producido. No obstante, a lo largo de los años y para conseguir estos objetivos se puso de manifiesto la necesidad de emplear

un conservante, en este caso el anhídrido sulfuroso (SO_2), con capacidad antimicrobiana y antioxidante, para garantizar el buen desarrollo de la fermentación alcohólica y la adecuada conservación del vino.

Por lo que respecta a la viticultura en nuestro país, y considerando los datos definitivos más recientes, correspondientes al año 2007, en España existen 1169 miles de ha cultivadas que producen 34,7 millones de hl. Esta cantidad de vino corresponde en un 54% a vinos de mesa, mientras que el resto, 46%, son vinos con denominación de origen. Además del consumo doméstico, España exportó en 2007 un total de 15,1 millones de hl por un valor de 1833 millones de euros, lo que supuso un aumento del 6,5% con respecto al año anterior. Estos datos ponen de manifiesto la importancia del sector vitivinícola en la economía española y la necesidad de mantener los niveles de calidad que permitan seguir aumentando las ventas.

Para conservar esta posición en el mercado mundial, el bodeguero español precisa mantener un nivel tecnológico elevado, pero también adecuarse a las preferencias del consumidor actual, reticente a la hora de consumir productos elaborados con conservantes químicos, además de a una legislación cada vez más restrictiva con respecto a la utilización del SO_2 . Estas son las razones que han llevado a la búsqueda de conservantes naturales con capacidad antimicrobiana que permitieran reducir o sustituir el empleo de SO_2 en vinificación. En este contexto se enmarcan los objetivos de la presente tesis, donde se evalúa la capacidad de péptidos y enzimas antimicrobianas para controlar microorganismos alterantes de vino.

1. Elaboración del vino

1.1. Materia prima: mosto de uva

1.1.1. Acondicionamiento

La elaboración de vino puede llevarse a cabo siguiendo distintos procesos que se inician, todos ellos, con la recolección de la uva o vendimia. Ésta, se lleva a cabo en el momento en que la uva ha alcanzado el grado de madurez adecuado, establecido por los enólogos dependiendo del tipo de vino que se desea obtener, la variedad de uva y la experiencia adquirida en vendimias anteriores.

Tras la recepción de la uva en la bodega se inician una serie de operaciones previas a la fermentación alcohólica conocidas como acondicionamiento. En primer lugar se determina la cantidad de azúcar de la materia prima, su acidez y el posible grado alcohólico que alcanzarán los vinos elaborados con estas uvas y se aplica una primera dosis de SO₂ (gaseoso o como metabisulfito potásico).

A continuación, los racimos de uva se someten a un proceso de despallado, con la finalidad de separar los granos de uva del raspón. Esta etapa permite economizar el espacio ocupado por la materia prima en la bodega, incrementar el grado alcohólico de los vinos, debido a que el raspón aporta agua al mosto, y evitar la aparición de sabores desagradables, de tipo astringente y herbáceo, procedentes de la parte leñosa del racimo de uva.

La siguiente etapa consiste en el estrujado o aplastamiento de la uva para obtener el mosto, que será posteriormente separado de los hollejos en la etapa de escurrido. Esta operación se realiza en el caso de mostos empleados para elaborar vinos blancos y precede a una etapa de prensado, cuya finalidad es la extracción del mosto que no ha sido escurrido. Así mismo, tanto en estos mostos como en aquellos utilizados para la elaboración de rosados, una práctica habitual es el desfangado,

cuyo objetivo es la eliminación de las partes sólidas que se encuentren en suspensión. Tras el estrujado y prensado se adiciona nuevamente SO₂ al mosto con la finalidad de mantener la cantidad adecuada de forma activa.

Seguidamente se procede a su encubado, que consiste en la introducción del mosto en contenedores de fermentación. Originariamente, dichos contenedores eran de madera pero, dada la elevada incidencia de contaminaciones microbianas y la dificultad para la refrigeración de su contenido, se emplean actualmente cubas de acero inoxidable con sistemas de refrigeración acoplados. Tras la etapa de encubado y antes de la fermentación alcohólica se adiciona nuevamente otra dosis de SO₂.

1.1.2. Composición del mosto

Los principales componentes del mosto de uva se muestran en la Tabla 1. Como se puede observar, el componente más abundante después del agua, son los azúcares, concretamente los monosacáridos. Destacan la glucosa y la fructosa, que se encuentran en cantidades equimolares (Ough, 1992), y su concentración depende de diversos parámetros, como las condiciones climáticas de maduración (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006).

Los ácidos orgánicos ocupan el segundo lugar, destacando el tartárico y el málico como mayoritarios, ya que suponen el 90% de la acidez fija (Jackson y Jackson, 1994). Junto con ellos se encuentran pequeñas cantidades de ácido láctico, cítrico y ascórbico.

Los compuestos nitrogenados se pueden desglosar en la fracción mineral o amoniacal (3-10% del total), aminoácidos (25-30%), polipéptidos (25-40%), y proteínas (5-10%). El contenido en nitrógeno del mosto suele ser limitante para el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* (Henschke y Jiranek, 1993) ya que es incapaz de asimilar nitrógeno inorgánico (nitratos y nitritos), proteínas y polipéptidos. Por ello, su crecimiento depende fundamentalmente, de la cantidad de amonio y aminoácidos presentes en el medio (Ough y Amerine, 1988).

Tabla 1. Composición del mosto de uva.

Compuesto	Concentración (g/L)
Agua	700-850
Monosacáridos	140-250
Polisacáridos	3-5
Ácidos orgánicos	9-27
Polifenoles	0,5
Compuestos nitrogenados	4-7
Minerales	0,80-2,80
Vitaminas	0,25-0,80

Fuente bibliográfica: Flanzy, 2003.

Los compuestos fenólicos presentes en el mosto son los responsables de su coloración y proceden principalmente de la piel de la uva, aunque los taninos se acumulan en las pepitas. Dichos compuestos fenólicos se dividen en flavonoides y no flavonoides. La familia de los flavonoides incluye principalmente flavonoles, antocianos y flavanoles (taninos), mientras que los no-flavonoides corresponden a los ácidos fenólicos, como son el ácido benzoico e hidroxicinámico, y los estilbenos. Los vinos tintos contienen todos los compuestos fenólicos enumerados mientras que los blancos poseen básicamente ácidos fenólicos y flavonoles.

Entre los compuestos aromáticos presentes en el mosto destacan los terpenos, responsables de los aromas primarios o varietales, característicos de cada variedad de uva. Están constituidos por unidades de isopreno y se encuentran en forma libre o glicosilados, siendo los primeros los únicos que poseen capacidad aromática (Jackson, 2000).

Debido a que la vinificación es un proceso de fermentación discontinua, los nutrientes presentes en el mosto se van agotando, lo que puede dar lugar a que el crecimiento de las levaduras esté condicionado por la limitación de uno o varios nutrientes. Por esta razón, en ocasiones

es necesario adicionar ciertas sales minerales ó compuestos nitrogenados al mosto, dado que son los compuestos críticos para el adecuado desarrollo de la fermentación.

1.2. Fermentación alcohólica

La fermentación alcohólica es el proceso bioquímico por el que los monosacáridos del mosto se transforman en etanol y dióxido de carbono (CO₂), como resultado del metabolismo anaerobio de las levaduras, principalmente *S. cerevisiae*, obteniéndose así el vino (Navarre y Langlade, 2006). El etanol puede alcanzar concentraciones entre el 12 y 14% (v/v), según la cantidad de azúcares del mosto, mientras que la cantidad de CO₂ formado es del orden de 56 litros por litro de mosto con un contenido en azúcares de 210 g/l aproximadamente. Durante esta fermentación también tiene lugar la formación de compuestos secundarios como el glicerol y el ácido succínico, además de ácido pirúvico, ácido α -cetoglutárico y acetaldehído. Las levaduras también sintetizan alcoholes superiores, ácidos grasos y sus ésteres, estos últimos considerados como los principales responsables de los aromas secundarios o fermentativos de los vinos (Hidalgo, 2003). La Figura 1 muestra los principales compuestos producidos por la levadura durante la fermentación alcohólica.

La fermentación alcohólica puede ser espontánea o inducida por la adición de levaduras seleccionadas. La primera es un proceso llevado a cabo por la acción de especies de levaduras presentes en la uva y el mosto, pertenecientes principalmente a los géneros *Hanseniaspora*, *Candida*, *Pichia* y *Metschnikowia*. Estas levaduras de bajo poder fermentativo crecen durante las etapas iniciales, y cuando la concentración de etanol aumenta se imponen las levaduras más tolerantes a este compuesto, pertenecientes al género *Saccharomyces*, que completan la fermentación (Santamaría *et al.*, 1999). Por razones de seguridad microbiológica y un mejor control de este proceso, la utilización de cepas de levadura seleccionadas de la especie *S. cerevisiae* constituye una

práctica cada vez más extendida, aplicándose en forma de levaduras secas activas.

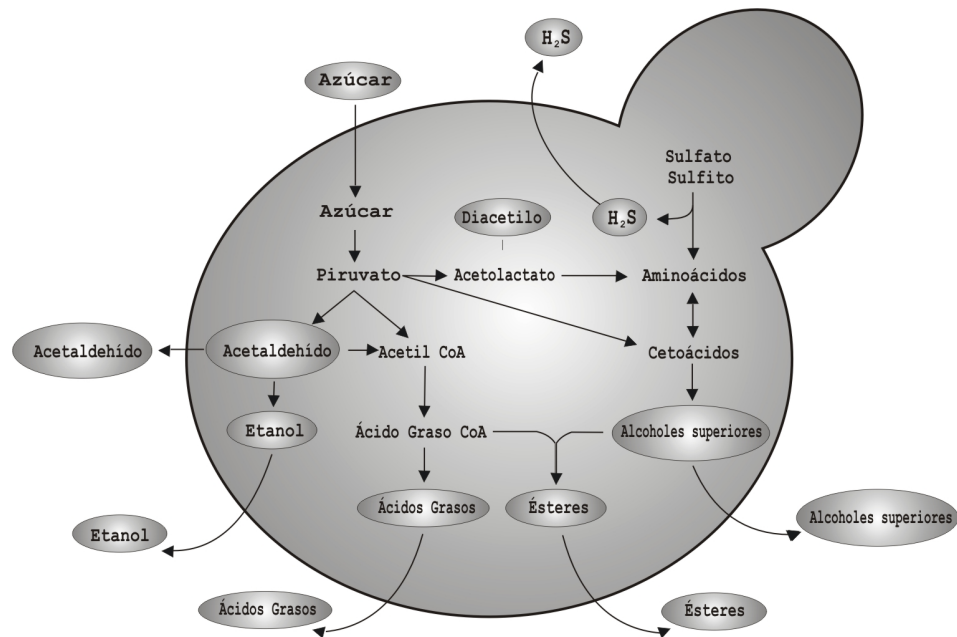


Figura 1. Principales compuestos producidos por las levaduras durante el proceso de fermentación alcohólica (Pretorius, 2000).

La curva de crecimiento típica de *S. cerevisiae* durante el proceso fermentativo se representa en la Figura 2. Tras la inoculación del mosto se inicia un corto periodo de latencia, transcurrido el cual comienza el ciclo de crecimiento típico de *S. cerevisiae* en las fermentaciones vnicas, que consta de tres etapas. La primera es una fase de crecimiento limitado que dura entre 2 y 5 días y produce un aumento de la población de dos unidades logarítmicas. En esta fase, la velocidad de crecimiento es máxima y suele consumirse entre un tercio y la mitad de la cantidad inicial de azúcares (Castor y Archer, 1956). A continuación el crecimiento entra en fase estacionaria, etapa de alrededor de 8 días de duración, durante la

cual no se produce aumento del número de células, pero las existentes siguen siendo metabólicamente activas y la velocidad de fermentación se mantiene en su valor máximo.

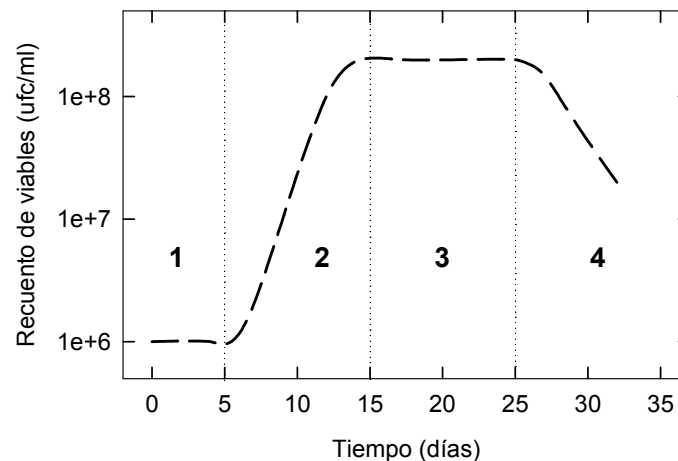


Figura 2. Curva de crecimiento típica de la levadura *S. cerevisiae* durante la fermentación alcohólica. Las etapas que la constituyen son la fase de latencia (1), fase de crecimiento exponencial (2), fase estacionaria (3) y fase de declive (4).

Finalmente el cultivo entra en una fase de muerte de hasta varias semanas, que se acompaña de una disminución de la velocidad de fermentación. Tras la muerte de las levaduras se produce la autodegradación enzimática de los constituyentes celulares, fenómeno conocido como autólisis (Farrer, 1956), que provoca la incorporación al vino de algunos productos procedentes de la misma, modificando sus propiedades y otorgando algunas de las características deseadas al producto final (Barre *et al.*, 2003). El proceso fermentativo se lleva a cabo a temperaturas entre 16 y 20°C en el caso de vinos blancos, mientras que si se trata de vinos tintos para crianza se recomiendan temperaturas

superiores, entre 28-30°C, y en el caso de vinos jóvenes la temperatura óptima oscila entre 20-25°C.

Tras el desarrollo de la fermentación alcohólica, se inicia la etapa de clarificación, cuya finalidad es limpiar el vino obtenido y eliminar los restos de levaduras (también denominadas lías), presentes en el mismo. Para ello se pueden emplear clarificantes minerales, como la bentonita, u orgánicos, como la gelatina, la cola de pescado, la caseína o la clara y albúmina de huevo, entre otros.

Finalizada esta etapa, el vino se almacena en depósitos a bajas temperaturas hasta el momento de su embotellado. Antes de llevarlo a cabo, el vino se somete a una etapa de filtrado, inicialmente mediante el empleo de tierras de diatomeas, que permiten la eliminación de la parte más grosera, y posteriormente utilizando membranas de filtración, que pueden llegar a ser esterilizantes (Hidalgo, 2003).

Los principales tipos de vino son los blancos, rosados y tintos, y su proceso de elaboración incluye, además de todas las etapas comunes descritas previamente, otras propias de cada tipo de vino, como se detalla en la Figura 3.

1.3. Fermentación maloláctica

En las etapas finales de la fermentación alcohólica, o tras la finalización de ésta, en ciertos vinos es deseable que se produzca la fermentación maloláctica o segunda fermentación (Hidalgo, 2003), que consiste en la transformación del ácido málico en ácido láctico. Las principales especies de bacterias lácticas responsables de llevar a cabo este proceso pertenecen a los géneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus* y *Pediococcus*, empleándose habitualmente cepas seleccionadas de la especie *Oenococcus oeni*.

El mecanismo bioquímico de transformación del ácido málico por las bacterias lácticas consiste en la descarboxilación de dicho ácido,

desprendiéndose una molécula de CO₂ y otra de ácido L (+) láctico. La consecuencia de esta transformación es una importante caída de la acidez total del vino, estimada en unos 0,6 g/l en ácido tartárico por cada 1 g/l de ácido málico metabolizado.

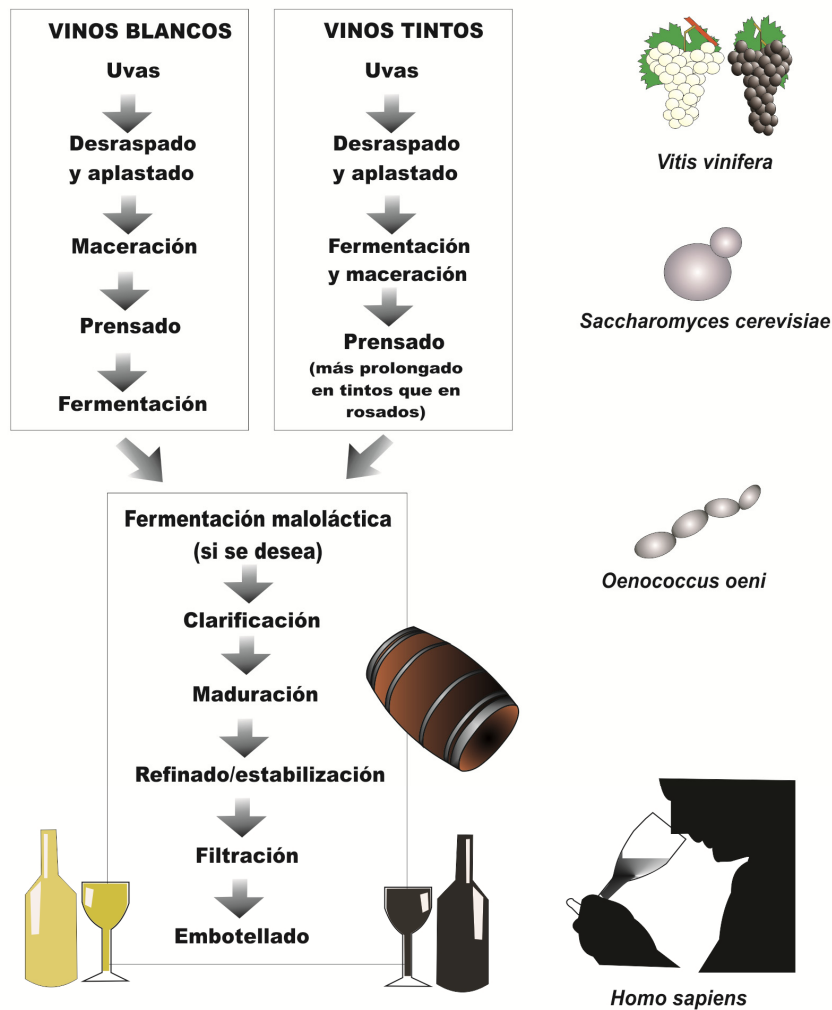


Figura 3. Principales etapas del proceso de producción de vinos tintos, rosados y blancos (Pretorius y Hoj, 2005).

Los principales factores que influyen en el desarrollo de la fermentación maloláctica son la temperatura, el pH y el contenido en SO₂ del vino. La temperatura óptima de desarrollo se encuentra entre 20-23°C, aunque el intervalo se puede ampliar hasta 10-30°C. El valor de pH óptimo para el desarrollo de estos microorganismos es de 4,2 a 4,5, mientras que el valor de pH mínimo por debajo del cual el crecimiento bacteriano se encuentra inhibido en su totalidad es de 3,0. El SO₂, por su parte, cuando alcanza niveles que se sitúan entre los 0,5-0,8 mg/l de SO₂ molecular provoca una disminución en la actividad de las bacterias lácticas, impidiendo el adecuado desarrollo de esta fermentación. También porcentajes de etanol elevados, el déficit de ciertos nutrientes o la inadecuada aireación durante el proceso pueden afectar a su desarrollo.

Esta segunda fermentación aporta mayor estabilidad biológica al vino, debido a su empobrecimiento en nutrientes. Además, la acumulación de manoproteínas que se produce durante el proceso, procedentes de las paredes celulares de las levaduras en autólisis y de las bacterias lácticas, comunican al vino una agradable sensación grasa y de volumen.

Debido a los efectos que el desarrollo de la fermentación maloláctica provoca en los vinos, es un proceso deseable en los tintos que se destinan a crianza, donde se requiere obtener una buena estabilidad biológica, o bien en otros vinos de elevada acidez que necesitan una desacidificación biológica, aún a costa de perder potencial aromático, como sucede en algunos vinos jóvenes. Sin embargo, en el caso de los vinos destinados a consumo rápido, que poseen bajos niveles de ácido málico y cuya presencia contribuye a mejorar las sensaciones gustativas, esta fermentación no resulta deseable.

2. Microorganismos alterantes de vino

La fermentación del mosto de uva y la producción de vinos de primera calidad es un proceso complejo, tanto a nivel microbiológico como

bioquímico, que incluye el desarrollo secuencial de diversas especies microbianas, dentro de un medio de composición cambiante y particular.

Dicho proceso incluye la interacción de hongos, levaduras y bacterias lácticas y acéticas, así como aquellos micovirus y bacteriófagos que afectan a estos microorganismos (Fleet, 1993; Fleet, 1998). La Figura 4 muestra los principales grupos microbianos presentes en las distintas etapas del proceso de vinificación.

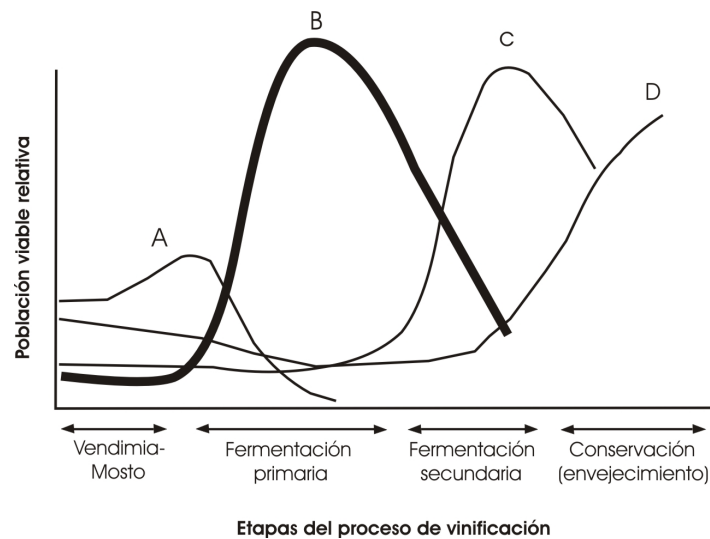


Figura 4. Crecimiento generalizado de (A) levaduras no-*Saccharomyces*, (B) *Saccharomyces*, (C) *Oenococcus oeni* y (D) levaduras y/o bacterias alterantes, durante el proceso de vinificación (Fugelsang y Edwards, 2007).

Durante las diversas etapas que incluye el proceso de vinificación se puede producir la alteración microbiológica del vino. La microbiota natural del grano de uva es el primer punto crítico como fuente de contaminación microbiológica. Las especies de levadura predominantes (en un 50-75%) en la superficie de la uva corresponden al género *Kloeckera/Hanseniaspora*. En menor proporción es posible encontrar otras especies de levadura débilmente fermentativas y poco tolerantes a etanol,

pertenecientes a los géneros *Metschnikowia*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Pichia*, *Kluyveromyces* y *Hansenula*, siendo escasa la presencia de las especies fermentativas *S. cerevisiae* y *Saccharomyces bayanus* (Fleet y Heard, 1993; Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006). Las principales especies de bacterias lácticas de la uva pertenecen a los géneros *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* y *Oenococcus*, mientras que las bacterias acéticas presentes en el grano se incluyen en los géneros *Gluconobacter* y *Acetobacter* (du Toit y Pretorius, 2000). La microbiota del grano de uva presenta cierta variabilidad dependiendo de factores externos como la variedad, el estado de la uva en la recolección, la temperatura, el suelo y las variaciones climáticas de cada cosecha y el empleo de fungicidas e insecticidas, entre otras prácticas agrícolas (Fleet, 1998; Fleet y Heard, 1993; Pretorius *et al.*, 1999), y afectará a la biodiversidad natural de los microorganismos presentes en el mosto. También es crucial la correcta limpieza del equipamiento de la bodega para evitar la contaminación del mosto por contacto directo (du Toit y Pretorius, 2000).

El segundo punto crítico de contaminación microbiológica es el proceso fermentativo (du Toit y Pretorius, 2000). La elevada concentración de azúcar y el pH bajo del mosto, junto a la adición de SO₂, como agente antioxidante y antimicrobiano, son factores que ejercen una fuerte presión selectiva sobre los microorganismos, de forma que únicamente unas pocas especies de levaduras y bacterias son capaces de proliferar en este medio. La levadura predominante durante el proceso es *S. cerevisiae*, y el incremento paulatino de los niveles de etanol durante la fermentación evita el desarrollo de ciertos hongos y bacterias (Henschke, 1997). En las fermentaciones espontáneas o naturales, las levaduras que inician el proceso fermentativo pertenecen a los géneros *Candida* y *Hanseniaspora*, mientras que en las etapas centrales, cuando el etanol alcanza niveles del 3-4% (Fleet y Heard, 1993; Henschke, 1997; Mortimer *et al.*, 1994), predominan las especies de los géneros *Metschnikowia* y *Pichia*. Estas especies de levaduras no-*Saccharomyces* son sensibles a etanol, de

manera que cuando su concentración se incrementa mueren, aunque pueden influir en la composición final del vino, ya que alcanzan concentraciones entre 10^6 y 10^7 ufc/ml (Fleet y Heard, 1993). Estas especies son sustituidas por cepas de la especie *S. cerevisiae*, que llevan a cabo el proceso fermentativo. En esta etapa también es crucial el pH, ya que si supera el valor de 3,6, se favorece la proliferación de bacterias del ácido láctico, fundamentalmente especies de los géneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc* y *Pediococcus*, así como diversas bacterias acéticas, pudiendo provocar un deterioro de la calidad del vino (Fleet, 1998; Joyeux *et al.*, 1984b; Lafon-Lafourcade *et al.*, 1983; Wibowo *et al.*, 1985).

Finalmente, el vino también puede ser susceptible de alteración microbiana en la etapa post-fermentativa, tanto en botella como durante su envejecimiento en bodega (du Toit y Pretorius, 2000). Durante este estadio los factores críticos son la buena higiene de la bodega, ausencia de oxígeno y la correcta dosificación de los agentes antimicrobianos, con el fin de asegurar la estabilidad del producto (Boulton *et al.*, 1996; Fleet, 1998). En esta etapa, el vino puede ser afectado por hongos y especies de *Actinomyces* y *Streptomyces* presentes en el corcho o en las barricas de roble (Lee y Simpson, 1993).

2.1. Levaduras

De los cien géneros de levadura que incluyen a más de 700 especies, descritas en la última edición de la serie monográfica *The Yeasts, A Taxonomic Study* (Kurtzman y Fell, 1998), únicamente quince están relacionados con el proceso de vinificación. Dicho grupo incluye a los géneros *Brettanomyces* y su equivalente sexual *Dekkera*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Hanseniaspora* y su forma asexual *Kloeckera*, *Kluyveromyces*, *Metschnikowia*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Saccharomycodes*, *Schizosaccharomyces* y *Zygosaccharomyces* (Pretorius *et al.*, 1999). De todas ellas se conocen como levaduras vínicas las especies del género *Saccharomyces*,

tolerantes a elevadas concentraciones de azúcar y etanol y capaces de llevar a cabo la fermentación alcohólica sin provocar alteración en los vinos. Por otra parte, el término levaduras silvestres se aplica al grupo no-*Saccharomyces*, que únicamente son capaces de llevar a cabo fermentaciones parciales. Ambos grupos pueden provocar alteraciones en los vinos. Sin embargo, los géneros de levadura que se aíslan habitualmente de los mismos son *Brettanomyces* (*Dekkera*), *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces* y *Zygosaccharomyces* (du Toit y Pretorius, 2000). Otras especies, a pesar de ser contaminantes habituales en bodega, dado que son levaduras aerobias obligadas (como es el caso de *Cryptococcus* spp.) poseen una escasa o nula capacidad de alteración.

La Tabla 2 recoge las principales alteraciones de los vinos y las levaduras causantes de las mismas. La alteración más habitual que pueden sufrir los vinos dulces es una re-fermentación en botella, debida a la presencia de células de levadura que pueden consumir los azúcares residuales presentes en estos vinos. La causa de esta alteración es una inadecuada filtración previa al embotellado de los mismos. La principal especie de levadura asociada a este tipo de alteración es *S. cerevisiae*, aunque también puede ser provocada por otras especies de levadura como *Schizosaccharomyces pombe*, *Zygosaccharomyces bailii* y *Saccharomyces ludwigii*. Esta última especie posee una elevada tolerancia al etanol y es altamente resistente al SO₂, razón por la que se suele aislar en bodegas donde se emplean altas dosis de este agente antimicrobiano (Boulton *et al.*, 1996; Loureiro y Malfeito-Ferreira, 2003a).

Otras especies de levadura provocan la alteración de los vinos por la formación de ésteres. Este es el caso de *Pichia anomala* y *Kloeckera apiculata* (*Hanseniaspora uvarum*), especies vinculadas al mosto y que provocan la alteración en las etapas iniciales de la fermentación alcohólica. El aroma característico de estos vinos se debe a la acumulación de ésteres del ácido acético como el acetato de etilo y el metilbutilacetato. El crecimiento de *Z. bailii* en los vinos también podría incrementar las cantidades de ácido acético y succínico en los mismos y reducir la cantidad

de ácido L-málico, provocando una reducción de la acidez total y una alteración en la concentración de ésteres (Boulton *et al.*, 1996; Fugelsang, 1997).

Tabla 2. Principales alteraciones de los vinos producidas por levaduras (du Toit y Pretorius, 2000).

Levadura alterante	Alteración
<i>Brettanomyces bruxellensis</i> Anamorfo: <i>Dekkera bruxellensis</i>	Producen fenoles volátiles y tetrahidropiridinas; incrementan los niveles de ácido acético.
<i>Candida</i> spp. <i>C. vini</i> ; <i>C. stellata</i> ; <i>C. pulcherrima</i> ; <i>C. krusei</i>	Provocan la aparición de películas; incrementan las concentraciones de acetaldehído, ácidos volátiles y ésteres.
<i>Hanseniaspora uvarum</i> Anamorfo: <i>Kloeckera apiculata</i>	Producen altos niveles de ácido acético y sus ésteres.
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	Crecimiento en forma de película; incrementa los niveles de acetato de etilo y acetaldehído.
<i>Pichia</i> spp. <i>P. anomala</i> ; <i>P. membranifaciens</i> ; <i>P. vini</i>	Producen películas de aspecto calcáreo y altos niveles de acetaldehído y acetato de etilo.
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Re-fermentación de vinos dulces.
<i>Saccharomyces ludwigii</i>	Produce elevadas concentraciones de acetaldehído y aporta viscosidad.
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Re-fermentación de vino embotellado; desacidificación.
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	Provoca turbidez y la aparición de sedimentos; incrementa los niveles de ácido acético y reduce la cantidad de málico.

Otro defecto de los vinos, consecuencia de la alteración por levaduras, es el incremento de la acidez volátil. El ácido acético es el principal ácido volátil presente en el vino. Este compuesto es producido por *S. cerevisiae* durante las etapas iniciales de la fermentación alcohólica. El grupo de levaduras implicadas en la acetificación de los vinos, por encima de los niveles habituales, incluye especies de género *Brettanomyces*, *P. anomala*, *K. apiculata* y *C. krusei* (Zoecklein et al., 1995).

La presencia de fenoles volátiles en los vinos, como vinilfenoles (4-vinilguayacol y 4-vinilfenol) en vinos blancos, o etilfenoles (4-etilguayacol y 4-etilfenol) en vinos tintos, se debe a la contaminación por especies del género *Dekkera*, y provoca aromas característicos a sudor de caballo y cuero mal curado. Estos fenoles volátiles se producen por la descarboxilación y reducción de diversos ácidos hidroxicinámicos entre los que se incluyen el *p*-cumárico y el ácido ferúlico (du Toit y Pretorius, 2000).

La contaminación por *Dekkera* también puede provocar otras alteraciones en el aroma de los vinos, atribuidas a la formación de tres bases volátiles heterocíclicas (2-acetiltetrahidropiridina, 2-etiltetrahidropiridina y 2-acetil-1-pirrolina), que producen el denominado olor a orina de ratón (Moreno-Arribas y Polo, 2005).

Algunas especies de levaduras alterantes, con metabolismo aerobio o débilmente fermentativo, como *P. membranifaciens*, *P. anomala* y *Candida* spp. se caracterizan por la formación de películas en la superficie de los vinos almacenados en tanques, que contienen niveles de SO₂ insuficientes para evitar su crecimiento (Loureiro y Malfeito-Ferreira, 2003a). Estas levaduras no sólo generan un problema estético, también pueden perjudicar la calidad del vino debido a que producen acetaldehído, compuesto que le otorga un sabor a oxidado. Además de dicho compuesto, a partir de etanol generan otros como ácido acético y ésteres de acetato (du Toit y Pretorius, 2000).

Por otro lado, el aminoácido mayoritario en mosto y vino es la L-arginina, que en *S. cerevisiae* es degradado a ornitina, amonio y CO₂ por la acción de la enzima arginasa (Ough *et al.*, 1988b). Como intermediario de esta reacción se forma urea que se secreta al vino, y en presencia de etanol produce etil carbamato, también llamado uretano, un potente compuesto cancerígeno (Monteiro y Bisson, 1991; Ough *et al.*, 1988a). Dada la implicación que puede tener este compuesto sobre la salud, la Organización Internacional de la Viña y el Vino (O.I.V.) ha admitido la adición de preparados comerciales de la enzima ureasa ácida al vino, con el fin de prevenir su formación (Moreno-Arribas y Polo, 2005). También se deben seleccionar las cepas de *S. cerevisiae* productoras de bajas cantidades de urea y minimizar las prácticas enológicas que puedan incrementar sus niveles en vino.

La desacidificación de los vinos también puede provocar su alteración debido a una pérdida del color rojo de los tintos, como consecuencia del incremento del pH. Si además dicho incremento es drástico, el color puede virar de rojo a un tono azulado. Las especies de levadura con mayor capacidad de desacidificación por degradación del ácido málico de los vinos son *Sz. pombe* y *Z. bailii*.

En la actualidad, se considera que las levaduras alterantes de vino más importantes pertenecen a los géneros *Dekkera*, *Zygosaccharomyces* y *Saccharomyces* (Loureiro y Malfeito-Ferreira, 2003a).

Las levaduras pertenecientes al género *Zygosaccharomyces* poseen una elevada capacidad para crecer en presencia de concentraciones altas de azúcar y llevar a cabo la fermentación de un mosto de uva. Este género incluye ocho especies, de las cuales únicamente cuatro se asocian al campo de la enología: *Z. bailii*, *Z. bisporus*, *Z. rouxii* y *Z. florentinus* (Boulton *et al.*, 1996; Fugelsang, 1998; Kurtzman y Fell, 1998). La especie alterante más difícil de combatir es *Z. bailii*, debido a su elevada resistencia a los conservantes empleados habitualmente en vinificación, junto a su capacidad para tolerar elevadas

concentraciones de etanol (>15%) y niveles de pH bajos (<2) (Fugelsang, 1998; Thomas y Davenport, 1985).

Las levaduras pertenecientes al género *Dekkera* y su anamorfo *Brettanomyces*, son capaces de crecer tanto en vino blanco como en tinto al final de la fermentación alcohólica, durante el envejecimiento de los vinos en barricas de roble, e incluso de forma lenta en botella, fermentando la pequeña cantidad de azúcares residuales presentes en los mismos. La principal especie alterante de vinos es *D. bruxellensis*, aislada en viñedos en los diferentes estadios del desarrollo de la uva (Loureiro y Malfeito-Ferreira, 2003a; Renouf y Lonvaud-Funel, 2007).

Respecto al género *Saccharomyces*, en determinados casos la especie *S. cerevisiae* puede actuar como alterante, dada su capacidad para provocar procesos de re-fermentación en vinos dulces.

2.2. Bacterias

2.2.1. Bacterias del ácido láctico

Cuando las distintas etapas del proceso de vinificación se controlan de forma adecuada, las bacterias lácticas (BAL) colaboran en la mejora de la calidad de los vinos, ya que son las encargadas de llevar a cabo la fermentación maloláctica. Sin embargo, si se produce su crecimiento incontrolado durante dicho proceso de vinificación, afectan negativamente a las características organolépticas y de salubridad de los vinos, disminuyendo considerablemente su calidad.

El grupo de BAL involucradas en los procesos de alteración de los vinos incluye especies pertenecientes al género *Lactobacillus*, como son *L. hilgardii*, *L. brevis* y *L. plantarum*, así como las especies *Pediococcus damnosus* y *Leuconostoc mesenteroides*. La especie *O. oeni*, denominada anteriormente *Leuconostoc oenos* (Dicks *et al.*, 1995), es la principal encargada de llevar a cabo la fermentación maloláctica, aunque en

ocasiones puede estar involucrada en procesos de alteración de los vinos, si su proliferación se produce en un momento inadecuado de la vinificación. El ambiente más propicio para que esto ocurra es un vino embotellado con un valor de pH superior a 3,5 y en presencia de los nutrientes necesarios para el desarrollo bacteriano (malato ó azúcares residuales). Como consecuencia de este proceso de re-fermentación el vino sufrirá una desacidificación y un incremento de pH, que se puede controlar con la adición al mismo de ácido tartárico (du Toit y Pretorius, 2000).

Las bacterias lácticas suelen estar presentes en uvas con un alto contenido en bacterias acéticas o contaminadas por hongos, dado que su presencia estimula el crecimiento bacteriano. Además, son capaces de tolerar el estrés que supone el vino, habiéndose adaptado al pH bajo, presencia de etanol y SO₂, bajas temperaturas y a la utilización de nutrientes del vino (Wibowo *et al.*, 1985). Durante la fermentación alcohólica no incrementan su población, pero transcurrida ésta pueden alcanzar concentraciones en vino de 10⁶-10⁸ ufc/ml (Fleet, 1998). Si el pH del vino es bajo (3-3,5) predomina *O. oeni*, mientras que a valores superiores (>3,5) predominan especies de *Lactobacillus* y *Pediococcus*, que si proliferan pueden afectar negativamente a la calidad del producto final (du Toit y Pretorius, 2000).

Las alteraciones que producen estas bacterias se resumen en la Tabla 3, siendo la más común el denominado “picado láctico”, que ocurre cuando las BAL inician la fermentación de los azúcares residuales presentes en el vino. Como consecuencia se producen cantidades excesivas de ácido D-láctico y acético, que incrementarán notablemente la acidez volátil del mismo (Moreno-Arribas y Polo, 2005). Otro caso de alteración como consecuencia del metabolismo de las bacterias lácticas es debido a la formación de acroleína. Algunas bacterias del ácido láctico son capaces de convertir el glicerol a 3-hidroxi propionaldehído por la acción de la glicerol deshidratasa (Boulton *et al.*, 1996). Este compuesto es precursor de la acroleína, que puede reaccionar con taninos presentes en el vino,

aportando un sabor amargo al mismo. Las bacterias lácticas responsables de ambos tipos de alteraciones pertenecen principalmente al género *Lactobacillus*.

Por otro lado, ciertas cepas de BAL son capaces de sintetizar polisacáridos extracelulares, provocando un deterioro de los vinos al aportarles un aspecto viscoso. Los principales géneros implicados en este tipo de alteración son *Leuconostoc* y *Pediococcus* (Manca de Nadra y Strasser de Saad, 1995; Van Vuuren y Dicks, 1993).

Especies del género *Lactobacillus*, como *L. brevis* y *L. hilgardii*, son las responsables, junto con *Dekkera* spp., de la síntesis de tetrahidropiridinas, compuestos que, como ya se ha comentado, aportan un aroma desagradable a los vinos (Grbin y Henschke, 2000).

En la actualidad está adquiriendo cada vez más notoriedad la relación de las BAL con la formación de compuestos negativos para la salud, como el etil carbamato y las aminas biógenas. La formación del primero sigue la ruta ya comentada en el caso de las levaduras, ya que las especies *L. hilgardii*, *L. brevis* y *O. oeni*, son capaces de degradar eficientemente la arginina hasta urea (Arena *et al.*, 1999; Mira de Orduña *et al.*, 2000). En relación con las aminas biógenas, las más comunes en vino son histamina, tiramina, putrescina y cadaverina, producidas por la descarboxilación bacteriana de los aminoácidos histidina, tirosina, arginina y lisina, respectivamente (Lehtonen, 1996).

La histamina, una de las aminas biógenas más estudiadas, puede provocar dolor de cabeza, hipotensión y problemas digestivos, mientras que la tiramina se asocia a procesos de migraña e hipertensión (Silla, 1996). Las especies *L. hilgardii*, *L. brevis*, *P. damnosus*, *Lc. mesenteroides* y *O. oeni*, han sido descritas como productoras de alguna de estas aminas biógenas (Arena y Manca de Nadra, 2001; Guerrini *et al.*, 2002; Lonvaud-Funel y Joyeux, 1994; Moreno-Arribas *et al.*, 2000).

Tabla 3. Principales alteraciones bacterianas de los vinos (du Toit y Pretorius, 2000).

Bacteria alterante	Alteración
Bacterias lácticas	
<i>Lactobacillus brevis</i>	Produce precursores de etilcarbamato, tetrahidropiridinas y aminas biógenas; consume ácido tartárico; provoca la acidificación de los vinos; forma manitol
<i>Lactobacillus hilgardii</i> <i>Lactobacillus cellobiosus</i>	Producen tetrahidropiridinas, provocan amargor como consecuencia del metabolismo del glicerol
<i>Lactobacillus kunkeei</i>	Produce altos niveles de ácido acético, implicada en paradas de fermentación
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Provoca degradación de tartrato; incrementa los niveles de diacetilo
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Aporta viscosidad; provoca amargor como consecuencia del metabolismo del glicerol
<i>Oenococcus oeni</i>	Produce precursores de etilcarbamato e histamina; implicada en paradas de fermentación; incrementa los niveles diacetilo
<i>Pediococcus damnosus</i>	Produce histamina; sintetiza polisacáridos
<i>Pediococcus parvulus</i>	Forma acroleína
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	Sintetiza polisacáridos
Bacterias acéticas	
<i>Acetobacter aceti</i> <i>Acetobacter pastorianus</i> <i>Gluconobacter oxydans</i>	Oxidan el etanol a acetaldehído y ácido acético; producen acetato de etilo, dihidroxiacetona y acetoína; aportan viscosidad al vino
Otras bacterias	
<i>Bacillus</i> spp. <i>Clostridium</i> spp.	Incrementan la acidez del vino al producir ácido butírico; forman sedimentos

Además, diversas especies de BAL son capaces de metabolizar varios ácidos orgánicos presentes en el vino, como los ácidos cítrico, tartárico y sórbico, hecho que puede afectar negativamente a la calidad del mismo. Por ejemplo, en el proceso de degradación del ácido cítrico se generan diversos productos que afectan a las características organolépticas de los vinos. El metabolito más importante que se produce es el diacetilo que otorga al vino notas a nuez y aroma a mantequilla (Martineau y Henick-Kling, 1995). Su acumulación es el resultado del crecimiento de BAL después de la fermentación alcohólica y/o durante la fermentación maloláctica (Fugelsang, 1997; Sponholz, 1993). Por su parte, la degradación del ácido tartárico, en la que están implicadas cepas de *L. plantarum* y *L. brevis*, puede provocar la acumulación de ácido acético como producto final, que incrementará la acidez volátil del vino alcanzando, en ocasiones, niveles inaceptables (Wibowo *et al.*, 1985). Por lo que se refiere a la degradación del ácido sórbico, ciertas bacterias lácticas, pertenecientes principalmente al género *Oenococcus*, son capaces de reducirlo a sorbinol, compuesto que en condiciones enológicas formará el alcohol 3,5-hexadieno-2-ol, que puede reaccionar con el etanol presente en el vino generando 2-etoxihexa-3,5-dieno, responsable de otorgar al vino un aroma característico a geranio (Fugelsang, 1997; Sponholz, 1993).

2.2.2. Bacterias del ácido acético

Las bacterias acéticas pertenecen a la familia *Acetobacteriaceae* y se conocen comúnmente como las bacterias del vinagre. Los géneros de bacterias acéticas de importancia en la industria del vino son *Acetobacter* y *Gluconobacter*, que se caracterizan por poder llevar a cabo el proceso denominado acetificación, que consiste en la oxidación del etanol presente en el vino a ácido acético. Las especies pertenecientes al primero de estos géneros son más tolerantes al etanol pudiendo sobrevivir a la fermentación alcohólica alterando el producto final, mientras que las especies incluidas

en el segundo de ellos tienen preferencia por ambientes que contengan altas concentraciones de azúcar y bajos niveles de etanol, por esta razón se suelen aislar de uvas y mostos (du Toit y Pretorius, 2000).

La presencia de bacterias del ácido acético en los vinos provoca la acumulación de varios productos que desemboca en un detrimento en la calidad de los mismos (Tabla 3). Entre ellos destacan, además del ácido acético, los ésteres de acetato, especialmente el acetato de etilo, la dihidroxiacetona, el acetaldehído y la acetoína, que además son capaces de unirse al SO₂ reduciendo su capacidad antimicrobiana (du Toit y Pretorius, 2000).

2.3. Otros microorganismos alterantes

En algunos casos se ha descrito también la alteración microbiana de los vinos por especies de los géneros *Bacillus* y *Clostridium*. En el primer caso pueden provocar la formación de sedimentos e incrementar la acidez volátil y total de los vinos alterados, mientras que la contaminación por *Clostridium* spp. genera ácido *n*-butírico que provoca olor a rancio (Tabla 3) (du Toit y Pretorius, 2000).

Diversas especies de hongos filamentosos, pertenecientes entre otros a los géneros *Alternaria*, *Aspergillus*, *Botrytis* o *Penicillium* (Fleet, 1998; Fugelsang, 1997), se han asociado con procesos de alteración de la uva previos a la vendimia, que pueden afectar negativamente a la calidad del vino elaborado con dicha cosecha. Estos hongos son incapaces de sobrevivir en vino, pero pueden crecer en el equipamiento de la bodega e incluso en las barricas de roble empleadas para su envejecimiento, aportando al mismo aroma a moho (du Toit y Pretorius, 2000).

Botrytis cinerea es la especie de hongo filamentoso que más frecuentemente daña la uva y puede provocar dos tipos de podredumbres: noble y gris. La podredumbre noble tiene lugar cuando se alternan periodos de clima húmedo y seco, condiciones óptimas para que después

de la infección el hongo quede localizado en el interior del grano e induzca una deshidratación controlada de la uva y una acumulación de glicerol como consecuencia de su metabolismo anaerobio. Los mostos producidos poseen mayor concentración de azúcares y una acidez total equilibrada. En estos casos la uva se emplea para la elaboración de vinos dulces de elevada calidad como los vinos de Tokay. Sin embargo, en zonas húmedas, y especialmente cuando se producen lluvias abundantes antes de la recolección, la infección progresa sin detenerse, provocando la denominada podredumbre gris que puede llegar a destruir el grano. En este caso, el hongo se desarrolla tanto en el exterior como en el interior del grano de uva, provocando la acumulación de ácido glucónico y glicerol. Además, dado que el hongo consume azúcares y ácidos tartárico y málico, se generan mostos con menor concentración de azúcares y un valor de acidez total reducido. Estas uvas botritizadas son más susceptibles a la alteración por levaduras e incluso otras especies de hongos, por lo que poseen una microbiota natural incrementada respecto a uvas sanas (Loureiro y Malfeito-Ferreira, 2003a).

3. Conservantes empleados en enología

El empleo de SO_2 en los procesos de fabricación de alimentos data de la antigüedad, desde los tiempos de griegos y romanos que lo utilizaron para limpiar las ánforas y otras vasijas empleadas en el transporte del vino. En los siglos posteriores el SO_2 se convirtió en el conservante químico más utilizado en la industria del vino, a través de la adición de sulfito o bisulfito, principalmente por sus propiedades antimicrobiana, antioxidante e inhibidora de enzimas, así como por su capacidad para mejorar aspectos gustativos de los vinos. Inicialmente el SO_2 era utilizado sólo en la etapa de envejecimiento, mientras que en la actualidad se emplea tanto en las etapas iniciales del proceso de vinificación como en el periodo de conservación, sin que hasta la fecha se hayan encontrado sustitutos aceptados por la totalidad del sector vitivinícola.

El SO₂ se puede encontrar en tres formas diferentes en el mosto o vino, siendo el equilibrio entre ellas dependiente del pH. A valores de pH inferiores a 2 se encuentra mayoritariamente en forma molecular (H₂SO₃), en el intervalo entre 2 y 7 como iones bisulfito (HSO₃⁻) y a valores superiores a 7 como iones sulfito (SO₃⁼), habiéndose demostrado que únicamente la forma molecular resulta activa (Fugelsang, 1997; Usseglio-Tomasset, 1992). El SO₂ presenta una serie de limitaciones respecto a su acción antimicrobiana cuando se añade en forma de bisulfito, debido a que al pH del vino (3-4) únicamente el 5% del bisulfito añadido se encuentra en la forma molecular activa (Romano y Suzzi, 1993). Además, esta forma activa puede combinarse con distintos componentes del vino (acetaldehído, antocianos, azúcares, cetoácidos y dihidroxiacetona) perdiendo su poder antimicrobiano (Fugelsang, 1997; Romano y Suzzi, 1993; Usseglio-Tomasset, 1992; Zoecklein *et al.*, 1995). Por último, su dosificación debe ser tal que inhiba las especies microbianas alterantes pero no las levaduras responsables de la fermentación alcohólica o las BAL que llevan a cabo la fermentación maloláctica.

El efecto microbicida del SO₂ sobre las levaduras se atribuye al bloqueo de la síntesis del acetil coenzima A por combinación con el grupo tiol (Dupuy *et al.*, 1967), efecto que puede revertir en presencia de glutatión o cisteína, compuestos que forman las levaduras resistentes al SO₂ (Peng *et al.*, 1998).

Habitualmente las levaduras no-*Saccharomyces* son más sensibles a la acción del SO₂, aspecto especialmente útil al inicio de la fermentación alcohólica para conseguir que *S. cerevisiae* domine dicho proceso. Sin embargo, hay estudios en los que se demuestra el crecimiento de levaduras pertenecientes a los géneros *Zygosaccharomyces* y *Dekkera* empleando niveles de SO₂ habituales en bodega entre 50-100 mg/l, por lo que el tratamiento no resulta completamente eficaz (Fleet, 1990; Heard y Fleet, 1998; Romano y Suzzi, 1993). Por el contrario el SO₂ es muy efectivo frente a algunas bacterias lácticas, en general más sensibles que las levaduras, debido a que no son únicamente susceptibles a la forma

libre, sino también a la combinada (Wibowo *et al.*, 1985). Por ello, cuando se precisa llevar a cabo la fermentación maloláctica, el SO₂ se añade cuando ésta se ha completado. Así mismo, las concentraciones residuales de sulfuroso deben ser inferiores a 40-50 mg/l, ya que en caso contrario se retardaría el inicio de la fermentación maloláctica por *O. oeni* (Davis *et al.*, 1985), favoreciendo que especies alterantes de los géneros *Lactobacillus* o *Pediococcus*, tolerantes al SO₂, intervengan en la fermentación.

Aunque los primeros estudios bibliográficos indicaban que el crecimiento de las bacterias acéticas era inhibido por el uso de SO₂ (Amerine y Kunkee, 1968), datos posteriores establecen que las especies pertenecientes al género *Acetobacter* sólo se inhiben a concentraciones de sulfuroso superiores a las empleadas habitualmente en las bodegas, lo que explica los numerosos casos de vinos alterados por dichas bacterias (Drysdale y Fleet, 1985; Joyeux *et al.*, 1984a).

El SO₂ posee también otras propiedades, entre las que destaca su capacidad antioxidante que es doble, ya que puede reaccionar directamente con el oxígeno del aire, impidiendo la actuación de las oxidasas, y también con los compuestos quinónicos derivados de la oxidación de los polifenoles, rompiendo la cadena de polimerización de los mismos y estabilizando los vinos. Además, las dosis habituales de SO₂ empleadas en bodega pueden aportar una mejora sensible del gusto de vinos obtenidos con uvas alteradas o procedentes de viñas mediocres. Por último, destaca su efecto disolvente, debido a la forma molecular H₂SO₃, que destruye las células vegetales en la maceración de la uva liberando antocianos, polifenoles, taninos y precursores de aromas (Bobet, 2000).

De todo lo expuesto anteriormente se deduce que el uso del SO₂ es una práctica habitual en las bodegas para asegurar una elevada calidad y estabilidad microbiológica de los vinos. Este conservante está incluido en la lista positiva de aditivos alimentarios permitidos en la UE (E220). Según la legislación comunitaria, el contenido total de SO₂ en los vinos no podrá exceder de las cantidades indicadas en los Reglamentos de la Comunidad

Europea nº 1493/1999 de fecha 17 de mayo y nº 1622/2000 de fecha 24 de julio, por los que se establece la Organización Común del Mercado Vitivinícola. En el caso de los vinos tintos, el contenido total en SO₂ en el momento de su oferta al consumo humano directo no puede exceder de 160 mg/l, mientras que en los vinos blancos y rosados el nivel máximo es de 210 mg/l. No obstante, estos valores se elevan a 210 mg/l en el caso de vinos tintos, y a 260 mg/l en el caso de vinos blancos y rosados, con un contenido en azúcares residuales igual o superior a 5 g/l. Para los vinos espumosos el nivel máximo es de 235 mg/l y para los vinos de licor y generosos es de 150 mg/l, cuando el contenido en azúcares residuales sea inferior a 5 g/l, y de 200 mg/l, cuando supere esta concentración. Según el Reglamento (CE) nº 1991/2004 de fecha 19 de noviembre, en la etiqueta de los vinos se debe indicar que contienen sulfitos.

El empleo de SO₂ durante la vinificación se ha asociado con cambios organolépticos indeseados (du Toit y Pretorius, 2000), y, en ocasiones, puede entrañar riesgos para la salud. A los niveles que contienen los vinos, el SO₂ está considerado como una sustancia ligeramente tóxica para los seres humanos. En este sentido, se ha descrito que puede provocar sofocación, irritación de las vías respiratorias, problemas digestivos (François-Collange *et al.*, 1991) y cefalea (Tamborra, 1993). Su empleo también se asocia, en ocasiones, con procesos de tipo alérgico, incluso a dosis muy reducidas (Stevenson y Simon, 1981). Todo ello, unido a una legislación cada vez más restrictiva y a la demanda por parte del consumidor de alimentos más naturales, justifica la necesidad de encontrar productos alternativos que resulten eficaces y merezcan la confianza del consumidor.

De hecho, los bodegueros desde hace décadas intentan reducir al máximo la utilización de SO₂, con el fin de minimizar el posible rechazo por el consumidor. Hasta el momento, se plantean por un lado el empleo de tecnologías de vinificación más refinadas y por otro, la utilización de otros conservantes químicos o biológicos.

Con respecto al primer abordaje, una posibilidad es la mejora del proceso de vinificación en su conjunto, haciendo hincapié en la etapa de prensado, en minimizar la extracción de sustancias susceptibles de ser oxidadas y en clarificar de forma inmediata los vinos una vez obtenidos (Asvany, 1971). También pueden llevarse a cabo otras modificaciones más drásticas, como es el uso de la esterilización filtrante combinada con el almacenamiento en atmósfera de gases inertes (Tamborra, 1993). Sin embargo, todo ello puede repercutir en la economía del proceso, encareciendo el producto final, y además no está exento de importantes problemas tecnológicos como son la frecuente obstrucción de los filtros o las necesidades de instalaciones adicionales.

En cuanto a la segunda opción, hasta el momento son numerosos los compuestos de carácter químico que han sido propuestos para sustituir al SO₂, entre los que destacan los ácidos sórbico, fumárico y benzoico, y el dimetil dicarbonato o velcorín (du Toit y Pretorius, 2000).

El ácido sórbico es un ácido graso insaturado de cadena corta, empleado habitualmente como antifúngico en la industria alimentaria. Su actividad se debe a las moléculas no dissociadas del compuesto, y es dependiente del pH del medio, incrementándose al reducir los valores del mismo. Se emplea como sorbato potásico, de elevada solubilidad en vino y agua, con dosis máximas de 200 mg/l expresado como ácido sórbico, según establece la O.I.V. (Resolución Oeno 5/1988). Se ha descrito que actúa interfiriendo en las funciones de las membranas celulares (du Toit y Pretorius, 2000). En algunos países se emplea para inhibir los procesos de re-fermentación que puede provocar *S. cerevisiae* en vinos dulces (Fugelsang, 1997; Zoecklein *et al.*, 1995). Sin embargo no es efectivo frente a bacterias lácticas, acéticas o levaduras de los géneros *Brettanomyces*, *Saccharomyces* y *Zygosaccharomyces* (Splittstoesser y Churney, 1992), e incluso puede ser utilizado por algunas bacterias lácticas para producir compuestos con aromas indeseables. El ácido fumárico se emplea en algunos países para controlar el crecimiento de diversas bacterias lácticas, aunque tiene una aplicación limitada debido a

que puede ser convertido a ácido málico por la enzima fumarasa que poseen diversas levaduras vínicas y especies de bacterias lácticas pertenecientes a los géneros *Lactobacillus*, *Pediococcus* y *Oenococcus* (Fugelsang, 1997; Ough y Kunkee, 1974). Por lo que respecta al ácido benzoico, su aplicación en vinos es útil únicamente en combinación con el sórbico y el sulfuroso (Zoecklein *et al.*, 1995).

El dimetil dicarbonato es un esterilizante que mezclado con agua se hidroliza para producir pequeñas cantidades de dióxido de carbono y metanol, ofreciendo una acción preservativa a corto plazo (Bobet, 2000). Provoca la desnaturalización de diversas enzimas de la vía fermentativa como la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa y la alcohol deshidrogenasa (Porter y Ough, 1982). Es eficaz frente a levaduras y bacterias y suele utilizarse para asegurar las fermentaciones llevadas a cabo mediante cultivos iniciadores. También se puede emplear con la finalidad de minimizar las cantidades de SO₂ necesarias para prevenir procesos de re-fermentación en vinos dulces (Threlfall y Morris, 2002) o para detener el desarrollo de la fermentación alcohólica en vinos procedentes de uvas botritizadas (Divol *et al.*, 2005). Sin embargo, su efectividad se ve reducida por la temperatura de vinificación (Porter y Ough, 1982), y además se han descrito cepas resistentes de levadura, como por ejemplo *Rhodotorula rubra* y *S. bayanus* (Daudt y Ough, 1980). Su adición al vino, en dosis no superiores a 200 mg/l, es una práctica enológica aceptada por la O.I.V. (Resolución Oeno 5/2001).

4. Agentes antimicrobianos de naturaleza proteica

Aunque los conservantes químicos tradicionales siguen teniendo un uso extenso, la búsqueda y estudio de compuestos antimicrobianos derivados de plantas, animales o microorganismos, para su uso como conservantes biológicos, nace del interés creciente por parte de los consumidores de productos más naturales. Entre todos ellos, destacan los compuestos de naturaleza proteica descritos a continuación. La aplicación

en el ámbito de la agroalimentación, y en concreto en enología ha sido autorizada en el caso de la lisozima. Diversos trabajos científicos han descrito también la aplicación potencial de bacteriocinas y proteínas "killer" en vinificación (apartado 4.3).

4.1. Proteínas y péptidos antimicrobianos

Los péptidos antimicrobianos (AMP, del inglés "antimicrobial peptides") forman parte de los mecanismos de defensa conservados a lo largo de la evolución y están presentes en organismos de muy distinta escala filogenética (Andreu y Rivas, 1998; Brogden, 2005; Brown y Hancock, 2006; Hancock, 2001; Zasloff, 2002). En animales superiores las respuestas de defensa frente a infecciones están determinadas fundamentalmente por un sistema inmune adaptativo y células especializadas, pero también se produce la liberación de AMP de pequeño peso molecular como parte de un sistema innato. En insectos, anfibios y otros organismos inferiores es aún mayor el papel que desempeñan los AMP en el sistema de defensa e inmunidad innata (Otvos, 2000). Los vegetales poseen también un sistema de defensa específico en el que intervienen pequeñas proteínas y péptidos con actividad frente a fitopatógenos, como por ejemplo las tioninas, defensinas o proteínas de transferencia de lípidos (Broekaert *et al.*, 1997; García-Olmedo *et al.*, 1998). En cuanto a los microorganismos, a través de la evolución han desarrollado distintas estrategias para competir por nutrientes en su medio ambiente. Algunos han mejorado sus sistemas de quimiotaxis (de Weert *et al.*, 2002) y otros han desarrollado compuestos antimicrobianos para eliminar a aquellos microorganismos competidores de su entorno (Cleveland *et al.*, 2001), como son los antibióticos de amplio espectro (Sahl y Bierbaum, 1998), productos del metabolismo como ácidos orgánicos (Lavermicocca *et al.*, 2000), moléculas quelantes de hierro (Mirleau *et al.*, 2000) y compuestos de naturaleza proteica con capacidad antimicrobiana, como son las bacteriocinas (Riley y Wertz, 2002).

La gran cantidad de AMP existentes ha motivado distintos intentos de sistematización en forma de bases de datos de acceso público, como son la “Antimicrobial Sequences Database” (<http://www.bbcm.units.it/~tossi/amsdb.html>) (Tossi *et al.*, 2000), la “Antimicrobial Peptide Database” (<http://aps.unmc.edu/AP/main.html>) (Wang y Wang, 2004), y ANTIMIC (<http://research.i2r.a-star.edu.sg/Templar/DB/ANTIMIC/>) (Brahmachary *et al.*, 2004). Estos recursos están orientados a describir péptidos naturales y sus derivados de interés biomédico, proporcionando herramientas de búsqueda, visualización de estructuras secundarias, o desarrollo de nuevas secuencias antimicrobianas.

El preocupante aumento de cepas bacterianas y fúngicas resistentes a antibióticos y las propiedades específicas de determinados AMP, han conducido a proponer su utilización médica como agentes terapéuticos (De Lucca y Walsh, 1999; Hancock, 2001; Hancock y Sahl, 2006; Zasloff, 2002). Diversos estudios han demostrado que determinados AMP poseen una potente actividad frente a un amplio abanico de microorganismos, incluyendo bacterias, tanto Gram positivas como Gram negativas, levaduras y hongos, e incluso frente a varios virus, tales como el VIH o el virus del herpes simple (Lorin *et al.*, 2005). También se han descrito AMP con actividad frente a parásitos eucariotas, tales como tripanosomas, los parásitos de la malaria, diversos nematodos (Dagan *et al.*, 2002; Efron *et al.*, 2002; Ghosh *et al.*, 1997; Krugliak *et al.*, 2000) y varios tipos de células tumorales (Kamysz *et al.*, 2003; Papo *et al.*, 2004).

De forma análoga, el interés creciente en la agricultura por la disminución del empleo de fungicidas, antibióticos y pesticidas ha llevado a proponer a los péptidos antimicrobianos como una alternativa para protección vegetal (Casteels *et al.*, 1989; Jaynes *et al.*, 1987; Marcos *et al.*, 2008; Montesinos, 2007; Rao, 1995; van der Biezen, 2001).

Finalmente, también en el campo de la alimentación y la conservación de alimentos, se ha explorado la utilización de AMP como

aditivos alimentarios, destacando el caso de la nisina, de origen microbiano y ya utilizado en la conservación de alimentos (Delvesbroughton, 1990). Un número creciente de estudios han demostrado que proteínas y péptidos con propiedades antimicrobianas podrían resultar de aplicación como conservantes en la industria alimentaria (Cleveland *et al.*, 2001; Cotter *et al.*, 2005; Rydlo *et al.*, 2006).

Es necesario mencionar que determinados péptidos naturales pueden presentar inconvenientes derivados de su biodisponibilidad, limitado espectro de acción, toxicidad inespecífica o estabilidad. Pero también es cierto que su pequeño tamaño multiplica las posibilidades de diseño racional por cambios en su secuencia de aminoácidos y, por tanto, modulación de sus propiedades en lo referente a estabilidad proteolítica, especificidad de patógeno, potencia o toxicidad. Su tamaño también posibilita la síntesis y purificación química, o su producción biotecnológica de forma heteróloga mediante el diseño de genes sintéticos (Ingham y Moore, 2007). Estas propiedades dotan a este grupo de moléculas de un elevado interés científico.

4.1.1. Propiedades biofísicas y estructurales

Los AMP comparten ciertas propiedades estructurales relacionadas con su actividad y especificidad, como son su secuencia de aminoácidos que a menudo contiene residuos catiónicos (lisina y arginina) e hidrofóbicos (triptófano, fenilalanina, leucina e isoleucina). La abundancia de residuos catiónicos les confiere su carga neta positiva a pH fisiológico y facilita su interacción con las envueltas celulares cargadas negativamente de los microorganismos. Además su composición aminoacídica les confiere predisposición para adoptar estructuras anfipáticas, en ocasiones inducidas bajo determinadas condiciones, que facilitan su interacción con bicapas lipídicas. Estas estructuras pueden ser muy variadas incluyendo α -hélices y láminas- β , pero también estructuras no convencionales e incluso conformaciones extendidas.

Desde el punto de vista estructural los AMP se pueden clasificar en varios grupos (Brogden, 2005; Epand y Vogel, 1999). El primero, minoritario, es el compuesto por péptidos aniónicos, de pequeño tamaño y ricos en residuos de glutámico y aspártico. Un ejemplo es la dermicidina de humanos (Schitteck *et al.*, 2001). El segundo grupo lo forman péptidos lineales catiónicos que carecen de residuos de cisteína y poseen estructuras secundarias en α -hélice. Pertenecen a este grupo la melitina y cecropinas de insectos, magaininas y buforinas de anfibios, o el péptido LL-37 de humanos (Tossi *et al.*, 2000). El tercer grupo incluye péptidos catiónicos con un alto contenido en aminoácidos específicos. Carecen de residuos de cisteína por lo que generalmente adoptan una estructura lineal, aunque no tan definida como los anteriores. En este grupo se encuentran los péptidos indolicidina y las histatinas, enriquecidos en residuos de triptófano e histidina, respectivamente (Chan *et al.*, 2006; De Smet y Contreras, 2005). Un cuarto grupo lo forman aquellos péptidos que contienen cisteínas en su estructura primaria y que por lo tanto son capaces de formar puentes disulfuro y estructuras bastante estables que contienen láminas- β y α -hélices. Este grupo lo conforman péptidos de mayor tamaño o pequeñas proteínas y se suele dividir a su vez en subgrupos en función del número de puentes disulfuro que posean. Pertenecen a él las defensinas de origen animal y vegetal (Ganz, 2004; Lehrer, 2004; Seebah *et al.*, 2007), o la plectasina aislada del hongo saprofito *Pseudoplectania nigrella* (Mygind *et al.*, 2005). Por último, el quinto grupo lo constituyen AMP provenientes de fragmentos de grandes proteínas (ver más adelante). La Tabla 4 y la Figura 5 muestran las secuencias y estructuras secundarias de algunos de estos péptidos.

4.1.2. Modo de acción antimicrobiano

El modo de acción de los AMP ha sido estudiado, fundamentalmente, desde la perspectiva de sus propiedades biofísicas. El primer paso en la acción de estos péptidos es la aproximación e

interacción física con las cubiertas celulares del microorganismo diana. En términos generales se asume que esta interacción no es estereoespecífica, ya que se ha demostrado que determinados péptidos con la misma secuencia de aminoácidos sintetizados con los estereoisómeros D- ó L- no presentan diferencias sustanciales de actividad (López-García *et al.*, 2000; Wade *et al.*, 1990).

Tabla 4. Secuencias de péptidos de origen natural.

Péptido	Secuencia ^a	Origen
Buforina 2	TRSS R AGLQFPV G RVH R LL R K	Anfibios
Magainina 2	G I G K FLHSA K K F G K AFV A L K A L	Anfibios
Indolicidina	I L P W K W P W P W R R	Animales
Histatina 5	DSH A K R HHGY K R K FHE K HH S H R GY	Humanos
LL-37	L L G D F F R K S K E K I G K E F K R I V Q R I K D F L R N L V P R T E S	Humanos
Cecropina A	K W K F K K I E K M G R N I R D G I V K A G P A I E V I G S A K A I	Insectos
Cecropina B	K W K V F K K I E K M G R N I R N G I V K A G P A I A V L G E A K A L	Insectos
Dermicidina	S S L L E K G L D G A K K A V G G L G K L G K D A V E D L E S V G K G A V H D V K D V L D S V	Humanos
A4 ^b	P N R A K R V I T T F R T	Animales
A23 ^b	W D E A A V N L A K S R W Y N Q T	Animales
Dermaseptina S4	A L W M T L L K K V L K A A A K A A L N A V L V G A N A	Anfibios
α-Defensina HNP-1	A C Y C R I P A C I A G E R R Y G T C I Y Q G R L W A F C C	Humanos
Plectasina	G F G C N G P W D E D D M Q C H N H C K S I K G Y K G G Y C A K G G F V C K C Y	Fúngico
Melitina	G I G A V L K V L T T G L P A L I S W I K R K R Q Q	Insectos

^aLos residuos de aminoácidos catiónicos arginina y lisina aparecen en rojo, los aromáticos triptófano y fenilalanina en verde, los alifáticos leucina, isoleucina y valina en azul, y en negrita los de cisteína formadores de puentes disulfuro.

^bPéptidos derivados de la lisozima.

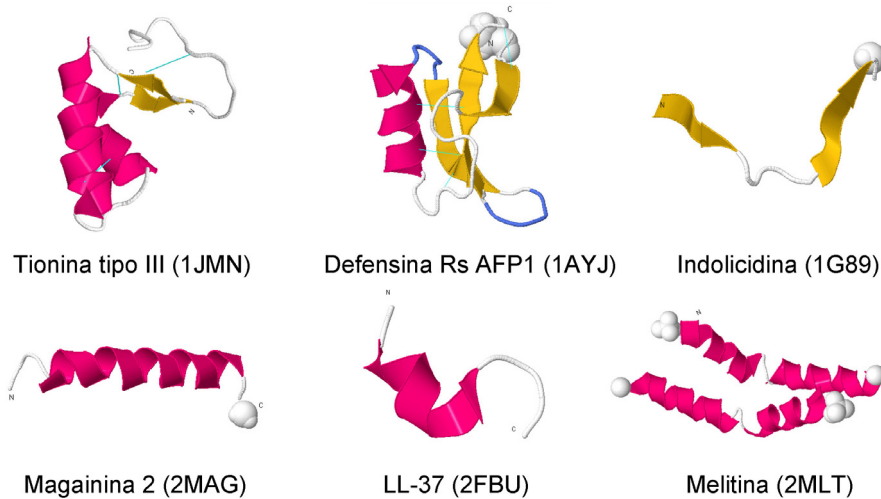


Figura 5. Estructuras secundarias representativas de péptidos y proteínas antimicrobianas de origen natural (ver referencias en el texto). Obtenidas desde la base de datos PDB ("Protein Data Bank", www.rcsb.org/pdb/) y visualizadas a través del programa Jmol Viewer. En el paréntesis seguido del nombre se indica el identificador en la base de datos PDB.

La naturaleza catiónica de estos AMP conlleva a una atracción electrostática por las envueltas celulares cargadas negativamente, como es el caso del lipopolisacárido (LPS) de bacterias Gram negativas, o las glicoproteínas y glicoesfingolípidos de hongos. Este hecho podría explicar la especificidad de los AMP frente a microorganismos y su menor toxicidad frente a células animales y vegetales (Epanand y Vogel, 1999; Zasloff, 2002). Relacionado con esta característica, es conocido que el aumento de la fuerza iónica del medio disminuye, en general, la actividad de los AMP catiónicos y proteínas antimicrobianas (Broekaert *et al.*, 1997; Dorschner *et al.*, 2006; García-Olmedo *et al.*, 1998; López-García *et al.*, 2000), lo que se interpreta como un apantallamiento de la interacción electrostática.

También existen ejemplos significativos de AMP cuya interacción no depende primariamente de la atracción electrostática, como es el caso

de la nisina, que comparte con muchos otros AMP la capacidad de formar poros en las membranas (Wiedemann *et al.*, 2001). Su interacción primaria se produce con el Lípido II, precursor del peptidoglicano de las membranas bacterianas, aumentando su concentración local y facilitando su interacción con dichas membranas y la formación de poros en las mismas, lo que incrementa su actividad hasta en tres órdenes de magnitud (Breukink *et al.*, 1999; Hsu *et al.*, 2004). Recientemente se ha demostrado un mecanismo análogo de unión al Lípido II en el caso de la proteína antifúngica plectasina (Tabla 4) (Schneider *et al.*, 2010). Además, se ha descrito que determinadas bacterias patógenas que normalmente están expuestas a la acción de AMP, tienen receptores de membrana implicados en el reconocimiento de péptidos catiónicos (Bader *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2007; Llama-Palacios *et al.*, 2005).

Así mismo, se ha demostrado que una α -tionina de vegetales tiene afinidad en su unión por el β -glucano de las paredes fúngicas (Oita *et al.*, 2000), mientras que el péptido sintético de nuevo diseño D4E1 interacciona preferentemente con ergosterol, lípido característico de membranas fúngicas (De Lucca *et al.*, 1998).

Una vez se ha producido la interacción del AMP con el microorganismo, se pueden producir una serie de efectos y cambios dinámicos sobre este último que afectan a su morfología e integridad, y en última instancia a su viabilidad. Los dos más ampliamente estudiados son la permeabilización celular y las alteraciones de la morfología y desarrollo del microorganismo.

Diversos estudios han demostrado que la capacidad de inserción y desestabilización de membranas lipídicas que poseen un gran número de AMP se correlaciona directamente con un efecto de permeabilización *in vitro* de vesículas artificiales. Este es el caso de péptidos como la melitina, cecropina A, magainina 2, defensinas animales (Hristova *et al.*, 1997; Kang *et al.*, 1998; Matsuzaki *et al.*, 1997; Zhao *et al.*, 2001) o derivados de la lactoferricina B (Nguyen *et al.*, 2005; Schibli *et al.*, 2002), estos últimos

incluidos en este trabajo. Por otro lado, la exposición a AMP también se ha asociado a cambios morfológicos en las membranas externa e interna de la bacteria *Escherichia coli* (Meincken *et al.*, 2005) o del micelio de hongos (Moreno *et al.*, 2006).

Aunque es obvio que la capacidad de muchos AMP para formar poros transmembrana está asociada a un efecto de lisis y muerte celular, la permeabilización celular no es el único modo de acción de estos péptidos (Brogden, 2005). Se ha demostrado que diversos AMP son capaces de atravesar las membranas lipídicas de una forma no destructiva ejerciendo su acción antimicrobiana mediante mecanismos intracelulares generales, como son la unión a ácidos nucleicos, la inhibición de la biosíntesis de proteínas, pared celular o ácidos nucleicos, y algunos más específicos que incluyen interacción con determinadas proteínas como son las chaperonas (revisado en Marcos y Gandía, 2009).

La Figura 6 recopila las distintas etapas que conducen a la interacción de los diferentes AMP con los microorganismos diana y su modo de acción antimicrobiano.

4.1.3. Bacteriocinas

Las bacteriocinas son un grupo de péptidos o proteínas de pequeño tamaño sintetizadas por diversas especies bacterianas a nivel ribosomal, y que son activas contra otras bacterias. Las bacteriocinas de aplicación más inmediata en alimentos son las producidas por bacterias lácticas. Se consideran de espectro reducido aquellas cuya actividad se limita a otras cepas de la misma especie, y de amplio espectro las que muestran capacidad antimicrobiana frente a otras especies bacterianas.

En términos generales, su actividad se dirige a especies Gram positivas, y en el caso de Gram negativas, únicamente, se ha demostrado actividad en aquellos casos en que la integridad de la membrana externa se ha visto comprometida.

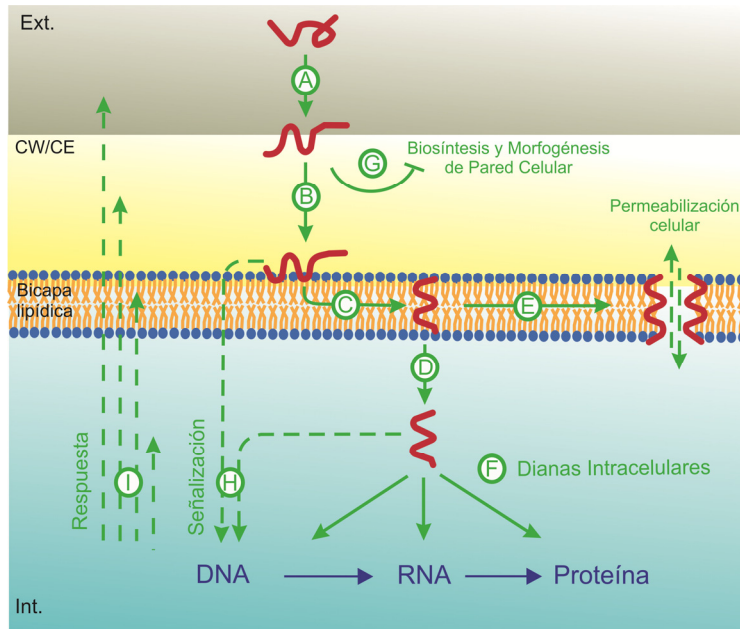


Figura 6. Modelo de la interacción y modo de acción antimicrobiano de AMP. Tal y como se muestra, es aplicable para células procariotas y eucariotas. (A) El AMP (en rojo) interacciona con las envueltas exteriores, siendo la atracción electrostática la fuerza inicial que conduce a la interacción. (B) El AMP puede difundir a través de la pared e interactuar con las bicapas lipídicas, permitiendo sus propiedades biofísicas su inserción en las membranas biológicas (C), en un proceso dependiente de la composición lipídica. Durante esta progresión, los AMP sufren plegamientos debidos a cambios en el microentorno que podrían aumentar su anfipaticidad y propiedades antimicrobianas. En este punto, los AMP pueden translocarse hacia el interior celular (D), desestructurar la arquitectura de la membrana llevando a la permeabilización celular (E), o bien producirse ambos fenómenos en función del balance entre concentración de péptido y tiempo de contacto, así como entre sus propiedades y las de los componentes celulares implicados. (F) Una vez internalizado, el AMP puede unirse a DNA, RNA y/o proteínas, alterando procesos como la replicación, síntesis de RNA o determinadas actividades enzimáticas. La actuación intracelular puede también producir la muerte y la subsiguiente permeabilización celular. (G) Otros modos de acción de AMP son la desestabilización de la síntesis, arquitectura o morfología de la pared celular. Se conoce además, que los microorganismos poseen mecanismos señalizadores que detectan la presencia de AMP (H), un proceso necesario para modificar la expresión génica y responder a la acción de los AMP a nivel de citosol, membrana, envueltas celulares o exterior celular (I) (Marcos *et al.*, 2008).

Los microorganismos productores, por su parte, poseen un mecanismo de autoinmunidad específico frente a ellas (revisado en Cotter *et al.*, 2005).

Las bacteriocinas se clasifican en 4 grupos (Klaenhammer, 1993). Las bacteriocinas de Clase I, conocidas como lantibióticos, contienen residuos aminoacídicos modificados post-traduccionalmente, tales como lantionina y β -metil lantionina. Las bacteriocinas incluidas en la Clase II, se caracterizan por ser péptidos lineales, mientras que la Clase III, incluye bacteriocinas termolábiles de gran tamaño. Por último, las bacteriocinas de Clase IV constituyen un grupo formado por moléculas complejas de carácter proteico que contienen además en su estructura lípidos y carbohidratos. Las bacteriocinas más comunes y estudiadas son las de las Clases I y II. Recientemente, se ha propuesto otra clasificación más restrictiva (Cotter *et al.*, 2005), que divide a las bacteriocinas en dos categorías, dependiendo de su contenido en anillos lantiónicos. Las bacteriocinas que contienen lantionina corresponden a la Clase I ó lantibióticos, siendo la nisina su representante más utilizado y estudiado, mientras que aquellas que no contienen lantionina corresponden a las de Clase II, como la pediocina PA1, lactatina F, enterocina AS48 ó lactococina A. Otros péptidos producidos por bacterias no serían considerados bacteriocinas en sentido estricto.

Las bacteriocinas poseen diversas propiedades que las convierten en compuestos con un alto potencial para su aplicación en la conservación de alimentos: están reconocidas como seguras (GRAS); no son tóxicas sobre células eucariotas; son tolerantes al pH y la temperatura; y las proteasas digestivas son capaces de inactivarlas. Además, los determinantes genéticos de su producción están codificados habitualmente por plásmidos, hecho que facilita su manipulación genética y expresión heteróloga.

Sin embargo, diversos estudios han mostrado que la actividad antimicrobiana de las bacteriocinas determinada en diversas matrices

alimentarias es inferior a la obtenida en medio de cultivo (Schillinger *et al.*, 1996). Su eficacia depende en gran medida de diversos factores complejos y relacionados con la matriz alimentaria correspondiente, como son su interacción con los distintos componentes de la misma, su posible precipitación, inactivación o incluso una distribución irregular (Gálvez *et al.*, 2007). Además, la microbiota presente en el alimento y todos aquellos factores relacionados con el microorganismo diana, tales como su estado fisiológico o la sensibilidad a la bacteriocina empleada, modulan la eficacia de estos compuestos.

Por todo ello, en la actualidad tan sólo la nisina y la pediocina PA1/AcH se emplean en alimentación. La nisina, lantibiótico producido por diversas cepas de *Lactococcus lactis*, fue descrita en 1947 y ya en 1969 se aprobó su uso alimentario, entrando en 1983 en la lista de aditivos alimentarios permitidos en Europa (número E234). En 1988 fue aprobado su empleo por la agencia estadounidense de alimentos y fármacos (FDA). La bacteriocina denominada PA-1 es producida por una cepa de *Pediococcus acidilacti* y su empleo está cubierto por varias patentes estadounidenses y europeas (Rodríguez *et al.*, 2002).

Diversos estudios han demostrado que las bacteriocinas pueden ser de aplicación en la bioconservación de carne, productos lácteos, pescados, bebidas alcohólicas, ensaladas, derivados del huevo, productos de panadería y vegetales fermentados, de forma individual o en combinación con otros métodos de conservación, o bien, por su incorporación en los envases o la superficie de los alimentos (Chen y Hoover, 2003; Gálvez *et al.*, 2008; O'Sullivan *et al.*, 2002; Settanni y Corsetti, 2008).

4.1.4. Proteínas “killer”

En la década de los 60, se describió el fenómeno “killer” en cepas de *S. cerevisiae* (Bevan y Makower, 1963). Posteriormente se han descrito

otras especies de levadura productoras de factores tóxicos de naturaleza proteica, letales para otras levaduras sensibles (Philliskirk y Young, 1975; Rosini, 1983). Las cepas "killer" de *S. cerevisiae* muestran un espectro de acción restringido a cepas sensibles del género *Saccharomyces*. Sin embargo, en el caso de toxinas "killer" producidas por especies de los géneros *Pichia*, *Hansenula*, *Williopsis* o *Kluyveromyces* (Polonelli *et al.*, 1983; Rosini y Cantini, 1987; Walker *et al.*, 1995), el espectro de acción se amplía a levaduras de distinto género. En los últimos años se ha propuesto la aplicación de estas cepas de levadura en diversos campos. Se ha descrito su empleo como agentes de biocontrol frente a levaduras y hongos alterantes en procesos fermentativos, y también para el tratamiento de frutas y cereales en postcosecha (Fredlund *et al.*, 2002; Kurtzman y Droby, 2001). También se han descrito diversas aplicaciones biomédicas para las toxinas "killer", destacando su utilización como nuevos agentes antimicóticos (Buzzini y Martini, 2001; Magliani *et al.*, 1997). El fenómeno "killer" también puede ser de utilidad en la caracterización de cultivos de levadura de interés clínico o industrial, ya que la diferente sensibilidad a un panel de toxinas puede permitir por ejemplo la discriminación entre cepas de *C. albicans* (Buzzini *et al.*, 2004; Polonelli *et al.*, 1983),

En el caso de *S. cerevisiae* las tres toxinas "killer" más estudiadas se denominan K_1 , K_2 y K_{28} , asociándose habitualmente las dos últimas con el proceso de vinificación, dada su actividad a valores bajos de pH (du Toit y Pretorius, 2000; Pfeiffer y Radler, 1984).

4.1.5. Péptidos derivados de proteínas

Se han identificado pequeños péptidos con propiedades antimicrobianas procedentes de las secuencias de aminoácidos o fragmentos de grandes proteínas, las cuales pueden tener o no actividad antimicrobiana.

En este contexto, la obtención de AMP derivados de proteínas que se encuentran de forma habitual en la alimentación humana presenta, por razones obvias, numerosas ventajas (Pellegrini, 2003). Ejemplos clásicos son los péptidos derivados de lisozima y de proteínas lácteas (Clare *et al.*, 2003; Korhonen y Pihlanto, 2006; López-Expósito *et al.*, 2006; Meisel, 2005).

Un caso a destacar es el de los péptidos derivados de la lisozima, enzima reconocida por su capacidad de digerir la pared celular de bacterias Gram positivas dada su actividad muramidásica frente a los enlaces glicosídicos β -1,4 del peptidoglicano (Fuglsang *et al.*, 1995). Las características de esta enzima y su aplicación se recogen en el apartado correspondiente a las enzimas con capacidad antimicrobiana.

Determinados péptidos derivados de la lisozima presentan además actividad antimicrobiana directa y desligada de la enzimática (Düring *et al.*, 1999). Se han identificado varios péptidos, tanto de la lisozima T4 como de la procedente de clara de huevo, entre los que destacan A4 y A23 (aminoácidos 143-155 y 126-141 de la lisozima T4, respectivamente, ver Tabla 4). El primero de ellos, mostró una potente actividad bactericida y fungiestática, mientras que el segundo únicamente fue activo frente a hongos. Posteriormente, otros autores identificaron más de veinte péptidos con actividad antimicrobiana a partir de un hidrolizado de lisozima de clara de huevo (Mine *et al.*, 2004). Estos péptidos exhibían actividad bacteriostática frente a bacterias tanto Gram positivas como Gram negativas.

La lactoferrina (LF) es una glicoproteína quelante de hierro perteneciente a la familia de las transferrinas. Se localiza en superficies mucosas, en el interior de gránulos específicos de leucocitos polimorfonucleares, y también en fluidos biológicos tales como la leche, considerada la principal fuente de LF, la saliva y el fluido seminal, indicando que podría jugar un papel protector en la respuesta inmune innata (revisado en Farnaud y Evans, 2003).

La LF es una glicoproteína monomérica bilobular con una masa molecular aproximada de 80 kDa. Sus dos lóbulos corresponden a los extremos amino (residuos 1-333) y carboxi-terminal (residuos 345-692) y son homólogos (37%), estando conectados por una cadena en α -hélice (residuos 334-344) (Figura 7). Cada uno de estos lóbulos está subdividido en dos dominios, que poseen una zona de unión reversible a hierro. Cada átomo de hierro está coordinado a cuatro ligandos (dos aminoácidos tirosina, un aspartato y una histidina), además de a un anión, habitualmente carbonato (Farnaud y Evans, 2003; Metz-Boutigue *et al.*, 1984; Williams, 1982). Las LFs de origen humano y bovino poseen un 69% de homología de secuencia y una estructura terciaria muy similar (Pierce *et al.*, 1991).

Se ha descrito un amplio abanico de actividades biológicas para esta proteína, aunque en muchos casos su significación biológica no está clara. Destacan las actividades antitumoral, antiinflamatoria, antioxidante e inmunomoduladora, además de propiedades antimicrobianas y antivirales. Algunas de ellas están relacionadas con su capacidad para secuestrar hierro, mientras que otras parecen ser independientes a dicha propiedad (Orsi, 2004; Tomita *et al.*, 2002; Wakabayashi *et al.*, 2006; Weinberg, 2007).

La actividad antibacteriana de la LF se asoció inicialmente a su capacidad para actuar como sideróforo (Arnold *et al.*, 1977), pero posteriormente se demostró su efecto bactericida frente a *Streptococcus mutans* en presencia de hierro en el medio (Arnold *et al.*, 1981). Como consecuencia, se propuso que la actividad antimicrobiana era el resultado de la interacción directa de la LF con la superficie bacteriana (Bortner *et al.*, 1989). En el caso de *E. coli*, estudios posteriores han sugerido que interactúa con el lipopolisacárido de membrana (Appelmelk *et al.*, 1994).

Por lo que se refiere a la actividad antifúngica de LF, se ha demostrado su capacidad de permeabilización de la membrana celular de *Candida* spp. (Bellamy *et al.*, 1993; Wakabayashi *et al.*, 1996). También se

ha descrito su actividad frente a hongos dermatofílicos pertenecientes al género *Trichophyton* (Wakabayashi *et al.*, 2000; Wakabayashi *et al.*, 2002).

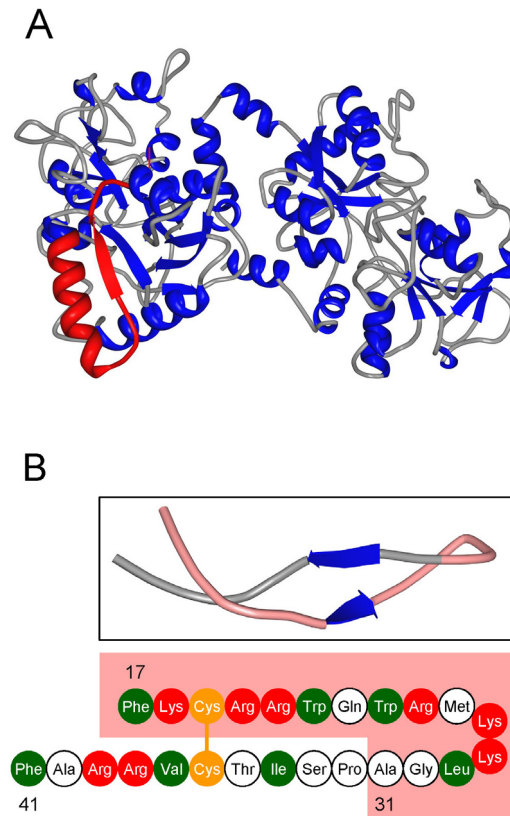


Figura 7. Estructura tridimensional de: (A) La lactoferrina bovina (PDB ID: 1BLF), y (B) de su péptido derivado LfcinB (PDB ID: 1LFC). Las estructuras e identificaciones (PDB ID) se obtuvieron del "Protein Data Bank" y fueron visualizadas con el programa PDB ProteinWorkshop v3.9. En (A) se señala en rojo la localización del fragmento N-terminal del cual se obtiene el péptido LfcinB tras una hidrólisis con pepsina. En la parte superior de (B) se muestra la estructura de LfcinB que es diferente a la que conforman los mismos residuos en el entorno de la proteína. En la parte inferior de (B) se muestra la secuencia de aminoácidos de LfcinB. En ambos casos se sombrea en rojo claro los residuos del fragmento LfcinB₁₇₋₃₁.

En un trabajo pionero sobre la estabilidad de proteínas antimicrobianas en el tracto digestivo, se demostró que mediante una hidrólisis con pepsina de la LF, tanto humana como bovina, se generaban péptidos que poseían mayor actividad antimicrobiana que la proteína nativa y carecían de la capacidad quelante de hierro (Bellamy *et al.*, 1992b). Dichos péptidos se denominaron lactoferricina humana (LfcinH) y bovina (LfcinB) y ambos derivan de la región N-terminal del lóbulo N (Bellamy *et al.*, 1992a; Bellamy *et al.*, 1992b). La estructura tridimensional de la LfcinB, así como su secuencia de aminoácidos, se puede observar en la Figura 7.

La LfcinH corresponde a los residuos de aminoácidos 1-47 de la región N-terminal de la proteína e incluye un bucle de 18 residuos de aminoácidos cerrado mediante un puente disulfuro interno. Los residuos 1-11 constituyen un fragmento separado, que se mantiene unido al bucle principal mediante otro puente disulfuro. La LfcinB, por su parte, está constituida por 25 aminoácidos y comprende únicamente los residuos 17-41, zona que incluye el bucle de 18 residuos de aminoácidos estabilizado mediante un puente disulfuro (Bellamy *et al.*, 1992b; Tomita *et al.*, 1991). Respecto a la potencia de acción antimicrobiana, es inferior en el caso de LfcinH. Esta diferencia de actividad podría deberse a la menor densidad en aminoácidos básicos que posee el bucle de 18 residuos de LfcinH. La secuencia de aminoácidos del péptido LfcinH, junto a la correspondiente a LfcinB se muestran en la Figura 8.

Se han caracterizado distintos péptidos sintéticos derivados de Lfcin que exhiben diversas actividades biológicas. Entre las propiedades vinculadas tanto a Lfcin como a sus péptidos derivados destacan la actividad antibacteriana, habiéndose descrito su eficacia frente a *E. coli*, *Staphylococcus aureus* y *L. monocytogenes* (Branen y Davidson, 2000; Chen *et al.*, 2006; Wakabayashi *et al.*, 1992) y la actividad antifúngica frente a *Candida albicans* (van der Kraan *et al.*, 2005) y hongos fitopatógenos (Muñoz y Marcos, 2006). Además, se han descrito sus propiedades antitumorales (Eliassen *et al.*, 2002; Eliassen *et al.*, 2003),

antivirales (Andersen *et al.*, 2004) e incluso antihipertensivas (Centeno *et al.*, 2006; Fernández-Musoles *et al.*, 2010; Ruiz-Giménez *et al.*, 2010).

Desde hace algunos años está establecida la tecnología para obtener LF a gran escala a partir de subproductos como el suero lácteo, mediante procesos cromatográficos, y por ello se venden comercialmente preparados con distinto grado de pureza. También se puede obtener LF mediante tecnología del DNA recombinante en microorganismos, plantas o ganado bovino (Wakabayashi *et al.*, 2006).

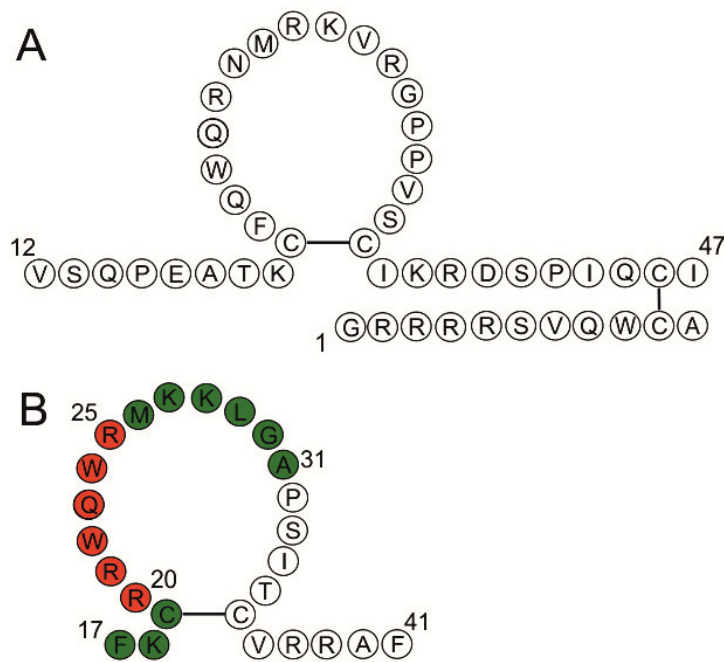


Figura 8. Secuencias de los péptidos LfcinH (A) y LfcinB (B), mostrándose los puentes disulfuro en su estructura. La numeración corresponde a la posición que ocupan los residuos en la proteína parental LF. Los aminoácidos de los péptidos derivados de LfcinB empleados en este estudio aparecen sombreados en rojo (péptido LfcinB₂₀₋₂₅) y su extensión en verde (LfcinB₁₇₋₃₁) [adaptado de (Bellamy *et al.*, 1992b)].

El interés por la LF y sus derivados se basa en que están considerados como “seguros” para distintas aplicaciones biotecnológicas (Tomita *et al.*, 2002; Wakabayashi *et al.*, 2006). La LF está presente en alimentos lácteos. En el ámbito de la conservación de alimentos, la primera aplicación comercial de la LF como suplemento de leches maternizadas en Japón data de hace 20 años, y desde entonces se ha utilizado como suplemento funcional en distintos alimentos lácteos o como antimicrobiano en productos de higiene (Tomita *et al.*, 2009). La LF también ha sido aplicada en productos cárnicos (Al-Nabulsi y Holley, 2007; del Olmo *et al.*, 2009), y recibió en 2008 la aprobación para su empleo en carne de vacuno en los EEUU. Con respecto a Lfcin, se ha descrito su aplicación en carne picada para controlar el crecimiento de *E. coli* (Venkitanarayanan *et al.*, 1999).

Con el objetivo de ampliar el uso de LF y sus derivados en alimentación, y siendo los procesos térmicos un método clásico de conservación, se ha estudiado el efecto de la temperatura sobre la actividad antibacteriana de la LF y sus hidrolizados frente a patógenos alimentarios. Los resultados indicaron que tanto la LF como sus hidrolizados eran estables a tratamientos de pasteurización (72°C, 15 seg) mientras que los tratamientos UHT (134°C, 2-5 seg) reducían su eficacia (Conesa *et al.*, 2010). También se ha estudiado la estabilidad de Lfcin frente a las peptidasas de los cultivos iniciadores de bacterias lácticas usados en productos lácteos. Los resultados mostraron que a diferencia de otros péptidos derivados de proteínas lácteas que son fácilmente degradados, la Lfcin conservaba el 50% de la actividad inicial después de 4 h de incubación (Paul y Somkuti, 2010).

4.1.6. Diseño racional de nuevos péptidos antimicrobianos

El desarrollo de la síntesis química de péptidos y sus análogos ha supuesto un gran avance en la caracterización e identificación de péptidos

bioactivos, de forma que se puede ensayar, prácticamente a voluntad, el efecto que tienen modificaciones, adiciones o deleciones concretas de determinados aminoácidos sobre la actividad de un péptido, o diseñar secuencias *de novo* y ensayar su actividad antimicrobiana pudiendo incluso dirigirla frente a microorganismos o dianas específicas de los mismos.

Una estrategia obvia en el diseño de AMP es la modificación de péptidos naturales con el fin de potenciar sus propiedades, dotándolos de mayor actividad, especificidad y espectro de acción o, por otro lado, reduciendo aquellas no deseables, como la toxicidad inespecífica o estabilidad reducida.

Existen numerosos ejemplos de mejora de actividad antimicrobiana (Marcos *et al.*, 2008). El péptido MSI-99 derivado de la magainina 2 posee actividad antibacteriana incrementada, conservando su actividad antifúngica (Alan y Earle, 2002). También se ha descrito que el péptido K4-S4 tiene mayor actividad antimicrobiana que su péptido parental, la dermaseptina S4, frente a bacterias Gram negativas y Gram positivas patógenas, tales como *E. coli*, *Salmonella* y *Listeria* spp., presentes en los alimentos (Yaron *et al.*, 2003).

Mediante el ensayo de una serie de análogos no hemolíticos de melitina, se identificaron péptidos (Mel.subK71) que inhibían la infección del virus del mosaico del tabaco (Marcos *et al.*, 1995). Este fue un ejemplo de obtención de una nueva propiedad, en este caso antiviral, mediante la modificación de péptidos naturales.

Una característica no deseable de los AMP es la susceptibilidad a la degradación proteolítica. En este sentido, se han diseñado análogos antimicrobianos con mayor resistencia a la degradación por proteasas, como el péptido Pep3 derivado de la cecropina A (Cavallarin *et al.*, 1998), y Myp30, derivado de magainina 2 (Li *et al.*, 2001).

En cuanto a la citotoxicidad, existen numerosos trabajos donde se describe su modulación a través de análogos de secuencia. En concreto,

se ha descrito un análogo de melitina de 15 residuos, derivado de su extremo C-terminal, que ha mostrado propiedades antibacterianas comparables al péptido parental, con reducida actividad hemolítica (Subbalakshmi *et al.*, 1999).

Desde mediados de los años noventa, la química combinatorial ha creado grandes expectativas en la identificación de nuevas sustancias bioactivas, debido a que posibilita la síntesis y ensayo de grandes colecciones de compuestos relacionados, denominadas bibliotecas (Blondelle *et al.*, 1996; Ganesan, 1998).

Una de las clases de bibliotecas combinatorias sintéticas más utilizadas son las compuestas por péptidos. Las llamadas bibliotecas “no definidas” no presuponen ninguna restricción de secuencia y representan todas las combinaciones posibles de un n-péptido. Se han utilizado bibliotecas de hexapéptidos como compromiso entre un número de mezclas manejable y una concentración efectiva en cada una de ellas (Blondelle y Houghten, 1996).

En este tipo de aproximación es común trabajar con D-aminoácidos, debido a que presentan mayor estabilidad, ya que se ha demostrado que en este tipo de AMP cortos su actividad es independiente de la estereoisomería de los aminoácidos que los constituyen (Wade *et al.*, 1990).

En trabajos anteriores realizados en el Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos, se utilizó una biblioteca de hexapéptidos en formato posicional frente al hongo fitopatógeno de frutos cítricos *Penicillium digitatum*, identificándose una serie de D-hexapéptidos, llamados genéricamente PAFs, con actividad antifúngica específica (López-García *et al.*, 2002). Tanto la biblioteca como los péptidos definidos fueron ensayados también contra microorganismos no diana como la bacteria *E. coli* y el hongo unicelular *S. cerevisiae*, con el objetivo de identificar AMP no sólo activos sino también específicos contra el hongo fitopatógeno. El péptido PAF26D (Figura 9) fue seleccionado de entre toda

la colección de PAF (PAF1 a PAF36) como el que mostró la combinación óptima de potencia antifúngica y especificidad en su acción frente a hongos filamentosos, en especial frente a *P. digitatum*.

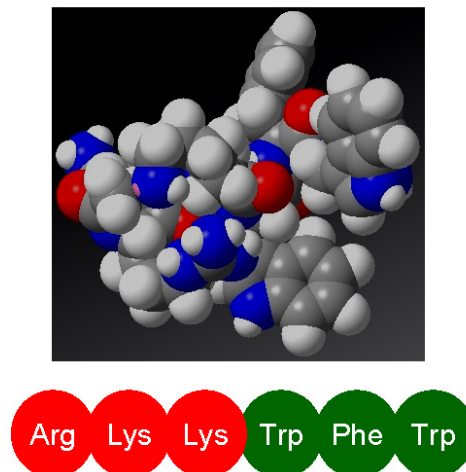


Figura 9. Representación tridimensional del plegamiento teórico junto a la secuencia del péptido sintético PAF26.

Esta colección de péptidos se caracteriza porque comparten los residuos de aminoácidos arginina y lisina en su extremo N-terminal, y fenilalanina y triptófano en el C-terminal. De los dos aminoácidos que ocupan las posiciones centrales, uno de ellos siempre es triptófano, y el otro un residuo variable. Precisamente por poseer dos residuos del aminoácido triptófano, muestran similitudes de secuencia con el centro activo de la bLF (López-García *et al.*, 2003).

4.2. Enzimas con capacidad antimicrobiana

Las enzimas antimicrobianas se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza, y juegan un papel significativo en los mecanismos de defensa de los organismos vivos frente a infecciones

producidas por bacterias y hongos. Considerando el gran número de nuevas enzimas que están siendo empleadas, con resultados satisfactorios, en el procesado de alimentos (Adlernissen, 1987; Fuglsang *et al.*, 1995), es lógico considerar la potencial aplicación de estas enzimas como antimicrobianos frente a microorganismos alterantes.

Las dos clases principales de enzimas antimicrobianas con posible uso en alimentos son las hidrolasas y las óxido-reductasas (Fuglsang *et al.*, 1995). Por lo que se refiere a las hidrolasas, estas enzimas ejercen su acción antimicrobiana por la degradación de componentes estructurales de la pared celular de los microorganismos. Las óxido-reductasas no poseen actividad antimicrobiana intrínseca, sino que los productos resultantes de su actividad catalítica son los responsables de dicha actividad.

4.2.1. Hidrolasas

Se distingue entre hidrolasas de pared celular bacteriana, que degradan el componente mayoritario de la misma, el peptidoglicano, e hidrolasas con capacidad para degradar la pared celular fúngica.

La composición química y la estructura de la capa de péptidoglicano es similar en bacterias Gram positivas y Gram negativas, aunque mucho más delgada en estas últimas. El peptidoglicano es un polímero formado por unidades de N-acetil-D-glucosamina unidas a través de enlaces β -1,4 al ácido N-acetilmurámico y es el principal responsable de la rigidez de la pared bacteriana. Entre las enzimas que degradan dicha pared, la lisozima o muramidasa es el ejemplo más conocido y con mayor aplicación tanto en productos farmacéuticos como en la industria agroalimentaria. Es de origen eucariota y componente del sistema de defensa innato del organismo productor, por lo que se considera como un bioconservante inocuo.

La lisozima posee actividad antimicrobiana frente a un amplio espectro de bacterias, hongos y virus patógenos (Benkerroum, 2008). Sin

embargo, su eficacia es relativamente pobre por diversas razones. Entre ellas destaca la resistencia de la pared celular de determinadas bacterias Gram positivas, por contener diversas modificaciones químicas (Clarke y Dupont, 1992). Por otro lado, las bacterias Gram negativas, de forma general, son insensibles a la acción de la lisozima, ya que poseen membrana externa que protege su capa de peptidoglicano. Sin embargo, es posible sensibilizarlas a la acción de la lisozima mediante la permeabilización de la membrana externa, empleando compuestos químicos como el EDTA (Payne *et al.*, 1994; Vaara, 1992), tratamientos de congelación-descongelación o de altas presiones (Masschalck *et al.*, 2001; Ray *et al.*, 1984).

La lisozima puede también actuar mediante un mecanismo no-lítico basado en su capacidad para provocar perturbaciones en la membrana celular (Düring *et al.*, 1999; Masschalck *et al.*, 2002). Por último, se ha descrito un tercer mecanismo que consiste en la inducción de autolisinas (Ibrahim *et al.*, 2001; Laible y Germaine, 1985). Dependiendo de la especie bacteriana y de las condiciones ambientales predominará un mecanismo.

En el contexto de la industria alimentaria se ha descrito la eficacia de la lisozima como conservante en carnes, frutas, verduras frescas, pescados, mariscos y sake (Corbo *et al.*, 2009; Raybaudi-Massilia *et al.*, 2009). Sin embargo, la aplicación más importante de la lisozima para la industria de la alimentación se relaciona con la elaboración de quesos, donde se emplea para evitar el problema conocido como esponjamiento butírico tardío ocasionado por *Clostridium tyrobutyricum*. Desde el punto de vista legal, su empleo como conservante (E1105) está permitido en quesos a una dosis máxima de 500 mg/l (Directiva 95/2/CE). El empleo de la lisozima en enología se describe en el apartado 4.3.

Dentro del grupo de enzimas que degradan la pared celular bacteriana, también se incluyen las autolisinas de origen bacteriano, y las virolisinas codificadas por bacteriófagos líticos de DNA bicatenario (García y Dillard, 2006; Heilmann *et al.*, 2005; Parisien *et al.*, 2008). Se ha descrito

el uso de ambas enzimas en aplicaciones médicas y biotecnológicas (Salazar y Asenjo, 2007), y en concreto las virolisinas se han empleado en alimentos e ingredientes alimentarios para eliminar *L. monocytogenes* (Loessner, 2005).

Por lo que se refiere a la pared celular fúngica, la Figura 10 refleja un esquema simplificado de su estructura y composición. Los principales componentes son tres clases de polisacáridos, quitina, β -1,3-glucano y β -1,6-glucano. También contiene dos clases mayoritarias de proteínas de pared (CWPs) glicosiladas: las unidas a dicha pared vía un glicosilfosfatidilinositol (GPI) o las de secuencia PIR (proteína con repeticiones internas). Las moléculas de β -1,3-glucano se mantienen unidas mediante puentes de hidrógeno y forman una red tridimensional que cubre toda la célula. La quitina está localizada en la parte interna de la pared celular y unida covalentemente al β -1,3-glucano, mientras que el β -1,6-glucano y las CWPs están ancladas en la parte exterior de la misma (Smits *et al.*, 1999). Considerando la composición de la pared celular, las principales proteínas antifúngicas con actividad hidrolítica son quitinasas y glucanasas (Selitrennikoff, 2001; Theis y Stahl, 2004).

Las quitinasas (EC 3.2.1.14) catalizan la degradación de la quitina y actúan, habitualmente, como endoquitinasas, produciendo quito-oligosacáridos de 2 a 6 unidades de N-acetilglucosamina (Stintzi *et al.*, 1993). En general, todos los organismos que contienen quitina producen quitinasas, que se deben requerir durante la morfogénesis de la pared celular y el exoesqueleto (Gooday, 1971). Se han identificado quitinasas procedentes de plantas, insectos, hongos y bacterias (Wang *et al.*, 2002; Watanabe *et al.*, 1999). Varias especies bacterianas pertenecientes a los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Streptomyces*, son capaces de crecer en presencia de quitina, como única fuente de carbono del medio, debido a la secreción de quitinasas (Wang *et al.*, 2002). Además de estar implicadas en el crecimiento y nutrición celular, las quitinasas también están involucradas en los mecanismos de defensa frente a patógenos. El efecto antifúngico de estas enzimas no sólo está vinculado a su capacidad para

degradar la quitina presente en las paredes celulares fúngicas, sino que también poseen un mecanismo de acción no lítico al ser capaces de unirse a la quitina e impedir la elongación del polímero (García-Casado *et al.*, 1998; Iseli *et al.*, 1993).

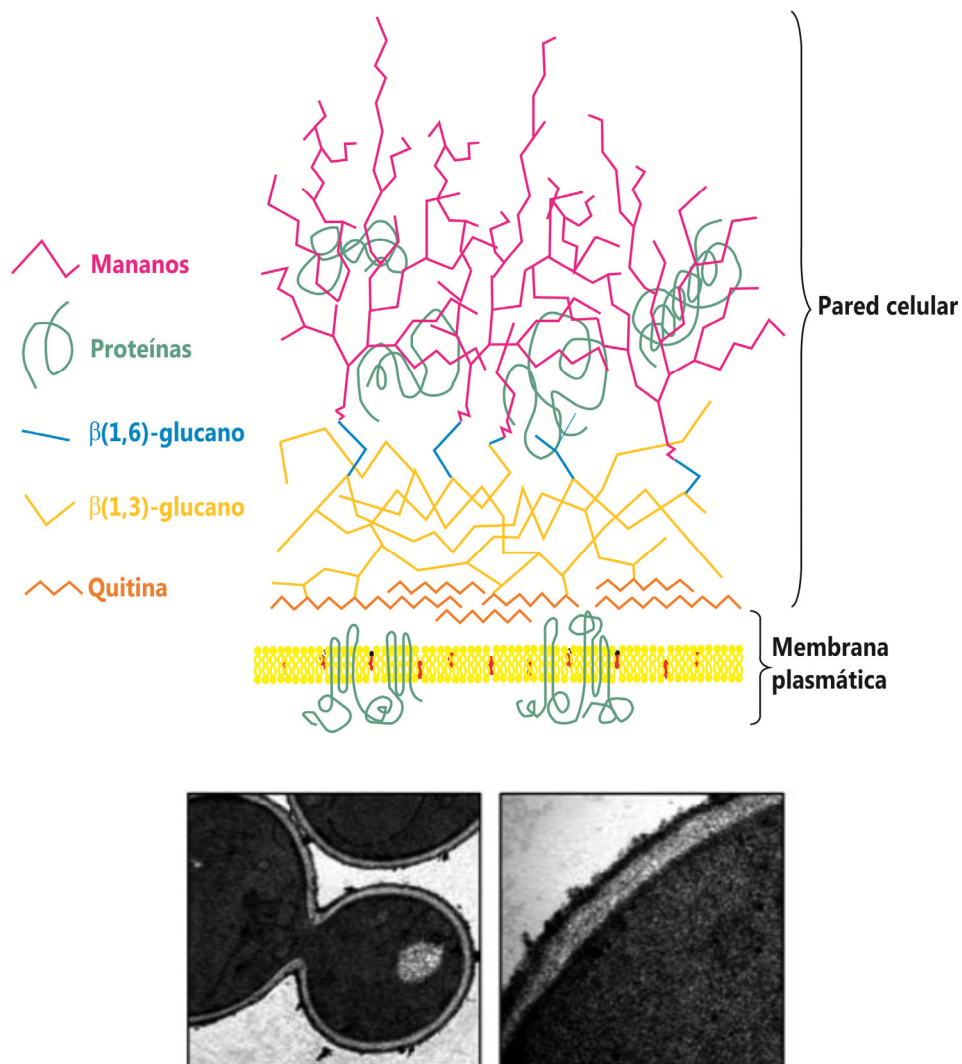


Figura 10. Esquema simplificado de la estructura y composición de la pared celular de las levaduras (Odds *et al.*, 2003) (A), y visualización mediante microscopía electrónica (B) (Pardo *et al.*, 2004).

En el contexto de la agroalimentación, se ha evaluado el empleo de quitinasas, en combinación con altas presiones hidrostáticas para inactivar las esporas de *Mucor plumbeus*, hongo alterante de distintos alimentos (Fenice *et al.*, 1999). También se ha descrito la utilización de quitinasas de *S. cerevisiae* para inhibir la germinación de esporas de *B. cinerea* (Carstens *et al.*, 2003b). Estos mismos autores han expresado una quitinasa de *S. cerevisiae*, codificada por el gen CTS1-2, para obtener plantas transgénicas de tabaco con una susceptibilidad reducida a la infección por *B. cinerea* (Carstens *et al.*, 2003a).

Un gran número de organismos producen β -glucanasas, enzimas que poseen la capacidad de hidrolizar los diferentes glucanos presentes en la pared celular fúngica, siendo las más abundantes las β -1,3-glucanasas (EC 3.2.1.39). Por ejemplo, las denominadas proteínas de defensa PR-2 de plantas tienen actividad β -1,3-glucanasa.

El mecanismo de acción antifúngico de las glucanasas puede ser directo o indirecto. El mecanismo directo se basa en la hidrólisis, fundamentalmente de los β -1,3-glucanos, lo que provoca la lisis celular inmediata. El efecto indirecto, también observado en el caso de las quitinasas, está asociado a fenómenos de patogénesis y respuestas de defensa en organismos superiores, y se debe a que la acción de estas enzimas provoca la liberación de oligosacáridos que a su vez inducen la activación de distintos mecanismos de defensa (Ryan y Farmer, 1991). Dada la complejidad de la estructura de la pared celular, es necesaria la acción hidrolítica de las β -1,6-glucanasas para complementar la acción de quitinasas y β -1,3-glucanasas y conseguir la hidrólisis completa de la pared celular de hongos filamentosos. En el caso de levaduras se ha descrito que la β -1,6-glucanasa es capaz, por sí misma, de producir halos de inhibición (de la Cruz *et al.*, 1995).

En alimentación las glucanasas se aplican fundamentalmente en la elaboración de cerveza, con el fin de eliminar rápidamente y de forma completa los glucanos procedentes de la cebada, que reducen la

filtrabilidad. También tienen aplicación en alimentación animal con el fin de aumentar la digestibilidad de los piensos. Al igual que en el caso de la lisozima, la aplicación de glucanasas en vinificación se describe en el apartado 4.3.

Además de las enzimas antifúngicas descritas previamente existen otras, tales como mananasas y α -glucanasas, que actúan sobre otro tipo de polisacáridos, tales como mananos, α -glucanos y celulosa, presentes también en la pared celular de algunos hongos y levaduras (Fuglsang *et al.*, 1995).

4.2.2. Óxido-reductasas

Los sistemas óxido-reductasa más estudiados en el contexto de la conservación de alimentos son el de la glucosa oxidasa y el de la lactoperoxidasa.

Las glucosa oxidasas (GOX; EC 1.1.3.4) producidas por diversos hongos tales como *Aspergillus niger* y *Penicillium* spp., catalizan la formación de peróxido de hidrógeno y D-glucono- δ -lactona a partir de β -D-glucosa y oxígeno. Su capacidad antimicrobiana se debe a la citotoxicidad que posee el peróxido de hidrógeno. En el ámbito de la conservación de alimentos se ha demostrado su efectividad frente a bacterias, tanto Gram positivas como Gram negativas en huevo líquido (Dobbenie *et al.*, 1995).

La enzima lactoperoxidasa (LP; EC 1.11.1.7), que se localiza en secreciones tales como leche y saliva, cataliza la oxidación de tiocianato (SCN^-) a hipotiocianato (OSCN^-) o a tiocianógeno (SCN_2), que reaccionan con los grupos sulfhidrilos de determinadas enzimas, provocando su inactivación. Además, a valores de pH cercanos a su óptimo (pH 5), estos compuestos podrían difundir a través de la membrana celular del microorganismo diana y provocar daño intracelular, incrementándose, por tanto, su actividad antimicrobiana. Existen varios estudios sobre las

propiedades antibacterianas del sistema LP en leche (Wolfson y Sumner, 1993) y otros alimentos como aves de corral (Wolfson *et al.*, 1994; Wolfson y Sumner, 1994). De hecho, el sistema LP es uno de los principales responsables de la actividad antibacteriana que posee la leche, y su presencia se puede aprovechar en la conservación de productos lácteos.

4.3. Aplicaciones en enología

En enología, tanto la especificidad de acción antimicrobiana como la efectividad en vino son dos aspectos relevantes en la búsqueda de conservantes alternativos al SO₂. En el proceso de vinificación, los compuestos antimicrobianos deberían ser selectivos frente a los microorganismos alterantes, y no afectar a los responsables tanto de la fermentación alcohólica como de la maloláctica. La comprobación de su eficacia debe de llevarse a cabo en mosto/vino, ya que se ha descrito que generalmente la capacidad antimicrobiana se reduce cuando se evalúa en el alimento respecto a medio de cultivo microbiológico (Venkitanarayanan *et al.*, 1999).

Por lo que se refiere a proteínas con capacidad antimicrobiana, la bibliografía recoge diferentes estudios sobre la aplicación de bacteriocinas y toxinas "killer" en vino. Se ha evaluado el efecto de la pediocina PD-1, producida por la cepa de *P. damnosus* NCFB 1832 sobre el crecimiento de *O. oeni* y dada la actividad antimicrobiana observada se concluyó que podría ser una alternativa eficaz a los conservantes químicos empleados en bodega (Bauer *et al.*, 2003). También se ha estudiado el posible uso de la nisina en vinificación, evaluando su efecto sobre diversos aislados de BAL (*Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus* y *Oenococcus* spp.) acéticas y levaduras (Radler, 1990a; Radler, 1990b; Rojo-Bezares *et al.*, 2007). Dada su efectividad tanto en medio microbiológico como en mosto y vino, la nisina podría emplearse en vinificación para reducir la cantidad de SO₂ necesario para controlar el crecimiento de bacterias lácticas. Además, muestra un efecto sinérgico, en combinación con el SO₂, mientras que no

afecta al correcto desarrollo de la fermentación alcohólica. Sin embargo, hasta el momento no se ha autorizado su empleo en enología (Moreno-Arribas y Polo, 2009).

Por lo que se refiere a toxinas "killer", conviene remarcar que su producción es una característica que se suele tener en cuenta en los procesos de selección de cepas comerciales de *S. cerevisiae* para facilitar su implantación en el proceso de vinificación (Van Vuuren y Jacobs, 1992), a pesar de su estrecho espectro de acción, ya que no afectan a levaduras alterantes pertenecientes a otros géneros. Este inconveniente desaparece en el caso de toxinas "killer" producidas por levaduras no-*Saccharomyces*. En este sentido, diversos estudios demuestran que la producida por *Tetrapisispora phaffii* (Kpkt) es activa, en condiciones de vinificación, frente a diversas levaduras alterantes de vino como *Sc. ludwigii*, *Z. bailii* y *Z. rouxii* (Palpacelli *et al.*, 1991) así como frente a especies del género *Hanseniaspora/Kloeckera* (Ciani y Fatichenti, 2001). Estos mismos autores han demostrado su efecto fungicida sobre *H. uvarum* en ensayos de microvinificación llevados a cabo con células inmovilizadas de *T. phaffii* (Comitini y Ciani, 2010). Dichos resultados convierten a esta levadura en candidata a emplearse como agente de biocontrol para evitar el crecimiento de levaduras apiculadas en los estadios pre-fermentativos y durante la fermentación del mosto de uva, así como en el control de levaduras alterantes de vinos dulces. Curiosamente, la caracterización bioquímica y la secuenciación del extremo N-terminal de la toxina purificada indicaron que era una proteína glicosilada, con una masa molecular de 33 kDa y con un 93% de identidad con una β -1,3-glucanasa de *S. cerevisiae*, lo que sugiere que en realidad se trata de una hidrolasa (Comitini *et al.*, 2004b).

También se han descrito toxinas activas frente a una de las levaduras alterantes más importantes en vinificación, *D. bruxellensis*. Entre ellas destacan las producidas por *P. membranifaciens* (PMKT2), *Ustilago maydis* (KP6), *P. anomala* (Pikt) y *Kluyveromyces wickerhamii* (Kwkt). Las dos primeras inhiben el crecimiento de *D. bruxellensis* sin afectar al de

S. cerevisiae, lo que las convierte en candidatos ideales para ser utilizados en enología (Santos *et al.*, 2009; Santos *et al.*, 2010). Por su parte, las toxinas Pikt y Kwkt ejercen su efecto fungicida en vino al menos durante un periodo de 10 días (Comitini *et al.*, 2004a).

Respecto al empleo de enzimas antifúngicas en vinificación, cabe destacar que el uso de lisozima en mostos y vinos a una dosis máxima de 500 mg/l ha sido autorizado con el objetivo de controlar la proliferación de bacterias lácticas (Resoluciones Oeno 10/97 y Oeno 6/97 de la O.I.V. y Reglamentos CE 1493/1999 y 423/2008).

La lisozima es una herramienta de gran flexibilidad para el bodeguero, ya que puede utilizarse en diversas etapas y a diferentes concentraciones según los objetivos buscados. Las aplicaciones principales de la lisozima pueden resumirse en: i) control preventivo al comienzo de la fermentación maloláctica, ii) protección del vino en caso de demoras en el proceso de la fermentación alcohólica y iii) estabilización microbiológica del vino después de la fermentación maloláctica (Bartowsky, 2003). A pesar de su efectividad, la lisozima se emplea a escala limitada, debido al coste que supone su extracción de las fuentes naturales en las que se localiza (du Toit y Pretorius, 2000).

Por lo que se refiere a las glucanasas, existen preparados enzimáticos que las contienen y que actualmente se emplean en diferentes etapas del proceso de vinificación con el fin de mejorar la filtración y clarificación de los mostos y vinos. Las preparaciones comerciales de glucanasas son producidas por especies del género *Trichoderma*. Estos preparados enzimáticos son activos a temperaturas entre 15-50 °C y pH 3-4 y su actividad no se ve afectada por el etanol (hasta un 14%) ni tampoco por niveles de SO₂ de hasta 350 mg/l.

Las primeras preparaciones de glucanasas se evaluaron en mostos obtenidos a partir de uvas botritizadas, con el objetivo de mejorar su filtración, ya que estos mostos se caracterizan por poseer elevadas cantidades de β-1,3-1,6-glucano de elevado peso molecular producido por

B. cinerea (Dubourdieu *et al.*, 1981; Villettaz *et al.*, 1984). Este tratamiento enzimático mejora la filtrabilidad sin producir ningún cambio sustancial en la composición del vino obtenido a partir de dichos mostos. La adición de estos preparados también contribuye a mejorar el aroma y la calidad global de determinados tipos de vino. Así mismo, facilitan la liberación de manoproteínas durante los procesos de envejecimiento sobre lías, debida a la propia autólisis de las levaduras (van Rensburg y Pretorius, 2000). Si bien en la actualidad estas glucanasas comerciales se emplean de manera rutinaria en bodega, su potencial como antimicrobiano no ha sido evaluado.

Algunos autores proponen el empleo de GOX en vinificación por su efecto antibacteriano (Malherbe *et al.*, 2003). Con este fin, se desarrolló una cepa de *S. cerevisiae* modificada genéticamente que expresaba el gen GOX de *A. niger*. Se demostró su actividad antimicrobiana *in vitro* frente a diversas bacterias lácticas, como *L. brevis*, *P. pentosaceus* y *Lactobacillus fermentum*, y acéticas, como *A. aceti* y *G. oxydans*. Así mismo también se ha propuesto la posibilidad de co-expresar el gen GOX con grupos de genes que codifican bacteriocinas (pediocina y leucocina) y enzimas antimicrobianas (quitinasas, glucanasas y lisozima) (du Toit y Pretorius, 2000; Pretorius, 2000; Pretorius y Bauer, 2002; Schoeman *et al.*, 1999).

Objetivos

Este trabajo se enmarca en la búsqueda de nuevas alternativas para el control de las contaminaciones microbianas de los vinos. Teniendo en cuenta los antecedentes descritos en la bibliografía, y revisados a lo largo de la Introducción, las alternativas que se plantean al empleo de SO₂ para el control de microorganismos alterantes de vino se basan en la aplicación de péptidos y enzimas con capacidad antimicrobiana. En este contexto, se han propuesto los objetivos que se detallan a continuación.

Como objetivo 1 se ha planteado la caracterización de la actividad antibacteriana de péptidos derivados de la lactoferrina bovina frente a diversas bacterias lácticas alterantes en vinificación, tanto en medio microbiológico como en condiciones de bodega.

El objetivo 2 ha consistido en la evaluación y caracterización de la actividad antifúngica en medio de cultivo y vino de péptidos derivados de la lactoferrina bovina y de una colección de péptidos PAF, que poseen similitudes de secuencia con el centro activo de la lactoferrina, para el control de levaduras alterantes en el proceso de vinificación.

Dentro del objetivo 3 hemos analizado la eficacia en medio microbiológico y vino de un preparado enzimático de β -glucanasas para el control de diversas levaduras alterantes de interés en enología.

Materiales y Métodos

1. Microorganismos

El grupo de microorganismos empleado en este trabajo se detalla en la Tabla 5. Entre ellos se encuentran varias especies de levaduras y bacterias del ácido láctico (BAL) que pueden producir la alteración microbiana del vino durante las diversas etapas del proceso de vinificación y también cepas vínicas comerciales de *Saccharomyces cerevisiae* y *Oenococcus oeni*.

Tabla 5. Microorganismos utilizados en este trabajo.

Especie	Aislado/cepa	Procedencia
<i>S. cerevisiae</i>	Lalvin T73	Lallemand
<i>C. albidus</i>		Bodega española
<i>P. membranifaciens</i>		Bodega española
<i>Z. bailii</i>		Bodega española
<i>Z. bisporus</i>		Bodega española
<i>D. bruxellensis</i>	F11	Bodega española
	531, 928, 1327,1700, 1701, 1717, 2114, 2174	Martorell <i>et al.</i> , 2006
<i>L. brevis</i>	216	CECT
<i>L. hilgardii</i>	4659	CECT
<i>P. damnosus</i>	4693	CECT
<i>O. oeni</i>	Viniflora® oenos	Chr. Hansen A/S, Dinamarca

Por lo que se refiere a las levaduras se incluyeron cuatro cepas aisladas de diferentes vinos españoles e identificadas mediante análisis RFLP de la región 5,8S-ITS como pertenecientes a las especies *Cryptococcus albidus*, *Pichia membranifaciens*, *Zygosaccharomyces bailii* y *Zygosaccharomyces bisporus*. También se incluyeron ocho cepas pertenecientes a la especie *Dekkera bruxellensis*, dos de ellas aisladas de vinos tintos de origen español y las seis restantes procedentes de bodegas

portuguesas con distinta localización geográfica, caracterizadas en un estudio previo mediante un análisis de restricción del DNA mitocondrial y la técnica RAPDs-PCR (Martorell *et al.*, 2006) (Tabla 6).

Tabla 6. Cepas pertenecientes a la especie *D. bruxellensis* empleadas en este trabajo.

Cepa	mtDNA ^a	Haplotipo ^a
1327	A	1
2114	A	2
2174	A	2
1700	A	3
531	A	4
928	A	4
1701	A	4
1717	A	5
F11	B ^b	n.d. ^c

^aPatrones de restricción de DNA mitocondrial y haplotipos, determinados mediante RAPDs, descritos previamente (Martorell *et al.*, 2006).

^bPatrón de restricción de DNA mitocondrial, determinado en este trabajo.

^cn.d.: No determinado.

Además se seleccionaron tres cepas de BAL de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) pertenecientes a las especies *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus hilgardii* y *Pediococcus damnosus*.

La cepa vínica comercial de *S. cerevisiae* (Lalvin T73, Lallemand Inc., Rexdale, Ontario, Canadá), se eligió para este estudio a modo de control, ya que *S. cerevisiae* es la principal levadura encargada de llevar a cabo la fermentación alcohólica del mosto de uva, y además puede actuar como alterante dada su capacidad para producir re-fermentaciones en vino embotellado. Por las mismas razones que en el caso anterior se incluyó una cepa comercial de *O. oeni* (Viniflora[®] oenos, Chr. Hansen A/S,

Dinamarca), responsable de la fermentación maloláctica, pero cuyo crecimiento en vinos donde no se desea llevar a cabo dicha fermentación se considera alteración.

2. Medios de crecimiento y condiciones de cultivo

2.1. Levaduras

Las levaduras empleadas en este trabajo se crecieron a una temperatura de 30°C en medio GPY (5 g/l extracto de levadura, 5 g/l peptona, 40 g/l glucosa, pH 5,5, más 20 g/l de agar bacteriológico en el caso de medio sólido). Para la preparación de los preinóculos las levaduras se crecieron 16 h en agitación, cuantificándose el número de células/ml mediante una cámara de contaje celular de Neubauer (Afora, Madrid, España), con el fin de ajustar la concentración apropiada para cada ensayo.

2.2. Bacterias

Las cuatro cepas de BAL empleadas en este trabajo se crecieron a una temperatura de 22°C en medio MRS (52 g/l MRS (Oxoid Ltd., Basingstoke, Reino Unido), 2 g/l ácido L-málico, 0,5 g/l L-cisteína, pH 4,8, más 30 g/l de agar bacteriológico en el caso de medio sólido). Para la preparación de los preinóculos las bacterias se crecieron durante 16 h sin agitación, estimándose el número de unidades formadoras de colonia (ufc)/ml extrapolando el valor de la DO_{492nm} a curvas patrón realizadas para cada bacteria. La Tabla 7 recoge las ecuaciones correspondientes a estas curvas patrón.

Tabla 7. Ecuaciones correspondientes a las curvas patrón de las bacterias lácticas objeto de estudio.

Especie	Curva patrón
<i>L. brevis</i>	$DO_{492nm} = 5,25 \times 10^{-9} \times (\text{ufc/ml}), R^2 0,9972$
<i>L. hilgardii</i>	$DO_{492nm} = 4,52 \times 10^{-9} \times (\text{ufc/ml}), R^2 0,9950$
<i>P. damnosus</i>	$DO_{492nm} = 1,80 \times 10^{-9} \times (\text{ufc/ml}), R^2 0,9941$
<i>O. oeni</i>	$DO_{492nm} = 4,54 \times 10^{-10} \times (\text{ufc/ml}), R^2 0,9992$

3. Mostos de uva y vinos.

El mosto de uva utilizado para diversos experimentos a lo largo de este trabajo fue de la variedad de uva Moscatel, con un contenido en azúcares reductores de 200 g/l y un valor de pH de 3,5. No se sometió a tratamiento de sulfitado, y previo a su empleo se clarificó por centrifugación (30 minutos a 4000 rpm), se le adicionó 1 g/l de Fermaid (Lallemand, Montreal, Canadá), nutriente complejo rico en nitrógeno asimilable empleado habitualmente para conseguir un desarrollo adecuado del proceso de vinificación, y 1 mg/l de dimetil dicarbonato (Fluka, Buchs, Suiza; 24 h, 4°C), con el fin de asegurar su esterilidad.

En el transcurso de este trabajo se han empleado diversos vinos blancos cuya caracterización se recoge en la Tabla 8.

4. Compuestos antimicrobianos

4.1. Péptidos sintéticos

4.1.1. Propiedades

Los péptidos sintéticos utilizados en este estudio (Tabla 9) fueron sintetizados por una compañía externa (GenScript Corporation, Piscataway, EEUU; <http://www.genscript.com/>) mediante la química del grupo base-lábil N-(9-fluorenil)-metoxicarbonilo (Fmoc) (Fields y Noble,

1990). Todos ellos se solicitaron a una pureza de >90%. Los péptidos se purificaron por cromatografía líquida de alta resolución en fase inversa (RP-HPLC) y su identidad se confirmó por espectrometría de masas MALDI-TOF. Todos los péptidos se sintetizaron con sus extremos modificados por acetilación (Ac) en el amino terminal y amidación (NH₂) en el carboxilo terminal. Además en el caso del péptido LfcinB₁₇₋₃₁ también se utilizó una versión con su extremo amino terminal modificado por adición covalente del fluoróforo 5-isotiocianato de fluoresceína (FITC-LfcinB₁₇₋₃₁).

Tabla 8. Caracterización de los vinos empleados en este trabajo.

Característica	Vinos			
	Cosecha 2005 ^a	Cosecha 2006 ^a	Vino desalcoholizado ^a	Vino embotellado ^a
Variedad de uva	Garnacha blanca	Garnacha blanca	Moscatel	Parellada
Acidez volátil (g/l)	0,31	0,38	0,3	0,25
Azúcar residual (g/l)	5,4	4,5	55	20
SO ₂ libre (ppm)	13	4	37	35
SO ₂ total (ppm)	20	8	106	102
Acidez total (g/l)	6,78	6,64	6,59	6,5
pH	3,03	3,34	2,77	3,1
Ácido málico (g/l)	0,86	0,52	1,82	n.d.
Grado alcohólico (% v/v)	13,83	13,06	1,68	10,8

^aNomenclatura empleada para designar a los distintos vinos en este trabajo.
n.d. No determinado.

Todos los péptidos utilizados poseen una carga neta positiva según estimaciones a pH fisiológico (entre +2 y +6) y son de bajo peso molecular. En los distintos estudios realizados y para alguno de los péptidos evaluados se utilizaron versiones de los péptidos sintetizados tanto con D como con L-aminoácidos. En cada caso se indicará el estereoisómero

utilizado con los correspondientes sufijos en el nombre del péptido (Tabla 9).

Tabla 9. Secuencias y propiedades de los péptidos usados en este estudio.

Péptido	Secuencia ^a	Carga neta ^b	MW	Fuente ^c
P20	Ac-rktpfw-NH ₂	+2	875,0	[1]
PAF25	Ac-rkfwfw-NH ₂	+2	1010,2	[1]
PAF26	Ac-rkkwfw-NH ₂	+3	991,2	[1]
PAF26L	Ac-RKKWFW-NH ₂	+3	991,2	[2]
PAF29	Ac-rkrwfw-NH ₂	+3	1019,2	[1]
PAF31	Ac-rkwfw-NH ₂	+2	1010,2	[1]
PAF32	Ac-rkwhfw-NH ₂	+2,1	1000,2	[1]
PAF33	Ac-rkwkfw-NH ₂	+3	991,2	[1]
PAF34	Ac-rkwlfw-NH ₂	+2	976,2	[1]
PAF36	Ac-rkwrwfw-NH ₂	+3	1019,2	[1]
PAF36L	Ac-RKWRFW-NH ₂	+3	1019,2	[2]
LfcinB ₂₀₋₂₅	Ac-RRWQWR-NH ₂	+3	1028,2	[3]
LfcinB ₁₇₋₃₁	Ac-FK C RRWQWR M KKLGA-NH ₂	+6	2035,5	[4]

^aLos aminoácidos con estereoisomería L se muestran en mayúsculas y con D en minúscula. Se indica la acetilación en el extremo N-terminal (Ac) y la amidación en C-terminal (NH₂). Los residuos de aminoácidos catiónicos R y K aparecen en rojo, los aromáticos W y F en verde y los de C, formadores de puentes disulfuro, en negrita.

^bCarga neta estimada a pH 7.

^cReferencia de la fuente: [1] (López-García *et al.*, 2002); [2] Este trabajo; [3] (López-García *et al.*, 2003); [4] (Haug y Svendsen, 2001).

4.1.2. Cuantificación espectrofotométrica

Los péptidos se disolvieron en tampón 10 mM 3-(N-morfolino)-ácido propanosulfónico (MOPS) a pH 7. Las concentraciones de cada péptido se determinaron por medida de la absorbancia a 280 nm ($\epsilon^{280} = 5600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ del aminoácido triptófano), confirmándose antes de cada experimento (Figura 11).

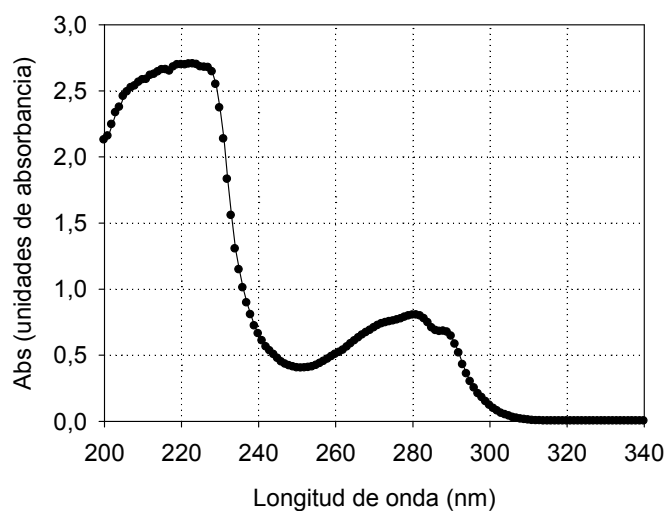


Figura 11. Cuantificación espectrofotométrica de los péptidos empleados en este trabajo. A modo de ejemplo se muestra el espectro de LfcinB₁₇₋₃₁ a la concentración de 72 μM , observándose el pico de absorbancia del triptófano a 280 nm.

En el caso del péptido FITC-LfcinB₁₇₋₃₁, la concentración también se determinó por espectrofotometría, mediante la medida de la absorbancia a 495 nm ($\epsilon^{495} = 68000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ del fluoróforo FITC). Soluciones madre de cada péptido se prepararon a 1-18 mM en tampón MOPS a pH 7 y se mantuvieron a -20°C .

4.2. Hidrolizado de lactoferrina bovina

Para la preparación del hidrolizado se disolvió 1 g de lactoferrina bovina (bLF) (USB Corporation, Cleveland, EEUU) en 20 ml de agua destilada y se ajustó a pH 2,5. La hidrólisis se llevó a cabo empleando pepsina porcina (Sigma Chemical Co., St. Louis, EEUU) al 3% (p/p) e incubando la mezcla en agitación a una temperatura de 37°C durante 4 h (Tomita *et al.*, 1991). Transcurrido este tiempo se detuvo la hidrólisis enzimática mediante calentamiento a 80°C durante 15 minutos. Tras la neutralización de la solución obtenida por adición de NaOH 1N, se centrifugó la misma a 10.000 rpm durante 30 minutos. La determinación de la cantidad de proteína, tanto en la solución inicial de bLF como en el hidrolizado resultante se llevó a cabo mediante el método de Bradford (Bradford, 1976) empleando seroalbúmina bovina (BSA) como proteína patrón (Ruiz-Giménez *et al.*, 2007).

4.3. Preparado enzimático rico en β -glucanasas

En este estudio se ha empleado, como agente antimicrobiano frente a levaduras alterantes de vino, un preparado enzimático denominado comercialmente GlucanexTM (Novozymes, Dittingen, Suiza). Este preparado de origen fúngico (*Trichoderma harzianum*) contiene, principalmente, una endo- β -1,3-glucanasa, una exo- β -1,3-glucanasa, una exo- β -1,6-glucanasa y una β -glucosidasa inespecífica (Dubourdieu *et al.*, 1985). Posee además otras actividades enzimáticas residuales, como celulasa, quitinasa y proteasa.

Las soluciones madre de Glucanex se prepararon a 1 y 10 mg/ml en vino blanco o agua destilada, y se esterilizaron por filtración (filtros de 0,2 μ m, Millipore, Bedford, EEUU).

5. Estudios *in vitro* sobre microorganismos

La actividad antimicrobiana de un compuesto se puede manifestar como una inhibición o retardo del crecimiento microbiano en presencia de dicho compuesto, actividad que se denomina bacteriostática o fungiestática, o como su muerte irreversible, denominada actividad microbicida. De este modo se ha caracterizado la actividad antimicrobiana de los péptidos sintéticos, el hidrolizado de bLF y del preparado enzimático Glucanex tanto en condiciones de laboratorio como en mosto y/o vino.

5.1. Ensayos de inhibición del crecimiento en placas de microtítulo

La inhibición del crecimiento *in vitro* de levaduras o bacterias en medio líquido se determinó en placas de microtítulo, empleando un protocolo descrito previamente (López-García *et al.*, 2002). Esta técnica permite evaluar de forma rápida un amplio intervalo de concentraciones para la obtención de las curvas dosis-respuesta, siendo necesarias cantidades mínimas del agente antimicrobiano.

5.1.1. Condiciones del ensayo

El ensayo de crecimiento de los microorganismos se realizó en placas estériles de microtítulo de 96 (*D. bruxellensis*, *Z. bailii*, *Z. bisporus*, *L. brevis*, *L. hilgardii*, *P. damnosus* y *O. oeni*) o 384 pocillos (*C. albidus*, *P. membranifaciens* y *S. cerevisiae*) (Nunc, Roskilde, Dinamarca) (Figura 12). El volumen final del pocillo fue de 100 μ l en las placas de 96 pocillos y de 40 μ l en las placas de 384 pocillos. Para la preparación de las primeras, se dispensaron 90 μ l del medio de cultivo apropiado para cada microorganismo en las filas correspondientes a los controles y 90 μ l del inóculo, preparado en el mismo medio, en el resto de ellas. A continuación se adicionaron 10 μ l de varias diluciones seriadas del agente

antimicrobiano a ensayar, a concentraciones 10x, disponiendo siempre de pocillos en ausencia de éste (correspondientes al crecimiento máximo del microorganismo) al que se le adicionaron 10 µl de MOPS, al igual que a los controles sin inocular. En el caso de las placas de 384 pocillos, la metodología seguida fue similar, adecuando los volúmenes al volumen final de los pocillos (40 µl).

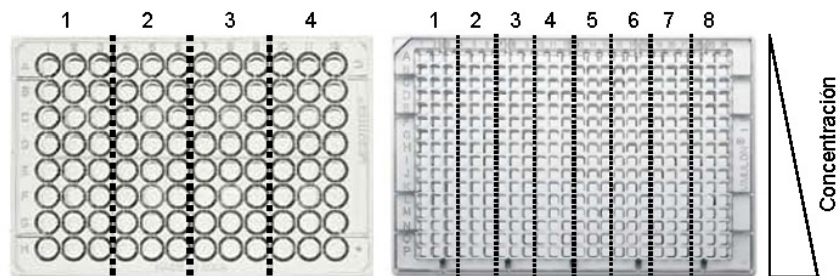


Figura 12. Placas de microtítulo de 96 (izquierda) y de 384 pocillos (derecha) utilizadas en los ensayos de actividad antimicrobiana. Las columnas representan las combinaciones de los diferentes péptidos para un microorganismo dado.

Las placas se incubaron a la temperatura apropiada para cada microorganismo en estufa y sin agitación. La evolución del crecimiento microbiano se siguió por medida de la turbidez a DO_{492nm} a diferentes tiempos de incubación en un espectrofotómetro de placas Multiskan Spectrum (Thermo Electron Corporation, Finlandia). En todos los experimentos se prepararon tres réplicas para cada concentración de antimicrobiano, y entre 3-12 réplicas de los controles en ausencia de microorganismo y en ausencia de antimicrobiano.

5.1.2. Levaduras

El medio líquido empleado fue GPY diluido cuatro veces (25% GPY) y suplementado con 0,003% (p/v en etanol 99%) de cloranfenicol (Merck, Darmstadt, Alemania), para evitar contaminaciones bacterianas. El inóculo se llevó a la concentración inicial de 10^5 – 10^6 células/ml. Los compuestos antimicrobianos se ensayaron a concentraciones en el intervalo 0,75–100 μ M en el caso de los péptidos sintéticos, entre 0,013 y 26 mg/ml para el hidrolizado de bLF y desde 1 hasta 1000 μ g/ml de Glucanex. Las placas se incubaron a 30°C durante 30 h.

5.1.3. Bacterias lácticas

El medio líquido empleado fue MRS diluido cuatro veces (25% MRS) y suplementado con 0,01% (p/v en agua destilada) de cicloheximida (Sigma Chemical Co., St. Louis, EEUU), para evitar así la contaminación por levaduras. La concentración inicial de inóculo fue de 10^7 – 10^8 ufc/ml. Los compuestos antimicrobianos se ensayaron a diferentes concentraciones en el intervalo 0,05–100 μ M (LfcinB₁₇₋₃₁) y 0,013–26 mg/ml (hidrolizado de bLF). Las placas se incubaron a una temperatura de 22°C durante 28 h.

5.1.4. Determinación de los parámetros de actividad antimicrobiana

El valor de IC₅₀ de un compuesto antimicrobiano se definió como la concentración requerida para obtener un 50% de inhibición en el crecimiento al alcanzar la fase estacionaria del mismo (20–24 h de incubación) y se estimó mediante una regresión no lineal de los datos experimentales con una curva sigmoide de cuatro parámetros (Ecuación 1 y Figura 13) usando el software SigmaPlot v8.02 (SPSS Inc., Chicago, IL, EEUU). El valor de IC₅₀ estimado se consideró válido si $p < 0,05$.

$$Y = Min + \frac{Max - Min}{\left(1 + \left(\frac{X}{IC_{50}}\right)^P\right)}$$

Ecuación 1. Ecuación sigmoide de cuatro parámetros utilizada en el cálculo del valor IC_{50} . En nuestro caso, los valores de X e Y son los de concentración de antimicrobiano y DO, respectivamente.

A partir de los datos experimentales se obtuvo la concentración mínima inhibitoria (MIC) de cada compuesto antimicrobiano para un microorganismo dado, definida como la mínima concentración del mismo que no mostró crecimiento al final del experimento (tras 30 h de incubación), en ninguno de los experimentos llevados a cabo con esa combinación de agente antimicrobiano-microorganismo (Figura 13).

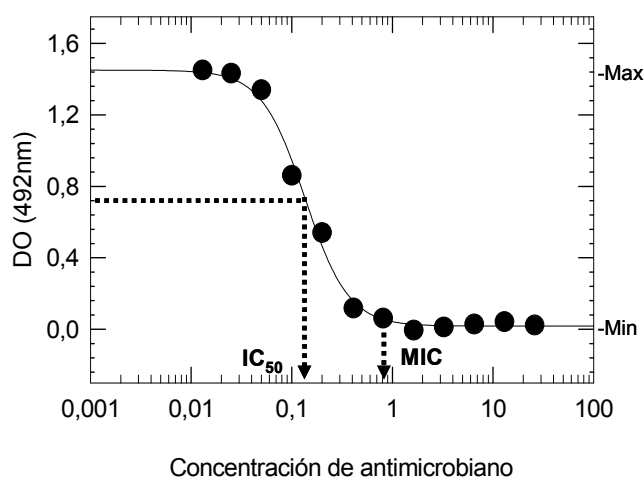


Figura 13. Ejemplo de ajuste mediante una regresión no lineal con la ecuación de cuatro parámetros (ver Ecuación 1) de los datos experimentales de DO a una curva sigmoide. Los puntos experimentales se muestran como círculos negros y el ajuste matemático como una línea negra. Además se indican los valores de IC_{50} y MIC obtenidos.

5.2. Ensayos de actividad microbicida de los péptidos

5.2.1. Levaduras

Se evaluó la actividad fungicida de los péptidos sintéticos PAF26L y LfcinB₁₇₋₃₁ sobre las levaduras *Z. bisporus*, *Z. bailii*, *S. cerevisiae* y *D. bruxellensis* F11, en medio de cultivo GPY 25%, vino blanco (cosecha 2005), y dicho vino blanco al que se le adicionó 0,5 mg/ml de ácido etilendiaminotetracético (EDTA) o se sometió a un proceso de desalado empleando la resina de intercambio iónico AG501-X8 (Bio-Rad Laboratories, Alcobendas, España) al 10% (p/v). Dicha resina se mantuvo en contacto con el vino durante 1 hora, a temperatura ambiente y con agitación, eliminándola transcurrido este tiempo mediante centrifugación (5 minutos a 10.000 rpm). También se incluyó vino blanco desalcoholizado. Para el resto de cepas de *D. bruxellensis* se evaluó la actividad microbicida de LfcinB₁₇₋₃₁ en GPY 25%, mosto y vino blanco (cosecha 2006).

Para llevar a cabo estos ensayos de actividad fungicida, suspensiones de células (10^3 células/ml) se incubaron con los péptidos a una concentración de 100 μ M en las matrices antes citadas. Tras 1 h y 24 h de incubación a 20°C, se sembraron 100 μ l de las mezclas en placas de GPY libres de péptido. Las placas se incubaron a 30°C hasta el óptimo crecimiento microbiano para proceder al recuento de las colonias. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

5.2.2. Bacterias lácticas

Para la realización de los ensayos de actividad bactericida, diferentes suspensiones celulares (10^4 - 10^6 ufc/ml) se incubaron con distintas concentraciones de LfcinB₁₇₋₃₁ (0-64 μ M) en MRS 25% y mosto a 20°C. Después de 1 h y 24 h de incubación, se depositaron en forma de gotas de 2,5 μ l sobre placas de MRS libres de péptido. Las placas se

incubaron a 22°C hasta la aparición de crecimiento. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

6. Ensayos de inoculación controlada en vino

Para evaluar el efecto de los agentes antimicrobianos en vino se realizaron ensayos de contaminación controlada. Estos ensayos se llevaron a cabo en matraces de 50 ml con alícuotas de 10 ml de vino blanco (cosecha 2005 ó 2006) cuya concentración de etanol se redujo hasta un 10% (v/v) para favorecer el crecimiento de *D. bruxellensis* F11 y hasta el 7% (v/v) en el caso de *Z. bisporus*. Estos vinos con concentraciones reducidas de etanol se obtuvieron mediante la adición de vino blanco desalcoholizado.

Los vinos se inocularon con diferentes concentraciones de células (1-10⁴ células/ml) a partir de preinóculos en GPY y los antimicrobianos se adicionaron a concentraciones de 100 µM (LfcinB₁₇₋₃₁), 5,3 mg/ml (hidrolizado de bLF) y concentraciones en el intervalo de 4,5-450 µg/ml en el caso del Glucanex. La temperatura de incubación fue de 20°C en ausencia de agitación. Se siguió el crecimiento microbiano por medidas periódicas de DO_{492nm}, en placas de microtitulación de 384 pocillos empleando un espectrofotómetro de microplacas. Los experimentos se prolongaron entre 10 y 42 días, dependiendo de la levadura y concentración de inóculo ensayada, considerándose el experimento finalizado cuando el crecimiento microbiano alcanzó la fase estacionaria.

De forma análoga, para evaluar el efecto del preparado enzimático Glucanex en vino embotellado se realizaron ensayos de contaminación controlada con *D. bruxellensis* F11 y *Z. bailii*. Estos ensayos se llevaron a cabo en botellas de vidrio de 750 ml que se llenaron con vino blanco de la variedad de uva Parellada (Tabla 8), dejando un espacio de cabeza mínimo. Las botellas se inocularon con 10⁴ células/ml a partir de cultivos nocturnos en GPY y el Glucanex se adicionó a una concentración de 500

µg/ml. Los ensayos se llevaron a cabo por triplicado incluyendo controles de vinos inoculados sin adición de Glucanex y de vinos sin inocular con y sin adición del preparado enzimático. La incubación se realizó a temperatura ambiente durante 60 días.

Periódicamente se evaluó el crecimiento microbiano por impedancia eléctrica indirecta y mediante siembra en placas de GPY incubadas a 30°C hasta el óptimo crecimiento microbiano. El equipo utilizado para llevar a cabo las medidas de variación de impedancia eléctrica fue un Micro Trac 4200-Sy Lab (Gomensoro S.A., Madrid, España), empleando un protocolo descrito previamente (Martínez *et al.*, 2004). Brevemente, las muestras de vino se filtraron empleando filtros Millipore de 0,45 µm (HAWGO2500, Millipore Ibérica, Madrid, España), que seguidamente se colocaron en las celdas de medida con medio de crecimiento BiMedia 001A (Sy-Lab, Neupurkersdorf, Austria). El CO₂ liberado por las levaduras durante su crecimiento provocó un incremento de la impedancia eléctrica de la solución de KOH al 0,2% (p/v) que se encuentra en contacto directo con los electrodos de medida. Cuando la variación de la impedancia fue mayor del 15% se consideró positivo el crecimiento microbiano.

7. Ensayos de inoculación controlada durante la fermentación alcohólica

7.1. Bacterias lácticas

Para evaluar los efectos del péptido sintético LfcinB₁₇₋₃₁ sobre el crecimiento de las 4 cepas de BAL y *S. cerevisiae* T73 (Tabla 5) a lo largo del proceso de fermentación se diseñaron fermentaciones conjuntas. Estos ensayos se llevaron a cabo con mosto estéril de la variedad Moscatel (ver apartado 3) al que se incrementó su valor de pH hasta 3,8 y se adicionó ácido L-málico (Fluka, Buchs, Suiza) hasta alcanzar una concentración final de 2 g/l. Tubos de 15 ml de capacidad con 13 ml de mosto se inocularon con 10⁸ ufc/ml de las diferentes BAL. Siguiendo el protocolo

descrito previamente (Gao *et al.*, 2002) se permitió que las bacterias se aclimataran al mosto durante un periodo de 2 días, tras el cual se adicionó LfcinB₁₇₋₃₁ a una concentración final 100 µM y 10² células/ml de *S. cerevisiae* T73. Las fermentaciones se llevaron a cabo por duplicado incluyendo controles en ausencia de péptido, en ausencia de bacterias lácticas y mosto sin inocular. La incubación se realizó a 22°C durante 20 días.

De forma periódica se cuantificó la población de levaduras y bacterias por siembra en placas de GPY suplementadas con 0,01% (p/v) de cloranfenicol y en placas de MRSA suplementadas con 0,01% (p/v) de cicloheximida. Las placas se incubaron a 30°C y 22°C, respectivamente. La siembra de los distintos controles en estos medios permitió confirmar la ausencia de contaminaciones cruzadas.

7.2. Levaduras

De forma análoga al estudio realizado con bacterias, para evaluar los efectos del péptido sintético LfcinB₁₇₋₃₁ sobre el crecimiento de *D. bruxellensis* (cepas F11 y 928) y *S. cerevisiae* T73 a lo largo del proceso de fermentación alcohólica se diseñaron fermentaciones conjuntas. Estas microvinificaciones se llevaron a cabo por triplicado, en matraces de 50 ml, empleando 10 ml de mosto, que se inocularon con 10⁴ células/ml de un crecimiento nocturno en medio GPY de la cepa correspondiente de *D. bruxellensis*. La adición del péptido LfcinB₁₇₋₃₁ (100 µM) y *S. cerevisiae* T73 (10² células/ml) se llevó a cabo tras un día de aclimatación de las cepas de *D. bruxellensis* en el mosto. Se incluyeron los controles oportunos en ausencia de péptido y mosto sin inocular. La incubación se realizó a 22°C durante 28 días.

Periódicamente se cuantificó la población de levaduras mediante siembra en placas GPY (*S. cerevisiae*) y GPY suplementadas con 0,01% (p/v) de cicloheximida (*D. bruxellensis*). Todas ellas se incubaron a 30°C

hasta el óptimo crecimiento microbiano, momento en que se procedió al recuento de colonias. Al igual que en el caso anterior, la siembra de los distintos controles en estos medios permitió confirmar la ausencia de contaminaciones cruzadas.

7.3. Determinación de parámetros enológicos

En el transcurso de los distintos procesos de fermentación alcohólica se determinaron diversos parámetros indicativos del proceso tales como el pH y grado alcohólico de los vinos, así como su concentración de acetaldehído, glicerol, azúcares reductores y ácido acético y málico. El pH se determinó empleando un electrodo de pH Crison (Barcelona, España), mientras que el etanol se cuantificó mediante el kit enzimático R-Biopharm (R-Biopharm AG, Darmstadt, Alemania). El resto de parámetros fueron determinados en un analizador Echo-Enosys (Tecnova, San Sebastián de los Reyes, España) empleando los kits enzimáticos comerciales correspondientes.

En los ensayos llevados a cabo con Glucanex en vino blanco embotellado se determinó el grado alcohólico utilizando un equipo de análisis de vino Anton-Paar Wine Alcoalyzer, los azúcares residuales y la acidez volátil se determinaron mediante IR-NIR y para la determinación de la acidez total se empleó un valorador Crison (Crison, Barcelona, España).

8. Identificación de levaduras vínicas

En el transcurso de este trabajo se han llevado a cabo estudios de identificación tanto a nivel de especie como de cepa, de las distintas levaduras alterantes disponibles, según los dos métodos descritos a continuación.

8.1. Análisis de la región ITS del DNA ribosómico

Se utilizó la técnica de análisis de restricción de la región ribosomal 5,8S-ITS según un protocolo descrito previamente (Esteve-Zarzoso *et al.*, 1999). Estas secuencias se utilizan para el establecimiento de relaciones filogenéticas y la identificación de especies (Kurtzman y Robnett, 1998) por contener las secuencias conservadas de los genes, separadas por espaciadores divergentes que difieren entre distintas especies e incluso cepas/aislados (Wen-Hsiung Li, 1997). Se amplificó la región que incluye el gen 5,8S y las regiones intergénicas ITS1 e ITS2 del DNA, mediante PCR con los oligonucleótidos ITS1 (5'-dTCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-dTCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White *et al.*, 1990) (Figura 14).

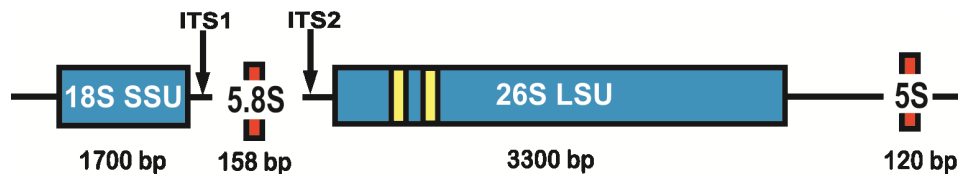


Figura 14. Esquema de la organización de los genes ribosomales.

Las células procedentes de una colonia se disgregaron en el tampón de PCR. En aquellos casos en que mediante esta técnica no se obtuvo amplificado se procedió a la extracción del DNA total de las levaduras, siguiendo procedimientos descritos anteriormente (Querol *et al.*, 1992; Sherman *et al.*, 1986).

La reacción de PCR se preparó en un volumen final de 100 μ l, que contenía 2 unidades de DNA polimerasa termoestable DyNAzymeTM II (Finnzymes Oy, Espoo, Finlandia), tampón comercial de la enzima, 0,3 μ M de cada desoxinucleótido (dATP, dCTP, dTTP y dGTP), 1 μ M de cada cebador ITS1 e ITS4, y la muestra a amplificar. La amplificación se realizó en un termociclador Progene (Techne, Cambridge, Reino Unido) con el siguiente programa: 95°C durante 5 min, si se empleó DNA como molde, ó

15 min si fue una colonia, y 40 ciclos sometiendo a la muestra a 94°C durante 1 min, 55,5°C durante 2 min y 72°C durante 2 min. Finalmente, se realizó una incubación a 72°C durante 10 min. La amplificación por PCR se confirmó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1,4% (p/v) en tampón TAE 1X (40 mM Tris-acetato, 1mM EDTA, pH 8) a 100V. La visualización se llevó a cabo por tinción con bromuro de etidio (0,5 µg/µl) (Esteve-Zarzoso *et al.*, 1999).

Los amplificadores de DNA fueron digeridos con los enzimas de restricción *CfoI*, *HaeIII* y *Hinfi* (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Alemania). Los fragmentos de restricción se separaron por electroforesis en geles de agarosa al 3% (p/v) en tampón TAE 1X a 100V, y se visualizaron por tinción con bromuro de etidio. Se empleó como marcador de peso molecular la escalera de 100 pb (Gibco BRL, Gaithersburg, Md., EEUU). Los fragmentos de amplificado y perfiles de restricción de especies de levaduras vínicas y otras relacionadas con alimentos y bebidas están actualmente disponibles “online” (<http://yeast-id.com/>) (de Llanos *et al.*, 2004; Esteve-Zarzoso *et al.*, 1999; Fernández-Espinar *et al.*, 2000; Guillamón *et al.*, 1998).

8.2. Análisis mediante restricción del DNA mitocondrial

Tras la obtención del DNA total, éste fue digerido con *Hinfi* según un protocolo descrito previamente (Querol *et al.*, 1992). La mezcla de reacción contenía 19 µl de DNA genómico, 2 µl de RNasa 500 µg/ml (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Alemania), 1,5 µl de enzima y 2,5 µl de tampón 10X. La mezcla se incubó a 37°C toda la noche. Los fragmentos de restricción del DNA mitocondrial se separaron en geles de agarosa al 1% (p/v) en tampón TAE 1X a 100 V. Posteriormente los fragmentos se visualizaron por tinción en bromuro de etidio. El tamaño de los fragmentos resultantes se calculó con el marcador de DNA del fago λ digerido con *PstI*.

9. Estudios de localización celular del péptido LfcinB₁₇₋₃₁ por microscopía

El péptido LfcinB₁₇₋₃₁ se sintetizó marcado covalentemente en su extremo N-terminal con 5-isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Figura 15; ver apartados 4.1.1 y 4.1.2) y se visualizó la interacción de FITC-LfcinB₁₇₋₃₁ con células de varias de las especies de levadura objeto de estudio, como *Z. bailii*, *Z. bisporus* y diversas cepas de *D. bruxellensis*, mediante microscopía de fluorescencia.

Para visualizar la interacción de LfcinB₁₇₋₃₁ con las distintas células de levadura, se emplearon cultivos de 16 h de cada una de ellas en medio GPY. Tras recoger las células mediante centrifugación (15 minutos, 4.000 rpm), éstas fueron resuspendidas en las matrices medio de cultivo GPY 25%, mosto o vino blanco (cosecha 2006). El tratamiento con péptidos se realizó en un volumen de 40 μ l (5×10^7 células/ml), en presencia de FITC-LfcinB₁₇₋₃₁ a las concentraciones 10, 25, 50 o 100 μ M. La fluorescencia se examinó inmediatamente después de iniciar el tratamiento, y tras 1 o 2 h, con un microscopio de epi-fluorescencia Eclipse E 90i (Nikon, Tokio, Japón) utilizando el sistema de filtros para las longitudes de onda de excitación a 450-490 nm y de emisión a 515-565 nm, necesarios para la visualización del FITC-LfcinB₁₇₋₃₁. También se obtuvieron las imágenes con contraste interferencial diferencial DIC de las muestras.

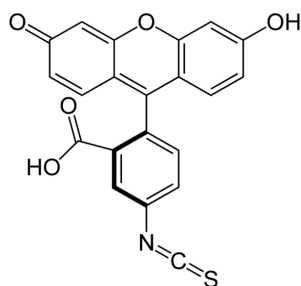


Figura 15. Estructura química del 5-isotiocianato de fluoresceína (FITC). El grupo isotiocianato (-N=C=S) permite a la molécula de fluoresceína reaccionar con grupos amino libres de proteínas.

10. Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos de los resultados correspondientes a la evaluación del efecto de los compuestos antimicrobianos sobre el crecimiento de las levaduras y bacterias lácticas, se realizaron mediante el paquete de programas StatGraphics Plus 5.1 (StatPoint, Herndon, EEUU). Mediante un análisis de varianza o ANOVA, se determinó si hubo una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de los distintos tratamientos al 95% de confianza (valor p del F-test $< 0,05$). En caso afirmativo, se determinó que medias eran estadísticamente diferentes a las restantes al 95% de confianza, según el método de la mínima diferencia significativa de Fisher (LSD) con el fin de agrupar, por similitud en sus valores de inhibición del crecimiento medios, tanto microorganismos como agentes antimicrobianos.

En los recuentos de viables obtenidos en los ensayos de actividad microbiciada de los diferentes agentes antimicrobianos se calculó la concentración celular, expresada en unidades formadoras de colonia por ml, media y la DE en cada caso.

Resultados

Capítulo 1. Caracterización de la actividad antimicrobiana de péptidos derivados de la lactoferrina bovina frente a bacterias lácticas de interés enológico

Como ya se ha comentado en la Introducción de esta memoria, la capacidad antibacteriana de los péptidos derivados de la lactoferrina bovina (bLF) está bien documentada en la bibliografía (Orsi, 2004; Tomita *et al.*, 2002; Weinberg, 2007). En la década de los 90 se identificó, a partir de un hidrolizado enzimático de bLF obtenido con pepsina, el fragmento lactoferrina B (LfcinB), que presenta mayor actividad antibacteriana que la proteína de la cual deriva (ver apartado 4.1.5 de la Introducción y la Figura 7) (Bellamy *et al.*, 1992b; Tomita *et al.*, 1991; Tomita *et al.*, 2002). Así mismo estudios posteriores identificaron en hidrolizados enzimáticos otras secuencias peptídicas diferentes de LfcinB con actividad antibacteriana (Dionysius y Milne, 1997; van der Kraan *et al.*, 2006).

La eficacia de péptidos derivados de bLF frente a bacterias lácticas de interés enológico no ha sido evaluada, motivo por el cual se consideró adecuado su estudio. Para ello se ha seleccionado LfcinB₁₇₋₃₁, un péptido de quince residuos derivado de LfcinB, que contiene su motivo mínimo antimicrobiano (Figura 7) (Haug y Svendsen, 2001; Strom *et al.*, 2002) con el objetivo de explorar su actividad antibacteriana en vinificación, en un estudio comparado con un hidrolizado de bLF obtenido con pepsina (HLF).

1. Estudio comparado del efecto de LfcinB₁₇₋₃₁ y HLF sobre el crecimiento bacteriano

En este estudio se ha evaluado el efecto tanto del HLF como del péptido sintético LfcinB₁₇₋₃₁, sobre el crecimiento *in vitro* de cuatro especies de bacterias del ácido láctico (BAL) de interés enología. Dos de ellas pertenecientes al género *Lactobacillus*, *L. brevis* y *L. hilgardii*, una tercera del género *Pediococcus*, *P. damnosus*, y la última de ellas correspondiente a una cepa comercial de *Oenococcus oeni*, empleada de forma habitual en bodega como cultivo iniciador para llevar a cabo la fermentación maloláctica.

Mediante los ensayos en placas de microtítulo se obtuvieron las curvas dosis-respuesta para HLF y LfcinB₁₇₋₃₁, que se muestran en la Figura 16. A partir de ellas se determinaron los valores de los parámetros IC₅₀ y MIC para cada binomio péptido-microorganismo, que se recogen en la Tabla 10.

Tabla 10. Propiedades antimicrobianas *in vitro* de HLF y del péptido LfcinB₁₇₋₃₁ frente a las diferentes especies de bacterias lácticas.

	HLF		LfcinB ₁₇₋₃₁	
	IC ₅₀ (mg/ml) ^a	MIC (mg/ml) ^a	IC ₅₀ (µg/ml) ^a	MIC (µg/ml) ^a
<i>L. brevis</i>	0,4	3,3	2,6	25,0
<i>L. hilgardii</i>	2,1	6,5	27,5	200,0
<i>P. damnosus</i>	0,4	3,3	2,0	6,3
<i>O. oeni</i>	2,8	26,0	>50	200,0

^a Los valores IC₅₀ y MIC fueron calculados en la fase estacionaria de crecimiento y corresponden al valor medio de tres réplicas independientes.

Los resultados muestran que todas las bacterias lácticas fueron susceptibles a concentraciones de HLF cercanas a 1 mg/ml, consiguiéndose una inhibición completa del crecimiento bacteriano con concentraciones superiores a 10 mg/ml. En el caso del péptido sintético, concentraciones en el intervalo entre 2 y 50 µg/ml provocaron una inhibición del 50% del crecimiento dependiendo de la bacteria, mientras que se observó una inhibición completa del mismo por encima de 200 µg/ml, concentración 50 veces inferior a la correspondiente al HLF. Por tanto, el péptido sintético LfcinB₁₇₋₃₁ resultó poseer una mayor potencia relativa de acción antibacteriana que HLF.

Cuando se comparó la sensibilidad de las diferentes bacterias lácticas a ambos antimicrobianos, las más susceptibles fueron *L. brevis* y *P. damnosus*, seguidas de *L. hilgardii* que mostró una sensibilidad intermedia y *O. oeni*, que destacó por ser la cepa más resistente a la

acción tanto del hidrolizado como de LfcinB₁₇₋₃₁. De estos resultados se concluye que la sensibilidad relativa a ambos compuestos de cada una de las bacterias lácticas es similar.

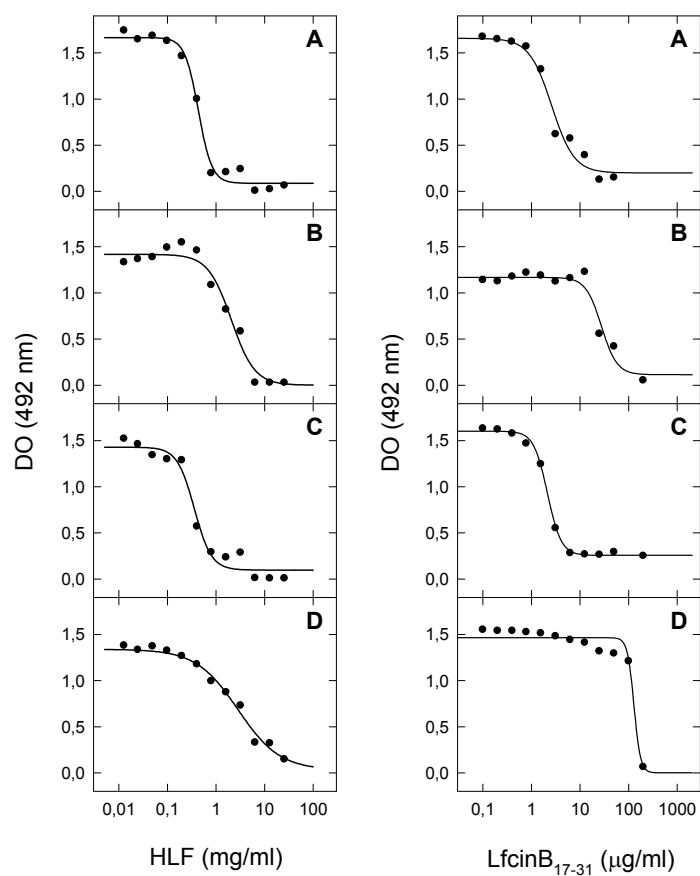


Figura 16. Actividad inhibitoria del HLF (panel izquierdo) y del péptido LfcinB₁₇₋₃₁ (panel derecho) sobre el crecimiento *in vitro* de *L. brevis* (panel A), *L. hilgardii* (B), *P. damnosus* (C) y *O. oeni* (D). Se incubaron 10⁷ ufc/ml de cada bacteria en 25% MRS en presencia de concentraciones crecientes tanto de HLF como del péptido sintético. Las muestras se prepararon por triplicado y los datos muestran los valores medios de DO tras 30 h de incubación, siendo la DE inferior al 10% del valor medio en todos los casos.

El análisis, por cromatografía de fase inversa (RP-HPLC), de HLF mostró un perfil peptídico muy complejo (datos no mostrados), en el que podrían coexistir distintas fracciones peptídicas inactivas y péptidos activos, los cuales tendrán una concentración relativa menor que LfcinB₁₇₋₃₁, hecho que podría explicar los resultados obtenidos. Además, varios estudios previos han descrito otras secuencias peptídicas de diversas zonas de la lactoferrina, con actividad antibacteriana (Dionysius y Milne, 1997; van der Kraan *et al.*, 2006), que podrían ser los responsables de una parte de la inhibición del crecimiento observada. Todos ellos se caracterizan, al igual que LfcinB₁₇₋₃₁, por ser péptidos de reducido tamaño, con carga neta positiva y alto contenido de aminoácidos hidrofóbicos.

2. Evaluación de la actividad bactericida de LfcinB₁₇₋₃₁

Debido a la mayor potencia de acción antibacteriana de LfcinB₁₇₋₃₁, se decidió profundizar en su caracterización tanto en medio de cultivo microbiológico como en mosto, con el objetivo de determinar si su actividad era bactericida (muerte celular irreversible) o bacteriostática (inhibición del crecimiento).

En estos estudios se incluyó el mosto con el fin de evaluar el efecto sobre la actividad bactericida del medio en el que interactúan las bacterias con LfcinB₁₇₋₃₁, y también porque el desarrollo de las BAL puede ocurrir en cualquiera de las etapas del proceso de vinificación. Para llevar a cabo estos experimentos se prepararon diluciones de un cultivo de cada BAL, tanto en medio de cultivo MRS como en mosto, y se incubaron en ausencia y presencia de concentraciones crecientes del péptido. Tras 24 h de incubación se prepararon diluciones seriadas al décimo y de cada muestra se depositó una gota en placas de medio sólido MRS sin péptido, para evaluar el crecimiento bacteriano (Figura 17).

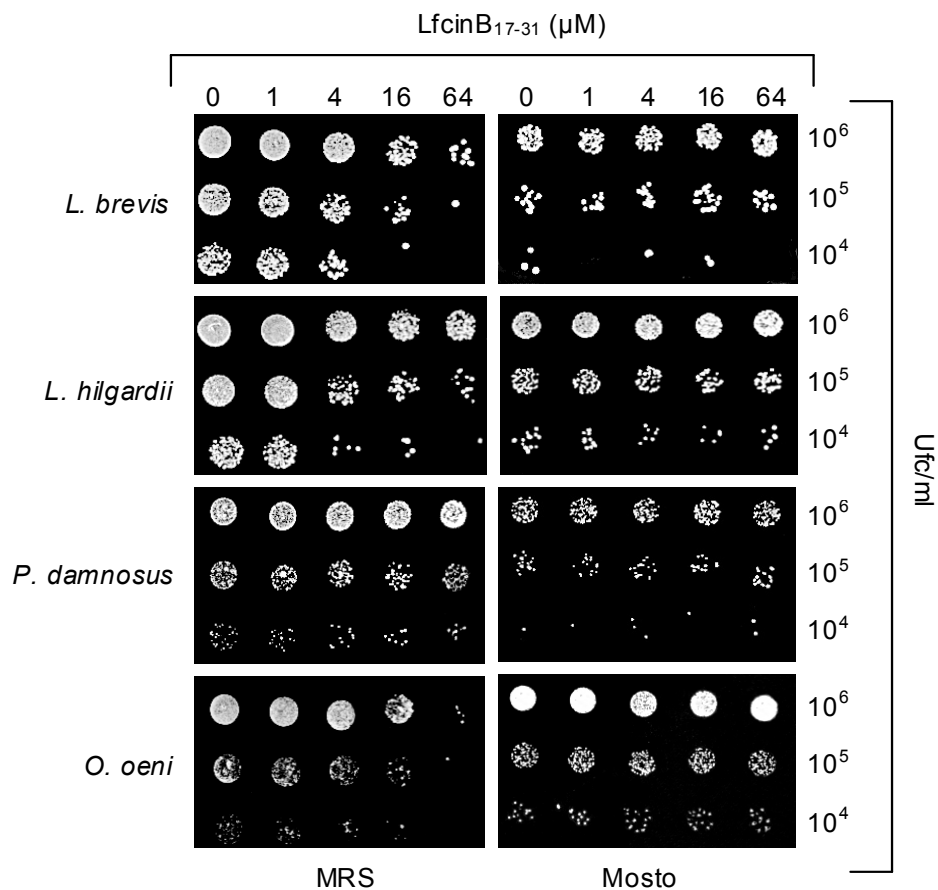


Figura 17. Valoración de la actividad bactericida de LfcinB₁₇₋₃₁ sobre diferentes especies de bacterias lácticas. Muestras de células de *L. brevis*, *L. hilgardii*, *P. damnosus* y *O. oeni*, tratadas con el péptido LfcinB₁₇₋₃₁, a las concentraciones indicadas, en medio MRS o mosto blanco, se aplicaron como gotas de 2,5 μl sobre placas de medio de cultivo sólido libre de péptido, tras 24 h de incubación.

Los paneles de la parte izquierda, incluidos en la Figura 17, muestran que en medio MRS, la presencia de LfcinB₁₇₋₃₁ afectó al crecimiento de *L. brevis*, *L. hilgardii* y *O. oeni*. En el caso de *L. brevis*, se observó actividad bactericida a la dosis de inóculo más baja evaluada, en

presencia de LfcinB₁₇₋₃₁ en el intervalo de concentraciones 16-64 µM. A concentraciones de inóculo más elevadas se detectó también una reducción de células viables. *L. hilgardii* mostró un comportamiento similar, observándose reducción en la viabilidad celular en presencia del péptido en un intervalo de concentraciones más amplio, 4-64 µM. Por su parte, *O. oeni* resultó ser más resistente que las anteriores, ya que a las dosis de inóculo más bajas (10^4 - 10^5 ufc/ml) sólo se observó actividad bactericida en presencia de una concentración de péptido 64 µM, además de una reducción en la viabilidad a elevadas concentraciones de inóculo. Sin embargo, la viabilidad de *P. damnosus*, que se mostró como la bacteria láctica más sensible al péptido LfcinB₁₇₋₃₁ al crecer en medio MRS (Tabla 10 y Figura 16), no se vio afectada a ninguna de las concentraciones de péptido evaluadas (Figura 17). Estos resultados indican que la actividad antibacteriana del péptido LfcinB₁₇₋₃₁ sobre *P. damnosus*, observada en medio de cultivo MRS, es únicamente bacteriostática, mientras que para el resto de bacterias lácticas, en estas mismas condiciones es, al menos en parte, bactericida.

Por otra parte, los paneles de la parte derecha de esta misma Figura 17, muestran cómo ninguna de las concentraciones de LfcinB₁₇₋₃₁ evaluadas afectó, significativamente, a la viabilidad celular de las cuatro BAL objeto de estudio, en mosto de uva.

Los resultados obtenidos demuestran un diferente modo de acción antibacteriano del péptido sintético LfcinB₁₇₋₃₁ frente a *L. brevis*, *L. hilgardii*, *O. oeni*, por un lado, y *P. damnosus*, por otro, dependiendo además del medio de incubación en el que se produzca la interacción péptido-microorganismo. Debido a estos resultados se consideró adecuado evaluar el efecto del péptido sobre las BAL durante la fermentación alcohólica de un mosto de uva, proceso en el cual la composición del medio sufre variaciones sustanciales.

3. Efecto antibacteriano de LfcinB₁₇₋₃₁ durante el proceso de fermentación alcohólica

Para evaluar el efecto antibacteriano de LfcinB₁₇₋₃₁ durante el proceso de la fermentación alcohólica, se diseñaron una serie de microvinificaciones, en las que se inoculó el mosto con cada una de las BAL objeto de estudio y, tras su aclimatación al medio, se inició el proceso de fermentación alcohólica por inoculación de la cepa comercial *S. cerevisiae* T73. Estas microvinificaciones se llevaron a cabo tanto en ausencia como en presencia de LfcinB₁₇₋₃₁.

Estos experimentos permiten estudiar la especificidad de la acción antimicrobiana del péptido, ya que coexisten dos tipos de microorganismos, y las consecuencias que su presencia puede ocasionar tanto en la fermentación alcohólica como en la maloláctica.

En primer lugar se evaluó el efecto del péptido LfcinB₁₇₋₃₁ en el desarrollo de la fermentación alcohólica, para lo que se llevaron a cabo microvinificaciones con *S. cerevisiae* en ausencia y presencia del péptido. La Figura 18 muestra la viabilidad celular de la levadura así como el consumo de azúcares, indicativos de la cinética de la fermentación.

Los resultados mostrados en dicha Figura 18 indican que la presencia del péptido sintético LfcinB₁₇₋₃₁ en el proceso de fermentación alcohólica no afectó significativamente ninguno de los dos parámetros evaluados, demostrando, por tanto, la ausencia de actividad antimicrobiana de este péptido frente a la cepa *S. cerevisiae*, que consumió los azúcares presentes en el mosto tras 9 días de fermentación. Dada la ausencia de actividad de LfcinB₁₇₋₃₁ sobre *S. cerevisiae*, se iniciaron los ensayos para evaluar su efecto sobre las BAL (*L. brevis*, *L. hilgardii*, *P. damnosus* y *O. oeni*) a lo largo del proceso de fermentación alcohólica.

La Figura 19 recoge los resultados correspondientes a la viabilidad celular, tanto de *S. cerevisiae* como de las diferentes bacterias lácticas, en el transcurso de cada una de las microfermentaciones.

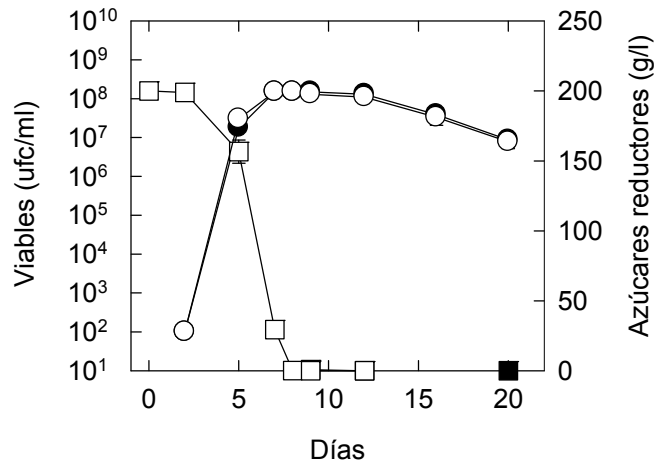


Figura 18. Evaluación del efecto de LfcinB₁₇₋₃₁ sobre la viabilidad celular de *S. cerevisiae* (círculos) y el consumo de azúcares reductores (cuadrados) durante la fermentación alcohólica, en ausencia (marcadores negros) o presencia (marcadores blancos) de LfcinB₁₇₋₃₁ a una concentración 100 μ M.

En primer lugar, como se puede observar en dicha Figura, en los cuatro casos, el incremento de la biomasa de *S. cerevisiae* tuvo lugar durante los 10 primeros días de la fermentación, sin observarse diferencias significativas en la cinética de fermentación en presencia o ausencia de LfcinB₁₇₋₃₁, resultados consistentes con los ya observados en el experimento anterior (Figura 18).

Durante el proceso fermentativo, la viabilidad celular de cada una de las BAL, en ausencia del péptido, fue diferente, como muestra también la Figura 19. Únicamente *L. hilgardii* y *O. oeni* mostraron un ligero incremento de la población, y tan sólo durante los 5 primeros días del experimento, mientras que en el caso de *L. brevis* y *P. damnosus* se observó un descenso de la misma desde el inicio del proceso fermentativo. Este comportamiento es habitual en mostos naturales, donde la población bacteriana aumenta hasta alcanzar un máximo de 10⁴ ufc/ml cuando la concentración de etanol es del 5-6% (v/v), momento en el que empieza a

descender hasta situarse en 10^2 ufc/ml al final de la fermentación alcohólica, siendo entonces *O. oeni* la especie predominante (Lonvaud-Funel, 1999). Además se ha descrito que el crecimiento de *S. cerevisiae* en mosto puede tener un efecto antagónico sobre las BAL, lo que se ha asociado a la producción de compuestos de origen proteico por parte de la levadura (Osborne y Edwards, 2007).

Por lo que se refiere al efecto del péptido sobre el crecimiento de cada una de las BAL, los resultados obtenidos fueron diferentes para cada una de ellas (Figura 19) y, a su vez, y de forma muy significativa, distintos de los observados en los ensayos en medio de cultivo microbiológico. En el caso de *L. hilgardii*, a pesar de la sensibilidad intermedia mostrada en medio MRS al péptido LfcinB₁₇₋₃₁ (Figura 16 y Figura 17), no se observó un efecto significativo sobre su viabilidad celular por la presencia del agente antimicrobiano a lo largo de la fermentación alcohólica (Figura 19B). En lo que respecta a la cepa de *P. damnosus*, su viabilidad resultó ser baja durante todo el experimento, observándose mayor velocidad en el descenso de viables en presencia de LfcinB₁₇₋₃₁, hasta alcanzar valores inferiores al límite de detección de la técnica empleada (Figura 19C). Una situación similar ocurrió con *L. brevis*, aunque en este caso el descenso de la viabilidad en las muestras control no fue tan acusado, manteniéndose en valores de 10^4 ufc/ml, que se vieron reducidos en más de dos unidades logarítmicas en presencia de LfcinB₁₇₋₃₁ (Figura 19A). Por su parte, *O. oeni*, cepa resistente a la acción antimicrobiana de LfcinB₁₇₋₃₁ en medio de cultivo microbiológico (Tabla 10 y Figura 16), fue, comparativamente, la más sensible durante el proceso de fermentación alcohólica. Como se muestra en la Figura 19D, a pesar de que las muestras control mantuvieron una elevada viabilidad a lo largo del proceso fermentativo, la presencia del péptido ocasionó un descenso en el recuento de viables de aproximadamente cuatro órdenes de magnitud, respecto a dichas muestras control.

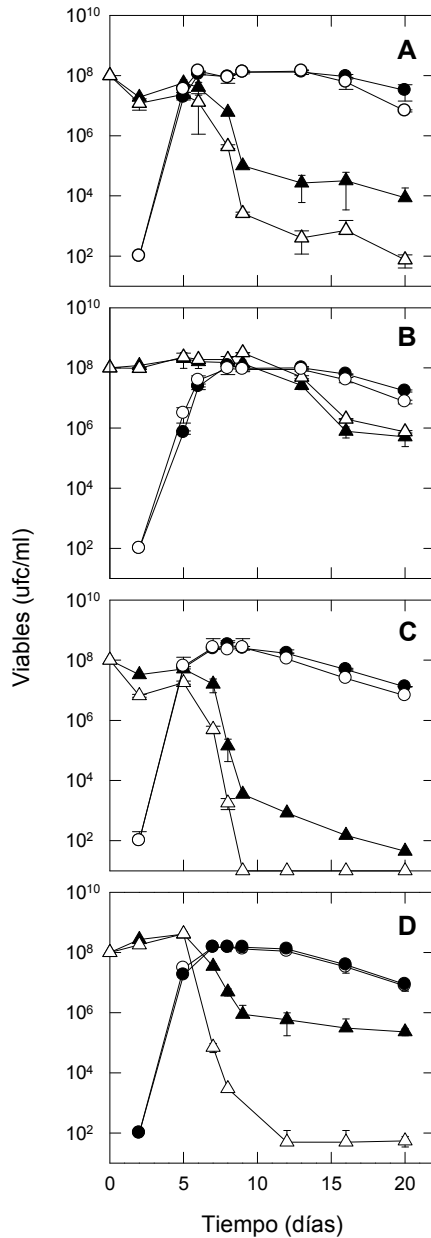


Figura 19. Evaluación del efecto de LfcinB₁₇₋₃₁ sobre la viabilidad microbiana durante la fermentación alcohólica. Se inoculó mosto de uva blanca con la cepa *S. cerevisiae* junto a *L. brevis* (A), *L. hilgardii* (B), *P. damnosus* (C) u *O. oeni* (D), en ausencia (símbolos negros) y presencia (símbolos blancos) de LfcinB₁₇₋₃₁ (100 µM). El eje izquierdo muestra la viabilidad de *S. cerevisiae* (círculos) y de cada una de las bacterias lácticas (triángulos) en el transcurso del proceso fermentativo.

El descenso observado en la viabilidad celular de *P. damnosus*, *L. brevis* y *O. oeni* en mosto en fermentación es poco probable que se deba a un efecto bactericida, dado que LfcinB₁₇₋₃₁ no posee dicho efecto en

mosto, como se demuestra en la Figura 17. Los resultados en su conjunto indican pues que en el caso de estas tres bacterias lácticas, el efecto del péptido sería, principalmente, bacteriostático.

Los parámetros enológicos de los vinos obtenidos con *S. cerevisiae* y las BAL se recogen en la Tabla 11, junto a los correspondientes a las fermentaciones llevadas a cabo sólo con *S. cerevisiae*. En todos los casos, la concentración de azúcares reductores en los vinos resultó ser inferior a 1 g/l. Como se puede observar en la tabla, la presencia de una concentración 100 μ M de LfcinB₁₇₋₃₁ en el proceso fermentativo no ocasionó diferencias significativas en los valores determinados de pH, etanol, acetaldehído, glicerol, y ácidos acético y málico, con respecto a los controles en los que únicamente estaba presente *S. cerevisiae*.

En nuestras condiciones experimentales, la presencia de BAL en las distintas fermentaciones en ausencia de péptido afectó, principalmente, a las concentraciones de ácido acético y málico, que fueron superiores e inferiores respectivamente a las determinadas en los vinos fermentados con *S. cerevisiae*. También se incrementó ligeramente el pH en los vinos producidos en presencia de *L. brevis* y *O. oeni*. En este segundo caso se observó además un aumento en la concentración de acetaldehído. Por su parte, *L. hilgardii* produjo la mayor cantidad de ácido acético, mientras que las cuatro bacterias lácticas consumieron prácticamente en su totalidad el ácido málico presente en el mosto. De acuerdo con los datos de viabilidad celular fue *P. damnosus* la bacteria con menor consumo de ácido málico.

La presencia de LfcinB₁₇₋₃₁, y de acuerdo con su efecto antibacteriano, afectó fundamentalmente a las fermentaciones inoculadas con *O. oeni*, en las cuales la concentración de ácido acético descendió mientras que la de ácido málico aumentó, con respecto al control en ausencia de péptido. Estos resultados confirman el efecto antibacteriano de LfcinB₁₇₋₃₁ sobre el crecimiento de *O. oeni* a lo largo de la fermentación alcohólica.

Tabla 11. Efecto de diferentes especies de bacterias lácticas y de la presencia del péptido sintético LfcinB₁₇₋₃₁ sobre el pH y los productos de fermentación del vino^b.

	<i>L. hilgardii</i>		<i>L. brevis</i>		<i>P. damnosus</i>		<i>O. oeni</i>	
	Control	LfcinB ₁₇₋₃₁ ^a	Control	LfcinB ₁₇₋₃₁ ^a	Control	LfcinB ₁₇₋₃₁ ^a	Control	LfcinB ₁₇₋₃₁ ^a
pH	3,4 ± 0,01	3,2 ± 0,01	3,2 ± 0,01	3,4 ± 0,01	3,4 ± 0,01	3,4 ± 0,01	3,4 ± 0,01	3,4 ± 0,01
Etanol (% v/v)	9,1 ± 0,6	9,7 ± 0,3	8,1 ± 0,4	8,2 ± 0,4	9,1 ± 0,1	8,8 ± 0,3	9,4 ± 0,1	9,0 ± 0,5
Acetaldehído (mg/l)	20,2 ± 1,3	14,9 ± 1,1	20,2 ± 2,1	20,4 ± 1,1	21,3 ± 1,2	14,8 ± 2,3	25,4 ± 7,5	27,0 ± 3,9
Ácido acético (g/l)	0,2 ± 0,02	0,2 ± 0,02	2,9 ± 0,1	2,8 ± 0,08	0,9 ± 0,02	0,8 ± 0,01	0,2 ± 0,03	0,7 ± 0,1
Glicerol (g/l)	7,6 ± 0,3	7,5 ± 0,3	8,0 ± 0,1	8,0 ± 0,1	6,7 ± 0,6	6,0 ± 0,2	7,0 ± 0,2	6,4 ± 0,1
Ácido L-Málico (g/l)	1,9 ± 0,01	1,9 ± 0,1	n.d. ^c	n.d.	0,1 ± 0,02	0,1 ± 0,0	0,5 ± 0,01	0,1 ± 0,04

^aLa concentración de péptido empleada fue 100 µM.

^bLos resultados están expresados como el valor medio ± DE de dos réplicas independientes de cada tratamiento.

^cn.d.: No detectado (por debajo del límite de detección de la técnica analítica).

Capítulo 2. Péptidos antimicrobianos frente a levaduras alterantes de vino

Como ya se ha comentado a lo largo de este trabajo, la capacidad antibacteriana de la lactoferrina (LF) y sus péptidos derivados ha sido ampliamente estudiada, mientras que su potencial antifúngico está, relativamente, menos documentado. Actualmente las levaduras juegan un papel predominante en las contaminaciones que se producen durante el proceso de vinificación, por lo que en este capítulo hemos caracterizado la actividad antifúngica de dos péptidos derivados del motivo antimicrobiano LfcinB, así como de una serie de péptidos de secuencia relacionada con este motivo, frente a levaduras alterantes de vino. También se ha evaluado su potencial aplicación en bodega, estudio en el cual se ha incluido un hidrolizado de LF bovina (HLF) obtenido con pepsina.

1. Sensibilidad de las levaduras alterantes frente a los péptidos antimicrobianos: selección de los péptidos más potentes

En este trabajo se han explorado las actividades antimicrobianas de dos péptidos representativos derivados de LfcinB, por un lado el núcleo antimicrobiano de seis residuos LfcinB₂₀₋₂₅, y por otro el péptido de 15 residuos LfcinB₁₇₋₃₁, cuya actividad antibacteriana frente a bacterias lácticas hemos caracterizado en el capítulo anterior de esta tesis. Dada la similitud de secuencia de LfcinB₂₀₋₂₅ con el grupo de hexapéptidos denominados PAF (López-García *et al.*, 2000), se han evaluado en paralelo ocho péptidos, sintetizados con D-aminoácidos, pertenecientes a este grupo (Tabla 12). Dichos péptidos se caracterizan por compartir los residuos de aminoácidos fenilalanina (F) y triptófano (W) en el extremo C-terminal y los residuos arginina (R) y lisina (K) en el N-terminal, además de contener dos residuos de triptófano cada uno de ellos. Como control negativo, se incluyó también en el estudio el péptido P20, debido a que, a pesar de su similitud de secuencia con el resto de péptidos empleados no muestra actividad antimicrobiana, lo que ha sido relacionado con la presencia de un único residuo de W (López-García *et al.*, 2002).

Tabla 12. Secuencias de los péptidos ensayados en este bloque.

Péptido	Secuencia ^a
P20	Ac-rktpfw-NH ₂
PAF25	Ac-rkfwfw-NH ₂
PAF26	Ac-rkkwfw-NH ₂
PAF26L	Ac-RKKWFW-NH ₂
PAF29	Ac-rkrwfw-NH ₂
PAF31	Ac-rkwffw-NH ₂
PAF32	Ac-rkwhfw-NH ₂
PAF33	Ac-rkwkfw-NH ₂
PAF34	Ac-rkwlfw-NH ₂
PAF36	Ac-rkwrwfw-NH ₂
PAF36L	Ac-RKWRFW-NH ₂
LfcinB ₂₀₋₂₅	Ac-RRWQWR-NH ₂
LfcinB ₁₇₋₃₁	Ac-FKCRRWQWRMKKLGA-NH ₂

^aEl código de colores que se utiliza en los distintos residuos es el descrito en la Tabla 9.

En primer lugar se evaluó el efecto de los péptidos, a tres concentraciones diferentes (3,2, 16 y 80 μ M), sobre el crecimiento en medio de cultivo microbiológico GPY, de las seis especies de levadura en estudio (*C. albidus*, *D. bruxellensis* F11, *P. membranifaciens*, *Z. bailii* y *Z. bisporus*, y la cepa vínica comercial *S. cerevisiae* T73). La concentración más alta evaluada proporcionó poca información (datos no mostrados), ya que todos los péptidos ensayados (excepto P20) mostraron porcentajes de inhibición del crecimiento próximos al 100%. Por otra parte, los resultados obtenidos empleando la concentración más pequeña de péptido (Tabla 13) indicaron ausencia de actividad frente a *C. albidus* y *Z. bisporus*, una leve actividad antimicrobiana frente a *D. bruxellensis* y *S. cerevisiae* y moderada frente a *P. membranifaciens*.

Tabla 13. Efecto de los D-hexapéptidos y los péptidos derivados de LfcinB, a una concentración de 3,2 µM, sobre el crecimiento, en medio GPY, de las levaduras alterantes de vino.

Péptido	Inhibición del crecimiento (%) ^a						
	<i>C. albidus</i>	<i>D. bruxellensis</i>	<i>P. membranifaciens</i>	<i>Z. bailii</i>	<i>Z. bisporus</i>	<i>S. cerevisiae</i>	
Control	0,0 ± 9,5 (NS)	0,0 ± 2,4 (a)	0,0 ± 12,5 (a)	0,0 ± 27,8 (a)	0,0 ± 1,3 (a)	0,0 ± 11,8 (a)	
P20	0,0 ± 2,1 (NS, AB)	3,6 ± 0,5 (cde, AB)	0,0 ± 3,7 (a, A)	31,1 ± 17,8 (bcd, C)	2,3 ± 0,6 (cd, AB)	11,8 ± 18,9 (a, B)	
PAF25	0,0 ± 0,4 (NS, A)	5,0 ± 0,6 (cdefg, AB)	26,3 ± 24,9 (cd, BC)	52,3 ± 11,3 (cde, C)	1,1 ± 0,8 (abcd, AB)	2,0 ± 26,6 (a, AB)	
PAF26	0,0 ± 4,8 (NS, -)	7,5 ± 0,8 (g, B)	9,1 ± 8,1 (abcd, B)	67,9 ± 8,3 (ef, C)	0,0 ± 0,7 (ab, AB)	0,0 ± 16,7 (-, -)	
PAF29	0,0 ± 13,5 (NS, A)	6,4 ± 0,4 (efg, A)	11,2 ± 18,4 (abcd, A)	56,7 ± 17,6 (def, B)	0,0 ± 0,8 (a, A)	7,2 ± 8,2 (a, A)	
PAF31	0,0 ± 12,5 (NS, A)	3,0 ± 0,7 (bcd, AB)	6,9 ± 18,6 (abc, B)	50,4 ± 14,0 (bcde, C)	0,6 ± 1,0 (abc, AB)	0,0 ± 11,0 (-, AB)	
PAF32	0,0 ± 11,1 (NS, A)	5,7 ± 0,4 (defg, A)	0,5 ± 14,3 (ab, A)	70,6 ± 4,8 (ef, B)	0,2 ± 0,2 (ab, A)	0,0 ± 28,9 (-, A)	
PAF33	0,0 ± 8,4 (NS, -)	6,8 ± 1,0 (fg, A)	19,5 ± 11,9 (bcd, B)	79,9 ± 1,7 (ef, C)	0,0 ± 0,2 (a, A)	9,4 ± 7,9 (a, AB)	
PAF34	0,0 ± 8,3 (NS, -)	0,7 ± 0,6 (ab, A)	15,8 ± 8,1 (bcd, B)	0,0 ± 4,3 (a, -)	0,0 ± 0,4 (a, A)	5,6 ± 7,2 (a, AB)	
PAF36	0,0 ± 3,9 (NS, AB)	13,0 ± 0,9 (h, C)	29,3 ± 10,9 (d, D)	92,0 ± 4,4 (f, E)	2,5 ± 0,4 (d, B)	0,0 ± 6,4 (-, A)	
LfcinB ₁₇₋₃₁	0,0 ± 3,9 (NS, A)	4,0 ± 0,8 (cdef, BC)	1,7 ± 0,5 (ab, B)	18,6 ± 15,6 (abc, C)	1,5 ± 0,7 (bcd, B)	0,0 ± 14,4 (-, AB)	
LfcinB ₂₀₋₂₅	0,0 ± 9,6 (NS, A)	2,5 ± 0,4 (bc, AB)	18,6 ± 12,8 (bcd, B)	16,2 ± 22,1 (ab, B)	0,7 ± 0,2 (abc, AB)	12,7 ± 17,1 (a, B)	

^aLos datos están expresados como porcentaje de inhibición del crecimiento con respecto al control sin péptido y corresponden al valor de la media ± DE de tres réplicas independientes. El análisis estadístico por columnas se muestra en letras minúsculas, y por filas en mayúsculas. Los datos que poseen las mismas letras no difieren con un 95% de nivel de confianza (método LSD). NS: Diferencias no significativas con respecto al control. (-) Datos no incluidos en el análisis estadístico.

La mayoría de los péptidos mostraron una elevada capacidad de inhibición del crecimiento *in vitro* de *Z. bailii*. Al incrementar la concentración de péptido a 16 μM , los resultados obtenidos, que se comentan a continuación, aportaron mayor información sobre el patrón de actividad antimicrobiana (Tabla 14).

De acuerdo con los datos obtenidos a la concentración de 3,2 μM (Tabla 13), *Z. bailii* resultó ser la levadura más sensible a la acción antimicrobiana de los péptidos. Por lo que respecta a los nueve hexapéptidos, todos ellos, excepto P20, mostraron unos porcentajes de inhibición del crecimiento de *Z. bisporus* entre un 65 y un 95%. En el caso de *C. albidus*, únicamente PAF25 y PAF36 resultaron activos, con porcentajes de inhibición del crecimiento de un 75 y un 95%, respectivamente. El efecto sobre el crecimiento de *D. bruxellensis* y *P. membranifaciens* presentó mayor variabilidad dependiendo del péptido evaluado (desde un 7 a un 88% y desde un 0 a un 100% de inhibición del crecimiento, respectivamente). Por último, es de destacar que ningún péptido inhibió el crecimiento de *S. cerevisiae* por encima del 50%.

De los péptidos evaluados, PAF26 y PAF36 destacaron por su potente actividad antimicrobiana. PAF26 tiene los residuos de aminoácidos K y W en las posiciones 3 y 4 respectivamente, mientras que PAF36 contiene W y R en dichas posiciones (ver Tabla 12). El péptido PAF36 comparte el residuo W en la posición 3 con PAF31-34, sin embargo dichos péptidos fueron menos efectivos a la concentración 3,2 μM . A la concentración 16 μM , los péptidos PAF31 y PAF33 mostraron una efectividad similar a la correspondiente a PAF36 frente a *P. membranifaciens*, observándose el mismo comportamiento en el caso de PAF31 frente a *Z. bailii*. Estos resultados indican la importancia del residuo de aminoácido R, situado en posición 4, en las secuencias de los péptidos empleados en este trabajo, que les confiere mayor actividad antimicrobiana, además de ampliar su espectro de acción.

Tabla 14. Efecto de los D-hexapéptidos y los péptidos derivados de LfcinB, a una concentración de 16 μ M, sobre el crecimiento, en medio GPY, de las levaduras alterantes de vino.

Péptido	Inhibición del crecimiento (%) ^a						
	<i>C. albicus</i>	<i>D. bruxellensis</i>	<i>P. membranifaciens</i>	<i>Z. bailii</i>	<i>Z. bisporus</i>	<i>S. cerevisiae</i>	
Control	0,0 \pm 9,5 (a)	0,0 \pm 2,4 (a)	0,0 \pm 12,5 (a)	0,0 \pm 27,8 (a)	0,0 \pm 1,3 (a)	0,0 \pm 11,8 (ab)	
P20	0,0 \pm 5,9 (-, AB)	7,0 \pm 0,9 (b, B)	0,0 \pm 6,0 (a, AB)	47,5 \pm 13,8 (b, C)	3,2 \pm 0,5 (a, B)	0,0 \pm 13,9 (-, A)	
PAF25	75,2 \pm 14,8 (b, B)	29,7 \pm 4,4 (d, A)	99,9 \pm 0,2 (e, C)	85,8 \pm 2,3 (c, BC)	85,7 \pm 2,0 (d, BC)	14,7 \pm 17,6 (bcd, A)	
PAF26	0,0 \pm 28,2 (-, A)	65,7 \pm 3,4 (g, B)	97,1 \pm 0,0 (e, B)	78,2 \pm 1,4 (bc, B)	80,2 \pm 1,7 (cd, B)	12,1 \pm 26,6 (bcd, A)	
PAF29	0,0 \pm 25,5 (-, A)	60,7 \pm 2,8 (f, C)	23,4 \pm 17,4 (bc, AB)	79,5 \pm 2,7 (bc, C)	79,3 \pm 0,6 (c, C)	26,1 \pm 1,6 (cd, B)	
PAF31	0,0 \pm 7,5 (-, A)	58,1 \pm 5,7 (f, C)	87,4 \pm 11,1 (e, D)	87,7 \pm 7,4 (c, D)	78,5 \pm 3,0 (c, D)	24,7 \pm 17,5 (cd, B)	
PAF32	0,0 \pm 6,4 (-, A)	52,4 \pm 1,6 (e, C)	54,4 \pm 13,8 (d, C)	72,4 \pm 4,3 (bc, C)	76,0 \pm 2,6 (c, C)	15,4 \pm 42,6 (bcd, B)	
PAF33	5,3 \pm 25,0 (a, A)	52,5 \pm 2,1 (e, B)	81,7 \pm 18,8 (e, C)	63,7 \pm 2,4 (bc, BC)	75,7 \pm 0,6 (c, C)	6,3 \pm 10,4 (abc, A)	
PAF34	0,0 \pm 3,4 (-, -)	17,5 \pm 1,6 (c, A)	47,5 \pm 20,6 (d, B)	70,7 \pm 3,5 (bc, C)	75,6 \pm 0,8 (c, C)	6,4 \pm 8,3 (abc, A)	
PAF36	94,7 \pm 0,3 (b, B)	88,0 \pm 3,6 (i, B)	100,0 \pm 0,3 (e, B)	94,3 \pm 2,9 (c, B)	94,5 \pm 3,8 (e, B)	35,8 \pm 18,9 (d, A)	
LfcinB ₁₇₋₃₁	0,0 \pm 3,4 (-, -)	71,7 \pm 1,8 (h, B)	3,3 \pm 2,3 (ab, A)	70,3 \pm 3,9 (bc, B)	64,5 \pm 15,7 (b, B)	10,6 \pm 5,8 (abc, A)	
LfcinB ₂₀₋₂₅	0,0 \pm 4,2 (-, -)	14,6 \pm 0,8 (c, C)	23,3 \pm 4,7 (c, D)	81,7 \pm 2,2 (bc, E)	2,0 \pm 0,3 (a, A)	8,3 \pm 3,0 (abc, B)	

^aLos datos están expresados como porcentaje de inhibición del crecimiento con respecto al control sin péptido y corresponden al valor de la media \pm DE de tres réplicas independientes. El análisis estadístico por columnas se muestra en letras minúsculas, y por filas en mayúsculas. Los datos que poseen las mismas letras no difieren con un 95% de nivel de confianza (método LSD). (-) Datos no incluidos en el análisis estadístico.

PAF26 comparte el residuo de W en posición 4 con PAF25 y PAF29 (Tabla 12), y los tres mostraron una capacidad de inhibición del crecimiento *in vitro* similar frente a las cepas del género *Zygosaccharomyces* y *S. cerevisiae*. En el caso de *Z. bailii* y *Z. bisporus* alcanzaron porcentajes de inhibición próximos al 80%, mientras que no superaron el 25% de inhibición, en ningún caso, frente a *S. cerevisiae*. Sin embargo, el perfil de actividad de cada uno de ellos resultó ser significativamente diferente en el caso de las tres levaduras restantes. *C. albidus* únicamente vio afectado su crecimiento por PAF25, con un 75% de inhibición, mientras que en el caso de *D. bruxellensis* los péptidos que resultaron más activos fueron PAF26 y 29, con un porcentaje de inhibición medio del 62%. Por último, únicamente PAF25 y 26 mostraron elevados porcentajes de inhibición del crecimiento en el caso de *P. membranifaciens* (Tabla 14).

Los resultados obtenidos también mostraron claramente los efectos de la posición de determinadas sustituciones de aminoácidos. Los péptidos PAF25 y PAF31, así como PAF29 y PAF36, presentan permutaciones de los residuos de aminoácidos en las posiciones 3 y 4 (Tabla 12), que determinan y afectan su perfil de actividad antimicrobiana (Tabla 14).

Por lo que respecta a los péptidos derivados de LfcinB, apenas se observó efecto sobre el crecimiento *in vitro* de las distintas levaduras a la concentración más baja evaluada (3,2 μM , ver Tabla 13). A la concentración de 16 μM (Tabla 14), la actividad antimicrobiana de ambos péptidos resultó ser dependiente del microorganismo diana. El comportamiento de LfcinB₂₀₋₂₅ y LfcinB₁₇₋₃₁ fue similar frente a *C. albidus*, *S. cerevisiae* y *Z. bailii*. No se observó ningún efecto sobre el crecimiento *in vitro* de *C. albidus*, la inhibición del crecimiento de *S. cerevisiae* fue leve, mientras que ambos péptidos mostraron porcentajes de inhibición del crecimiento superiores al 70% en el caso de *Z. bailii*. Por otro lado, el comportamiento de dichos péptidos resultó ser significativamente diferente frente a *D. bruxellensis*, *P. membranifaciens* y *Z. bisporus*. El péptido LfcinB₁₇₋₃₁ mostró una actividad inhibidora del crecimiento *in vitro* superior

al 50% en el caso de *D. bruxellensis* y *Z. bisporus*, mientras que LfcinB₂₀₋₂₅ únicamente fue capaz de superar dicho 50% en el caso de *Z. bailii*. Sin embargo, el péptido de seis residuos de aminoácidos resultó ser el más efectivo frente a *P. membranifaciens*.

En base a estos resultados, donde se observa que los péptidos muestran perfiles de actividad diferentes frente a las levaduras alterantes, se seleccionaron PAF26, PAF36 y LfcinB₁₇₋₃₁ para completar su caracterización.

2. Caracterización de la actividad antimicrobiana de los péptidos seleccionados

2.1. Determinación de IC₅₀ y MIC

Se llevó a cabo un estudio más detallado sobre la actividad antifúngica de los péptidos PAF26, PAF36 y LfcinB₁₇₋₃₁, frente a *D. bruxellensis*, *Z. bailii* y *Z. bisporus*, dada su mayor sensibilidad. A pesar de su mayor resistencia a los agentes antimicrobianos empleados, también se incluyó en el estudio *S. cerevisiae* como un control adicional. Además, teniendo en cuenta las posibles aplicaciones biotecnológicas de estos péptidos y para una mejor comparación con el derivado de LfcinB, se incluyeron en el estudio los correspondientes isómeros ópticos, PAF26L y PAF36L, sintetizados con L-aminoácidos.

La Figura 20 muestra las curvas dosis-respuesta de los péptidos PAF26 y 36, sintetizados tanto con D- como con L-aminoácidos, y LfcinB₁₇₋₃₁, sobre el crecimiento *in vitro* de las cuatro levaduras. Los valores obtenidos de IC₅₀ y MIC para cada binomio péptido/microorganismo se recogen en la Tabla 15. Los resultados confirman la mayor potencia de los péptidos frente a *Z. bailii*, con valores de IC₅₀ y MIC inferiores a los correspondientes a *D. bruxellensis*, *Z. bisporus* y *S. cerevisiae*.

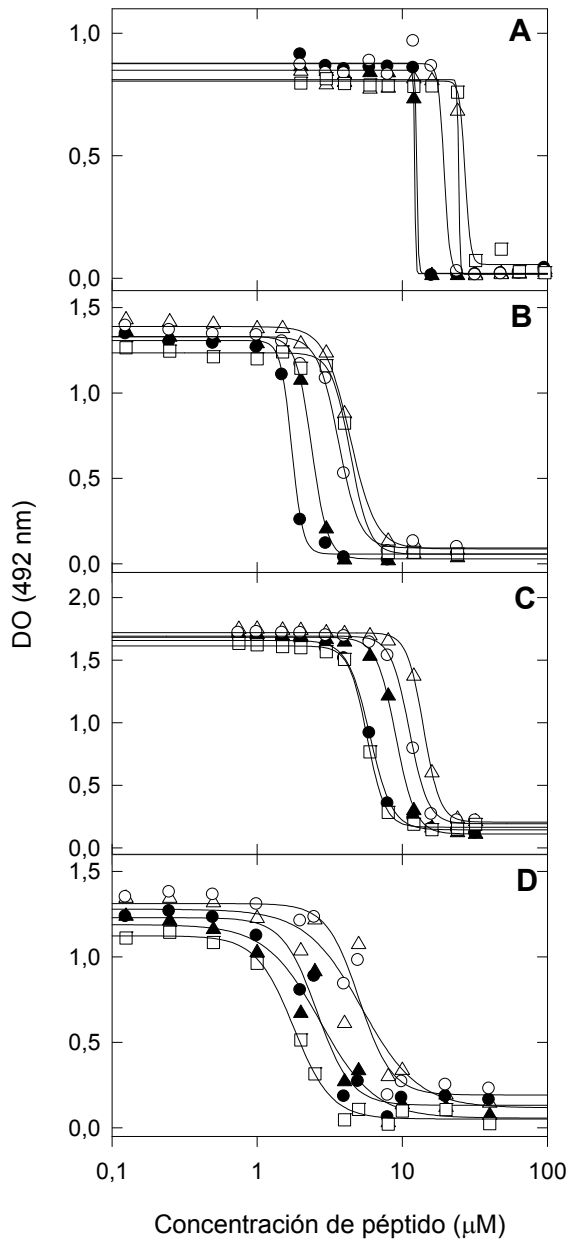


Figura 20. Efecto de los péptidos sobre el crecimiento *in vitro* de *S. cerevisiae* (A), *Z. bailii* (B), *Z. bisporus* (C) y *D. bruxellensis* (D). Se incubaron 10^5 células/ml con concentraciones crecientes de los péptidos: PAF36 (●), PAF36L (○), PAF26 (▲), PAF26L (△) y LfcinB₁₇₋₃₁ (□). Los ensayos se llevaron a cabo por triplicado y los resultados muestran los valores medios de densidad óptica tras 20-24 h de incubación.

En términos generales, los D-hexapéptidos resultaron ser ligeramente más potentes que sus isómeros sintetizados con L-aminoácidos, aunque es de destacar el caso de LfcinB₁₇₋₃₁, que resultó ser el más potente, por encima incluso de los D-hexapéptidos, frente a *D. bruxellensis*. También superó en potencia a PAF26 y a los L-hexapéptidos e igualó a PAF36 frente a *Z. bisporus*.

Tabla 15. Efecto de los péptidos sobre el crecimiento *in vitro* de *S. cerevisiae*, *Z. bailii*, *Z. bisporus* y *D. bruxellensis*.

	PAF36		PAF36L		PAF26		PAF26L		LfcinB ₁₇₋₃₁	
	IC ₅₀ ^a	MIC ^a	IC ₅₀	MIC	IC ₅₀	MIC	IC ₅₀	MIC	IC ₅₀	MIC
<i>S. cerevisiae</i>	12,6	16	19,4	24	12,2	16	24,5	32	27,1	32
<i>Z. bailii</i>	1,7	4	3,6	8	2,4	4	4,4	8	4,4	8
<i>Z. bisporus</i>	6,0	16	11,2	16	9,0	16	14,0	24	5,7	12
<i>D. bruxellensis</i>	3,1	8	5,8	8	3,4	8	6,7	20	2,3	5

^aLos valores IC₅₀ y MIC, calculados en la fase estacionaria de crecimiento de cada levadura, están expresados en unidades micromolar.

2.2. Determinación de la actividad fungicida en distintos medios de crecimiento

Con el objetivo de ampliar la caracterización de los péptidos y establecer si su actividad antimicrobiana se modifica en función del medio de crecimiento del microorganismo, se realizaron ensayos de actividad fungicida tanto en medio de cultivo como en vino.

Se seleccionaron dos de los péptidos sintetizados con L-aminoácidos: LfcinB₁₇₋₃₁ como un péptido derivado de una proteína natural, y PAF26L como ejemplo de péptido catiónico obtenido *de novo*. Este último péptido se seleccionó, a pesar de que su potencia antimicrobiana fue ligeramente inferior a la de PAF36L, por ser un péptido

ya estudiado en trabajos previos del grupo frente a hongos fitopatógenos (Muñoz, 2008).

Los experimentos se llevaron a cabo empleando concentraciones de ambos péptidos en el intervalo entre 12,5 (próxima al valor del MIC determinado en medio GPY) y 100 μ M. Tanto PAF26L como LfcinB₁₇₋₃₁ mostraron actividad fungicida en medio GPY frente a las levaduras estudiadas, en todo el rango de concentraciones. Sin embargo, al emplearse vino como medio de contacto péptido-microorganismo, únicamente LfcinB₁₇₋₃₁ mostró actividad fungicida, a las concentraciones más elevadas, y tan sólo frente a determinadas levaduras.

La Tabla 16 resume los resultados obtenidos a una concentración de 100 μ M. En primer lugar, en ausencia de péptido, se observó una viabilidad diferente de las levaduras, dependiendo de la matriz en que se encontraban, siendo más acusada a las 24 h de crecimiento. Mientras que en medio GPY la viabilidad se incrementó entre 1-3 unidades logarítmicas en todos los casos, en vino sufrió un notable descenso, que en el caso de *D. bruxellensis* alcanzó las 2 unidades logarítmicas. Únicamente *S. cerevisiae* mantuvo el recuento de viables constante en el transcurso del ensayo en vino.

Respecto al efecto de ambos péptidos, tras una hora de contacto en medio GPY, la viabilidad celular alcanzó niveles indetectables en todos los casos, resultado que indica que la actividad antimicrobiana de ambos péptidos en medio microbiológico es fungicida. Al emplear vino como medio de contacto, únicamente resultó activo LfcinB₁₇₋₃₁ frente a *D. bruxellensis* y *Z. bisporus*. En ambos casos, tras una hora de contacto se observó una reducción en el recuento de colonias de una unidad logarítmica. Por el contrario, el péptido PAF26L no mostró actividad fungicida en vino, a pesar de que la concentración empleada fue notablemente superior al valor del MIC determinado en medio GPY.

Tabla 16. Evaluación de la actividad fungicida de PAF26L y LfcinB₁₇₋₃₁ sobre las levaduras seleccionadas en medio de cultivo GPY y vino.

		Unidades formadoras de colonia (ufc) por ml ^a			
		GPY ^b		Vino ^c	
		1h ^d	24h	1h	24h
<i>Z. baillii</i>	Control	830 ± 117	4900 ± 902	930 ± 118	560 ± 60
	PAF26L ^e	ND	ND	880 ± 150	670 ± 76
	LfcinB ₁₇₋₃₁ ^e	ND	ND	760 ± 120	610 ± 72
<i>S. cerevisiae</i>	Control	760 ± 278	2x10 ⁶ ± 3x10 ⁵	630 ± 47	680 ± 70
	PAF26L ^e	70 ± 17	ND	670 ± 52	730 ± 76
	LfcinB ₁₇₋₃₁ ^e	ND	ND	690 ± 20	590 ± 135
<i>Z. bisporus</i>	Control	930 ± 70	15000 ± 3511	590 ± 45	210 ± 62
	PAF26L ^e	ND	ND	540 ± 125	73 ± 12
	LfcinB ₁₇₋₃₁ ^e	ND	ND	63 ± 31*	ND
<i>D. bruxellensis</i> F11	Control	1100 ± 144	8800 ± 1159	440 ± 55	3 ± 6
	PAF26L ^e	ND	ND	430 ± 60	ND
	LfcinB ₁₇₋₃₁ ^e	ND	ND	27 ± 15*	ND

^aLos tratamientos fueron preparados por triplicado y los datos que se muestran corresponden al valor medio de los recuentos en placa (ufc/ml) ± DE. La concentración inicial de inóculo empleada fue 10³ células/ml. ND: No detectado.

^bSe empleó medio GPY al 25%.

^cVino de la cosecha 2005.

^dTiempo de contacto péptido-microorganismo.

^eLa concentración de péptido empleada fue 100 µM.

*Significativamente diferente del control ($p < 0,01$).

Estos resultados ponen de manifiesto la diferente acción antimicrobiana de los péptidos dependiendo del medio ó matriz en que interactúen con el microorganismo diana, dada la reducción de eficacia observada en vino respecto a medio GPY. Este efecto es dependiente tanto del péptido como del microorganismo, y no está relacionado con la

potencia relativa que los distintos péptidos muestran en medio GPY, como lo demuestra el hecho de que la cepa más sensible en dicho medio, *Z. bailii*, no se ve afectada por los péptidos en vino. Por tanto, estos resultados resaltan la importancia de evaluar la actividad antimicrobiana de los compuestos objeto de estudio en la matriz alimentaria en la que se pretendan emplear, ya que los componentes del alimento pueden interferir en el desarrollo de la actividad observada *in vitro* (Rydlo *et al.*, 2006; Venkitanarayanan *et al.*, 1999).

2.3. Efecto antimicrobiano del péptido LfcinB₁₇₋₃₁ frente a distintas cepas de *D. bruxellensis*

Además de observarse un efecto diferente de los péptidos antimicrobianos dependiendo de la especie de levadura evaluada y del medio o matriz en el que interactúen, es posible que cepas de la misma especie puedan mostrar distinta susceptibilidad a su acción, como ya se ha descrito para algunos compuestos antimicrobianos (Goretti *et al.*, 2009; Wakabayashi *et al.*, 1998). Por esta razón, se decidió llevar a cabo una caracterización de la actividad antimicrobiana del péptido LfcinB₁₇₋₃₁ frente a un grupo de aislados de *D. bruxellensis* procedentes de vinos de diversos orígenes, y así evaluar el efecto de la cepa sobre dicha actividad.

Se seleccionó esta especie de levadura por ser considerada una de las contaminantes de vino más habituales (Chatonnet *et al.*, 1995; Heresztyn, 1986), y también por la sensibilidad mostrada por *D. bruxellensis* F11 frente a LfcinB₁₇₋₃₁ en nuestros ensayos. Además, estudios publicados recientemente han demostrado una gran diversidad entre las cepas de esta especie que han sido aisladas de vino, con respecto a su capacidad de alteración (Fugelsang y Zoecklein, 2003) y al impacto que producen en el perfil fenólico de los vinos (Silva *et al.*, 2005). También se ha confirmado la diversidad genética existente en aislados de esta especie obtenidos de vinos de diferentes orígenes (Curtin *et al.*, 2007; Martorell *et al.*, 2006).

2.3.1. Determinación de IC₅₀ y MIC

La Figura 21 muestra las curvas dosis-respuesta, en medio GPY, de LfcinB₁₇₋₃₁ frente al grupo de cepas de *D. bruxellensis* objeto de estudio. En ella se observa la diferente sensibilidad de las cepas que se refleja en los valores de MIC e IC₅₀ correspondientes, recogidos en la Tabla 17. Para facilitar la comparación con la cepa F11, se han incluido, tanto en la Tabla como en la Figura, los resultados obtenidos anteriormente para dicha cepa.

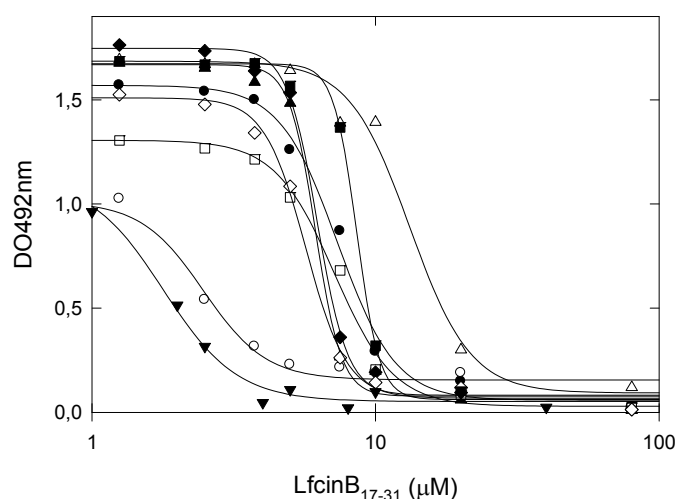


Figura 21. Efecto del péptido LfcinB₁₇₋₃₁ sobre el crecimiento *in vitro* de las cepas de *D. bruxellensis* 531 (●), 928 (○), 1327 (▲), 1700 (Δ), 1701 (■), 1717 (□), 2114 (◆), 2174 (◇) y F11 (▼). Se incubaron 10⁵ células/ml con concentraciones crecientes de dicho péptido. Los ensayos se llevaron a cabo por triplicado y los resultados muestran los valores medios de densidad óptica después de 20-24 h de incubación.

Como se puede observar en la Tabla 17, los valores de MIC estuvieron en el rango micromolar para todas las cepas de *D. bruxellensis* evaluadas, situándose entre 3,75 µM, correspondiente a la cepa 928, y 20 µM, valor obtenido en el caso de las cepas 1700, 531, 1701 y 1717. Por

su parte, los valores obtenidos de IC₅₀ estuvieron en el intervalo entre 1,8 µM y 13,2 µM, correspondientes a las cepas F11 y 1700, respectivamente. Nuestros resultados confirman la diferente sensibilidad de las cepas de *D. bruxellensis* frente a la acción antimicrobiana de LfcinB₁₇₋₃₁. En concreto, las cepas F11 y 928 fueron las más sensibles, mientras que la cepa 1700 resultó ser la más resistente. Sin embargo, no fue posible obtener una correlación entre la sensibilidad de las cepas al péptido y el patrón de restricción de DNA mitocondrial o los haplotipos, determinados por RAPDs.

Tabla 17. Efecto de LfcinB₁₇₋₃₁ sobre el crecimiento *in vitro* de varias cepas de *D. bruxellensis*.

Cepa	IC ₅₀ ^a	MIC ^a	mtDNA ^c	Haplotipo ^c
1327	6,1 ± 0,2 (12,4) ^b	7,5 (15,3)	A	1
2114	6,2 ± 0,1 (12,6)	10 (20,4)	A	2
2174	5,7 ± 0,2 (11,6)	7,5 (15,3)	A	2
1700	13,2 ± 0,8 (26,7)	20 (40,7)	A	3
531	7,4 ± 0,3 (15,1)	20 (40,7)	A	4
928	2,5 ± 0,2 (5,1)	3,75 (7,6)	A	4
1701	8,6 ± 0,1 (17,5)	20 (40,7)	A	4
1717	7,2 ± 0,3 (14,7)	20 (40,7)	A	5
F11	1,8 ± 0,1 (3,7)	5 (10,2)	B ^d	n.d. ^e

^aLos valores IC₅₀ y MIC, calculados en la fase estacionaria de crecimiento de cada cepa, están expresados en unidades micromolar. El resultado correspondiente al IC₅₀ se muestra como el valor medio de tres réplicas independientes ± DE.

^bLos valores colocados entre paréntesis están expresados en µg/ml.

^cPatrones de restricción de DNA mitocondrial y haplotipos, determinados mediante RAPDs, descritos previamente (Martorell *et al.*, 2006).

^dPatrón de restricción de DNA mitocondrial, determinado en este trabajo.

^en.d.: No determinado.

2.3.2. Determinación de la actividad fungicida en distintos medios de crecimiento

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos al evaluar la actividad fungicida en distintas matrices para las diferentes especies de levadura, y también la variación en la sensibilidad en función de la cepa de levadura evaluada, se decidió determinar la actividad fungicida de LfcinB₁₇₋₃₁ frente a las distintas cepas de *D. bruxellensis* en medio GPY, mosto y vino. Se incluyó la matriz mosto ya que la alteración microbiológica de los vinos causada por *Dekkera* se puede producir tanto en producto acabado como en las distintas etapas de la fermentación alcohólica, dado que se ha demostrado que la primera fuente de *D. bruxellensis* es la uva (Renouf y Lonvaud-Funel, 2007).

Tras mantener en contacto el péptido, a una concentración 100 µM, con las distintas cepas de *D. bruxellensis* en GPY, el recuento de viables alcanzó valores indetectables tanto a la hora como a las 24 h de contacto en todos los casos (Tabla 18). Este resultado indica que la actividad antimicrobiana de LfcinB₁₇₋₃₁ en esta matriz es fungicida, al igual que ocurría en el caso de la cepa de *D. bruxellensis* F11 y el resto de especies de levadura evaluadas previamente (*Z. bailii*, *Z. bisporus* y *S. cerevisiae*) (Tabla 16). Sin embargo, en mosto y vino, se observó un comportamiento diferente dependiendo de la cepa ensayada. Además, en ambas matrices se detectó una ligera reducción de la viabilidad celular en los ensayos control (en ausencia de péptido), al comparar los resultados con los obtenidos en medio GPY, hecho también observado en los ensayos de actividad fungicida llevados a cabo con la cepa de *D. bruxellensis* F11 y las especies *Z. bailii*, *Z. bisporus* y *S. cerevisiae* (Tabla 16).

Tabla 18. Evaluación de la actividad fungicida de LfcinB₁₇₋₃₁ sobre aislados de *D. bruxellensis* en las matrices medio GPY, mosto y vino.

Cepa		Unidades formadoras de colonia por ml ^a					
		GPY		Mosto ^d		Vino ^e	
		Control	LfcinB ₁₇₋₃₁ ^c	Control	LfcinB ₁₇₋₃₁	Control	LfcinB ₁₇₋₃₁
531	1h ^b	710 ± 10	ND	500 ± 85	355 ± 20	150 ± 45	50 ± 10
	24h	5200 ± 2310	ND	670 ± 175	625 ± 300	20 ± 10	ND
928	1h	1045 ± 240	ND	960 ± 95	80 ± 25**	555 ± 260	30 ± 20*
	24h	3630 ± 1175	ND	1565 ± 60	70 ± 40**	170 ± 35	ND
1327	1h	820 ± 40	ND	625 ± 95	235 ± 70**	365 ± 75	87 ± 55
	24h	5600 ± 590	ND	440 ± 60	165 ± 95	200 ± 40	ND
1700	1h	570 ± 60	ND	330 ± 60	225 ± 70**	30 ± 10	35 ± 30
	24h	4070 ± 415	ND	290 ± 115	190 ± 105	ND	ND
1701	1h	430 ± 60	ND	480 ± 30	405 ± 60	150 ± 30	3 ± 6*
	24h	1500 ± 570	ND	503 ± 25	625 ± 75	ND	ND
1717	1h	500 ± 130	ND	545 ± 45	545 ± 90	460 ± 56	180 ± 10*
	24h	1360 ± 255	ND	2310 ± 80	2235 ± 230	20 ± 10	ND
2114	1h	550 ± 100	ND	610 ± 40	605 ± 130	50 ± 25	7 ± 6
	24h	5000 ± 1000	ND	770 ± 118	1135 ± 510	10 ± 10	ND
2174	1h	750 ± 115	ND	845 ± 105	580 ± 135	55 ± 10	7 ± 6*
	24h	3380 ± 235	ND	1200 ± 45	860 ± 50	35 ± 45	ND
F11	1h	1200 ± 231	ND	390 ± 45	240 ± 30*	140 ± 10	7 ± 12**
	24h	7800 ± 1070	ND	390 ± 129	250 ± 80	7 ± 12	ND

^aLos tratamientos fueron preparados por triplicado y los datos que se muestran corresponden al valor medio de los recuentos en placa (ufc/ml) ± DE. ND: No detectado. El inóculo empleado fue 10³ células/ml.

^bTiempo de contacto péptido-microorganismo.

^cLa concentración de péptido empleada fue 100 µM.

^dVer apartado 3 de Materiales y Métodos.

^eVino de la cosecha 2006 (Tabla 8).

* Significativamente diferente del control ($p < 0,05$).

**Significativamente diferente del control ($p < 0,01$).

En mosto, el mayor descenso en la viabilidad se observó en el caso de la cepa *D. bruxellensis* 928, con una reducción en el recuento en placa de una unidad logarítmica tras 1 h de exposición al péptido (Tabla 18), que pasó a ser aproximadamente de dos unidades logarítmicas después de 24 h de contacto. Otras cepas cuya viabilidad en mosto se vio afectada significativamente por LfcinB₁₇₋₃₁ fueron 1327, 1700, y F11. En los tres casos el recuento de viables se redujo a la mitad en presencia de este péptido, independientemente del tiempo de exposición al mismo. El resto de cepas (531, 1701, 1717, 2114 y 2174) no sufrieron un descenso significativo en la viabilidad celular, independientemente del tiempo de contacto.

Al emplear vino como matriz, y tras 1 h de exposición al péptido, en el caso de las cepas 928, 1701, 1717, 2174 y F11 se observó una reducción significativa en la viabilidad celular, destacando el caso de F11 (Tabla 18). La actividad fungicida de LfcinB₁₇₋₃₁ frente a esta cepa había sido evaluada previamente (Tabla 16), pero se ha incluido de nuevo en los ensayos llevados a cabo con el resto de cepas de *D. bruxellensis* a modo de control, obteniéndose resultados similares. Después de 24 h de exposición, se detectó un drástico descenso en el recuento de viables, por efecto de la matriz de contacto, en los tratamientos en ausencia de péptido para la mayoría de las cepas evaluadas, lo que impidió la evaluación de la actividad fungicida de LfcinB₁₇₋₃₁. Sólo en el caso de las cepas 928 y 1327 no se produjo este efecto en las muestras control, y sí que se pudo observar la actividad del péptido a las 24 h de contacto, que provocó un descenso en el recuento de viables hasta niveles indetectables. Estos resultados sugieren por tanto, que la actividad de LfcinB₁₇₋₃₁ en vino es fundamentalmente fungicida.

De estos resultados se puede concluir que las cepas de *D. bruxellensis* más sensibles a la acción antimicrobiana del péptido LfcinB₁₇₋₃₁, tanto en mosto como en vino, fueron 928 y F11, que a su vez mostraron los valores más bajos de IC₅₀ en medio GPY (Tabla 17). Sin embargo, no se observó una completa correlación entre los datos

recogidos en ambas tablas, ya que cepas como 1700, 1701, y 1717, con valores de MIC de 20 μ M en GPY, se vieron afectadas en mosto o en vino, mientras que aislados como 531 y 2114 no vieron afectada su viabilidad celular por la presencia del péptido LfcinB₁₇₋₃₁ en estas matrices, a pesar de que la concentración empleada fue entre cinco y diez veces superior al valor MIC determinado en medio GPY, para estos aislados.

Estos resultados muestran la diferente acción antimicrobiana de LfcinB₁₇₋₃₁ dependiendo del medio en que interactúe con el microorganismo diana. Este efecto diferencial depende del péptido empleado como agente antimicrobiano, como previamente habíamos demostrado para este mismo péptido y PAF26L frente a cuatro especies de levadura alterantes de vino, incluyendo *D. bruxellensis* (Tabla 16), y también del microorganismo alterante, tanto a nivel de especie como de cepa, como se puede observar en las Tabla 16 y Tabla 18.

Dada la reducción en la potencia relativa de los péptidos en mosto y vino, hecho que se extrae de los resultados mostrados en las Tabla 16 y Tabla 18, es necesario destacar de nuevo la necesidad de evaluar la capacidad antimicrobiana de los compuestos de interés en aquella matriz donde se pretenda que ejerzan su acción.

3. Estudio de la interacción péptido-microorganismo

3.1. Efecto de los componentes de la matriz de contacto

Los resultados anteriores han demostrado que la actividad antimicrobiana de los péptidos sufre notables variaciones dependiendo de la composición de la matriz empleada. Por esta razón, se planteó profundizar en el estudio del efecto de los principales compuestos que la integran, y que pudieran afectar el modo de acción de los péptidos.

En estudios previos se ha descrito que el primer paso en la acción de los péptidos antimicrobianos catiónicos, como los examinados en este

estudio, es la aproximación e interacción física con los elementos cargados negativamente presentes en la superficie de los microorganismos diana (Brogden, 2005; Zasloff, 2002). Como consecuencia de ello, el aumento de la fuerza iónica del medio disminuye, en general, su actividad antimicrobiana, hecho que se interpreta como un apantallamiento de la interacción electrostática, y que se ha observado en el caso del péptido PAF26, que reduce su efecto frente a hongos filamentosos en presencia de sales (López-García *et al.*, 2002). Existen otros estudios que confirman que la actividad antimicrobiana de los péptidos derivados de LfcinB disminuye en presencia de sales, tales como $MgCl_2$ o $CaCl_2$, a concentraciones de hasta 5 mM, o NaCl, KCl ó NH_4Cl , a concentraciones de hasta 100 mM (Bellamy *et al.*, 1992a; Rydlo *et al.*, 2006), siendo activos, sin embargo, en una amplia gama de pH.

Dado el posible mecanismo de acción de estos péptidos, el etanol también podría ocasionar una disminución de su actividad antimicrobiana, aunque de forma indirecta, ya que se ha descrito que es capaz de inducir cambios en la composición de la membrana de las levaduras. El efecto más conocido del etanol en *S. cerevisiae*, es el cambio en la composición de ácidos grasos de los fosfolípidos de membrana, con un aumento en la proporción de ácidos grasos insaturados y en la longitud media de los mismos, dando lugar a una mayor fluidez de la membrana celular (Alexandre *et al.*, 1994; Dinh *et al.*, 2008; Gupta *et al.*, 1994). Por el contrario, se ha descrito que varias cepas de *Z. bailii* responden al estrés por etanol disminuyendo el grado de insaturación de los ácidos grasos presentes en la membrana (Baleiras y Huis, 1995).

Debido a que la composición de los vinos incluye tanto etanol como varias sales minerales, entre las que destacan NaCl y $CaCl_2$ (Liu *et al.*, 1995), decidimos evaluar su posible influencia en la actividad antimicrobiana de los péptidos estudiados, con el fin de averiguar si podrían ser la causa del distinto comportamiento de estos péptidos en las matrices hasta ahora evaluadas, medio de cultivo GPY, mosto y vino.

Para abordar este estudio se llevaron a cabo una serie de ensayos de actividad fungicida de los péptidos PAF26L y LfcinB₁₇₋₃₁, sobre las levaduras *D. bruxellensis* F11, *S. cerevisiae*, *Z. bailii* y *Z. bisporus*. Se empleó como medio de contacto vino blanco suplementado con un quelante de cationes (EDTA a 0,5 mg/ml) o sometido a un proceso de desalado empleando una resina de intercambio iónico mixta (AG501-X8), y vino blanco desalcoholizado (ver Tabla 8). A modo de control y a efectos comparativos, se incluyeron medio GPY y vino blanco sin ningún tipo de tratamiento.

Los resultados obtenidos pueden observarse en la Figura 22. En primer lugar, y como ya habíamos descrito previamente (Tabla 16), por lo que respecta a los controles en medio microbiológico, la actividad de ambos péptidos frente a las cuatro levaduras fue principalmente fungicida. Empleando vino como matriz se confirmó que el único péptido activo era LfcinB₁₇₋₃₁, y únicamente frente a *Z. bisporus*, *D. bruxellensis*, y de forma muy ligera en el caso de *Z. bailii*.

Por lo que respecta al etanol, su efecto sobre la actividad fungicida puede deducirse de los resultados obtenidos utilizando vino desalcoholizado. Como se puede observar, los datos obtenidos no revelaron, en ningún caso, un incremento de dicha actividad en ausencia de etanol, lo que indicaría que este componente del vino no es el responsable de la reducción de actividad fungicida de PAF26L y LfcinB₁₇₋₃₁ en esta matriz alimentaria.

Estos experimentos también muestran que la presencia de EDTA no tiene ningún efecto sobre la actividad fungicida de los péptidos, a pesar de que se ha descrito su empleo para restablecer la actividad antimicrobiana de péptidos derivados de LfcinB sobre bacterias patógenas de los alimentos en medios ricos en cationes (Branen y Davidson, 2000). Estos resultados sugieren que los iones metálicos que es capaz de quelar el EDTA, presentes en el vino, no serían los responsables de la reducción de la actividad fungicida de PAF26L y LfcinB₁₇₋₃₁ observada en esta matriz.

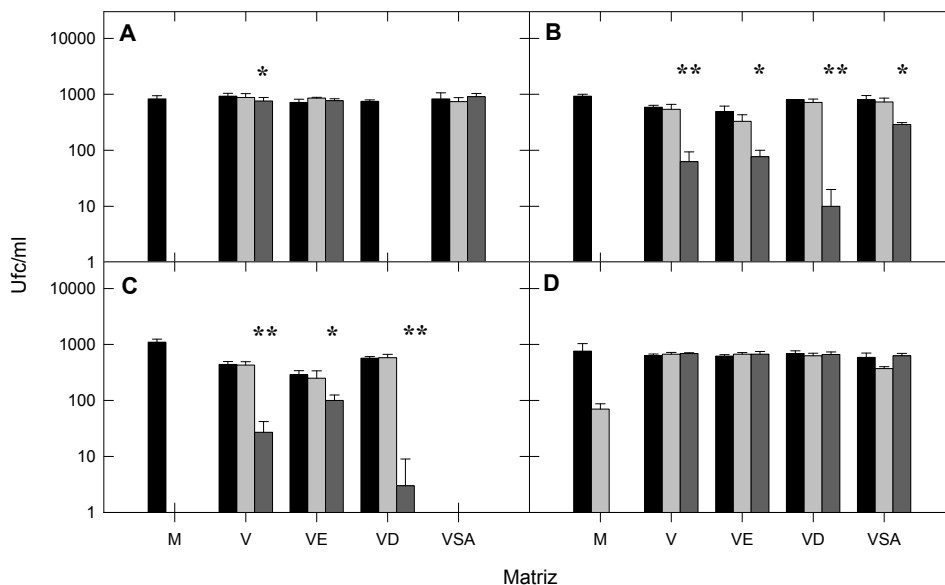


Figura 22. Efecto del etanol y las sales presentes en el vino en la actividad fungicida de PAF26L (barras gris claro) y LfcinB₁₇₋₃₁ (barras gris oscuro) sobre *Z. bailii* (A), *Z. bisporus* (B), *D. bruxellensis* F11 (C) y *S. cerevisiae* (D). Se incubaron 10³ células/ml de cada levadura en ausencia (barras negras) y presencia de ambos péptidos (100 μM), durante 1 h, en GPY (M), vino blanco (cosecha 2006) (V), este vino suplementado con 0,5 mg/ml de EDTA (VE) o desalado con la resina AG501-X8 (VD) y en vino blanco desalcoholizado (VSA). Los tratamientos se prepararon por triplicado y los datos que se muestran corresponden al valor medio de los recuentos en placa (ufc/ml) ± DE. Los datos significativamente diferentes del control a un nivel de confianza del 95 y 99% ($p < 0,05$ y $0,01$) se señalan mediante uno y dos asteriscos, respectivamente (análisis estadístico mediante el método de la mínima diferencia significativa de Fisher).

Por último, la eliminación de las sales presentes en el vino con la resina de intercambio iónico consiguió, en el caso de *Z. bailii*, recuperar los niveles de actividad de PAF26L y LfcinB₁₇₋₃₁ obtenidos en medio microbiológico. Estos resultados sugieren que ciertas sales presentes en el

vino podrían actuar enmascarando la superficie de las células de levadura de *Z. bailii*, cargada negativamente, impidiendo así la interacción con los péptidos antimicrobianos. Si este mismo razonamiento pudiera aplicarse también al resto de levaduras en estudio, se esperaría un notable incremento de la actividad fungicida de los dos péptidos frente a *Z. bisporus*, *D. bruxellensis* y *S. cerevisiae*. Sin embargo, la ausencia de sales no consiguió restablecer los niveles de actividad obtenidos en medio de cultivo, ni tampoco produjo variaciones significativas sobre la actividad tanto de LfcinB₁₇₋₃₁ como de PAF26L frente a *D. bruxellensis*, *S. cerevisiae* y *Z. bisporus* en vino. Estos datos sugieren por tanto que la sensibilidad de estas tres levaduras a estos péptidos antimicrobianos no es debida, al menos principalmente, a interacciones electrostáticas y/o que el descenso de actividad observado en vino se debería a otros componentes de esta matriz alimentaria que bloquean o inactivan la acción de los péptidos.


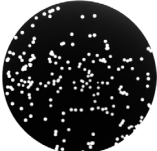




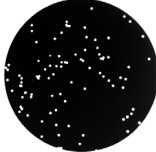









A modo de ejemplo, la Figura 23 recoge las fotografías de las placas de medio GPY procedentes de los ensayos de actividad fungicida de LfcinB₁₇₋₃₁ frente a *Z. bailii*, llevados a cabo con el fin de evaluar el efecto de las sales presentes en el vino en la actividad antimicrobiana de este péptido, a partir de las cuales se obtuvieron los recuentos indicados para los distintos tratamientos en la Figura 22.

3.2. Estudios de microscopía

La microscopía de fluorescencia se ha utilizado en trabajos previos para investigar la interacción entre péptidos catiónicos y distintos microorganismos (Muñoz *et al.*, 2006; Powers *et al.*, 2006; Vivès *et al.*, 1997). En este estudio se emplea el péptido LfcinB₁₇₋₃₁, sintetizado con su extremo N-terminal modificado mediante la adición covalente del fluoróforo FITC, con el objetivo de visualizar su interacción con células de levadura en medio microbiológico, mosto y vino.

Para evaluar la interacción de FITC-LfcinB₁₇₋₃₁ con *D. bruxellensis*, *Z. bailii* y *Z. bisporus*, se pusieron en contacto durante 1 h el péptido, a una concentración de 100 µM, y las diferentes levaduras en medio GPY, mosto y vino estériles.

Figura 23. Efecto de las sales presentes en el vino en la actividad fungicida de LfcinB₁₇₋₃₁ sobre *Z. bailii*.

	Recuento en placa (ufc) ^a			
	Control		LfcinB ₁₇₋₃₁	
	1h ^b	24h	1h	24h
GPY				
Vino blanco				
Vino + EDTA (0,5 mg/ml)				
Vino + AG501- X8				

^aImágenes correspondientes a una de las placas del triplicado disponible de cada tratamiento. El inóculo inicial empleado fue 10³ células/ml.

^bTiempo de contacto péptido-microorganismo.

La Figura 24 y la Figura 25 muestran las fotografías obtenidas mediante microscopía de fluorescencia en experimentos paralelos con

D. bruxellensis F11 y las dos especies de *Zygosaccharomyces*, respectivamente.

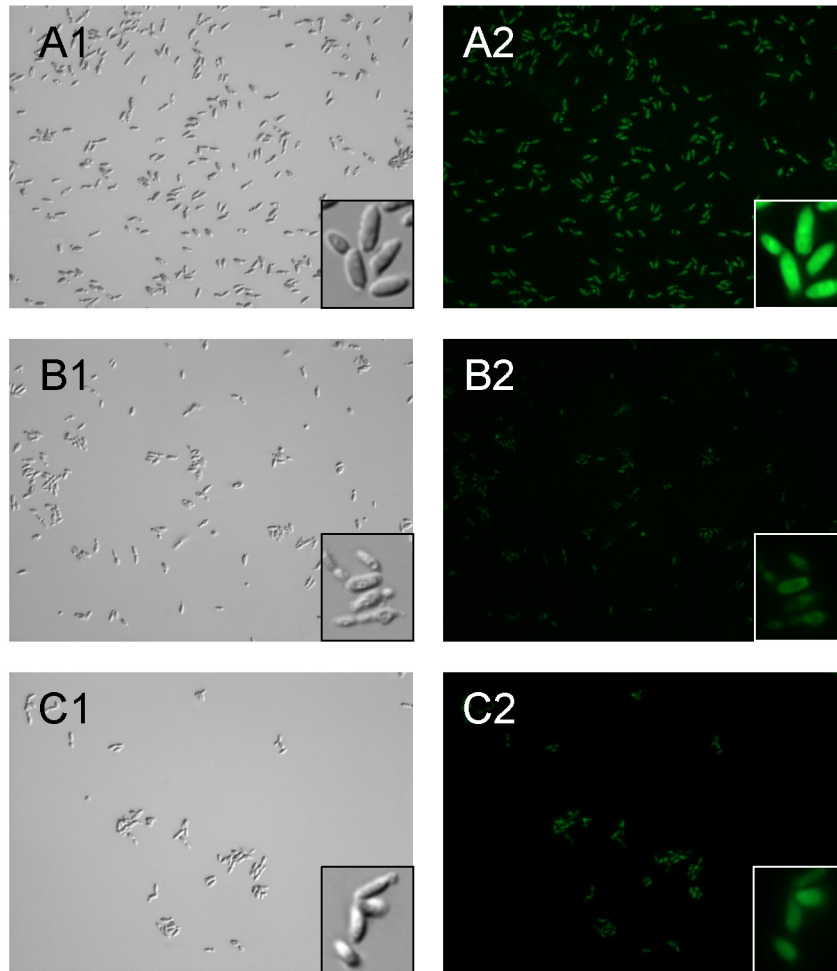


Figura 24. Visualización microscópica de la interacción de FITC-LfcinB₁₇₋₃₁ (100 μ M) con la cepa *D. bruxellensis* F11 tras 1 h a temperatura ambiente. Se expusieron 5×10^7 células/ml en GPY 25% (panel A), mosto (apartado 3 de Materiales y Métodos) (panel B) y vino (cosecha 2006) (panel C). Los paneles 1 y 2 muestran micrografías de la misma área, visualizada en campo claro o fluorescencia, respectivamente. Las imágenes de mayor tamaño corresponden a 400x y las pequeñas a 1000x.

En la Figura 24 se observa como la intensidad de la señal fluorescente debida a la interacción del péptido FITC-LfcinB₁₇₋₃₁ con las células de *D. bruxellensis* en las distintas matrices fue diferente, y se correlacionó con los resultados de actividad fungicida en GPY, mosto y vino (Tabla 18).

En concreto, la mayor intensidad de fluorescencia se observó en aquellas células que fueron incubadas con el péptido marcado en medio GPY (panel A2), matriz donde dicho péptido también mostró mayor actividad fungicida. En mosto (panel B2), una alta proporción de células (por encima del 95%) interactuaron con el péptido, aunque la intensidad de fluorescencia fue inferior a la observada en medio GPY, lo que se correlacionó con la ligera actividad fungicida de LfcinB₁₇₋₃₁ frente a *D. bruxellensis* F11 en esta matriz. En vino (panel C2), también un alto porcentaje de células interactuaron con el péptido, incrementándose, además, la intensidad de fluorescencia respecto al mosto, aunque sin alcanzar la observada al emplear medio GPY, resultado que es consistente con la actividad fungicida observada en vino. Estos resultados parecen sugerir que existe correlación entre la intensidad de fluorescencia y la actividad antimicrobiana, más que entre el número de células que interactúan con el péptido y dicha actividad. Esto indicaría que aunque debe producirse una interacción mínima entre el péptido y la levadura para provocar el efecto antifúngico, ésta por si sola no es suficiente, y que un efecto de la dosis y/o un modo de acción intracelular estarían implicados en el efecto antimicrobiano, tal y como se ha descrito para otros péptidos derivados de LfcinB (revisado en Brogden, 2005).

La Figura 25 muestra estos mismos ensayos llevados a cabo con las levaduras *Z. bisporus* y *Z. bailii*. Al igual que en el caso de *D. bruxellensis*, la mayor intensidad de fluorescencia se observó en aquellas células que fueron incubadas con el péptido marcado en medio GPY, donde también se obtuvo una mayor actividad fungicida de LfcinB₁₇₋₃₁ (ver Tabla 16). En vino se observó una leve fluorescencia, tanto para *Z. bisporus* como para *Z. bailii* transcurrida 1 h de incubación en presencia

del péptido marcado, aunque es interesante destacar que esta fluorescencia se apreció de forma casi inmediata tras la adición del FITC en el caso de *Z. bisporus* y no en el de *Z. bailii* (datos no mostrados). Estos resultados, por tanto, también se correlacionan con los datos de actividad fungicida de LfcinB₁₇₋₃₁ frente a ambas especies en vino, recogidos en la Tabla 16, que mostraron una notable actividad del péptido frente a *Z. bisporus*, y por el contrario una ausencia de actividad fungicida frente a *Z. bailii*.

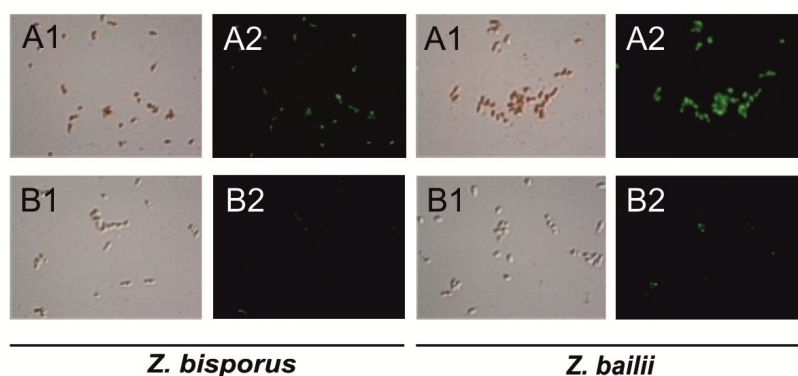


Figura 25. Visualización por microscopía óptica de fluorescencia de la interacción de FITC-LfcinB₁₇₋₃₁ (100 µM) con las levaduras *Z. bisporus* y *Z. bailii*. Se expusieron 5×10^7 células/ml de cada cepa con FITC-LfcinB₁₇₋₃₁, a la concentración de 100 µM, en medio GPY 25% (bloque A) y vino blanco (cosecha 2006) (bloque B). Los paneles 1 muestran las imágenes de campo claro y los paneles 2 la fluorescencia emitida por el péptido FITC-LfcinB₁₇₋₃₁, tras 1 h de la puesta en contacto péptido-microorganismo en ambas matrices.

4. Aplicación en el proceso de vinificación

Para evaluar la posible aplicación de los péptidos antimicrobianos en el proceso de vinificación, se diseñaron una serie de experimentos con el fin de completar los ensayos de actividad fungicida ya descritos en esta

memoria. Para estos experimentos se seleccionó el péptido LfcinB₁₇₋₃₁, tanto por su origen natural como por los buenos resultados obtenidos en los ensayos de actividad fungicida frente a *D. bruxellensis* y *Z. bisporus* (ver Tabla 16). Ya que la alteración microbiológica del vino puede producirse en cualquiera de las etapas del proceso de vinificación, se planteó evaluar la capacidad antimicrobiana del péptido tanto en vino acabado como durante el proceso de fermentación alcohólica. El primero de los experimentos consistió en crecer las levaduras alterantes, de forma individual, en vino acabado, mientras que el segundo, supuso una inoculación conjunta de la levadura alterante y *S. cerevisiae*.

Teniendo en cuenta que en estos momentos el procedimiento de síntesis química utilizada para la obtención de LfcinB₁₇₋₃₁ puede dificultar, desde el punto de vista económico, su aplicación, se ha evaluado también la posibilidad de utilizar un hidrolizado de lactoferrina bovina como agente antimicrobiano.

4.1. Efecto de LfcinB₁₇₋₃₁ en vino acabado

Estos experimentos se llevaron a cabo a una concentración de péptido 100 µM, que en los ensayos previos de actividad fungicida en vino había provocado una reducción significativa en el número de células viables de *Z. bisporus* y *D. bruxellensis* F11 (ver Tabla 16).

En ambos casos la adición de LfcinB₁₇₋₃₁ al vino, produjo un retraso en el crecimiento o una inhibición completa del mismo, dependiendo de la dosis de inóculo empleada. Los resultados obtenidos se recogen en la Figura 26, donde se puede observar que, en el caso de *Z. bisporus*, a la dosis más alta de inóculo empleada (10³ células/ml) (panel 1A), la alteración del vino, en ausencia de péptido, se produjo a los siete días de la inoculación, mientras que la presencia de LfcinB₁₇₋₃₁ retrasó 2-3 días el inicio del crecimiento, y transcurridos nueve días dicho crecimiento fue significativamente menor que el correspondiente al control sin péptido.

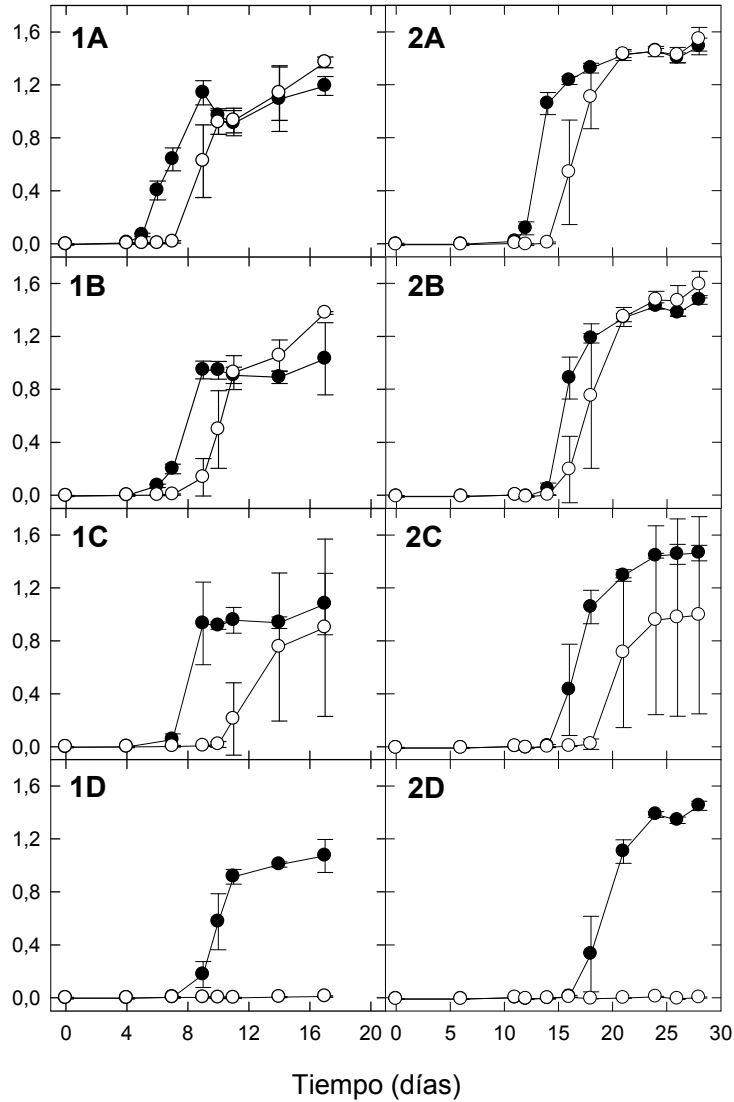


Figura 26. Efecto de LfcinB₁₇₋₃₁ sobre el crecimiento de *Z. bisporus* (1) y *D. bruxellensis* F11 (2) en vino blanco (cosecha 2005, corregido a 7% (v/v) de etanol en el caso (1) y cosecha 2006, corregido a 10% (v/v) de etanol en el (2)). Se inocularon concentraciones celulares crecientes de ambas levaduras, 1 (panel D), 10 (C), 10² (B) y 10³ células/ml (A), en ausencia (●) y presencia (○) de LfcinB₁₇₋₃₁ 100 μM. Los tratamientos fueron preparados por triplicado y los datos que se muestran corresponden a los valores medios de medidas de la densidad óptica ± DE.

Este retraso en el crecimiento fue más acusado al disminuir la dosis de inóculo inicial de *Z. bisporus* empleada (paneles 1B a 1D), consiguiéndose una ausencia del mismo, y por tanto de contaminación del vino, al emplear un inóculo inicial de levadura de 1 célula/ml (panel 1D).

En el caso de *D. bruxellensis*, la presencia de LfcinB₁₇₋₃₁ produjo un retraso en el crecimiento microbiano que osciló entre 3 y 8 días, a las dosis de inóculo superiores a 10 células/ml (paneles 2A a 2C), mientras que a la concentración de inóculo más baja evaluada (1 célula/ml) el agente antimicrobiano inhibió completamente el crecimiento, tras 42 días de la inoculación, evitando por tanto la contaminación del vino (panel 2D).

Dado el retraso en el inicio del crecimiento de *D. bruxellensis*, sobre todo en los ensayos llevados a cabo con los inóculos más reducidos, se confirmó que dicho crecimiento observado visualmente y cuantificado mediante DO correspondía realmente a la cepa de *D. bruxellensis* inoculada. Para ello, se procedió a la identificación a nivel de especie de un número significativo de colonias, mediante un análisis de restricción de la región ribosomal 5,8S-ITS (Esteve-Zarzoso *et al.*, 1999). Para la amplificación de la región 5,8S-ITS se utilizaron los oligonucleótidos ITS1 e ITS4. Los fragmentos de amplificación obtenidos, de un tamaño aproximado de 490 pb, fueron digeridos con tres endonucleasas, *Hinf*I, *Hae*III y *Cfo*I, que generaron patrones de restricción de 250+180+60, 390+100 y 270+220, respectivamente (Figura 27).

La consulta de una base de datos para la identificación rápida de levaduras (<http://yeast-id.com/>), permitió confirmar que *D. bruxellensis* fue la única especie presente en los ensayos de crecimiento en vino. Esta identificación se realizó a partir de las siembras en placa a tiempo final de las muestras sin péptido, correspondientes al ensayo con la concentración de inóculo más baja. No se pudieron incluir colonias procedentes de las muestras que contenían LfcinB₁₇₋₃₁ ya que no se recuperaron viables en ninguna de las réplicas del ensayo debido al efecto del péptido.

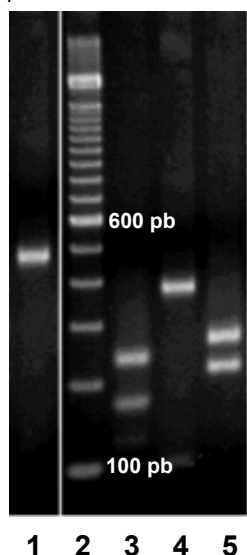


Figura 27. Identificación mediante un análisis de restricción de la región ribosomal 5,8S-ITS de la especie *D. bruxellensis*. La muestra (1) corresponde al amplificado de dicha región y las (3), (4) y (5) a los fragmentos generados por la digestión de dicho amplificado con *CfoI*, *HaeIII* y *HinfI*, respectivamente. La muestra (2) corresponde al marcador de escalera de DNA de 100 pb.

4.2. Efecto de LfcinB₁₇₋₃₁ durante la fermentación alcohólica

En estos experimentos, análogos a los descritos con BAL en el capítulo anterior, coexistieron dos especies de levadura: *S. cerevisiae*, cultivo iniciador encargado de llevar a cabo la fermentación alcohólica y resistente a la acción de LfcinB₁₇₋₃₁, y *D. bruxellensis* como levadura contaminante sensible a este péptido en vino. Se utilizaron los aislados de *D. bruxellensis*, 928 y F11, que en los ensayos de actividad fungicida fueron los más sensibles a la acción de este péptido tanto en mosto como en vino (ver Tabla 18).

Para llevar a cabo estos experimentos, en primer lugar se inoculó el mosto con un aislado de *D. bruxellensis* (10^4 células/ml), y transcurridas 24h, se inoculó *S. cerevisiae* (10^2 células/ml) y al mismo tiempo se adicionó LfcinB₁₇₋₃₁ (100 μ M). Se empleó un inóculo reducido de *S. cerevisiae* con el fin de prolongar el proceso fermentativo en el tiempo, y así poder llevar a cabo una evaluación más exhaustiva del efecto antimicrobiano de LfcinB₁₇₋₃₁.

En estas condiciones, la fermentación alcohólica tuvo una duración aproximada de 28 días. En la Figura 28 se muestra la evolución de la población de *D. bruxellensis* 928 y *S. cerevisiae* T73.

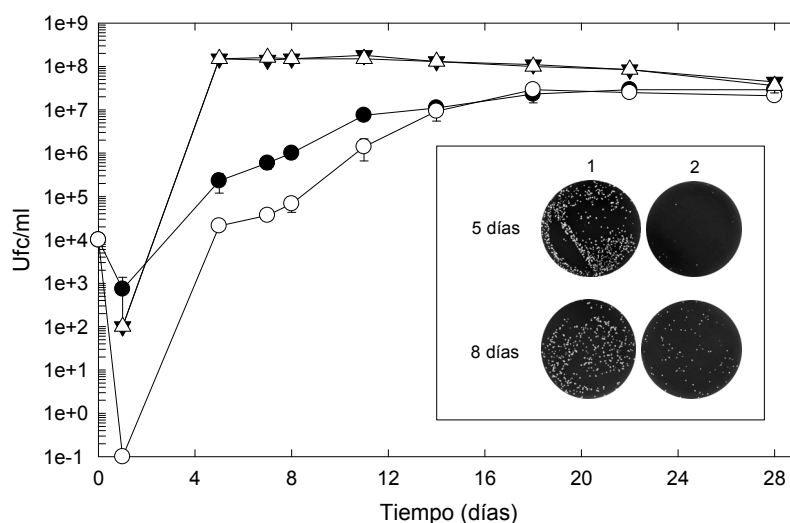


Figura 28. Efecto de LfcinB₁₇₋₃₁ sobre el crecimiento de *S. cerevisiae* T73 (triángulos) y *D. bruxellensis* 928 (círculos) en una fermentación conjunta. Se adicionaron 10² células/ml de la cepa T73, a un mosto inoculado con 10⁴ células/ml de *D. bruxellensis*, tras un periodo de aclimatación de 1 día, en ausencia (símbolos negros) y presencia (símbolos blancos) de una concentración 100 μM de LfcinB₁₇₋₃₁. Los ensayos se llevaron a cabo por triplicado y los valores representados corresponden a la media de los recuentos en placa, expresados en ufc/ml ± DE. Se adjuntan imágenes de los recuentos en placa de la misma dilución, de *D. bruxellensis* en ausencia (1) y presencia (2) de LfcinB₁₇₋₃₁, tras 5 y 8 días del inicio de la fermentación.

Como se puede observar en dicha figura, en ausencia de péptido la población de *D. bruxellensis* 928, tras un retroceso de una unidad logarítmica a las 24 h de su inoculación, fue aumentando de forma progresiva hasta alcanzar un población máxima de aproximadamente

10^7 células/ml a los 18 días de fermentación, que se mantuvo constante hasta el final del experimento. Por lo que respecta a *S. cerevisiae*, su población aumentó desde el inicio hasta alcanzar un máximo de aproximadamente 10^8 células/ml al cuarto día de fermentación, manteniéndose constante hasta el final de la misma.

En cuanto al efecto de LfcinB₁₇₋₃₁, su adición provocó un drástico descenso inicial en el recuento de viables de *D. bruxellensis* 928, observándose durante los primeros catorce días del experimento un retraso en su crecimiento, respecto a la muestra en ausencia de péptido. A partir de ese momento, y hasta la finalización de la fermentación, la población de *D. bruxellensis* fue similar a la población de las muestras sin péptido. Corroborando resultados descritos en el capítulo anterior, la población de *S. cerevisiae* no se vio afectada por la presencia de LfcinB₁₇₋₃₁.

Por lo que respecta a *D. bruxellensis* F11, su comportamiento a lo largo de la fermentación llevada a cabo en ausencia de péptido, fue similar al descrito para la cepa 928, alcanzando una población aproximada de 5×10^8 ufc/ml al quinto día de crecimiento, que se mantuvo hasta el final de la fermentación. Sin embargo, contrariamente a lo descrito con la cepa 928, el crecimiento de *D. bruxellensis* F11 no se vio modificado en presencia de LfcinB₁₇₋₃₁ (resultados no mostrados).

Por tanto, los resultados obtenidos muestran, nuevamente, la especificidad que posee el péptido LfcinB₁₇₋₃₁, respecto a su acción antimicrobiana, ya que su presencia afecta en mayor o menor grado aislados de *D. bruxellensis*, mientras que el crecimiento de *S. cerevisiae* y el desarrollo de la fermentación alcohólica no sufren alteraciones significativas, al igual que ocurría en el caso de las bacterias lácticas. Además, la actividad de dicho péptido a lo largo del proceso frente a los dos aislados de *D. bruxellensis* empleados, fue dependiente de cepa, corroborando los resultados mostrados en la Tabla 18, que revelaban la escasa actividad fungicida de LfcinB₁₇₋₃₁ frente a la cepa F11 de

D. bruxellensis en mosto, mientras que ésta era considerable en el caso de la cepa 928. Estos resultados también corroboran el hecho de que en los ensayos de capacidad antimicrobiana en vino, a una concentración de inóculo de 10^3 células/ml, la adición de LfcinB₁₇₋₃₁ únicamente consiga un retraso en el crecimiento de *D. bruxellensis* (Figura 26).

4.3. Efecto de un hidrolizado de LF en vino acabado

Dado que no disponíamos de ningún dato previo sobre la capacidad antimicrobiana de HLF frente a levaduras alterantes de vino, se inició este estudio evaluando su efecto sobre el crecimiento de *Z. bailii*, *Z. bisporus*, *S. cerevisiae* y *D. bruxellensis* F11 en medio de cultivo microbiológico, tal y como se abordó con los péptidos individuales.

La Figura 29 muestra las curvas dosis-respuesta obtenidas para cada microorganismo, mientras que los valores correspondientes de IC₅₀ y MIC se recogen en la Tabla 19.

Como se puede observar, las dos levaduras más resistentes a la acción del HLF fueron *Z. bailii* y *S. cerevisiae*, con valores IC₅₀ de 0,4 mg/ml y 0,5 mg/ml, respectivamente, e idéntico valor de MIC, 1,6 mg/ml. *Z. bisporus* y *D. bruxellensis*, resultaron ser más sensibles a la acción de HLF, obteniéndose valores de IC₅₀ de 0,1 mg/ml en ambos casos y MIC de 0,4 mg/ml y 0,8 mg/ml, respectivamente.

La diferente sensibilidad de las levaduras frente al HLF, se correlaciona con la obtenida empleando LfcinB₁₇₋₃₁ como antimicrobiano (ver Tabla 15). Sin embargo, la potencia del HLF resultó ser aproximadamente un orden de magnitud inferior a la mostrada por el péptido individual, cuyos valores de IC₅₀ y MIC oscilaron entre 0,005 y 0,070 mg/ml. Como ya se comentó en el primer capítulo de esta memoria, estos resultados pueden ser debidos al perfil peptídico generado en la hidrólisis de la bLF con pepsina y a la baja concentración del péptido LfcinB₁₇₋₃₁, o secuencias que lo contengan, en el hidrolizado obtenido.

Teniendo en cuenta estos resultados, para evaluar la actividad antimicrobiana del HLF en vino blanco, se seleccionó *D. bruxellensis* F11, por su elevada sensibilidad *in vitro* tanto a dicho hidrolizado como al péptido sintético LfcinB₁₇₋₃₁ (ver Tabla 15).

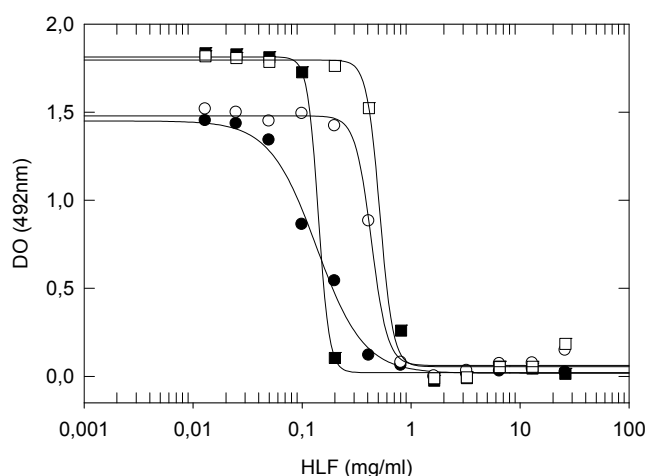


Figura 29. Efecto de un hidrolizado de lactoferrina con pepsina sobre el crecimiento *in vitro* de *S. cerevisiae* T73 (□), *Z. bailii* (○), *Z. bisporus* (■) y *D. bruxellensis* F11 (●). Se incubaron 5×10^5 células/ml con concentraciones crecientes de dicho hidrolizado. Los ensayos se llevaron a cabo por triplicado y los resultados muestran los valores medios de densidad óptica después de 26 h de incubación.

Debido a que los resultados obtenidos en este trabajo indican que la actividad de los péptidos disminuye de forma significativa al ser evaluada en vino, la concentración de HLF utilizada fue de 5,3 mg/ml, muy por encima del valor MIC determinado en medio microbiológico para la levadura empleada (0,1 mg/ml). La dosis de inóculo inicial elegida fue de 1 célula/ml, a la cual se observó crecimiento de *D. bruxellensis* en vino blanco así como una inhibición del mismo en presencia de LfcinB₁₇₋₃₁ (Figura 26).

Tabla 19. Efecto del HLF sobre el crecimiento *in vitro* de *S. cerevisiae*, *Z. bailii*, *Z. bisporus* y *D. bruxellensis*.

	IC ₅₀ ^a	MIC ^a
<i>S. cerevisiae</i> T73	0,52 ± 0,81	1,6
<i>Z. bailii</i>	0,43 ± 0,01	1,6
<i>Z. bisporus</i>	0,14 ± 0,02	0,4
<i>D. bruxellensis</i> F11	0,14 ± 0,01	0,8

^aLos valores IC₅₀ y MIC, calculados en la fase estacionaria de crecimiento de cada cepa, están expresados en mg/ml.

El resultado correspondiente al IC₅₀ se muestra como el valor medio de tres réplicas independientes ± DE.

La Figura 30 muestra los resultados obtenidos tras 42 días de crecimiento de la levadura en vino blanco en presencia y ausencia de HLF.

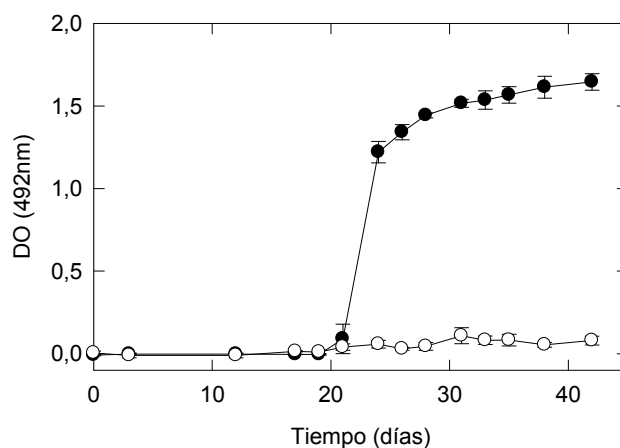


Figura 30. Efecto del HLF sobre el crecimiento de *D. bruxellensis* F11 en vino. Se inoculó vino blanco (cosecha 2006, corregido el etanol a 10% (v/v)) con 1 célula/ml de *D. bruxellensis* en ausencia (●) y presencia (○) de una concentración de 5,3 mg/ml de HLF. Los tratamientos fueron preparados por triplicado y los datos que se muestran corresponden a los valores medios de densidad óptica ± DE.

Como se puede observar en dicha figura, el hidrolizado fue capaz de inhibir completamente el crecimiento de *D. bruxellensis*, lo que sugiere su posible aplicación para el control de este alterante en vino.

Al igual que en los ensayos en vino realizados con LfcinB₁₇₋₃₁, se confirmó mediante análisis de restricción de la región ribosomal 5,8S-ITS que la especie de levadura presente en el ensayo era *D. bruxellensis* (datos no mostrados).

Capítulo 3. β -Glucanasas frente a levaduras alterantes de vino

La utilización de enzimas antimicrobianas es otra de las estrategias posibles para el control de microorganismos alterantes. En el proceso de vinificación, el empleo de enzimas es una práctica común que, realizada de forma racional, reporta numerosos beneficios a dicho proceso. En este contexto, la Organización Internacional de la Vid y el Vino (O.I.V.) ha autorizado el uso de la lisozima durante el proceso de vinificación, dada su actividad bacteriolítica frente a bacterias del ácido láctico. Sin embargo, no existe ninguna alternativa similar para el control de levaduras alterantes.

Debido a la composición de la pared celular de las levaduras (Figura 10), las quitinasas y β -glucanasas son consideradas como enzimas antifúngicas muy potentes. Además, existen preparados comerciales cuyo empleo en el proceso de vinificación ha sido autorizado para mejorar las etapas de clarificación, filtración y envejecimiento de los vinos y en los que la actividad β -glucanasa es una de las principales actividades enzimáticas presentes (van Rensburg y Pretorius, 2000). Por estos motivos, en este capítulo se plantea el empleo de este tipo de preparados enzimáticos como agentes antimicrobianos frente a levaduras alterantes de vino.

1. Sensibilidad de las levaduras alterantes frente al preparado enzimático Glucanex

Se seleccionó el preparado comercial Glucanex por ser un preparado rico en actividad β -glucanasa de amplio uso en bodega cuyos componentes principales son una endo- β -1,3-glucanasa, una exo- β -1,3-glucanasa, una exo- β -1,6-glucanasa y una β -glucosidasa inespecífica (Dubourdieu *et al.*, 1985). Se estudió el efecto del Glucanex sobre el crecimiento *in vitro* en GPY, de las 6 especies de levaduras empleadas a lo largo del presente trabajo.

Inicialmente se evaluó el efecto de la preparación enzimática a una concentración de 45 μ g/ml, que corresponde a la dosis recomendada por el fabricante para mejorar la filtración de los vinos elaborados con uvas

botritizadas, pero no mostró ningún efecto sobre el crecimiento de las levaduras alterantes. Sin embargo, dosis mayores, situadas en el intervalo entre 200 y 1000 $\mu\text{g/ml}$, mostraron diferente actividad inhibitoria dependiendo de la levadura evaluada (Tabla 20).

Tabla 20. Efecto del Glucanex sobre el crecimiento de las levaduras en GPY.

Levaduras	Inhibición del crecimiento (%) ^a					
	Glucanex ($\mu\text{g/ml}$)					
	200		500		1000	
<i>S. cerevisiae</i> T73	0,0 \pm 0,0	(A)	0,0 \pm 0,0	(A)	0,0 \pm 0,0	(A)
<i>Z. bisporus</i>	11,7 \pm 2,9	(BC)	72,0 \pm 2,4	(C)	83,8 \pm 2,4	(E)
<i>Z. bailii</i>	69,6 \pm 1,9	(D)	77,6 \pm 3,3	(C)	80,5 \pm 2,3	(D)
<i>P. membranifaciens</i>	1,2 \pm 2,0	(AB)	0,6 \pm 0,9	(A)	11,6 \pm 1,6	(B)
<i>D. bruxellensis</i>	77,5 \pm 1,5	(D)	79,8 \pm 0,8	(C)	84,7 \pm 1,4	(E)
<i>C. albidus</i>	15,6 \pm 14,9	(C)	13,8 \pm 10,0	(B)	67,0 \pm 1,4	(C)

^aLos datos están expresados como porcentaje de inhibición del crecimiento con respecto al control sin enzima y corresponden al valor de la media \pm DE de tres réplicas independientes. El análisis estadístico por columnas se muestra en letras mayúsculas. Los datos que poseen las mismas letras no difieren con un 95% de nivel de confianza (método LSD).

Las cepas más sensibles a la acción del Glucanex fueron *D. bruxellensis* y *Z. bailii*, mostrando porcentajes de inhibición del crecimiento superiores al 65%, en presencia de 200 $\mu\text{g/ml}$ del preparado enzimático. Sin embargo, esta dosis mostró un efecto inhibitorio leve sobre el crecimiento de *C. albidus*, *P. membranifaciens* y *Z. bisporus*, con porcentajes de inhibición inferiores al 15%. Al incrementarse la concentración de Glucanex se observó un ascenso gradual de actividad inhibitoria sobre las cepas *C. albidus* y *Z. bisporus*, sin embargo, en presencia de 1000 $\mu\text{g/ml}$ del preparado enzimático, la dosis más alta evaluada, el porcentaje de inhibición del crecimiento de la cepa

P. membranifaciens no superó el 12%, no detectándose inhibición en el caso de *S. cerevisiae*.

Las dos levaduras más sensibles a la acción antimicrobiana del preparado enzimático, *D. bruxellensis* y *Z. bailii*, fueron seleccionadas para caracterizar la actividad antifúngica del Glucanex. La Figura 31 muestra las curvas dosis-respuesta del preparado enzimático sobre el crecimiento *in vitro* en GPY de las dos levaduras *D. bruxellensis* y *Z. bailii*. Como se puede deducir de, los valores de IC₅₀ y MIC, la potencia del Glucanex fue similar para ambas.

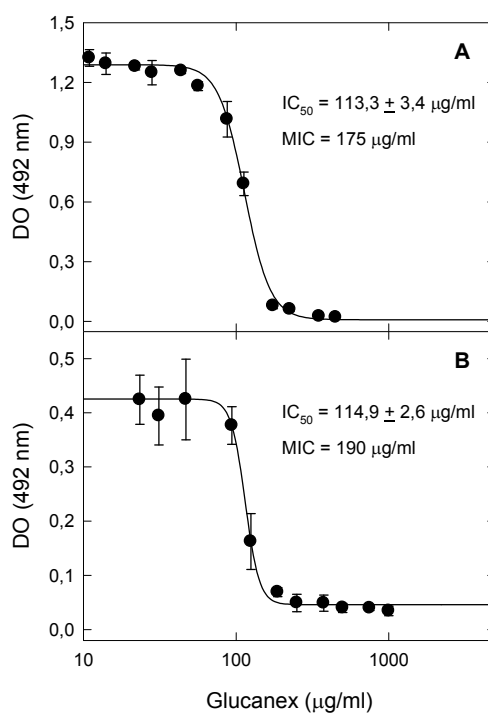


Figura 31. Efecto del preparado enzimático Glucanex sobre el crecimiento *in vitro* en medio GPY de *D. bruxellensis* (A) y *Z. bailii* (B). Se incubaron 5×10^5 células/ml con concentraciones crecientes de Glucanex hasta 1000 µg/ml. Los ensayos se llevaron a cabo por triplicado y los resultados muestran los valores medios de DO ± DE tras 24-26 h de incubación.

2. Aplicación del Glucanex en vino

Para evaluar la posible aplicación del Glucanex en vino, se diseñaron una serie de experimentos con el fin de caracterizar sus propiedades antimicrobianas en esta matriz. Estos ensayos se realizaron con las levaduras alterantes más sensibles en medio microbiológico, *D. bruxellensis* y *Z. bailii* y al igual que en capítulos anteriores, se incluyó *S. cerevisiae* debido a su relevancia en el proceso de vinificación.

La Figura 32 muestra los resultados de un experimento representativo de crecimiento de *D. bruxellensis* en vino blanco en presencia de diferentes concentraciones de Glucanex. Como se puede observar, en ausencia del preparado enzimático, esta levadura inició su crecimiento en vino 15 días después de la inoculación, alcanzando la fase estacionaria a los 25 días del inicio del experimento. Sin embargo, la presencia de concentraciones crecientes de Glucanex ocasionó un retraso progresivo del crecimiento de la levadura, más acusado al aumentar la concentración de preparado enzimático. Las dosis más bajas evaluadas (50 y 100 µg/ml) ocasionaron un retraso en el inicio del crecimiento de 3 y 9 días, respectivamente, respecto al control en ausencia del preparado enzimático. Al incrementar la concentración de Glucanex, en el intervalo 150-200 µg/ml, este retraso fue cada vez más acusado. En presencia de 300 µg/ml, no se detectó crecimiento de *D. bruxellensis* durante todo el experimento, que concluyó transcurridos 33 días de la inoculación.

Un experimento similar al comentado y representativo del efecto del Glucanex sobre el crecimiento de las levaduras *Z. bailii* y *S. cerevisiae* en vino se muestra en la Figura 33. Como se puede observar, ambas levaduras son capaces de aumentar su población en el vino más rápidamente que *D. bruxellensis*. Mientras que esta última levadura inició su crecimiento en vino transcurridos 15 días de la inoculación, en el caso de *Z. bailii* (panel A) y *S. cerevisiae* (panel B) el crecimiento es detectable tras 3 y 7 días, respectivamente.

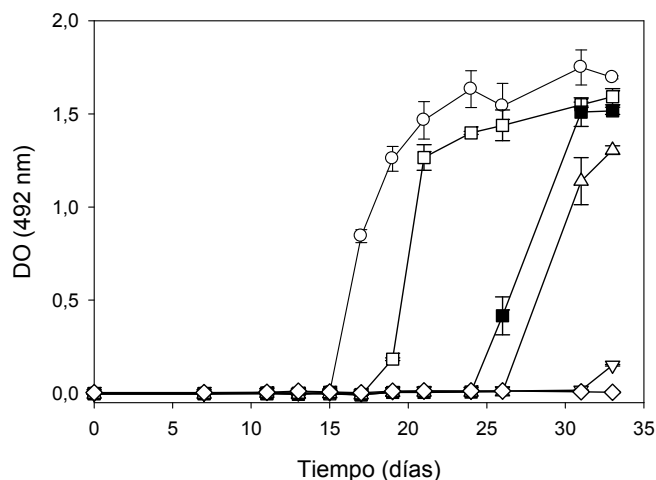


Figura 32. Efecto del preparado enzimático Glucanex sobre el crecimiento de *D. bruxellensis* en vino blanco. Se inoculó el vino con células de levadura, a una concentración inicial de 10^4 células/ml, en ausencia (○) o presencia de Glucanex. Las dosis empleadas de preparado enzimático fueron 50 (□), 100 (■), 150 (△), 200 (▽) y 300 $\mu\text{g/ml}$ (◇).

A efectos comparativos, tanto en la Figura 32 como en la Figura 33, se puede tomar como referencia la curva de crecimiento correspondiente a la dosis de Glucanex de 100 $\mu\text{g/ml}$ (■). Como se puede observar, la presencia de esta dosis de preparado enzimático en vino afectó de forma diferente a las tres levaduras estudiadas. La más sensible de todas ellas fue *D. bruxellensis*, dado que provocó un retraso en el inicio de su crecimiento de aproximadamente 10 días, mientras que en el caso de *Z. bailii* y *S. cerevisiae* este retraso fue tan solo de 3 y 2 días, respectivamente.

Para completar la caracterización del Glucanex se llevó a cabo un experimento en bodega con el fin de evaluar su efecto fungicida en vino en condiciones que pudieran aproximarse más a las reales. Se embotelló, manteniendo un espacio de cabeza reducido, vino blanco, al que se

inoculó *D. bruxellensis* o *Z. bailii* en ausencia y presencia de 500 $\mu\text{g/ml}$ de Glucanex. Se incluyó como control vino embotellado sin inocular, con y sin adición del preparado enzimático.

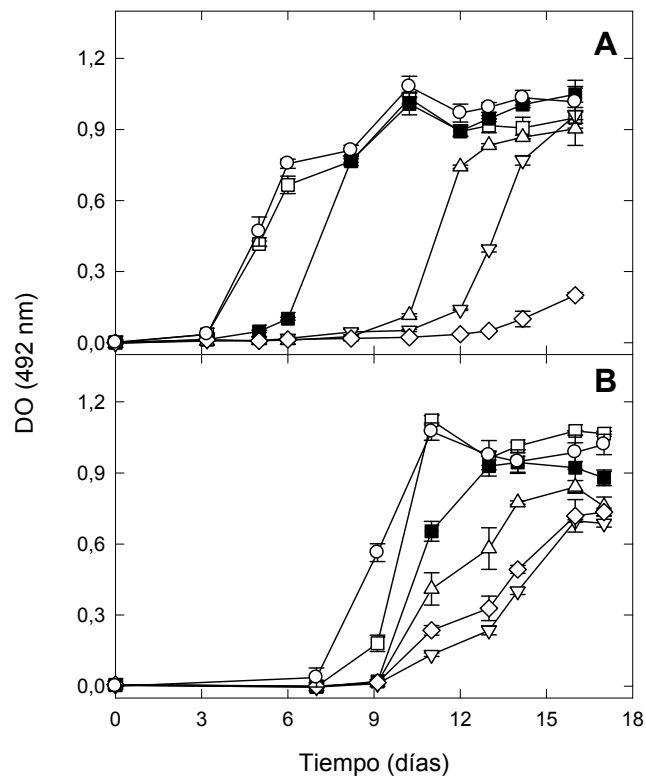


Figura 33. Efecto del preparado enzimático Glucanex sobre el crecimiento de *Z. bailii* (A) y *S. cerevisiae* (B) en vino. Se inoculó el vino con células de levadura, a una concentración inicial de 10^4 células/ml, en ausencia (○) o presencia de Glucanex. Las dosis empleadas de preparado enzimático fueron 45 (□), 100 (■), 250 (△), 350 (▽) y 450 $\mu\text{g/ml}$ (◇).

Con el fin de evaluar el efecto antimicrobiano del Glucanex, el crecimiento de las levaduras se siguió mediante medidas periódicas de impedancia eléctrica indirecta. Bajo estas condiciones experimentales

únicamente *Z. bailii* fue capaz de crecer. En el caso de *D. bruxellensis*, y a pesar de que el experimento se prolongó durante 60 días, no se detectó crecimiento a lo largo del mismo. Este hecho pudo deberse tanto al limitado espacio de cabeza de las botellas de vino empleadas, como también a la presencia de niveles mayores de SO₂ en este vino (35 mg/l), respecto al empleado en los ensayos representados en la Figura 32 y en la Figura 33 (4 mg/l).

La Figura 34 muestra un experimento representativo de los cambios de impedancia eléctrica detectada en vinos inoculados con *Z. bailii*. En el caso de los vinos sin inocular (panel A), no se observó variación significativa de la impedancia eléctrica a lo largo del experimento. En aquellos vinos inoculados con *Z. bailii*, transcurrido 1 día, la medida de impedancia permitió detectar la presencia de la levadura, pero no se observaron diferencias significativas entre las muestras en ausencia y presencia de Glucanex (panel B). Sin embargo, tras 15 días y hasta el final del experimento (60 días), únicamente se detectó crecimiento en los vinos a los que no se había adicionado Glucanex (panel C). Estos resultados sugieren que la presencia de Glucanex en los vinos provoca una eliminación o reducción muy significativa de células viables de *Z. bailii* en los mismos.

De forma paralela, en aquellos muestreos en los que se observaron diferencias de impedancia eléctrica entre las muestras tratadas y sin tratar con Glucanex, se llevó a cabo un recuento en placa, cuyos resultados se muestran en la Tabla 21.

En las muestras sin tratar con Glucanex el resultado promedio de los recuentos en placa a lo largo del experimento fue de 10⁴ ufc/ml, alcanzando un máximo de población de 5x10⁴ ufc/ml tras 45 días del inicio del mismo. La presencia de Glucanex provocó una reducción significativa de la viabilidad celular de *Z. bailii*, tal y como mostraban los resultados previos de impedancia.

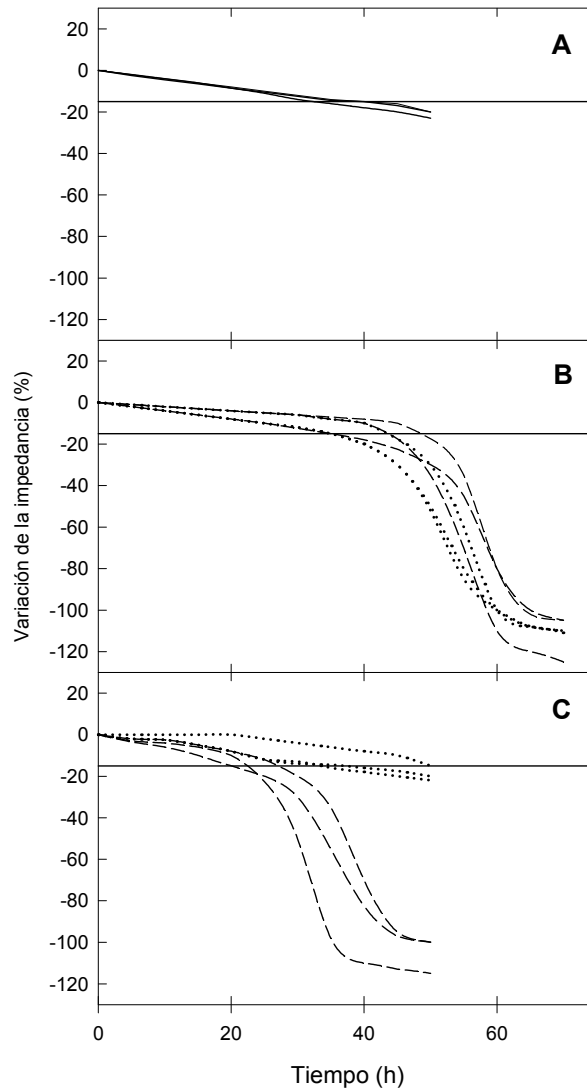


Figura 34. Variación de la impedancia en los vinos tratados y sin tratar con Glucanex. Panel A: Vinos sin inocular. Panel B: Vinos inoculados con *Z. bailii* (10^4 células/ml) tras 1 día de crecimiento en presencia (líneas de puntos) o ausencia (líneas discontinuas) de 500 $\mu\text{g/ml}$ de Glucanex. Panel C: Vinos inoculados con *Z. bailii* (10^4 células/ml) tras 45 días de crecimiento en presencia (líneas de puntos) o ausencia (líneas discontinuas) de 500 $\mu\text{g/ml}$ de Glucanex.

Tabla 21. Efecto del Glucanex sobre el crecimiento de *Z. bailii* en vino embotellado.

Tiempo (días)	Unidades formadoras de colonia (ufc)/ml ^a	
	Control	Glucanex ^b
15	11400 ± 3400	380 ± 490
30	8900 ± 3500	90 ± 70
45	47000 ± 14400	35 ± 60 ^c
60	28400 ± 11600	300 ± 520 ^c

^aLos tratamientos fueron preparados por triplicado y los datos que se muestran corresponden al valor medio de los recuentos en placa (ufc/ml) ± DE.

^bLa concentración de Glucanex empleada fue 500 µg/ml.

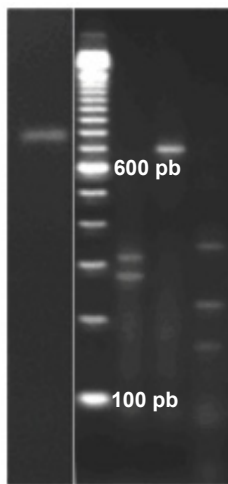
^cÚnicamente se detectaron células viables en una de las tres réplicas.

Además, en los recuentos en placa realizados tras 45 y 60 días del inicio del experimento, la viabilidad celular alcanzó valores indetectables en dos de las tres réplicas llevadas a cabo. Estos resultados sugieren que el efecto antimicrobiano del Glucanex frente a *Z. bailii* en vino podría deberse, al menos en parte, a una actividad fungicida.

De nuevo en este experimento se confirmó mediante análisis de la región ribosomal 5,8S-ITS que la especie de levadura presente en las muestras al finalizar el mismo era *Z. bailii* (Figura 35).

Comprobada la capacidad antimicrobiana del Glucanex, se evaluó su efecto sobre los principales parámetros enológicos de los vinos obtenidos. En la Tabla 22 se recogen dichos parámetros tanto para los vinos control como los contaminados con *Z. bailii* en presencia y ausencia de Glucanex. Como se puede observar, la adición del preparado enzimático en los vinos control (no inoculados) tuvo un efecto mínimo sobre los parámetros enológicos determinados, que consistieron en un modesto incremento de la acidez total y los niveles de etanol. En el caso de los vinos inoculados con *Z. bailii* sin adición de Glucanex, el crecimiento

de la levadura se reflejó en un descenso de los niveles de azúcares reductores y un aumento del contenido en etanol. Así mismo se detectó un ligero incremento en la acidez volátil y total de los vinos obtenidos. Sin embargo, los vinos inoculados con *Z. bailii* y con adición de preparado enzimático mostraron unos niveles de azúcares reductores y etanol similares a los de los vinos no inoculados, lo que indica el efecto antifúngico del Glucanex.



1 2 3 4 5

Figura 35. Identificación mediante un análisis de restricción de la región ribosomal 5,8S-ITS de la especie *Z. bailii*. La muestra (1) corresponde al amplificado de dicha región y las (3), (4) y (5) a los fragmentos generados por la digestión de dicho amplificado con *CfoI*, *HaeIII* y *HinfI*, respectivamente. La muestra (2) corresponde al marcador de escalera de DNA de 100 pb.

Estos resultados indican que el Glucanex podría ser una alternativa para el control de contaminaciones provocadas por *Z. bailii* en la industria vinícola. De esta forma, se otorga una aplicación adicional a los preparados enzimáticos ricos en β -glucanasas, dado que se ha demostrado su capacidad para inhibir el crecimiento de determinadas levaduras alterantes de vino.

Tabla 22. Efecto de la contaminación con *Z. bailii* y el tratamiento con Glucanex sobre parámetros enológicos del vino^a.

	Vino no inoculado		Vino inoculado con <i>Z. bailii</i>	
	Control	Glucanex ^c	Control	Glucanex ^c
pH	3,02 ± 0,02 (b)	3,02 ± 0,01 (b)	3,00 ± 0,01 (a)	3,02 ± 0,01 (b)
Acidez Volátil (g/l)	0,22 ± 0,03 (bc)	0,20 ± 0,02 (b)	0,25 ± 0,01 (c)	0,16 ± 0,00 (a)
Acidez Total (g/l)	5,30 ± 0,10 (b)	5,50 ± 0,00 (c)	5,87 ± 0,10 (d)	5,07 ± 0,12 (a)
Azúcares Red. (g/l)	21,00 ± 0,60 (b)	21,13 ± 0,58 (b)	17,33 ± 0,61 (a)	20,73 ± 0,31 (b)
Etanol (%) (v/v)	10,60 ± 0,03 (a)	10,74 ± 0,06 (b)	10,90 ± 0,06 (c)	10,56 ± 0,06 (a)

^aLos datos corresponden al valor medio ± DE de la medida de tres réplicas independientes de cada tratamiento. Los parámetros se determinaron tras 60 días de tratamiento. El análisis de separación de valores (método LSD) de cada parámetro (filas) se muestra en letras (95% de nivel de confianza).

^bLa concentración inicial de inóculo de *Z. bailii* fue 10⁴ células/ml.

^cLa concentración de Glucanex empleada fue 500 µg/ml.

Discusión

Los riesgos de contaminación microbiana son constantes a lo largo del proceso de vinificación y pueden provocar alteraciones tanto de la calidad organoléptica como del estado sanitario del vino, llegando incluso a hacerlo no apto para el consumo. Los principales microorganismos alterantes incluyen especies de diversos géneros de levadura (*Dekkera*, *Zygosaccharomyces*, *Pichia*, *Hanseniaspora* y *Candida*, entre otros), algunos géneros de bacterias lácticas (*Lactobacillus*, *Leuconostoc* o *Pediococcus*) y los géneros de bacterias acéticas *Acetobacter* y *Gluconobacter*.

Tradicionalmente, las principales contaminaciones microbianas de los vinos eran de origen bacteriano (Boulton *et al.*, 1996; Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006; Sponholz, 1993). Sin embargo, los avances en la tecnología del vino, así como la mejora en las normas que garantizan la calidad del producto han conducido a la práctica extinción de este tipo de contaminaciones. Por el contrario, en los últimos años, las alteraciones producidas por levaduras han adquirido una importancia creciente, tanto en la industria del vino, como en el resto de la industria alimentaria (Thomas, 1993). Esto es debido a la gran variedad de nuevas formulaciones de alimentos y bebidas así como a la aplicación de procesos menos severos (Fleet, 1999; Loureiro y Querol, 1999).

No existe una legislación estricta en cuanto a niveles máximos permitidos de levaduras y bacterias en vino. La O.I.V., como autoridad reguladora que incluye a la mayoría de los países productores, no define un nivel máximo de contaminación microbiana. La única condición es mantener una apariencia clara de la botella, lo que supone una carga microbiana inferior a 10^4 - 10^5 ufc/ml (en vinos blancos) para levaduras que producen sedimentos, o menor de 10^2 - 10^3 ufc/ml para levaduras floculantes (Loureiro y Malfeito-Ferreira, 2003a). Esta generalización no es extensible a especies del género *Dekkera/Brettanomyces*, debido a la problemática asociada a la producción de 4-etilfenol (Chatonnet *et al.*,

1992), ni a la especie *Z. bailii*, ya que unas pocas células viables pueden ser suficientes para causar alteración (Deak y Beuchat, 1996).

Ante esta situación, cada bodega establece los niveles máximos de levaduras y bacterias aceptables en sus vinos, más restrictivos que los recomendados por la O.I.V.. De hecho, en el caso de las levaduras un estudio realizado en distintas bodegas concluye que para vinos con más de 5 g/l de azúcar residual se aceptaría un máximo de 2 ufc/250 ml, mientras que en vinos secos blancos y tintos se permitirían de 5 a 15 ufc/100 ml. En el caso de vinos que se consumen rápidamente, se admitirían niveles de hasta 100 ufc/ml. En la práctica, cuando los vinos superan estos valores, se conservan durante un tiempo prolongado valorando su evolución o se someten a un reprocesado (Loureiro y Malfeito-Ferreira, 2003a). Por lo que se refiere a bacterias, niveles inferiores a 30 ufc/100 ml resultan aceptables para las bodegas (Martínez *et al.*, 2004).

Las contaminaciones microbianas provocan anualmente pérdidas muy significativas en la industria vinícola. En concreto, en 2008 este tipo de contaminaciones dio lugar a la retirada de un 5,9% del total de botellas manufacturadas (Goode y Harrop, 2008). Destaca la especial incidencia de los denominados vinos “brett”, alterados por el crecimiento de *Dekkera*, cuyo porcentaje se incrementó desde el 10,6% en 2006 hasta un 15,8% en 2008. En el caso de otras levaduras, como *Z. bailii* y *S. cerevisiae*, alterantes de vinos embotellados con azúcar residual, su incidencia en bodega es menor aunque sus efectos, entre los que se incluyen la producción de gas, sedimentos y velos, no deben menospreciarse (Loureiro y Malfeito-Ferreira, 2003a; Zumárraga y Barbero, 2009).

Para paliar esta problemática, el uso del anhídrido sulfuroso es habitual en las bodegas, aunque este tratamiento no es totalmente eficaz debido a la resistencia que presentan las levaduras alterantes (Fleet, 1990; Heard y Fleet, 1998; Romano y Suzzi, 1993). Concretamente, *Z. bailii*, tolera niveles elevados de SO₂ total (de hasta 300 mg/l) (Thomas y

Davenport, 1985) y en el caso de *D. bruxellensis*, un estudio realizado sobre las características fisiológicas de 35 cepas de esta especie concluyó que el 49% crecían con concentraciones de SO₂ total superiores a 100 mg/l y a pH 3,4, llegando incluso a tolerar 150 mg/l (Conterno *et al.*, 2006). El control de *S. cerevisiae*, cuando actúa como alterante, también es complicado ya que resiste concentraciones relativamente elevadas de SO₂ total (de hasta 240 mg/l) como resultado de una exposición continua a este conservante (Chang *et al.*, 1997; du Toit y Pretorius, 2000).

Respecto a las bacterias lácticas, aunque en términos generales son más sensibles al sulfuroso, también se han descrito especies resistentes pertenecientes a los géneros *Lactobacillus* y *Pediococcus*. Un estudio realizado con 146 cepas pertenecientes a diversas especies de bacterias lácticas demostró la capacidad de todas ellas para crecer en presencia de 64 mg/l de SO₂ total, resultando ser las cepas de *Pediococcus parvulus* o las especies del género *Lactobacillus* más tolerantes a este conservante químico que las cepas de *O. oeni* evaluadas (Davis *et al.*, 1988). Las bacterias acéticas, por su parte, son más resistentes a la acción del sulfuroso y algunas especies del género *Acetobacter* sólo se inhiben a concentraciones superiores a las empleadas actualmente en bodega (Hidalgo, 2003; Joyeux *et al.*, 1984a; Romano y Suzzi, 1993). Es necesario recordar que las dosis de SO₂ empleadas habitualmente en bodega están en torno a 100 mg/l, y el nivel máximo de SO₂ total que, según la legislación, se permite en los vinos oscila entre 160 mg/l en el caso de tintos y 210 mg/l para blancos y rosados.

Resulta evidente pues que el empleo del sulfuroso en vinificación no es totalmente eficaz para controlar alteraciones microbianas, hecho que se agravaría si se redujera su concentración atendiendo a las preferencias actuales del consumidor. Por este doble motivo se están buscando alternativas naturales y eficaces para sustituir o reducir el empleo de este conservante en enología.

Ante esta situación, el presente trabajo plantea dos alternativas: el empleo de péptidos y enzimas con capacidad antimicrobiana. El motivo de elegir estas dos alternativas, se basa en los diferentes mecanismos de acción asociados a cada una de ellas.

1. Identificación de péptidos PAF frente a levaduras alterantes de vino

En trabajos anteriores dirigidos a la identificación de pequeños péptidos con actividad específica frente a hongos fitopatógenos, se demostró que el hexapéptido PAF19 (Ac-rktwfw-NH₂) inhibía el crecimiento *in vitro* de cepas de *Penicillium italicum*, *P. digitatum* y *Botrytis cinerea* (López-García *et al.*, 2000). Posteriormente, utilizando este péptido como guía se obtuvo una serie de 12 D-hexapéptidos (PAF25-36) con potencial actividad antifúngica frente a *P. digitatum*, que también fueron ensayados contra microorganismos no diana como la cepa de laboratorio *S. cerevisiae* W303-1A y *E.coli* DH5α (López-García *et al.*, 2002). En concreto, PAF26 (Ac-rkkwfw-NH₂) destacó por la combinación óptima de potencia antifúngica frente a hongos filamentosos y especificidad de acción, ya que presentó una escasa actividad *in vitro* contra *S. cerevisiae* W303-1A. Por otra parte, PAF34 (Ac-rkwfw-NH₂) mostró un comportamiento inverso, y fue marcadamente más activo contra *S. cerevisiae* W303-1A que PAF26. En este mismo trabajo se comprobó que la combinación de varios de estos péptidos, como son PAF19, PAF26, PAF32 y PAF34 no provocaba un efecto sinérgico, observándose únicamente un efecto aditivo entre ellos, lo que sugiere que actúan sobre la misma diana celular (López-García *et al.*, 2002).

Debido a su actividad antifúngica y especificidad, esta serie de péptidos PAF se evaluó frente a levaduras alterantes de vino. También en este caso se requiere que los péptidos demuestren tanto actividad como especificidad de acción, debido a que en el proceso de vinificación intervienen microorganismos beneficiosos, como *S. cerevisiae*, encargada de llevar a cabo la fermentación alcohólica, y cuya viabilidad no debe verse

afectada si los péptidos antimicrobianos se emplean en esta etapa del proceso.

En términos generales, los ensayos de actividad antimicrobiana *in vitro* llevados a cabo con los péptidos PAF en este trabajo (Tabla 23), demostraron que todos ellos poseían menor toxicidad frente a la cepa vínica de *S. cerevisiae* que frente al resto de especies de levadura evaluadas, siendo las más sensibles a su acción *Z. bailii*, *D. bruxellensis* y *Z. bisporus* (Tabla 14). En nuestras condiciones de ensayo no observamos diferencias significativas entre PAF26 y PAF34 frente a *S. cerevisiae*, contrariamente a lo descrito frente a *S. cerevisiae* W303-1A (López-García *et al.*, 2002). La resistencia relativa de *S. cerevisiae* a la acción antimicrobiana de los péptidos PAF no es un caso aislado en el ámbito de los AMP de pequeño tamaño. En concreto, la cepa de laboratorio *S. cerevisiae* SU-50, también demostró una menor sensibilidad al péptido antimicrobiano MB-21 que la cepa de *Z. bailii* NCYC 563 (Bom *et al.*, 2001).

Tabla 23. Secuencias de los péptidos PAF usados en este estudio.

Péptido	Secuencia ^a
PAF25	Ac-rkfwfw-NH ₂
PAF26	Ac-rkkwfw-NH ₂
PAF29	Ac-rkrwfw-NH ₂
PAF31	Ac-rkwfwfw-NH ₂
PAF32	Ac-rkwhfw-NH ₂
PAF33	Ac-rkwkfw-NH ₂
PAF34	Ac-rkwlfw-NH ₂
PAF36	Ac-rkwrwfw-NH ₂

^aEl código de colores que se utiliza en los distintos residuos es el descrito en la Tabla 9.

Los péptidos más activos resultaron ser PAF36 (Ac-rkwrfw-NH₂) y PAF26, con una potencia antimicrobiana muy similar (Tabla 15). Los valores de IC₅₀ oscilaron entre 1,7 y 12,6 µM y los de MIC entre 4 y 16 µM. Por lo que se refiere a la potencia antimicrobiana de PAF26, ésta resultó ser ligeramente superior frente a las tres levaduras más sensibles, *D. bruxellensis*, *Z. bailii* y *Z. bisporus* (IC₅₀ 2,4-9 µM), que frente a hongos fitopatógenos (IC₅₀ 11-45 µM). A pesar de que la cepa vínica de *S. cerevisiae* evaluada en este trabajo resultó ser la más resistente de todas las especies de levaduras testadas, fue más sensible frente a PAF26 (IC₅₀=12,2 µM) que la cepa de laboratorio *S. cerevisiae* W303-1A evaluada anteriormente (IC₅₀ > 80 µM) (López-García *et al.*, 2002), lo que sugiere un efecto de la cepa de levadura en la acción antimicrobiana del AMP, tal y como se discute más adelante. Estas observaciones deben tomarse con cautela ya que las condiciones de crecimiento de los microorganismos y de aplicación de los péptidos son específicas de cada estudio.

Los factores clave en la actividad de los hexapéptidos PAF son su composición en aminoácidos pero también el orden de éstos dentro de la molécula. Esto ya había sido demostrado previamente con hongos filamentosos (López-García *et al.*, 2002) y ha sido confirmado en nuestro trabajo. Prueba de ello, como ya hemos comentado, es el caso del péptido PAF36, que posee un residuo de triptófano en posición 3 (siempre desde el extremo N terminal), que comparte con los péptidos PAF31-34, y un residuo catiónico, arginina, en posición 4 (Tabla 23). PAF36 es el péptido con mayor potencia antimicrobiana de todos ellos, lo que sugiere que es el residuo de arginina, en el marco de esta colección de D-hexapéptidos, el responsable de esta mayor actividad (Figura 36). Este residuo de arginina también fue fundamental en la mayor actividad antimicrobiana de PAF36 frente a *E. coli* DH5α, en comparación con PAF33 que posee un residuo de lisina en dicha posición 4 (López-García *et al.*, 2002). En este mismo trabajo previo también se observó un distinto perfil de actividad para los péptidos PAF32 y PAF34, con idéntica secuencia de aminoácidos a excepción del residuo en posición 4, que correspondía a histidina y leucina,

respectivamente. PAF32 mostró una actividad muy leve frente a *S. cerevisiae* W303-1A, mientras que esta misma levadura fue mucho más susceptible a la acción de PAF34 (López-García *et al.*, 2002).

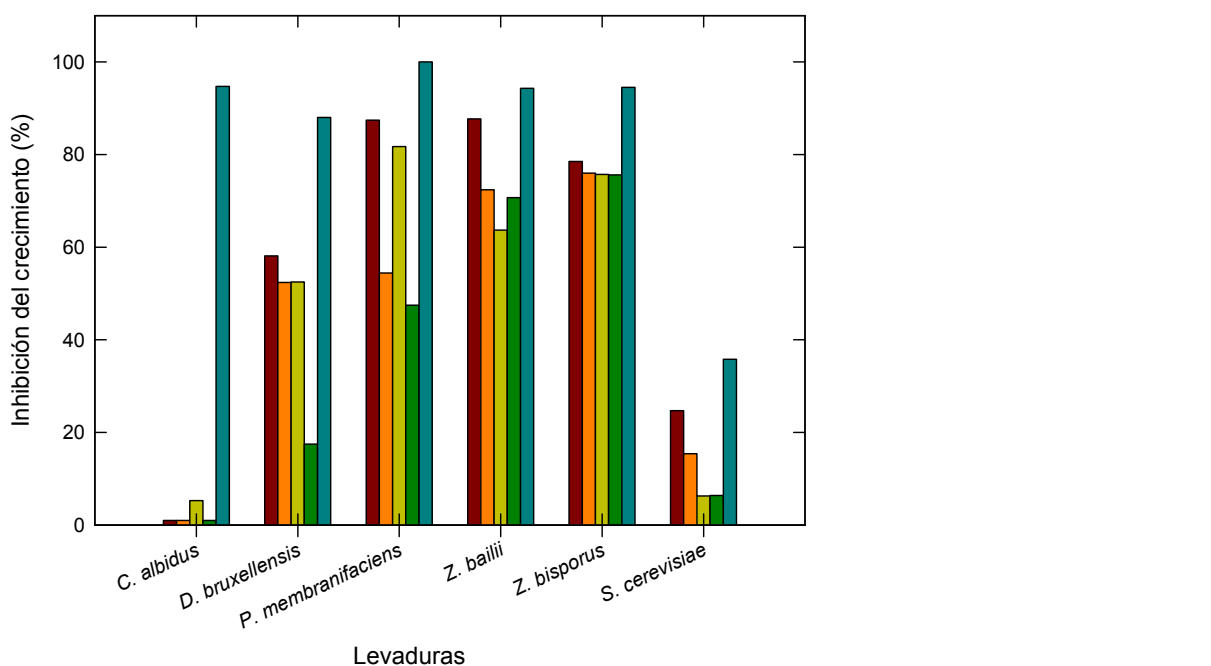


Figura 36. Propiedades antimicrobianas *in vitro* de los D-hexapéptidos PAF que poseen un residuo triptófano en posición 3 y un residuo variable en posición 4, que se indica entre paréntesis: PAF31 (F; ■), PAF32 (H; ■), PAF33 (K; ■), PAF34 (L; ■) y PAF36 (R; ■), frente a las levaduras alterantes de vino. Los datos mostrados indican inhibición del crecimiento, expresado en porcentaje, a una dosis de péptido de 16 μ M.

Las similitudes de secuencia de los péptidos PAF permiten también evaluar el efecto de la posición de determinados residuos de aminoácidos en la actividad antimicrobiana de estos péptidos. Las parejas de péptidos PAF25 (rkfwfw) y PAF31 (rkwwfw), y PAF29 (rkrfwfw) y PAF36 (rkwwfw), muestran permutaciones de los residuos en las posiciones 3 y 4. Los

resultados obtenidos en nuestro trabajo demuestran que PAF31 posee una actividad antimicrobiana *in vitro* similar (frente a *P. membranifaciens* y género *Zygosaccharomyces*) o superior (en el caso de *C. albidus*, *D. bruxellensis* y *S. cerevisiae*) a PAF25. Respecto a la segunda pareja de péptidos, el péptido con mayor actividad antimicrobiana *in vitro* fue PAF36. Por tanto, en ambas parejas de péptidos, el PAF que poseía un residuo de triptófano en posición 3 exhibía mayor potencia antimicrobiana que el que tenía este residuo en posición 4. Sin embargo, en el caso de hongos fitopatógenos la pareja de péptidos PAF25 y PAF31 mostraron similares propiedades antifúngicas (López-García *et al.*, 2002).

Por otro lado, nuestros resultados también subrayan la importancia del microorganismo diana en la potencia antimicrobiana de los AMP. Esto resulta obvio observando el caso de PAF25, PAF26 y PAF29, todos ellos con la misma secuencia de aminoácidos a excepción del residuo situado en posición 3, correspondiente a fenilalanina, lisina y arginina, respectivamente (Tabla 23). Sin embargo, el perfil relativo de actividad *in vitro* de estos péptidos fue diferente dependiendo de la levadura alterante evaluada, como se puede observar en la Figura 37. Estos resultados indican que, si bien la secuencia peptídica y la posición de determinados residuos es crítica a la hora de determinar la potencia antimicrobiana, también existen en el microorganismo diana factores específicos que modulan su susceptibilidad y por tanto afectan a la actividad final de un péptido.

También en otros AMP ricos en arginina y triptófano, similares a los péptidos PAF evaluados en este trabajo, se ha demostrado que el apropiado ordenamiento y agrupamiento de determinados residuos es fundamental en su actividad y especificidad, y probablemente reflejan características estructurales críticas (Cherkasov *et al.*, 2009; Wessolowski *et al.*, 2004). Por ejemplo, en un estudio reciente en el que se han utilizado herramientas de inteligencia artificial para el diseño de AMP asistido por ordenador, se han analizado 100.000 nonapéptidos “virtuales” para identificar los péptidos antibacterianos HHC-10 (KRWWKWIRW) y HHC-36

(KRWWKWWRR) -de secuencia marcadamente similar a nuestros PAFs-, demostrando también que péptidos de composición muy similar pero de diferente secuencia (estructura primaria) eran completamente inactivos (WVKVWKYTW ó WVRVYRYW) (Cherkasov *et al.*, 2009). Cabe destacar que éstos últimos cumplen con las características genéricas de carga catiónica, hidrofobicidad y anfipaticidad que son generales en la mayoría de AMP.

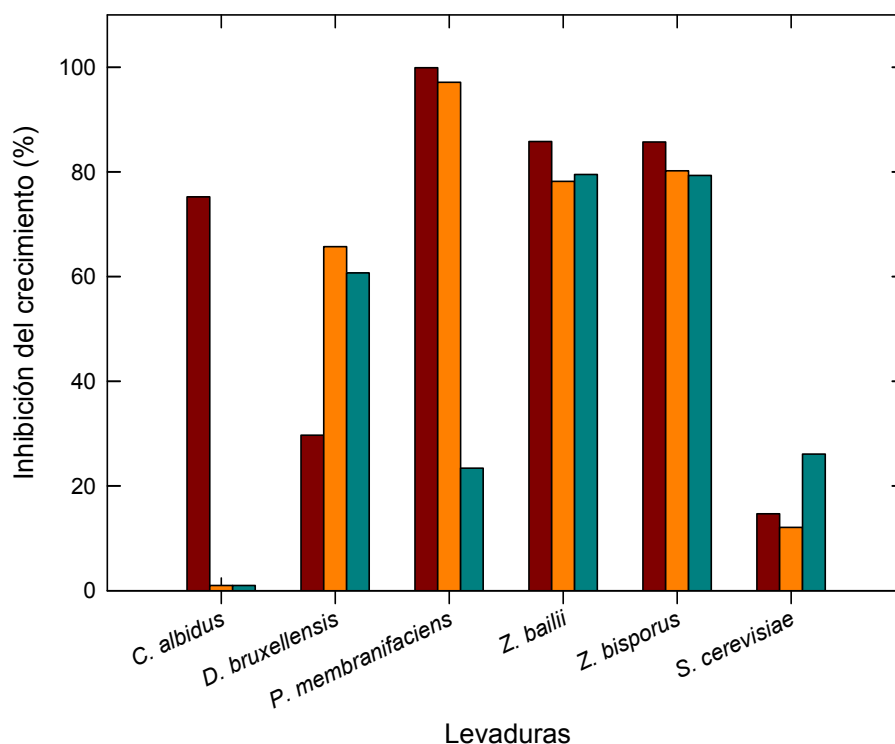


Figura 37. Propiedades antimicrobianas *in vitro* de los D-hexapéptidos PAF que poseen un residuo triptófano en posición 4 y un residuo variable en posición 3, que se indica entre paréntesis: PAF25 (F; ■), PAF26 (K; ■) y PAF29 (R; ■) frente a las levaduras alterantes de vino. Los datos indican inhibición del crecimiento, expresado en porcentaje, empleando una dosis de péptido de 16 μ M.

Otro ejemplo es el estudio llevado a cabo con el péptido RRWWRF (Wessolowski *et al.*, 2004). Modificando la posición de los aminoácidos y sintetizando análogos cíclicos, se subrayó la importancia tanto de la conformación espacial como del adecuado ordenamiento de los residuos aromáticos que permiten la formación de regiones hidrofóbicas favorables para la actividad antimicrobiana y selectividad de los AMP. Respecto a otros péptidos ricos en arginina, como Bac2A (RLARIVVIRVAR), se ha demostrado que su actividad frente a *Pseudomonas aeruginosa* no depende únicamente de la composición en aminoácidos, de la carga neta o de la hidrofobicidad de los AMP, sino que también requiere un patrón característico de la secuencia lineal de aminoácidos (Hilpert *et al.*, 2006).

1.1. Efecto de la estereoisomería

El escrutinio de péptidos PAF que nos permitió la selección de PAF36 y PAF26 se llevó a cabo con péptidos sintetizados con D-aminoácidos. Aunque los péptidos D son mucho más estables a la degradación proteolítica que los sintetizados con aminoácidos L (Blondelle y Houghten, 1996; Miller *et al.*, 1995), el empleo de este tipo de péptidos tiene como principal inconveniente su elevado coste, debido a que únicamente pueden ser obtenidos mediante síntesis química. Por esta razón incluimos en la caracterización posterior los correspondientes isómeros ópticos, PAF26L y PAF36L, sintetizados con L-aminoácidos que permiten abordar estrategias de producción biotecnológica, y que incluso obtenidos por síntesis son considerablemente más económicos que las formas D. Algunos estudios han demostrado que este tipo de AMP cortos no presentan diferencias significativas de actividad cuando son sintetizados con los isómeros D- o L-. Tal es el caso de los péptidos derivados de cecropina A, magainina 2 amida y melitina frente a especies representativas de bacterias Gram positivas y Gram negativas (Wade *et al.*, 1990). Este hecho sugiere un modo de interacción no quirál con los microorganismos.

Este trabajo nos permite comparar la actividad antimicrobiana de PAF26 y PAF36 sintetizados con D- y L-aminoácidos. Los valores correspondientes de IC₅₀ y MIC para cada pareja de isómeros están en el rango micromolar, pero en todos los casos son ligeramente superiores para los L-hexapéptidos, debido probablemente a una mayor susceptibilidad a la degradación por las proteasas presentes en el medio de cultivo que los D-hexapéptidos. Esta diferente susceptibilidad a la proteólisis también se señaló en el caso de la pareja de isómeros del péptido PAF19 (López-García *et al.*, 2000). Las curvas de inhibición del crecimiento de *P. digitatum*, empleando una dosis 50 µM, indicaban una mayor sensibilidad a PAF19D, pero únicamente a tiempos de incubación largos (superiores a 48 h). A tiempos cortos, la actividad de ambos estereoisómeros era muy similar, y la mayor actividad aparente del D-hexapéptido a tiempos largos sería un reflejo de la degradación parcial que se observó para el péptido sintetizado con L-aminoácidos. Este hecho, que inicialmente puede parecer contraproducente desde el punto de vista de una aplicación práctica, supone en realidad una ventaja que refleja la biocompatibilidad (biodegradabilidad) de estrategias de control basadas en péptidos antimicrobianos, siempre y cuando se pudiese conseguir el balance adecuado entre la potencia de la actividad y la pérdida gradual de la misma motivada por la degradación.

Como consecuencia del enfoque práctico otorgado al trabajo, se ha intentado conocer el comportamiento de los péptidos antimicrobianos en el vino, como matriz alimentaria de posible aplicación. Los ensayos en vino llevan inherentes la evaluación de la hidrólisis de los péptidos antimicrobianos por las proteasas presentes en el mismo, hecho por el que se obviaron los ensayos de degradación proteolítica *in vitro*. Aún así, es necesario mencionar que el contenido en proteasas con actividad hidrolítica en el vino es reducido. Aquellas procedentes de la uva se inhiben en presencia de etanol (Cordonnier y Dugal, 1968), mientras que del conjunto de proteasas secretadas por *S. cerevisiae* únicamente la proteasa A vacuolar es activa al pH del vino (Pretorius, 2000).

2. Péptidos derivados de LfcinB frente a microorganismos alterantes de vino

2.1. LfcinB₁₇₋₃₁ como antifúngico

Por lo que se refiere al segundo grupo de péptidos evaluados en este trabajo, los péptidos derivados de LfcinB, cabe destacar que la actividad de LfcinB₁₇₋₃₁ (₁₇FKCRRWQWRMKKLGA₃₁) y LfcinB₂₀₋₂₅ (₂₀RRWQWR₂₅) se caracterizó por ser dependiente del microorganismo diana (Tabla 14), tal y como habíamos descrito para los péptidos PAF. Además, en términos generales, la actividad de LfcinB₁₇₋₃₁ fue superior o similar a la correspondiente a LfcinB₂₀₋₂₅, excepto en el caso de *P. membranifaciens*, como ya se había demostrado frente a *P. digitatum* (Muñoz y Marcos, 2006). Conviene recordar que el hexapéptido es el motivo mínimo con actividad antimicrobiana de LfcinB (Schibli *et al.*, 1999; Tomita *et al.*, 1994).

Al igual que ocurrió en la evaluación de los péptidos PAF, las tres levaduras más sensibles a la acción de LfcinB₁₇₋₃₁ fueron *D. bruxellensis*, *Z. bailii* y *Z. bisporus*. El hecho de que LfcinB₁₇₋₃₁ sea el péptido más efectivo frente a *D. bruxellensis* y *Z. bisporus*, por encima incluso de los D-hexapéptidos, resulta relevante para su posible aplicación en vinificación, dado su origen natural. En este contexto la comparación de su potencia antifúngica con la de PAF26L y PAF36L se muestra en la Figura 38. De nuevo remarcar que *S. cerevisiae* fue la especie más resistente a la acción de LfcinB₁₇₋₃₁, aunque en este caso y contrariamente a lo que ocurre con *D. bruxellensis* y *Z. bisporus*, LfcinB₁₇₋₃₁ es menos potente que los péptidos PAF, lo que demuestra su mayor especificidad. Un valor muy similar de IC₅₀ al que hemos determinado para la cepa vínica de *S. cerevisiae* (IC₅₀= 27 µM), fue descrito para la cepa de laboratorio FY1679 (IC₅₀= 28 µM) (Muñoz y Marcos, 2006).

Nuestro trabajo ha confirmado que la efectividad de los AMP es dependiente de especie. En el caso de LfcinB₁₇₋₃₁ y *D. bruxellensis* esta

actividad también varía con la cepa (Tabla 17). Este hecho es de gran relevancia práctica, ya que no permite generalizar las conclusiones obtenidas para una determinada especie a sus distintas cepas. En el caso concreto de la especie *D. bruxellensis*, se han aislado un número elevado de cepas contaminantes en vino (Campolongo *et al.*, 2010; Curtin *et al.*, 2007; Martorell *et al.*, 2006), con diferente capacidad de producción de fenoles volátiles (Fugelsang y Zoecklein, 2003; Silva *et al.*, 2005). Sin embargo es necesario destacar que el péptido fue efectivo frente a todas las cepas evaluadas, con valores de IC₅₀ en el rango 1,8-13,2 µM.

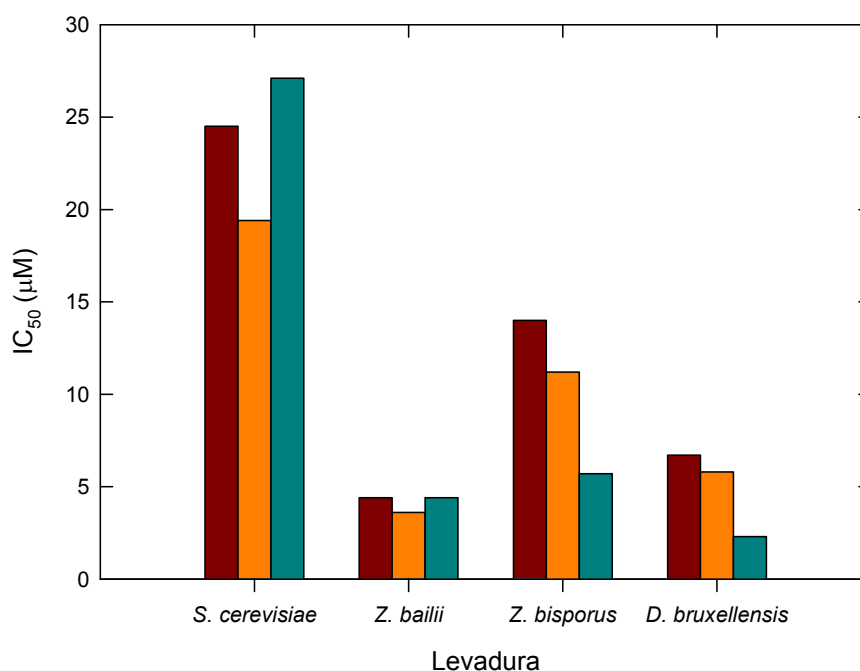


Figura 38. Propiedades antimicrobianas *in vitro* de los péptidos PAF26L (■), PAF36L (■) y LfcinB₁₇₋₃₁ (■) frente a las principales levaduras alterantes de vino. Los datos mostrados corresponden al valor IC₅₀ para cada combinación péptido-microorganismo, expresado en unidades micromolar.

Trabajos previos ya habían demostrado que la potencia tanto de bLF como de su péptido derivado LfcinB es dependiente de cepa (Wakabayashi *et al.*, 1998). En concreto se describieron diferencias significativas en la susceptibilidad a la acción antimicrobiana de estos compuestos en el caso de la especie *C. albicans*. Estas diferencias fueron mayores en el caso de LF (valores de MIC que oscilaron entre 200 y 6400 µg/ml) que en el de LfcinB (valores de MIC entre 50 y 400 µg/ml). En nuestro caso no se observó un intervalo de valores de MIC tan amplio para las 9 cepas de *D. bruxellensis* estudiadas, ya que varió entre 7 y 40 µg/ml.

También se ha demostrado la diferente sensibilidad de cepas de *D. bruxellensis*, *P. membranifaciens*, *S. cerevisiae*, *Z. bisporus* y *Z. bailii* frente a la proteína "killer" KT4561 de *Williopsis saturnus* (Goretti *et al.*, 2009). Cabe destacar que su patrón de actividad es diferente al observado para LfcinB₁₇₋₃₁. La especie más sensible fue *S. cerevisiae* (MIC₉₀= 0,125 µg/ml), seguida de *Z. bailii* (MIC₉₀= 0,5 µg/ml). Por su parte, la especie *D. bruxellensis* mostró una sensibilidad intermedia (MIC₉₀= 32 µg/ml), mientras que las especies más resistentes fueron *Z. bisporus* y *P. membranifaciens* (MIC₉₀ >32 µg/ml), hecho que podría indicar un diferente modo de acción respecto a los péptidos derivados de LfcinB.

Los escasos estudios que existen acerca de la actividad antifúngica de péptidos derivados de LfcinB, se han centrado en la levadura *C. albicans* (Bellamy *et al.*, 1993; Chen *et al.*, 2006; Orsi, 2004), y diferentes especies de *Cryptococcus* (Bellamy *et al.*, 1994). En este último caso, el valor MIC de LfcinB para *C. albidus* fue 24 µg/ml, mientras que en nuestro trabajo fueron necesarias dosis de LfcinB₁₇₋₃₁ y LfcinB₂₀₋₂₅ de 163 y 82 µg/ml, respectivamente, para conseguir la inhibición completa de su crecimiento. Una estrategia que cabe destacar para el control de *S. cerevisiae* y *Z. bailii* combina el péptido MB-21 (FASLLGKALKALAKQ) y compuestos que afectan a la formación de la pared celular de las levaduras, como gentiobiosa u oligómeros de β-1,6-glucano (Bom *et al.*, 2001). Las dosis de péptido empleadas (6-25 µM), en el mismo rango que nuestros péptidos, provocaban un retraso significativo en el crecimiento de

S. cerevisiae y *Z. bailii*. Sin embargo, para conseguir una inhibición completa del crecimiento fue necesaria la combinación con gentiobiosa a una concentración de 200 mM.

Existen numerosos trabajos donde se emplean diferentes fitoquímicos como antimicrobianos. Concretamente, se ha descrito que el ácido ferúlico, a una concentración de 1,29 mM, es capaz de inhibir completamente el crecimiento de una cepa para champán de *S. cerevisiae*, en medio de cultivo microbiológico (Baranowski *et al.*, 1980). Otros compuestos descritos, con actividad antimicrobiana frente a diversas cepas de *S. cerevisiae*, han sido el timol (Falcone *et al.*, 2005), octil galato (Fujita y Kubo, 2002) y vainillina (Fitzgerald *et al.*, 2003), con valores de MIC de 2,24, 0,089 y 21 mM, respectivamente. También se ha determinado el valor de MIC de algunos de estos compuestos frente a cepas de *Z. bailii*, resultando ser 0,177 mM en el caso de octil galato (Fujita y Kubo, 2002), y 20 mM para la vainillina (Fitzgerald *et al.*, 2003) y 0,17 mM para el poligodial (Fujita y Kubo, 2005). Como se puede extraer de estos datos, la efectividad de todos estos compuestos es notablemente inferior a la correspondiente a nuestros péptidos, que mostraron valores de MIC en el intervalo 0,016-0,032 mM en el caso de la cepa vínica de *S. cerevisiae* y entre 0,004 y 0,008 mM en el caso de *Z. bailii*, valores entre 20 y 650 veces inferiores a los MIC determinados para los fitoquímicos anteriores.

2.2. LfcinB₁₇₋₃₁ como antibacteriano

Contrariamente al caso de las levaduras, en la bibliografía existen diversas aproximaciones basadas en péptidos antimicrobianos para prevenir el crecimiento de bacterias lácticas alterantes de vino. Entre ellas destacan el empleo de bacteriocinas, principalmente nisina (Carl *et al.*, 2004; Chung y Hancock, 2000; Rojo-Bezares *et al.*, 2007). Esta bacteriocina se reveló como un eficaz agente antimicrobiano frente a distintas especies de bacterias lácticas pertenecientes a los géneros *Oenococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* y *Pediococcus* (Rojo-Bezares *et*

al., 2007). Mientras que el MIC correspondiente a distintas cepas de *O. oeni* estaba en el intervalo 0,012-0,024 µg/ml, para el resto de bacterias lácticas oscilaba entre 0,39-400 µg/ml. Por tanto, *O. oeni* fue la especie más susceptible a la acción de la nisina en medio de cultivo microbiológico, lo que contrasta con nuestros resultados que indican que esta especie, junto con *L. hilgardii*, son las más resistentes de todas las evaluadas a la acción de LfcinB₁₇₋₃₁ en MRS. Este hecho podría ser un reflejo de los diferentes modos de acción de la nisina y de LfcinB₁₇₋₃₁. En concreto, se ha postulado que la nisina actúa por interacción directa con el Lípido II, un componente específico de la membrana bacteriana y precursor del peptidoglicano de la pared celular. Dicha interacción incrementa la concentración local de la nisina en la membrana celular y promueve la capacidad del péptido para la formación de poros en la misma, además de inhibir la síntesis del peptidoglicano (Wiedemann *et al.*, 2001). Por lo que se refiere a LfcinB₁₇₋₃₁, diversos trabajos han demostrado que, a dosis subletales, al igual que LfcinB, interacciona con las envolturas celulares bacterianas, y tras dicha interacción posee la capacidad de traslocarse al interior de las células, ejerciendo su acción antimicrobiana a nivel intracelular (Farnaud *et al.*, 2004; Haukland *et al.*, 2001; Ulvatne *et al.*, 2004). A dosis más altas y concentraciones por encima del MIC, estos péptidos, como la mayoría de péptidos catiónicos y anfipáticos, provocan la permeabilización de las membranas celulares y la muerte por lisis celular.

La combinación de nisina y lisozima frente a bacterias lácticas alterantes, muestra un efecto sinérgico (Chung y Hancock, 2000). En nuestro trabajo también hemos intentado esta aproximación, combinando la aplicación de LfcinB₁₇₋₃₁ y la lisozima, aunque nuestros resultados no revelaron ninguna sinergia (datos no mostrados). No es descartable que esta falta de sinergia se deba a una similitud de mecanismo antimicrobiano o diana celular, ya que como hemos mencionado los péptidos derivados de LfcinB interaccionan en primera instancia con las envolturas bacterianas y podrían enmascarar el acceso al peptidoglicano sobre el que actúa la lisozima.

Diversos estudios han identificado los residuos de aminoácidos determinantes de las propiedades antibacterianas de los péptidos derivados de LfcinB (Farnaud y Evans, 2003; Haug *et al.*, 2007; Haug y Svendsen, 2001; Orsi, 2004). En el caso de LfcinB₁₇₋₃₁, el uso de análogos de sustitución de alanina demostró la importancia de los dos residuos de triptófano que posee en su secuencia sobre su actividad antimicrobiana, ya que la sustitución de uno de estos residuos por alanina provocó una pérdida significativa de actividad frente a *S. aureus* y *E. coli*. La importancia de estos residuos de triptófano también se puso de manifiesto mediante la introducción de un segundo residuo de triptófano en la secuencia de los péptidos de 15 residuos derivados de Lfcin humana, caprina y porcina, que incrementó la actividad antibacteriana de estos péptidos hasta seis veces (Strom *et al.*, 2000). La relevancia del triptófano se ha asociado a su tamaño, forma y carácter aromático (Haug y Svendsen, 2001), que posibilitan su interacción e inserción en bicapas lipídicas (Schibli *et al.*, 1999). Así mismo, el resto de residuos básicos e hidrofóbicos contribuyen a mantener la actividad antibacteriana de LfcinB₁₇₋₃₁ (Strom *et al.*, 2002; Vogel *et al.*, 2002).

La importancia de los residuos de triptófano también se ha confirmado en otros péptidos antibacterianos diferentes a los evaluados en este estudio. Es el caso de PKLLTKFLKSWIG, en el que la introducción de uno o dos de estos residuos en su secuencia resultó en un incremento de su actividad antibacteriana, pero también hemolítica (Bikshapathy *et al.*, 1999). Se han estudiado además las propiedades antimicrobianas de diversos péptidos con un elevado contenido en triptófano, como tritripticina (Lawyer *et al.*, 1996) e indolicidina (Selsted *et al.*, 1992), y los resultados sugieren que estos residuos juegan un papel crucial en su interacción con las bacterias. Debido a los escasos estudios sobre la actividad antifúngica de péptidos derivados de LfcinB, queda por demostrar la importancia de estos residuos en su actividad frente a levaduras alterantes de vino.

3. β -glucanasas frente a levaduras alterantes de vino

La evaluación *in vitro* del efecto antifúngico del Glucanex reveló su capacidad de inhibición del crecimiento de dos de las levaduras alterantes de vino más importantes, como son *D. bruxellensis* y *Z. bailii*. Sin embargo, la dosis de Glucanex de 200 $\mu\text{g/ml}$, que ocasionó una inhibición del crecimiento de estas dos levaduras próxima al 70%, en el caso de *Z. bisporus*, *C. albidus* y *P. membranifaciens* sólo consiguió una inhibición en torno al 15% (Tabla 20). En el caso de *S. cerevisiae*, el Glucanex no tuvo ningún efecto sobre su crecimiento *in vitro*, incluso a una concentración de 1000 $\mu\text{g/ml}$. Estas concentraciones de Glucanex necesarias para observar el efecto antimicrobiano son superiores a las dosis recomendadas por el fabricante para mejorar la filtración de los vinos, que oscilan entre 15 y 45 $\mu\text{g/ml}$.

La efectividad del Glucanex frente a las distintas especies de levadura podría estar relacionada con la composición y estructura de sus paredes celulares, que varía entre diferentes especies e incluso entre distintas cepas dentro de una especie (Nguyen *et al.*, 1998). Además, dicha pared es una estructura de naturaleza dinámica, y por tanto, su composición y arquitectura también pueden variar en respuesta a cambios del medio de cultivo y a lo largo de la fase de crecimiento. Se ha descrito que la sensibilidad de las levaduras al tratamiento con Glucanex permite estimar el contenido en β -glucanos de la pared celular de las mismas, de manera que las levaduras más resistentes al tratamiento con β -glucanasas tendrían un mayor contenido de β -glucanos en la pared celular, mientras que en el caso de las cepas más sensibles el contenido será menor (Kim *et al.*, 2004). En este mismo trabajo se observó que concentraciones de Glucanex de 150 $\mu\text{g/ml}$ no afectaban al crecimiento de *S. cerevisiae*, resultados similares a los obtenidos en este trabajo, hecho que indica que esta cepa de levadura posee un alto contenido de β -glucanos en la pared celular.

El Glucanex mostró un patrón de actividad relativa *in vitro* frente a las levaduras alterantes *D. bruxellensis*, *Z. bailii*, *Z. bisporus* y *S. cerevisiae* muy similar al correspondiente a los péptidos más potentes, PAF26, PAF36 y LfcinB₁₇₋₃₁, aunque poseen un diferente modo de acción antimicrobiano. El Glucanex, como ya hemos indicado, ejerce su acción antimicrobiana al provocar la degradación de los β -glucanos presentes en la pared celular, mientras que los AMP no poseen esta capacidad de hidrolizar componentes estructurales, si bien el primer paso en su acción antimicrobiana es, precisamente, la interacción con las cubiertas celulares de los microorganismos (Erand y Vogel, 1999; Marcos y Gandía, 2009; Zasloff, 2002). Por tanto, la composición de la pared celular de las diferentes levaduras condiciona esta interacción y con ello la susceptibilidad a la acción de los AMP.

En busca de posibles sinergias, se combinaron Glucanex y LfcinB₁₇₋₃₁. Sin embargo, esta combinación no dio los resultados esperados (datos no mostrados), tal y como había ocurrido con la combinación entre LfcinB₁₇₋₃₁ y lisozima. Inicialmente, habíamos diseñado el experimento desde la hipótesis de que la actividad hidrolítica de pared asociada al Glucanex, podría facilitar el acceso de los AMP a las membranas y al interior celular y por tanto incrementar su toxicidad. Sin embargo, se ha demostrado recientemente que la degradación enzimática parcial de la pared celular de un hongo lo insensibiliza frente a una proteína antimicrobiana que requiere la interacción inicial con dicha pared (van der Weerden *et al.*, 2010). Una explicación alternativa a la falta de eficacia de la combinación se relaciona con la degradación de los péptidos antimicrobianos, ocasionada por la actividad proteasa residual presente en el preparado enzimático. De hecho, mediante un análisis por cromatografía de fase inversa (RP-HPLC) se confirmó la degradación de los péptidos en presencia de Glucanex. Por tanto, dicha combinación sólo sería factible empleando preparados enzimáticos exentos de proteasas. Esta estrategia sería similar a la ya comentada referente a la combinación del péptido MB-21 y la gentiobiosa (Bom *et al.*, 2001).

4. Aplicación en enología

4.1. Empleo de LfcinB₁₇₋₃₁ para el control de las contaminaciones microbianas en vino

En este trabajo se demuestra que la eficacia de los péptidos antimicrobianos se reduce significativamente en mosto o vino respecto a medio microbiológico. Este diferente comportamiento depende tanto del péptido como del microorganismo diana, y no está asociado con la potencia relativa de los distintos péptidos en medio de cultivo pero sí podría estar relacionado con su mecanismo de acción, y en concreto con la interacción física con las envolturas celulares.

De los péptidos seleccionados en medio microbiológico, sólo LfcinB₁₇₋₃₁ mostró una cierta actividad antimicrobiana en vino, y únicamente frente a *Z. bisporus* y *D. bruxellensis*. En el caso de *Z. baillii*, los ensayos de actividad fungicida demostraron que las sales presentes en mosto y vino podrían ser las responsables de la nula eficacia de los péptidos en estos medios, ya que el desalado restablece en vino una actividad comparable a la observada en medio de cultivo. Estas sales podrían actuar apantallando la carga negativa de la superficie celular, hecho que impediría la interacción del péptido con la levadura. Sin embargo, para *Z. bisporus* y *D. bruxellensis* el desalado o la quelación de cationes divalentes no mejoran sustancialmente la actividad de los péptidos en vino, sugiriendo en estos casos que la interacción no está determinada electrostáticamente. Finalmente, nuestros resultados demuestran que la ausencia de actividad de los péptidos frente a *S. cerevisiae* en vino tampoco se debe al contenido en sales del mismo. En su conjunto, los datos sugieren que, para estas tres últimas levaduras, las interacciones electrostáticas no son las principales responsables de la actividad antimicrobiana de los péptidos.

Aún en aquellos casos en los que se observó actividad antimicrobiana en vino, la efectividad no fue la misma que en medio de cultivo. Es de destacar que fue necesario incrementar la dosis de

LfcinB₁₇₋₃₁ hasta 100 µM (entre 10 y 20 veces al valor del MIC en medio microbiológico) y reducir la carga microbiana desde 10³ a 1 célula/ml para conseguir una completa inhibición del crecimiento de *Z. bisporus* y *D. bruxellensis*. Estos resultados evidencian que la efectividad de este péptido es también dependiente de la carga microbiana inicial. Por tanto, el grado de contaminación de los vinos es un factor importante a tener en cuenta a la hora de utilizar este antimicrobiano. Conviene recordar que el límite de contaminación que se ha descrito como aceptable en las bodegas es inferior a 1 célula/100 ml, especialmente en vinos dulces (Loureiro y Malfeito-Ferreira, 2003a) y que la concentración celular más baja empleada en nuestros experimentos, y que además somos capaces de controlar (1 célula/ml), se encuentra dos unidades logarítmicas por encima del límite considerado como seguro en bodega.

En la bibliografía hay trabajos que evidencian tanto la reducción de la eficacia de compuestos antimicrobianos en vino como el efecto de la carga microbiana inicial. A modo de ejemplo destacar que para que el antibiótico natamicina fuera eficaz en vino tinto frente a *Z. bailii* fue necesaria una dosis de 10 mg/l, ocho veces superior al MIC previamente determinado en medio microbiológico (MIC= 1,25 mg/l) (Thomas *et al.*, 2005). Por lo que se refiere a la carga microbiana, se ha descrito que, el dimetil dicarbonato, a su dosis máxima permitida en bodega (200 mg/l), no es capaz de inhibir completamente el crecimiento de *D. bruxellensis* a una concentración de 10⁶ células/ml, mientras que cuando la carga microbiana inicial se reduce a 500 células/ml es posible inhibir completamente el crecimiento con una concentración de 100 mg/l (Costa *et al.*, 2008).

Nuestros resultados sugieren, por tanto, la posible aplicación de LfcinB₁₇₋₃₁ en el control de vinos alterados por *D. bruxellensis* y *Z. bisporus*, aportando una nueva estrategia a las ya descritas en la bibliografía. Entre ellas, destaca la aplicación del quitosano, polímero bioactivo de amplia utilización, que ha demostrado actividad antimicrobiana *in vitro* frente a *D. bruxellesis* y *D. intermedius*, a dosis de 6 y 2 g/l de quitosano, respectivamente. Además, el quitosano muestra un efecto selectivo sobre

ambas especies en cultivos mixtos con *S. cerevisiae* (Gómez-Rivas *et al.*, 2004). Sin embargo, a pesar de que los autores sugieren el empleo de quitosano en vinificación, hasta el momento sólo ha sido demostrada su eficacia en medio microbiológico. Una aproximación similar a la desarrollada en este trabajo es el empleo de toxinas killer de *P. anomala* y *K. wickerhamii* para evitar el crecimiento *D. bruxellensis* en vino (Comitini *et al.*, 2004a). Ambas mostraron una potente actividad tanto en medio de cultivo microbiológico como en vino. En estos ensayos no se consiguió una inhibición total del crecimiento aunque hay que remarcar que se partió de una carga microbiana inicial de 10^5 células/ml. También se han desarrollado tratamientos térmicos para eliminar las contaminaciones causadas por *Dekkera*, tanto en vino como en equipamiento de la bodega (Couto *et al.*, 2005).

En el caso de *Z. bisporus*, cuyo control en vino también es posible mediante el empleo de LfcinB₁₇₋₃₁, no se han encontrado trabajos donde se describan posibles estrategias de control que permitan establecer una comparación con nuestros resultados. De hecho, únicamente se sugiere, al igual que en otros casos de contaminantes de origen microbiano, disponer de un programa de limpieza y desinfección adecuados y un control microbiológico del vino embotellado, con el fin de asegurar la calidad del mismo y mantener la confianza del consumidor (Zumárraga y Barbero, 2009).

La nula efectividad en vino de LfcinB₁₇₋₃₁ frente a *S. cerevisiae*, se confirmó en los ensayos de fermentación conjunta con *D. bruxellensis*. En estas fermentaciones, el péptido fue capaz de retrasar el crecimiento de la levadura no-*Saccharomyces* sin interferir en el crecimiento de *S. cerevisiae*, ni por tanto en el correcto desarrollo de la fermentación alcohólica. Estos datos ponen de manifiesto de una forma muy significativa la especificidad diferencial de LfcinB₁₇₋₃₁ frente a distintas especies de levadura. También resultan selectivos ciertos compuestos con capacidad antimicrobiana producidos por la cepa CCMI 885 de *S. cerevisiae* frente a *Hanseniaspora guillermondii*, levadura apiculada presente en la uva y en

las etapas iniciales de la fermentación (Albergaria *et al.*, 2010). Estos autores demostraron que el/los compuestos responsable/s correspondían a una fracción peptídica de peso molecular entre 2 y 10 kDa. Al igual que en nuestro trabajo, su especificidad se puso de manifiesto en fermentaciones llevadas a cabo con cultivos mixtos de las dos especies de levadura. En nuestras condiciones de trabajo no se observó ningún efecto de inhibición del crecimiento de *D. bruxellensis* en presencia de *S. cerevisiae*.

La especificidad de acción antimicrobiana propia de LfcinB₁₇₋₃₁ se observó de nuevo en las microvinificaciones llevadas a cabo en presencia de *S. cerevisiae* y bacterias lácticas. LfcinB₁₇₋₃₁ afectó notablemente a la viabilidad de *O. oeni*, y también a la de *L. brevis* y *P. damnosus*, sin que, como en el caso anterior, se viera afectado el crecimiento de *S. cerevisiae*. Resultados similares se han descrito para bacteriocinas (Bauer *et al.*, 2003) en microvinificaciones llevadas a cabo en presencia de *S. cerevisiae* y de BAL, por lo que LfcinB₁₇₋₃₁, puede competir con estos compuestos, al menos en cuanto a especificidad de acción.

Además, las microvinificaciones revelaron diferencias significativas de actividad respecto a los experimentos llevados a cabo en medio de cultivo. Estas diferencias fueron dependientes de especie. A modo de ejemplo recordar que *L. hilgardii* a pesar de la sensibilidad intermedia mostrada en MRS, no resultó afectada por LfcinB₁₇₋₃₁ durante la fermentación, mientras que *O. oeni*, la especie más resistente en medio, fue la más sensible durante este proceso. Sin descartar que la composición del vino pueda favorecer el modo de acción de este péptido sobre *O. oeni*, otra posible y atractiva explicación para el incremento de actividad de LfcinB₁₇₋₃₁ en mosto en fermentación, es un efecto sinérgico del péptido con metabolitos secundarios derivados del crecimiento de *S. cerevisiae*. En estudios recientes se ha observado que diversas cepas vínicas de *S. cerevisiae* son capaces de inhibir el desarrollo de la fermentación maloláctica dirigida por *O. oeni*, por un mecanismo independiente de la producción de SO₂ o de ácidos grasos de cadena media (Nehme *et al.*, 2010; Osborne y Edwards, 2007). De hecho, al igual

que en el trabajo de Albergaria *et al.* (2010), se ha demostrado que el efecto inhibitorio es debido a una fracción peptídica, de peso molecular entre 5 y 10 kDa, producida por determinadas cepas de *S. cerevisiae*. Esta posibilidad permitiría la combinación entre *S. cerevisiae* y AMPs para ampliar el espectro de acción y diversificar las dianas celulares, lo que resultaría en un control más efectivo de un número más amplio de microorganismos alterantes.

En nuestras condiciones experimentales los vinos obtenidos con *S. cerevisiae* y *O. oeni* se caracterizaron por tener incrementada la concentración de ácido acético y disminuida la de ácido málico, en comparación con los vinos obtenidos con *S. cerevisiae*. Sin embargo, la presencia de LfcinB₁₇₋₃₁ en la fermentación conjunta permitió obtener vinos con niveles de estos dos ácidos similares a los de los vinos obtenidos en monocultivo. Este hecho, que refleja la acción antimicrobiana del péptido frente a la bacteria, permitiría, variando la concentración de péptidos derivados de LfcinB, ayudar a modular el alcance de la fermentación maloláctica.

Los resultados obtenidos demuestran que los péptidos derivados de LF, como LfcinB₁₇₋₃₁, pueden ser una alternativa eficaz para el control de bacterias lácticas alterantes de vino. Aunque, en las condiciones ensayadas, la presencia de LfcinB₁₇₋₃₁ no afectó a ninguno de los parámetros indicativos del proceso de fermentación tales como pH, concentración de etanol, acetaldehído, ácido acético, glicerol y azúcares reductores, sería necesario conocer su efecto sobre la calidad organoléptica del producto final. Actualmente, entre las estrategias encaminadas al control de BAL en vinificación, destaca el empleo de lisozima, enzima bacteriolítica cuyo uso está autorizado por la O.I.V. A pesar de su demostrada eficacia en mostos y vinos (Gerbaux *et al.*, 1997; Gerbaux *et al.*, 1999; Gould, 1996), los elevados costes asociados a su empleo son actualmente un factor limitante para su aplicación, aspecto que también debería de ser valorado para LfcinB₁₇₋₃₁. A modo de comparación, comentar que las dosis de péptido efectivas en mosto, al menos frente a

P. damnosus, *L. brevis* y *O.oeni*, son del mismo orden de magnitud que las dosis de lisozima aplicadas durante la vinificación en blanco (250-500 mg/l).

4.2. Potencial antifúngico de enzimas β -glucanasas en vino

Partiendo de la eficacia del Glucanex en medio de cultivo en la inhibición a *D. bruxellensis* y *Z. bailii*, cuya sensibilidad fue similar (MIC \approx 200 μ g/ml), se diseñaron también experimentos para evaluar su efecto en vino. En este caso, el preparado enzimático también fue efectivo, aunque a dosis superiores, frente a ambas levaduras, que curiosamente mostraron sensibilidades diferentes (MIC = 300 μ g/ml para *D. bruxellensis*; MIC > 450 μ g/ml para *Z. bailii*).

Un resultado relevante es el observado en el caso de *S. cerevisiae*, ya que el Glucanex no fue efectivo frente a esta levadura en medio, pero sí lo fue en vino. Este diferente comportamiento puede ser debido a que la composición de su pared celular puede ser distinta en vino y en medio microbiológico, así como verse también afectada por las diferentes condiciones de crecimiento (Kim y Yun, 2006). También se podría deber a que el pH óptimo del preparado enzimático, situado en el rango de pH 3-4, está más próximo al del vino que al del medio GPY. Por tanto, al igual que en el caso de los péptidos, la eficacia del Glucanex depende tanto del microorganismo como de la matriz o medio donde interactúan.

Datos adicionales al efecto del Glucanex en vino fueron proporcionados por los ensayos realizados con vino embotellado procedente de la línea de llenado de bodega, e inoculados bien con *Z. bailii* o con *D. bruxellensis*. El Glucanex resultó efectivo frente a *Z. bailii*, sin que su adición afectara de forma significativa a los principales parámetros del vino. El efecto del Glucanex sobre el crecimiento microbiano se demostró por medidas de impedancia eléctrica, método de detección que actualmente está sustituyendo a los sistemas de cuantificación clásicos en

las bodegas (Martínez *et al.*, 2004). Nos gustaría remarcar que el principal objetivo de estos experimentos fue precisamente utilizar una metodología experimental que permitiera simular una aplicación práctica en bodega. Sin embargo, somos conscientes de que la aplicación del Glucanex en bodega sólo sería factible antes del embotellado del vino, para permitir así su posterior eliminación en el proceso de filtrado que sufren todos los vinos previo a su embotellamiento.

Ante estos resultados es interesante destacar que el Glucanex es, de los antimicrobianos ensayados en este trabajo, el único que permite el control efectivo de *Z. bailii*. Como ya se ha comentado en esta memoria, la presencia de esta levadura en el vino puede convertirse en un serio problema para las bodegas, debido a que por su osmotolerancia y resistencia a los conservantes convencionales puede alcanzar niveles de contaminación elevados a partir de poblaciones iniciales muy bajas. Habitualmente aparece en vinos embotellados donde puede causar alteraciones tales como un exceso de producción de CO₂ así como la aparición de turbidez y sedimentos en las botellas, con las consecuentes pérdidas económicas derivadas de los vinos defectuosos, razones por las cuales es indispensable su control efectivo (Zumárraga y Barbero, 2009). Hasta el momento para el control de *Z. bailii* se aconseja a las bodegas disponer de unas medidas de higiene adecuadas, y tan sólo se ha descrito el empleo de dimetil dicarbonato como posible estrategia alternativa. Con la dosis máxima permitida en bodega (200 mg/l) es posible controlar el crecimiento de *Z. bailii* incluso a concentraciones iniciales de 10⁶ células/ml (Costa *et al.*, 2008). Nuestro trabajo presenta, por tanto, una alternativa diferente a las existentes hasta el momento.

Respecto a *D. bruxellensis*, no disponemos de datos sobre el efecto del Glucanex en vino embotellado debido a que en nuestras condiciones experimentales no fue capaz de crecer, probablemente por el efecto del SO₂ presente en el vino empleado, que fueron 35 ppm en forma libre frente a las 4 ppm del vino utilizado en los primeros ensayos, o bien por el limitado espacio de cabeza de las botellas. Sin embargo, los resultados

previos obtenidos en vino que revelan a *D. bruxellensis* como la levadura más sensible a la acción del Glucanex, por encima incluso de *Z. bailii*, sugieren la potencial aplicación de este agente antimicrobiano para el control en bodega de contaminaciones provocadas también por esta levadura.

Una conclusión de este trabajo es, por tanto, la aplicación potencial de los preparados enzimáticos ricos en actividad β -glucanasa como agentes antimicrobianos en vino. Esta nueva aplicación se sumaría a las ya conocidas para este tipo de preparados que son fundamentalmente la mejora de la clarificación y procesado de mostos y vinos, y la mejora de la estabilidad proteica y tartárica de los vinos mediante la liberación de manoproteínas (van Rensburg y Pretorius, 2000). El preparado enzimático podría por tanto ejercer su actividad antimicrobiana durante ambos procesos. Dado que dicho preparado se añade durante el acondicionamiento del mosto, las enzimas permanecen en el medio hasta la etapa de clarificación del vino, prolongando su acción antimicrobiana en el tiempo. Inevitablemente serían necesarios estudios para establecer la dosis efectiva del preparado de forma que el crecimiento de *S. cerevisiae* no se viera afectado. Esta problemática no se daría en el caso de utilizar el Glucanex durante la etapa de envejecimiento, cuando la fermentación alcohólica ya ha terminado. Aquí presentaría la ventaja de permitir un control efectivo de los posibles alterantes, incluyendo también a *S. cerevisiae*.

Considerando pues el efecto antimicrobiano del Glucanex en vino y su uso habitual en bodega, su aplicación podría ser fácilmente aceptada por los enólogos, teniendo en cuenta además que se ha demostrado que su empleo no afecta de forma significativa a la composición de los vinos (van Rensburg y Pretorius, 2000). El hecho de que la cantidad necesaria para ejercer un efecto antimicrobiano eficaz sea superior a la dosis recomendada para la mejora de la filtración, no supondría un impedimento para su aplicación, dado que en el caso de las enzimas no se han establecido unos niveles máximos obligatorios.

5. Consideraciones prácticas de la aplicación de antimicrobianos en agroalimentación

Es evidente que la utilización de péptidos y enzimas con capacidad antimicrobiana en enología es una alternativa prometedora y que merece continuar siendo explorada, tal y como nuestro grupo ha contribuido a poner de manifiesto.

Somos conscientes de que la producción biotecnológica de los AMP, utilizando metodologías de bajo coste y garantizando la seguridad biológica de los sistemas de producción, es el principal cuello de botella de esta estrategia. En este sentido, hasta la fecha se han descrito varios sistemas de expresión, tanto procariotas (Chen *et al.*, 2008; Feng *et al.*, 2006; Guerreiro *et al.*, 2008; Park *et al.*, 2009; Xu *et al.*, 2007), como eucariotas (Chen *et al.*, 2009; Jin *et al.*, 2009; Yamada *et al.*, 1990; Zhang *et al.*, 2006) para la sobreexpresión de AMP recombinantes. Entre ellos destaca la levadura *Pichia pastoris*, ya que ofrece notables ventajas en cuanto a sus niveles de expresión, estabilidad y posibilidad de producir el AMP a escala industrial. Mediante este sistema se ha descrito la producción de distintas defensinas (Almeida *et al.*, 2001; Cabral *et al.*, 2003; Wisniewski *et al.*, 2003) o del péptido cecropina A y derivados (Jin *et al.*, 2006b; Jin *et al.*, 2006a). En concreto, para el caso de LfcinB y péptidos derivados, se han descrito sistemas de producción en *E. coli* (Feng *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2006) y también en *P. pastoris*. En este último sistema se ha conseguido la sobreexpresión de péptidos derivados de Lfcin caprina de longitudes similares a los evaluados en este trabajo (Chen *et al.*, 2009).

En el contexto de este estudio una alternativa muy atractiva sería el desarrollo de cepas vínicas de *S. cerevisiae* con capacidad de expresar péptidos antimicrobianos. En este sentido la especificidad mostrada por LfcinB₁₇₋₃₁ lo convierte en un candidato ideal para el desarrollo de esta estrategia, que permitiría el control de levaduras y bacterias alterantes por la propia levadura que lleva a cabo el proceso de fermentación alcohólica.

Cabe destacar que ya se ha descrito el clonaje y expresión de genes de bacteriocinas en *S. cerevisiae* con este mismo fin. En concreto las bacteriocinas expresadas fueron la pediocina PA-1 de *P. acidilacti* y la leucocina B-Ta11a de *Leuconostoc carnosum* (du Toit *et al.*, 1999; Felix *et al.*, 1994; González y Kunka, 1987; Schoeman *et al.*, 1999). Sin embargo, los problemas de aceptación social relativos a la utilización de organismos modificados genéticamente en agroalimentación en general, y en enología en particular, sobre todo en la Unión Europea, hacen que esta posibilidad tenga que ser considerada más como alternativa de futuro que de presente.

Ante las consideraciones expuestas, este trabajo plantea la posible aplicación de hidrolizados de LF bovina como fuente de péptidos antimicrobianos. En la actualidad, esta proteína es posible obtenerla a gran escala a partir de leche de bovino ó suero lácteo (Wakabayashi *et al.*, 2006), y también se ha descrito su producción en *A. oryzae* (Ward *et al.*, 1992) y *A. niger* var. *awamari* (Ward *et al.*, 1995), así como en leche de vacas modificadas genéticamente (van Berkel *et al.*, 2002). Nuestros resultados ponen de manifiesto la posibilidad de controlar la contaminación en vino de un alterante tan problemático como *D. bruxellensis* mediante la adición de un hidrolizado de LF, que podría ser también potencialmente efectivo frente al resto de microorganismos que sólo han sido evaluados en este trabajo en medio microbiológico. Esta propuesta tampoco está exenta de consideraciones adicionales, ya que además de los costes de obtención del hidrolizado, habría que tener en cuenta sobre todo las repercusiones organolépticas en el vino.

Otro aspecto importante a tener en cuenta es el impacto de estos péptidos sobre la salud humana. En este sentido y como punto de referencia, existen en la bibliografía trabajos en los que se demuestra que los péptidos derivados de LfcinB no poseen actividad hemolítica (Nikawa *et al.*, 2004) y no ejercen un efecto tóxico frente a células animales (citado como resultados sin publicar Wakabayashi *et al.*, 1999). Además, su seguridad como conservantes en la industria alimentaria se refuerza por el

hecho de que tienen un origen natural, dada su presencia en leche de mamíferos, y por su acción antimicrobiana específica. A este respecto, tanto LF como los péptidos derivados de esta proteína tienen un notable historial de propuestas para aplicaciones agroalimentarias (Centeno *et al.*, 2006; Naidu, 2002; Tomita *et al.*, 2002; Tomita *et al.*, 2009; Wakabayashi *et al.*, 2006). Además, en nuestro grupo se ha demostrado que PAF26L tampoco posee actividad hemolítica (Muñoz *et al.*, 2006) y no resulta tóxico para células epiteliales humanas en cultivo (López-García *et al.*, 2007).

Todas estas consideraciones asociadas al empleo de péptidos antimicrobianos en vinificación, no serían aplicables a la utilización de preparados enzimáticos como los descritos en este trabajo, en especial si se tiene en cuenta que ya son utilizados en bodega, aunque con otros fines. De nuevo, sería necesario evaluar el posible coste económico de esta estrategia ya que, por ejemplo, éste es el principal inconveniente que lleva asociado en la actualidad el empleo de lisozima.

Hemos evaluado la posibilidad de sinergias entre AMP y enzimas sin obtener resultados positivos. La viabilidad de diferentes combinaciones de antimicrobianos ha sido descrita en distintos trabajos (Bom *et al.*, 2001; Chung y Hancock, 2000), por lo que es una estrategia en la que convendría profundizar. En el caso concreto del vino, la combinación de antimicrobianos y SO₂ es una opción atractiva que podría permitir reducir las dosis de ambos compuestos. En este sentido, se ha descrito que la adición de SO₂ favorece el efecto antimicrobiano del dimetil dicarbonato (Costa *et al.*, 2008). En nuestros ensayos en vino hemos evaluado la capacidad antimicrobiana de péptidos y Glucanex en presencia de SO₂, dado que todos los vinos contienen una determinada cantidad de este agente conservante. Por tanto, el efecto observado podría ser debido a un efecto sinérgico derivado de la combinación de ambos antimicrobianos más que a la acción única del AMP o del preparado enzimático. Sin embargo, dados los resultados obtenidos que demuestran una menor efectividad en vino, en términos generales, de estos compuestos y la resistencia al SO₂ descrita para el grupo de microorganismos alterantes

empleados, es de suponer que no existe un efecto sinérgico. A pesar de estos resultados, deberían abordarse estudios más exhaustivos que permitieran confirmar o descartar este posible efecto.

Por último, este trabajo no sólo ha puesto de manifiesto el potencial de los péptidos y enzimas para el control de microorganismos en vinificación, sino que ofrece más posibilidades en el ámbito de la agroalimentación. Se debe considerar que las dos estrategias han revelado su eficacia en medio microbiológico frente a un grupo amplio de levaduras y/o bacterias lácticas alterantes de vino, pero también con un largo historial como contaminantes en la industria alimentaria. Concretamente, las especies *Z. bailii* y *Z. bisporus* se pueden aislar de concentrados de frutas, bebidas, mermeladas, gelatinas, jaleas, conservas, salsas, quesos, salchichas, mazapanes o frutos secos. *S. cerevisiae* por su parte, contamina los mismos tipos de alimentos, a excepción de los fermentados, mientras que *D. bruxellensis* se aísla con frecuencia de bebidas no alcohólicas, salsas y aderezos para ensalada (Loureiro y Malfeito-Ferreira, 2003b), sin olvidar que es la principal contaminante en las industrias de producción de bioetanol (de Souza Liberal *et al.*, 2007). Por otro lado, especies de BAL pertenecientes a los géneros *Lactobacillus* y *Leuconostoc* se asocian con alteraciones de carne de cerdo y de vacuno refrigerada (Borch *et al.*, 1996; Schirmer y Langsrud, 2010) y de productos derivados del pescado (Lyhs, 2002). Por tanto, los resultados derivados de los ensayos *in vitro* llevados a cabo en este estudio se podrían emplear como base para investigar su posible aplicación en otros alimentos, teniendo en cuenta, por supuesto, la necesidad de evaluar su potencial real en la matriz alimentaria correspondiente.

Conclusiones

1. El péptido LfcinB₁₇₋₃₁ derivado del dominio antimicrobiano de la lactoferrina bovina y los hexapéptidos PAF26 y PAF36 inhiben el crecimiento *in vitro* de las especies de levadura *D. bruxellensis*, *Z. bailii*, *Z. bisporus*, *P. membranifaciens* y *S. cerevisiae*. La actividad antifúngica de los tres péptidos es similar y dependiente de especie. En el caso del péptido derivado de lactoferrina, su perfil de inhibición frente a *D. bruxellensis* varía con la cepa.
2. El péptido LfcinB₁₇₋₃₁ también inhibe el crecimiento *in vitro* de las especies de bacterias lácticas *L. brevis*, *L. hilgardii*, *P. damnosus* y *O. oeni*. La actividad antibacteriana de LfcinB₁₇₋₃₁ es dependiente de especie.
3. El preparado enzimático Glucanex, rico en actividad β -glucanasa, inhibe el crecimiento *in vitro* de las especies de levadura alterantes de vino *D. bruxellensis* y *Z. bailii*. Su actividad antifúngica es dependiente de especie.
4. El patrón de actividad relativa frente a levaduras de los péptidos PAF26, PAF36 y LfcinB₁₇₋₃₁ es muy similar al del Glucanex, a pesar del presumible diferente modo de acción de los péptidos. Este hecho indica que la composición de la pared celular de las levaduras modula la susceptibilidad a la acción de estos compuestos antimicrobianos.
5. En términos generales, la eficacia de los péptidos PAF26 y LfcinB₁₇₋₃₁ así como la del Glucanex se reduce significativamente en mosto y/o vino, respecto al medio de cultivo. Este diferente comportamiento depende tanto del compuesto antimicrobiano como del microorganismo diana y la matriz donde ambos interactúan. Este hecho resalta la importancia de evaluar las propiedades antimicrobianas de los compuestos tanto en medio microbiológico como en la matriz alimentaria correspondiente.
6. Nuestros resultados indican que las sales minerales causan el descenso de actividad en vino de los péptidos PAF26 y LfcinB₁₇₋₃₁ frente a *Z. bailii*, mientras que no están relacionadas con la reducción de actividad en el

caso de *Z. bisporus*, *D. bruxellensis* y *S. cerevisiae*. El etanol, por su parte, no es en ningún caso el responsable de esta menor actividad en vino.

7. La interacción del péptido FITC-LfcinB₁₇₋₃₁ con células de *D. bruxellensis*, *Z. bailii* y *Z. bisporus*, medida por observación microscópica de la intensidad de fluorescencia, varía en medio de cultivo, mosto o vino, y se correlaciona con la actividad fungicida que muestra el péptido en estos medios.

8. El péptido LfcinB₁₇₋₃₁ inhibe el crecimiento de *D. bruxellensis* y *Z. bisporus* en vino, siendo su efectividad dependiente de la carga microbiana.

9. El péptido LfcinB₁₇₋₃₁ ha demostrado especificidad de acción antimicrobiana mediante ensayos de fermentación combinada, afectando selectivamente el crecimiento de varias cepas de *D. bruxellensis* o de las bacterias lácticas *O. oeni*, *L. brevis* y *P. damnosus* pero no de *S. cerevisiae*. Por tanto, nuestros datos muestran el potencial del péptido LfcinB₁₇₋₃₁ para el control de las contaminaciones microbianas en distintas etapas del proceso de elaboración de los vinos.

10. Nuestro trabajo ha revelado la posibilidad de utilizar un hidrolizado de lactoferrina para controlar la contaminación de los vinos por *D. bruxellensis*, como una aproximación más económica y natural al empleo de péptidos sintéticos. También podría ser efectivo frente al resto de microorganismos alterantes, para los que se ha demostrado su actividad antimicrobiana en medio de cultivo. En todos los casos, el hidrolizado de lactoferrina muestra un patrón de actividad relativa similar al caso de LfcinB₁₇₋₃₁, aunque las dosis efectivas son significativamente superiores.

11. El preparado enzimático Glucanex ha revelado su posible aplicación en vino para el control de contaminaciones ocasionadas por *Z. bailii*, *D. bruxellensis* y *S. cerevisiae*. De las alternativas empleadas en este trabajo es la única que permite el control efectivo de *Z. bailii* y *S. cerevisiae* en vino. En el caso de *D. bruxellensis*, nuestro trabajo presenta por tanto

Conclusiones

dos estrategias alternativas para su control, como son la aplicación de péptidos derivados de LF o de Glucanex.

12. En nuestras condiciones experimentales la adición al vino de Glucanex, LfcinB₁₇₋₃₁ o de un hidrolizado de lactoferrina como agentes de control microbiano no afecta a los principales parámetros enológicos, aunque es necesario evaluar su repercusión sobre el coste y las características organolépticas del producto final.

Difusión de Resultados

El trabajo descrito ha dado lugar a las siguientes publicaciones y comunicaciones a congresos:

Publicaciones referidas en el Science Citation Index (SCI):

1. Enrique, M., Marcos, J.F., Yuste, M., Martínez, M., Vallés, S., Manzanares, P. (2007) Antimicrobial action of synthetic peptides towards wine spoilage yeasts. *International Journal of Food Microbiology*, 118: 318-325.
2. Enrique, M., Marcos, J.F., Yuste, M., Martínez, M., Vallés, S., Manzanares, P. (2008) Inhibition of the wine spoilage yeast *Dekkera bruxellensis* by bovine lactoferrin-derived peptides. *International Journal of Food Microbiology*, 127: 229-234.
3. Enrique, M., Manzanares, P., Yuste, M., Martínez, M., Vallés, S., Marcos, J.F. (2009) Selectivity and antimicrobial action of bovine lactoferrin derived peptides against wine lactic acid bacteria. *Food Microbiology*, 26: 340-346.
4. Enrique, M., Ibañez, A., Marcos, J.F., Yuste, M., Martínez, M., Vallés, S., Manzanares, P. (2010) β -glucanases as a tool for the control of wine spoilage yeasts. *Journal of Food Science*, 75: M41-45

Comunicaciones a Congresos Científicos:

1. Enrique, M., Vallés, S., Marcos, J.F., Ibañez, E., Yuste, M., Esteve-Zarzoso, B., Manzanares, P. Estudio de la capacidad antimicrobiana de péptidos y extractos fenólicos frente a levaduras alterantes de vino. XX Congreso Nacional de Microbiología (SEM). Cáceres, 2005.

2. Enrique, M., Vallés, S., Marcos, J.F., Ibáñez, E., Yuste, M., Esteve-Zaroso, B., Manzanares, P. Alternativas al uso del anhídrido sulfuroso: antimicrobianos de naturaleza peptídica o fenólica procedentes de subproductos de la vinificación. *Xarxa temàtica de llevats d'interès enològic*. L'Ampolla, 2005.
3. Enrique, M., Marcos, J.F., Yuste, M., Martínez, M., Vallés, S., Manzanares, P. Antimicrobial action of synthetic peptides towards wine spoilage yeasts. *International Specialized Symposium on yeasts- ISSY26*. Sorrento (Italia), 2007.
4. García-Ruiz, A., Enrique, M., Manzanares, P., Marcos, J.F., Bartolomé, B., Moreno-Arribas, M.V. Potencial de polifenoles y de péptidos antimicrobianos para reducir el empleo del SO₂ en enología. *VI Foro Mundial del Vino*. Logroño, 2008.

Bibliografía

- Adlernissen, J.** (1987). Newer uses of microbial enzymes in food-processing. *Trends Biotechnol.* 5: 170-174.
- Al-Nabulsi, A. A., Holley, R. A.** (2007). Effects on *Escherichia coli* O157:H7 and meat starter cultures of bovine lactoferrin in broth and microencapsulated lactoferrin in dry sausage batters. *Int. J. Food Microbiol.* 113: 84-91.
- Alan, A. R., Earle, E. D.** (2002). Sensitivity of bacterial and fungal plant pathogens to the lytic peptides, MSI-99, magainin II, and cecropin B. *Mol. Plant Microbe Interact.* 15: 701-708.
- Albergaria, H., Francisco, D., Gori, K., Arneborg, N., Gírio, F.** (2010). *Saccharomyces cerevisiae* CCMI 885 secretes peptides that inhibit the growth of some non-*Saccharomyces* wine-related strains. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 86: 965-972.
- Alexandre, H., Rousseaux, I., Charpentier, C.** (1994). Ethanol adaptation mechanisms in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 20: 173-183.
- Almeida, M. S., Cabral, K. S., de Medeiros, L. N., Valente, A. P., Almeida, F. C., Kurtenbach, E.** (2001). cDNA cloning and heterologous expression of functional cysteine-rich antifungal protein Psd1 in the yeast *Pichia pastoris*. *Arch. Biochem. Biophys.* 395: 199-207.
- Amerine, M. A., Kunkee, R. E.** (1968). Microbiology of winemaking. *Annu. Rev. Microbiol.* 22: 323-358.
- Andersen, J. H., Jenssen, H., Sandvik, K., Gutteberg, T. J.** (2004). Anti-HSV activity of lactoferrin and lactoferricin is dependent on the presence of heparan sulphate at the cell surface. *J. Med. Virol.* 74: 262-271.
- Andreu, D., Rivas, L.** (1998). Animal antimicrobial peptides: an overview. *Biopolymers* 47: 415-433.
- Appelmeik, B. J., An, Y. Q., Geerts, M., Thijs, B. G., de Boer, H. A., MacLaren, D. M., de Graaff, J., Nuijens, J. H.** (1994). Lactoferrin is a lipid A-binding protein. *Infect. Immun.* 62: 2628-2632.
- Arena, M. E., Manca de Nadra, M. C.** (2001). Biogenic amine production by *Lactobacillus*. *J. Appl. Microbiol.* 90: 158-162.
- Arena, M. E., Saguir, F. M., Manca de Nadra, M. C.** (1999). Arginine, citrulline and ornithine metabolism by lactic acid bacteria from wine. *Int. J. Food Microbiol.* 52: 155-161.

- Arnold, R. R., Cole, M. F., McGhee, J. R.** (1977). A bactericidal effect for human lactoferrin. *Science* 197: 263-265.
- Arnold, R. R., Russell, J. E., Champion, W. J., Gauthier, J. J.** (1981). Bactericidal activity of human lactoferrin: influence of physical conditions and metabolic state of the target microorganism. *Infect. Immun.* 32: 655-660.
- Asvany, A.** (1971). The present state of techniques for the replacement of SO₂. *Bulletin de l'O. I. V.* 44: 244-248.
- Bader, M. W., Sanowar, S., Daley, M. E., Schneider, A. R., Cho, U., Xu, W., Klevit, R. E., Le, M. H., Miller, S. I.** (2005). Recognition of antimicrobial peptides by a bacterial sensor kinase. *Cell* 122: 461-472.
- Baleiras, M. M., Huis, J. H.** (1995). Influence of ethanol and temperature on the cellular fatty acid composition of *Zygosaccharomyces bailii* spoilage yeasts. *J. Appl. Bacteriol.* 78: 327-334.
- Baranowski, J. D., Davidson, P. M., Nagel, C. W., Branen, A. L.** (1980). Inhibition of *Saccharomyces cerevisiae* by naturally occurring hydroxycinnamates. *J. Food Sci.* 45: 592-594.
- Barre, P., Blondin, B., Dequin, S., Feuillat, M., Sablayrolles, J. M., Salmon, J. M.** (2003). La levadura de fermentación alcohólica. *En: Enología: Fundamentos Científicos y Tecnológicos.* Flanzy, C., ed. 2ª ed. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, España, pp. 274-322.
- Bartowsky, E.** (2003). Lysozyme and winemaking. *Aust. New Zeal. Grapegrower Winemaker* 31: 101-104.
- Bauer, R., Nel, H. A., Dicks, L. M. T.** (2003). Pediocin PD-1 as a method to control growth of *Oenococcus oeni* in wine. *Am. J. Enol. Vitic.* 54: 86-91.
- Bellamy, W., Takase, M., Wakabayashi, H., Kawase, K., Tomita, M.** (1992a). Antibacterial spectrum of lactoferricin-B, a potent bactericidal peptide derived from the N-terminal region of bovine lactoferrin. *J. Appl. Bacteriol.* 73: 472-479.
- Bellamy, W., Takase, M., Yamauchi, K., Wakabayashi, H., Kawase, K., Tomita, M.** (1992b). Identification of the bactericidal domain of lactoferrin. *Biochim. Biophys. Acta* 1121: 130-136.
- Bellamy, W., Wakabayashi, H., Takase, M., Kawase, K., Shimamura, S., Tomita, M.** (1993). Killing of *Candida albicans* by lactoferricin B, a potent antimicrobial peptide derived from the N-terminal region of bovine lactoferrin. *Med. Microbiol. Immunol.* 182: 97-105.

- Bellamy, W., Yamauchi, K., Wakabayashi, H., Takase, M., Takakura, N., Shimamura, S., Tomita, M.** (1994). Antifungal properties of lactoferricin-B, a peptide derived from the N-Terminal region of bovine lactoferrin. *Lett. Appl. Microbiol.* 18: 230-233.
- Benkerroum, N.** (2008). Antimicrobial activity of lysozyme with special relevance to milk. *Afr. J. Biotechnol.* 7: 4856-4867.
- Bevan, E. A., Makower, M.** (1963). The physiological basis of the killer character in yeasts. *En: Proceedings of XIth International Congress on Genetics.* Geerts, S. J., ed. Pergamon Press, Oxford, UK, pp. 202-203.
- Bikshapathy, E., Sitaram, N., Nagaraj, R.** (1999). Effect of introducing *p*-fluorophenylalanine and multiple tryptophan residues in a 13-residue antibacterial peptide. *Prot. & Peptide Lett.* 6: 67-71.
- Blondelle, S. E., Houghten, R. A.** (1996). Novel antimicrobial compounds identified using synthetic combinatorial library technology. *Trends Biotechnol.* 14: 60-65.
- Blondelle, S. E., Takahashi, E., Houghten, R. A., PerezPaya, E.** (1996). Rapid identification of compounds with enhanced antimicrobial activity by using conformationally defined combinatorial libraries. *Biochem. J.* 313: 141-147.
- Bobet, R.** (2000). Minimització de l'ús de SO₂ en vins blancs sobre mares. Correlacions amb els compostos carbonílics. Tesis doctoral. Universitat Rovira i Virgili, Tarragona, España.
- Bom, I. J., Klis, F. M., de Nobel, H., Brul, S.** (2001). A new strategy for inhibition of the spoilage yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Zygosaccharomyces bailii* based on combination of a membrane-active peptide with an oligosaccharide that leads to an impaired glycosylphosphatidylinositol (GPI)-dependent yeast wall protein layer. *FEMS Yeast Res.* 1: 187-194.
- Borch, E., Kant-Muermans, M. L., Blixt, Y.** (1996). Bacterial spoilage of meat and cured meat products. *Int. J. Food Microbiol.* 33: 103-120.
- Bortner, C. A., Arnold, R. R., Miller, R. D.** (1989). Bactericidal effect of lactoferrin on *Legionella pneumophila*: effect of the physiological state of the organism. *Can. J. Microbiol.* 35: 1048-1051.
- Boulton, R. B., Singleton, V. L., Bisson, L. F., Kunkee, R. E.** (1996). Principles and practices of winemaking. Chapman and Hall, NY, USA.

- Bradford, M. M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Brahmachary, M., Krishnan, S. P., Koh, J. L., Khan, A. M., Seah, S. H., Tan, T. W., Brusic, V., Bajic, V. B.** (2004). ANTIMIC: a database of antimicrobial sequences. *Nucleic Acids Res.* 32: D586-D589.
- Branen, J., Davidson, P. M.** (2000). Activity of hydrolysed lactoferrin against foodborne pathogenic bacteria in growth media: the effect of EDTA. *Lett. Appl. Microbiol.* 30: 233-237.
- Breukink, E., Wiedemann, I., van Kraaij, C., Kuipers, O. P., Sahl, H. G., de Kruijff, B.** (1999). Use of the cell wall precursor lipid II by a pore-forming peptide antibiotic. *Science* 286: 2361-2364.
- Broekaert, W. F., Cammue, B. P. A., de Bolle, M. F. C., Thevissen, K., de Samblanx, G. W., Osborn, R. W.** (1997). Antimicrobial peptides from plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* 16: 297-323.
- Brogden, K. A.** (2005). Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat. Rev. Microbiol.* 3: 238-250.
- Brown, K. L., Hancock, R. E.** (2006). Cationic host defense (antimicrobial) peptides. *Curr. Opin. Immunol.* 18: 24-30.
- Buzzini, P., Martini, A.** (2001). Large-scale screening of selected *Candida maltosa*, *Debaryomyces hansenii* and *Pichia anomala* killer toxin activity against pathogenic yeasts. *Med. Mycol.* 39: 479-482.
- Buzzini, P., Turchetti, B., Martini, A.** (2004). Assessment of discriminatory power of three different fingerprinting methods based on killer toxin sensitivity for the differentiation of *Saccharomyces cerevisiae* strains. *J. Appl. Microbiol.* 96: 1194-1201.
- Cabral, K. M., Almeida, M. S., Valente, A. P., Almeida, F. C., Kurtenbach, E.** (2003). Production of the active antifungal *Pisum sativum* defensin 1 (Psd1) in *Pichia pastoris*: overcoming the inefficiency of the STE13 protease. *Protein Expr. Purif.* 31: 115-122.
- Campolongo, S., Rantsiou, K., Giordano, M., Gerbi, V., Cocolin, L.** (2010). Prevalence and biodiversity of *Brettanomyces bruxellensis* in wine from northwestern Italy. *Am. J. Enol. Vitic.* 61: 486-491.
- Carl, G. D., Leisner, J. J., Swings, J., Vancanneyt, M.** (2004). Intra-specific variation of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus pentosus* in sensitivity

Bibliografía

- towards various bacteriocins. *Antonie Van Leeuwenhoek Int. J. Gen. Molec. Microbiol.* 85: 209-216.
- Carstens, M., Vivier, M. A., Pretorius, I. S.** (2003a). The *Saccharomyces cerevisiae* chitinase, encoded by the CTS1-2 gene, confers antifungal activity against *Botrytis cinerea* to transgenic tobacco. *Transgenic Res.* 12: 497-508.
- Carstens, M., Vivier, M. A., van Rensburg, P., Pretorius, I. S.** (2003b). Overexpression, secretion and antifungal activity of the *Saccharomyces cerevisiae* chitinase. *Annals Microbiol.* 53: 15-28.
- Casteels, P., Ampe, C., Jacobs, F., Vaeck, M., Tempst, P.** (1989). Apidaecins: antibacterial peptides from honeybees. *EMBO J.* 8: 2387-2391.
- Castor, J. G. B., Archer, T. E.** (1956). Amino acids in must and wines, proline, serine and threonine. *Am. J. Enol. Vitic.* 7: 19-25.
- Cavallarin, L., Andreu, D., San Segundo, B.** (1998). Cecropin A-derived peptides are potent inhibitors of fungal plant pathogens. *Mol. Plant Microbe Interact.* 11: 218-227.
- Centeno, J. M., Burguete, M. C., Castelló-Ruiz, M., Enrique, M., Vallés, S., Salom, J. B., Torregrosa, G., Marcos, J. F., Alborch, E., Manzanares, P.** (2006). Lactoferricin-related peptides with inhibitory effects on ACE-dependent vasoconstriction. *J. Agric. Food Chem.* 54: 5323-5329.
- Chan, D. I., Prenner, E. J., Vogel, H. J.** (2006). Tryptophan- and arginine-rich antimicrobial peptides: structures and mechanisms of action. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* 1758: 1184-1202.
- Chang, I. S., Kim, B. H., Shin, P. K.** (1997). Use of sulfite and hydrogen peroxide to control bacterial contamination in ethanol fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 1-6.
- Chatonnet, P., Dubourdieu, D., Boidron, J. N., Pons, M.** (1992). The origin of ethylphenols in wines. *J. Sci. Food Agric.* 60: 165-178.
- 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.
- Chen, G. H., Chen, W. M., Huang, G. T., Chen, Y. W., Jiang, S. T.** (2009). Expression of recombinant antibacterial lactoferricin-related peptides from *Pichia pastoris* expression system. *J. Agric. Food Chem.* 57: 9509-9515.

- Chen, G. H., Yin, L. J., Chiang, I. H., Jiang, S. T.** (2008). Cloning and expression of antibacterial goat lactoferricin from *Escherichia coli* AD494(DE3)pLysS expression system. *J. Food Prot.* 71: 2523-2525.
- Chen, H., Hoover, D.** (2003). Bacteriocins and their food applications. *Comp. Rev. Food Sci. Food Safety* 2: 82-100.
- Chen, H. L., Yen, C. C., Lu, C. Y., Yu, C. H., Chen, C. M.** (2006). Synthetic porcine lactoferricin with a 20-residue peptide exhibits antimicrobial activity against *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, and *Candida albicans*. *J. Agric. Food Chem.* 54: 3277-3282.
- Cherkasov, A., Hilpert, K., Jenssen, H., Fjell, C. D., Waldbrook, M., Mullaly, S. C., Volkmer, R., Hancock, R. E.** (2009). Use of artificial intelligence in the design of small peptide antibiotics effective against a broad spectrum of highly antibiotic-resistant superbugs. *ACS Chem. Biol.* 4: 65-74.
- Chung, W., Hancock, R. E. W.** (2000). Action of lysozyme and nisin mixtures against lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 60: 25-32.
- Ciani, M., Fatichenti, F.** (2001). Killer toxin of *Kluyveromyces phaffii* DBVPG 6076 as a biopreservative agent to control apiculate wine yeasts. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 3058-3063.
- Clare, D. A., Catignani, G. L., Swaisgood, H. E.** (2003). Biodefense properties of milk: the role of antimicrobial proteins and peptides. *Curr. Pharm. Des.* 9: 1239-1255.
- Clarke, A. J., Dupont, C.** (1992). *o*-Acetylated peptidoglycan - its occurrence, pathobiological significance, and biosynthesis. *Can. J. Microbiol.* 38: 85-91.
- Cleveland, J., Montville, T. J., Nes, I. F., Chikindas, M. L.** (2001). Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *Int. J. Food Microbiol.* 71: 1-20.
- Comitini, F., Ciani, M.** (2010). The zymocidal activity of *Tetrapisispora phaffii* in the control of *Hanseniaspora uvarum* during the early stages of winemaking. *Lett. Appl. Microbiol.* 50: 50-56.
- Comitini, F., De Ingeniis, J., Pepe, L., Mannazzu, I., Ciani, M.** (2004a). *Pichia anomala* and *Kluyveromyces wickerhamii* killer toxins as new tools against *Dekkera/Brettanomyces* spoilage yeasts. *FEMS Microbiol. Lett.* 238: 235-240.
- Comitini, F., Di Pietro, N., Zacchi, L., Mannazzu, I., Ciani, M.** (2004b). *Kluyveromyces phaffii* killer toxin active against wine spoilage yeasts: purification and characterization. *Microbiology* 150: 2535-2541.

- Conesa, C., Rota, C., Castillo, E., Perez, M. D., Calvo, M., Sanchez, L.** (2010). Effect of heat treatment on the antibacterial activity of bovine lactoferrin against three foodborne pathogens. *Int. J. Dairy Technol.* 63: 209-215.
- Conterno, L., Joseph, C. M. L., Arvik, T. J., Henick-Kling, T., Bisson, L. F.** (2006). Genetic and physiological characterization of *Brettanomyces bruxellensis* strains isolated from wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 57: 139-147.
- Corbo, M. R., Bevilacqua, A., Campaniello, D., D'Amato, D., Speranza, B., Sinigaglia, M.** (2009). Prolonging microbial shelf life of foods through the use of natural compounds and non-thermal approaches - a review. *Int. J. Food Sci. Technol.* 44: 223-241.
- Cordonnier, R., Dugal, A.** (1968). Les activités protéolytiques du raisin. *Ann. Technol. Agr.* 17: 189-206.
- Costa, A., Barata, A., Malfeito-Ferreira, M., Loureiro, V.** (2008). Evaluation of the inhibitory effect of dimethyl dicarbonate (DMDC) against wine microorganisms. *Food Microbiol.* 25: 422-427.
- Cotter, P. D., Hill, C., Ross, R. P.** (2005). Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nat. Rev. Microbiol.* 3: 777-788.
- Couto, J. A., Neves, F., Campos, F., Hogg, T.** (2005). Thermal inactivation of the wine spoilage yeasts *Dekkera/Brettanomyces*. *Int. J. Food Microbiol.* 104: 337-344.
- Curtin, C. D., Bellon, J. R., Henschke, P. A., Godden, P. W., de Barros Lopes, M. A.** (2007). Genetic diversity of *Dekkera bruxellensis* yeasts isolated from Australian wineries. *FEMS Yeast Res.* 7: 471-481.
- Dagan, A., Efron, L., Gaidukov, L., Mor, A., Ginsburg, H.** (2002). *In vitro* antiplasmodium effects of dermaseptin S4 derivatives. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46: 1059-1066.
- Daudt, C. E., Ough, C. S.** (1980). Action of dimethyldicarbonate on various yeasts. *Am. J. Enol. Vitic.* 31: 21-23.
- Davis, C. R., Wibowo, D., Eschenbruch, R., Lee, T. H., Fleet, G. H.** (1985). Practical implications of malolactic fermentation: a review. *Am. J. Enol. Vitic.* 36: 290-301.
- Davis, C. R., Wibowo, D., Fleet, G. H., Lee, T. H.** (1988). Properties of wine lactic acid bacteria: their potential enological significance. *Am. J. Enol. Vitic.* 39: 137-142.

- de la Cruz, J., Pintor-Toro, J. A., Benitez, T., Llobell, A.** (1995). Purification and characterization of an endo- β -1,6-glucanase from *Trichoderma harzianum* that is related to its mycoparasitism. *J. Bacteriol.* 177: 1864-1871.
- de Llanos, R., Fernández-Espinar, M. T., Querol, A.** (2004). Identification of species of the genus *Candida* by analysis of the 5,8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *Antonie Van Leeuwenhoek Int. J. Gen. Molec. Microbiol.* 85: 175-185.
- De Lucca, A. J., Bland, J. M., Grimm, C., Jacks, T. J., Cary, J. W., Jaynes, J. M., Cleveland, T. E., Walsh, T. J.** (1998). Fungicidal properties, sterol binding, and proteolytic resistance of the synthetic peptide D4E1. *Can. J. Microbiol.* 44: 514-520.
- De Lucca, A. J., Walsh, T. J.** (1999). Antifungal peptides: novel therapeutic compounds against emerging pathogens. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43: 1-11.
- De Smet, K., Contreras, R.** (2005). Human antimicrobial peptides: defensins, cathelicidins and histatins. *Biotechnol. Lett.* 27: 1337-1347.
- de Souza Liberal, A. T., Basílio, A. C. M., do Monte Resende, A., Brasileiro, B. T. V., da Silva-Filho, E. A., de Moraes, J. O. F., Simoes, D. A., de Moraes Jr, M. A.** (2007). Identification of *Dekkera bruxellensis* as a major contaminant yeast in continuous fuel ethanol fermentation. *J. Appl. Microbiol.* 102: 538-547.
- de Weert, S., Vermeiren, H., Mulders, I. H., Kuiper, I., Hendrickx, N., Bloemberg, G. V., Vanderleyden, J., De, M. R., Lugtenberg, B. J.** (2002). Flagella-driven chemotaxis towards exudate components is an important trait for tomato root colonization by *Pseudomonas fluorescens*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 15: 1173-1180.
- Deak, T., Beuchat, L. R.** (1996). Handbook of food spoilage yeasts. *CRC Press, Boca Raton, USA*
- del Olmo, A., Morales, P., Nuñez, M.** (2009). Bactericidal activity of lactoferrin and its amidated and pepsin-digested derivatives against *Pseudomonas fluorescens* in ground beef and meat fractions. *J. Food Prot.* 72: 760-765.
- Delvesbroughton, J.** (1990). Nisin and its uses as a food preservative. *Food Technol.* 44: 100-107.
- Dicks, L. M., Dellaglio, F., Collins, M. D.** (1995). Proposal to reclassify *Leuconostoc oenos* as *Oenococcus oeni* [corrige.] gen. nov., comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45: 395-397.

- Dinh, T. N., Nagahisa, K., Hirasawa, T., Furusawa, C., Shimizu, H.** (2008). Adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* cells to high ethanol concentration and changes in fatty acid composition of membrane and cell size. *PLoS ONE* 3: e2623-e2623.
- Dionysius, D. A., Milne, J. M.** (1997). Antibacterial peptides of bovine lactoferrin: purification and characterization. *J. Dairy Sci.* 80: 667-674.
- Divol, B., Strehaiano, P., Lonvaud-Funel, A.** (2005). Effectiveness of dimethyldicarbonate to stop alcoholic fermentation in wine. *Food Microbiol.* 22: 169-178.
- Dobbenie, D., Uyttendaele, M., Debevere, J.** (1995). Antibacterial activity of the glucose oxidase/glucose system in liquid whole egg. *J. Food Prot.* 58: 273-279.
- Dorschner, R. A., López-García, B., Peschel, A., Kraus, D., Morikawa, K., Nizet, V., Gallo, R. L.** (2006). The mammalian ionic environment dictates microbial susceptibility to antimicrobial defense peptides. *FASEB J.* 20: 35-42.
- Drysdale, G. S., Fleet, G. H.** (1985). Acetic acid bacteria in some australian wines. *Food Technol. Aust.* 37: 17-20.
- du Toit, M., Pretorius, I. S.** (2000). Microbial spoilage and preservation of wine: using weapons from nature's own arsenal - a review. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 21: 74-92.
- du Toit, M., Schoeman, H., Vivier, M. A., Dicks, L. M. T., Hastings, J. W., Pretorius, I. S.** (1999). A yeast with antimicrobial activity as possible alternative to chemical preservatives. *En: Food Microbiology and Food Safety into the Next Millenium. Proceedings of the 17th International Conference of the ICFMH.* Tuijtelars, A. C. J., Samson, R. A., Rombouts, F. M., Notermans, S., eds. Ponsen and Looyen, Wageningen, The Netherlands, pp. 319-322.
- Dubourdieu, D., Desplanques, C., Villettaz, J.-C., Ribéreau-Gayon, P.** (1985). Investigations of an industrial β -d-glucanase from *Trichoderma harzianum*. *Carbohydr. Res.* 144: 277-287.
- Dubourdieu, D., Ribéreau-Gayon, P., Fournet, B.** (1981). Structure of the extracellular β -d-glucan from *Botrytis cinerea*. *Carbohydr. Res.* 93: 294-299.
- Dupuy, P., Morfaux, J. N., Usciati, M.** (1967). Métabolisme azoté des levures en oenologie. 2on Symposium International d'Oenologie, Bordeaux, France.
- Düring, K., Porsch, P., Mahn, A., Brinkmann, O., Gieffers, W.** (1999). The non-enzymatic microbicidal activity of lysozymes. *FEBS Lett.* 449: 93-100.

- Efron, L., Dagan, A., Gaidukov, L., Ginsburg, H., Mor, A.** (2002). Direct interaction of dermaseptin S4 aminoheptanoyl derivative with intraerythrocytic malaria parasite leading to increased specific antiparasitic activity in culture. *J. Biol. Chem.* 277: 24067-24072.
- Eliassen, L. T., Berge, G., Sveinbjornsson, B., Svendsen, J. S., Vorland, L. H., Rekdal, O.** (2002). Evidence for a direct antitumor mechanism of action of bovine lactoferricin. *Anticancer Res.* 22: 2703-2710.
- Eliassen, L. T., Haug, B. E., Berge, G., Rekdal, O.** (2003). Enhanced antitumour activity of 15-residue bovine lactoferricin derivatives containing bulky aromatic amino acids and lipophilic N-terminal modifications. *J. Pept. Sci.* 9: 510-517.
- Epand, R. M., Vogel, H. J.** (1999). Diversity of antimicrobial peptides and their mechanisms of action. *Biochim. Biophys. Acta* 1462: 11-28.
- Esteve-Zarzoso, B., Belloch, C., Uruburu, F., Querol, A.** (1999). Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5,8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49: 329-337.
- Falcone, P., Speranza, B., Del Nobile, M. A., Corbo, M. R., Sinigaglia, M.** (2005). Study on the antimicrobial activity of thymol intended as a natural preservative. *J. Food Prot.* 68: 1664-1670.
- Farnaud, S., Evans, R. W.** (2003). Lactoferrin - a multifunctional protein with antimicrobial properties. *Mol. Immunol.* 40: 395-405.
- Farnaud, S., Spiller, C., Moriarty, L. C., Patel, A., Gant, V., Odell, E. W., Evans, R. W.** (2004). Interactions of lactoferricin-derived peptides with LPS and antimicrobial activity. *FEMS Microbiol. Lett.* 233: 193-199.
- Farrer, K. T. H.** (1956). The autolysis of yeast. *Food Sci. Abstr.* 28: 1-12.
- Felix, J. V., Papathanasopoulos, M. A., Smith, A. A., von Holy A., Hastings, J. W.** (1994). Characterization of leucocin B-Ta11a: a bacteriocin from *Leuconostoc carnosum* Ta11a isolated from meat. *Curr. Microbiol.* 29: 207-212.
- Feng, X., Liu, C., Guo, J., Bi, C., Cheng, B., Li, Z., Shan, A., Li, Z.** (2010). Expression and purification of an antimicrobial peptide, bovine lactoferricin derivative LfcinB-W10 in *Escherichia coli*. *Curr. Microbiol.* 60: 179-184.
- Feng, X. J., Wang, J. H., Shan, A. S., Teng, D., Yang, Y. L., Yao, Y., Yang, G. P., Shao, Y. C., Liu, S., Zhang, F.** (2006). Fusion expression of bovine lactoferricin in *Escherichia coli*. *Protein Expr. Purif.* 47: 110-117.

- Fenice, M., Di Giambattista R., Leuba, J. L., Federici, F.** (1999). Inactivation of *Mucor plumbeus* by the combined actions of chitinase and high hydrostatic pressure. *Int. J. Food Microbiol.* 52: 109-113.
- Fernández-Espinar, M. T., Esteve-Zarzoso, B., Querol, A., Barrio, E.** (2000). RFLP analysis 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 yeasts. *Antonie Van Leeuwenhoek Int. J. Gen. Molec. Microbiol.* 78: 87-97.
- Fernández-Musoles, R., López-Díez, J. J., Torregrosa, G., Vallés, S., Alborch, E., Manzanares, P., Salom, J. B.** (2010). Lactoferricin B-derived peptides with inhibitory effects on ECE-dependent vasoconstriction. *Peptides* 31: 1926-1933.
- Fields, G. B., Noble, R. L.** (1990). Solid phase peptide synthesis utilizing 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino acids. *Int. J. Pept. Protein Res.* 35: 161-214.
- Fitzgerald, D. J., Stratford, M., Narbad, A.** (2003). Analysis of the inhibition of food spoilage yeasts by vanillin. *Int. J. Food Microbiol.* 86: 113-122.
- Fleet, G. H.** (1990). Growth of yeasts during wine fermentations. *J. Wine Res.* 1: 211-223.
- Fleet, G. H.** (1993). The microorganisms of winemaking - isolation, enumeration and identification. *En: Wine Microbiology and Biotechnology.* Fleet, G. H., ed. Harwood Academic Publisher, Chur, Switzerland, pp. 1-25.
- Fleet, G. H.** (1998). The microbiology of alcoholic beverages. *En: Microbiology of Fermented Foods.* Wood, B. J. B., ed. Blackie Academic and Professional, London, UK, pp. 217-262.
- Fleet, G. H.** (1999). Microorganisms in food ecosystems. *Int. J. Food Microbiol.* 50: 101-117.
- Fleet, G. H., Heard, G. M.** (1993). Yeasts growth during fermentation. *En: Wine Microbiology and Biotechnology.* Fleet, G. H., ed. Harwood Academic Publisher, Chur, Switzerland, pp. 27-57.
- François-Collange, M., Pernot, F., Suschetet, M., Mareschi, J. P.** (1991). Estimation of intake of sulphite via foods in France. *Cah. Nutr. Diet.* 26: 352-358.
- Fredlund, E., Druvefors, U., Boysen, M. E., Lingsten, K. J., Schnurer, J.** (2002). Physiological characteristics of the biocontrol yeast *Pichia anomala* J121. *FEMS Yeast Res.* 2: 395-402.
- Fugelsang, K. C.** (1997). *Wine Microbiology.* Chapman and Hall, NY, USA.

- Fugelsang, K. C.** (1998). *Zygosaccharomyces*, a spoilage yeast isolated from grape juice. Viticulture and Enology Research Center, California State University, Fresno, USA.
- Fugelsang, K. C., Edwards, C. G.** (2007). Microbial ecology during vinification. *En: Wine Microbiology: Practical Applications and Procedures*. 2nd ed. Springer Science and Business Media LLC, NY, USA, pp. 84-87.
- Fugelsang, K. C., Zoecklein, B. W.** (2003). Population dynamics and effects of *Brettanomyces bruxellensis* strains on Pinot noir (*Vitis vinifera* L.) wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 54: 294-300.
- Fuglsang, C. C., Johansen, C., Christgau, S., Adlernissen, J.** (1995). Antimicrobial enzymes: applications and future potential in the food industry. *Trends Food Sci. Technol.* 6: 390-396.
- Fujita, K., Kubo, I.** (2002). Antifungal activity of octyl gallate. *Int. J. Food Microbiol.* 79: 193-201.
- Fujita, K., Kubo, I.** (2005). Naturally occurring antifungal agents against *Zygosaccharomyces bailii* and their synergism. *J. Agric. Food Chem.* 53: 5187-5191.
- Gálvez, A., Abriouel, H., López, R. L., Ben Omar N.** (2007). Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *Int. J. Food Microbiol.* 120: 51-70.
- Gálvez, A., López, R. L., Abriouel, H., Valdivia, E., Omar, N. B.** (2008). Application of bacteriocins in the control of foodborne pathogenic and spoilage bacteria. *Crit. Rev. Biotechnol.* 28: 125-152.
- Ganesan, A.** (1998). Combinatorial chemistry in the hunt for medicines. *Nature* 393: 727-727.
- Ganz, T.** (2004). Defensins: antimicrobial peptides of vertebrates. *C. R. Biol.* 327: 539-549.
- Gao, Y. C., Zhang, G. P., Krentz, S., Darius, S., Power, J., Lagarde, G.** (2002). Inhibition of spoilage lactic acid bacteria by lysozyme during wine alcoholic fermentation. *Aust. J. Grape Wine Res.* 8: 76-83.
- García, D. L., Dillard, J. P.** (2006). AmiC functions as an N-acetylmuramyl-L-alanine amidase necessary for cell separation and can promote autolysis in *Neisseria gonorrhoeae*. *J. Bacteriol.* 188: 7211-7221.
- García-Casado, G., Collada, C., Allona, I., Casado, R., Pacios, L. F., Aragoncillo, C., Gómez, L.** (1998). Site-directed mutagenesis of active site

Bibliografía

- residues in a class I endochitinase from chestnut seeds. *Glycobiology* 8: 1021-1028.
- García-Olmedo, F., Molina, A., Alamillo, J. M., Rodríguez-Palenzuela, P.** (1998). Plant defense peptides. *Biopolymers* 47: 479-491.
- Gerbaux, V., Meistermann, E., Cottureau, P., Barriere, C., Cuinier, C., Berger, J. L., Villa, A.** (1999). Use of lysozyme in enology. *Bulletin de l'O. I. V.* 819-820: 349-373.
- Gerbaux, V., Villa, A., Monamy, C., Bertrand, A.** (1997). Use of lysozyme to inhibit malolactic fermentation and to stabilize wine after malolactic fermentation. *Am. J. Enol. Vitic.* 48: 49-54.
- Ghosh, J. K., Shaool, D., Guillaud, P., Ciceron, L., Mazier, D., Kustanovich, I., Shai, Y., Mor, A.** (1997). Selective cytotoxicity of dermaseptin S3 toward intraerythrocytic *Plasmodium falciparum* and the underlying molecular basis. *J. Biol. Chem.* 272: 31609-31616.
- Gómez-Rivas, L., Escudero-Abarca, B. I., Aguilar-Uscanga, M. G., Hayward-Jones, P. M., Mendoza, P., Ramírez, M.** (2004). Selective antimicrobial action of chitosan against spoilage yeasts in mixed culture fermentations. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 31: 16-22.
- González, C. F., Kunka, B. S.** (1987). Plasmid-associated bacteriocin production and sucrose fermentation in *Pediococcus acidilactici*. *Appl. Environ. Microbiol.* 53: 2534-2538.
- Gooday, G. W.** (1971). Autoradiographic study of hyphal growth of some fungi. *J. Gen. Microbiol.* 67: 125-133.
- Goode, J., Harrop, S.** (2008). Sulphur compounds: production and sensory impact on wine. *Proceedings of Les XXes Entretiens Scientifiques Lallemand*, Horsens, Denmark.
- Goretti, M., Turchetti, B., Buratta, M., Branda, E., Corazzi, L., Vaughan-Martini, A., Buzzini, P.** (2009). *In vitro* antimycotic activity of a *Williopsis saturnus* killer protein against food spoilage yeasts. *Int. J. Food Microbiol.* 131: 178-182.
- Gould, G. W.** (1996). Industry perspectives on the use of antimicrobials and inhibitors for food applications. *J. Food Prot. Suppl.*: 82-86.
- Grbin, P. R., Henschke, P. A.** (2000). Mousy off-flavor production in grape juice and wine. *Aust. J. Grape Wine Res.* 6: 255-262.

- Guerreiro, C. I., Fontes, C. M., Gama, M., Domingues, L.** (2008). *Escherichia coli* expression and purification of four antimicrobial peptides fused to a family 3 carbohydrate-binding module (CBM) from *Clostridium thermocellum*. *Protein Expr. Purif.* 59: 161-168.
- Guerrini, S., Mangani, S., Granchi, L., Vincenzini, M.** (2002). Biogenic amine production by *Oenococcus oeni*. *Curr Microbiol* 44: 374-378.
- Guillamón, J. M., Sabaté, J., Barrio, E., Cano, J., Querol, A.** (1998). Rapid identification of wine yeast species based on RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region. *Arch. Microbiol.* 169: 387-392.
- Gupta, S., Sharma, S. C., Singh, B.** (1994). Changes in the composition and peroxidation of yeast membrane lipids during ethanol stress. *Acta Microbiol. Immunol. Hung.* 41: 197-204.
- Hancock, R. E.** (2001). Cationic peptides: effectors in innate immunity and novel antimicrobials. *Lancet Infect. Dis.* 1: 156-164.
- Hancock, R. E. W., Sahl, H. G.** (2006). Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nat. Biotechnol.* 24: 1551-1557.
- Haug, B. E., Strom, M. B., Svendsen, J. S.** (2007). The medicinal chemistry of short lactoferricin-based antibacterial peptides. *Curr. Med. Chem.* 14: 1-18.
- Haug, B. E., Svendsen, J. S.** (2001). The role of tryptophan in the antibacterial activity of a 15-residue bovine lactoferricin peptide. *J. Pept. Sci.* 7: 190-196.
- Haukland, H. H., Ulvatne, H., Sandvik, K., Vorland, L. H.** (2001). The antimicrobial peptides lactoferricin B and magainin 2 cross over the bacterial cytoplasmic membrane and reside in the cytoplasm. *FEBS Lett.* 508: 389-393.
- Heard, G. H., Fleet, G. H.** (1998). The effect of sulphur dioxide on yeast growth during natural and inoculated wine fermentation. *Aust. N. Z. Wine Ind. J.* 3: 57-60.
- Heilmann, C., Hartleib, J., Hussain, M. S., Peters, G.** (2005). The multifunctional *Staphylococcus aureus* autolysin aaa mediates adherence to immobilized fibrinogen and fibronectin. *Infect. Immun.* 73: 4793-4802.
- Henschke, P. A.** (1997). Wine yeast. *En: Yeast Sugar Metabolism: Biochemistry, Genetics, Biotechnology and Applications.* Zimmermann, F. K., Entian, K.-D., eds. Technomic Publishing, Lancaster, USA, pp. 527-560.

- Henschke, P. A., Jiranek, V.** (1993). Yeasts - Metabolism of nitrogen compounds. *En: Wine Microbiology and Biotechnology*. Fleet, G. H., ed. Harwood Academic Publishers, Chur, Switzerland, pp. 77-164.
- Heresztyn, T.** (1986). Formation of substituted tetrahydropyridines by species of *Brettanomyces* and *Lactobacillus* isolated from mousy wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 37: 127-132.
- Hidalgo, J.** (2003). Tratado de Enología. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, España.
- Hilpert, K., Elliott, M. R., Volkmer-Engert, R., Henklein, P., Donini, O., Zhou, Q., Winkler, D. F., Hancock, R. E.** (2006). Sequence requirements and an optimization strategy for short antimicrobial peptides. *Chem. Biol.* 13: 1101-1107.
- Hristova, K., Selsted, M. E., White, S. H.** (1997). Critical role of lipid composition in membrane permeabilization by rabbit neutrophil defensins. *J. Biol. Chem.* 272: 24224-24233.
- Hsu, S. T., Breukink, E., Tischenko, E., Lutters, M. A., de K. B., Kaptein, R., Bonvin, A. M., van Nuland, N. A.** (2004). The nisin-lipid II complex reveals a pyrophosphate cage that provides a blueprint for novel antibiotics. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 11: 963-967.
- Ibrahim, H. R., Matsuzaki, T., Aoki, T.** (2001). Genetic evidence that antibacterial activity of lysozyme is independent of its catalytic function. *FEBS Lett.* 506: 27-32.
- Ingham, A. B., Moore, R. J.** (2007). Recombinant production of antimicrobial peptides in heterologous microbial systems. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 47: 1-9.
- Iseli, B., Boller, T., Neuhaus, J. M.** (1993). The N-terminal cysteine-rich domain of tobacco class I chitinase is essential for chitin binding but not for catalytic or antifungal activity. *Plant Physiol.* 103: 221-226.
- Jackson, R. S.** (2000). Wine Science. Principles, Practice, Perception (Food Science and Technology). 2nd ed. Academic Press, San Diego, USA.
- Jackson, R. S., Jackson, R.** (1994). Wine Science. Principles and Applications (Food Science and Technology). 1st ed. Academic Press, San Diego, USA.
- Jaynes, J., Xanthopoulos, K., Destefanobeltran, L., Dodds, J.** (1987). Increasing bacterial disease resistance in plants utilizing antibacterial genes from insects. *Bioessays* 6: 263-270.

- Jin, F., Xu, X., Wang, L., Zhang, W., Gu, D.** (2006a). Expression of recombinant hybrid peptide cecropinA(1-8)-magainin2(1-12) in *Pichia pastoris*: purification and characterization. *Protein Expr. Purif.* 50: 147-156.
- Jin, F., Xu, X., Zhang, W., Gu, D.** (2006b). Expression and characterization of a housefly cecropin gene in the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*. *Protein Expr. Purif.* 49: 39-46.
- Jin, F. L., Xu, X. X., Yu, X. Q., Ren, S. X.** (2009). Expression and characterization of antimicrobial peptide CecropinAD in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Process Biochem.* 44: 11-16.
- Joyeux, A., Lafon-Lafourcade, S., Ribéreau-Gayon, P.** (1984a). Evolution of acetic acid bacteria during fermentation and storage of wine. *Appl. Environ. Microbiol.* 48: 153-156.
- Joyeux, A., Lafon-Lafourcade, S., Ribéreau-Gayon, P.** (1984b). Metabolism of acetic acid bacteria in grape must. Consequences on alcoholic and malolactic fermentation. *Sci. Alim.* 4: 247-255.
- Kamysz, W., Okrój, M., Lukasiak, J.** (2003). Novel properties of antimicrobial peptides. *Acta Biochim. Pol.* 50: 461-469.
- Kang, J. H., Shin, S. Y., Jang, S. Y., Lee, M. K., Hahm, K. S.** (1998). Release of aqueous contents from phospholipid vesicles induced by cecropin A (1-8)-magainin 2 (1-12) hybrid and its analogues. *J. Pept. Res.* 52: 45-50.
- Kim, H. K., Chun, D. S., Kim, J. S., Yun, C. H., Lee, J. H., Hong, S. K., Kang, D. K.** (2006). Expression of the cationic antimicrobial peptide lactoferricin fused with the anionic peptide in *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 72: 330-338.
- Kim, K. S., Chang, J. E., Yun, H. S.** (2004). Estimation of soluble β -glucan content of yeast cell wall by the sensitivity to Glucanex® 200G treatment. *Enzyme Microbial Technol.* 35: 672-677.
- Kim, K. S., Yun, H. S.** (2006). Production of soluble β -glucan from the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme Microbial Technol.* 39: 496-500.
- Klaenhammer, T. R.** (1993). Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 12: 39-85.
- Korhonen, H., Pihlanto, A.** (2006). Bioactive peptides: production and functionality. *Int. Dairy J.* 16: 945-960.

- Krugliak, M., Feder, R., Zolotarev, V. Y., Gaidukov, L., Dagan, A., Ginsburg, H., Mor, A.** (2000). Antimalarial activities of dermaseptin S4 derivatives. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44: 2442-2451.
- Kurtzman, C. P., Droby, S.** (2001). *Metschnikowia fructicola*, a new ascosporic yeast with potential for biocontrol of postharvest fruit rots. *Syst. Appl. Microbiol.* 24: 395-399.
- Kurtzman, C. P., Fell, J. W.** (1998). The Yeasts: A Taxonomic Study. Kurtzman, C.P., Fell, J.W., eds. 4th ed. Elsevier Science B. V., Amsterdam, The Netherlands.
- Kurtzman, C. P., Robnett, C. J.** (1998). Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie Van Leeuwenhoek Int. J. Gen. Molec. Microbiol.* 73: 331-371.
- Lafon-Lafourcade, S., Carre, E., Ribéreau-Gayon, P.** (1983). Occurrence of lactic acid bacteria during the different stages of vinification and conservation of wines. *Appl. Environ. Microbiol.* 46: 874-880.
- Laible, N. J., Germaine, G. R.** (1985). Bactericidal activity of human lysozyme, muramidase-inactive lysozyme, and cationic polypeptides against *Streptococcus sanguis* and *Streptococcus faecalis*: inhibition by chitin oligosaccharides. *Infect. Immun.* 48: 720-728.
- Lavermicocca, P., Valerio, F., Evidente, A., Lazzaroni, S., Corsetti, A., Gobbetti, M.** (2000). Purification and characterization of novel antifungal compounds from the sourdough *Lactobacillus plantarum* strain 21B. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 4084-4090.
- Lawyer, C., Pai, S., Watabe, M., Borgia, P., Mashimo, T., Eagleton, L., Watabe, K.** (1996). Antimicrobial activity of a 13 amino acid tryptophan-rich peptide derived from a putative porcine precursor protein of a novel family of antibacterial peptides. *FEBS Lett.* 390: 95-98.
- Lee, T. H., Simpson, R. F.** (1993). Microbiology and chemistry of cork taints in wine. *En: Wine Microbiology and Biotechnology.* Fleet, G. H., ed. Harwood Academic Publishers, Chur, Switzerland, pp. 353-372.
- Lehrer, R. I.** (2004). Primate defensins. *Nat. Rev. Microbiol.* 2: 727-738.
- Lehtonen, P.** (1996). Determination of amines and amino acids in wine - a review. *Am. J. Enol. Vitic.* 47: 127-133.

- Li, M., Lai, Y., Villaruz, A. E., Cha, D. J., Sturdevant, D. E., Otto, M.** (2007). Gram-positive three-component antimicrobial peptide-sensing system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104: 9469-9474.
- Li, Q., Lawrence, C. B., Xing, H. Y., Babbitt, R. A., Bass, W. T., Maiti, I. B., Everett, N. P.** (2001). Enhanced disease resistance conferred by expression of an antimicrobial magainin analog in transgenic tobacco. *Planta* 212: 635-639.
- Liu, S. Q., Davis, C. R., Brooks, J. D.** (1995). Growth and metabolism of selected lactic acid bacteria in synthetic wine. *Am. J. Enol. Vitic.* 46: 166-174.
- Llama-Palacios, A., López-Solanilla, E., Rodríguez-Palenzuela, P.** (2005). Role of the PhoP-PhoQ system in the virulence of *Erwinia chrysanthemi* strain 3937: involvement in sensitivity to plant antimicrobial peptides, survival at acid pH, and regulation of pectolytic enzymes. *J. Bacteriol.* 187: 2157-2162.
- Loessner, M. J.** (2005). Bacteriophage endolysins - current state of research and applications. *Curr. Opin. Microbiol.* 8: 480-487.
- Lonvaud-Funel, A.** (1999). Lactic acid bacteria in the quality improvement and depreciation of wine. *Antonie Van Leeuwenhoek Int. J. Gen. Molec. Microbiol.* 76: 317-331.
- Lonvaud-Funel, A., Joyeux, A.** (1994). Histamine production by wine lactic acid bacteria: isolation of a histamine-producing strain of *Leuconostoc oenos*. *J. Appl. Bacteriol.* 77: 401-407.
- López-Expósito, I., Minervini, F., Amigo, L., Recio, I.** (2006). Identification of antibacterial peptides from bovine κ -casein. *J. Food Prot.* 69: 2992-2997.
- López-García, B., González-Candelas, L., Pérez-Payá, E., Marcos, J. F.** (2000). Identification and characterization of a hexapeptide with activity against phytopathogenic fungi that cause postharvest decay in fruits. *Mol. Plant Microbe Interact.* 13: 837-846.
- López-García, B., Pérez-Payá, E., Marcos, J. F.** (2002). Identification of novel hexapeptides bioactive against phytopathogenic fungi through screening of a synthetic peptide combinatorial library. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 2453-2460.
- López-García, B., Ubhayasekera, W., Gallo, R. L., Marcos, J. F.** (2007). Parallel evaluation of antimicrobial peptides derived from the synthetic PAF26 and the human LL37. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 356: 107-113.
- López-García, B., Veyrat, A., Pérez-Payá, E., González-Candelas, L., Marcos, J. F.** (2003). Comparison of the activity of antifungal hexapeptides and the

Bibliografía

- fungicides thiabendazole and imazalil against postharvest fungal pathogens. *Int. J. Food Microbiol.* 89: 163-170.
- Lorin, C., Saidi, H., Belaid, A., Zairi, A., Baleux, F., Hocini, H., Belec, L., Hani, K., Tangy, F.** (2005). The antimicrobial peptide dermaseptin S4 inhibits HIV-1 infectivity *in vitro*. *Virology* 334: 264-275.
- Loureiro, V., Malfeito-Ferreira, M.** (2003a). Spoilage yeasts in the wine industry. *Int. J. Food Microbiol.* 86: 23-50.
- Loureiro, V., Malfeito-Ferreira, M.** (2003b). Yeasts in spoilage. *En: Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*. Caballero, B., Trugo, L., Finglas, P., eds. 2nd ed. Academic Press, London, UK, pp. 5530-5536.
- Loureiro, V., Querol, A.** (1999). The prevalence and control of spoilage yeasts in foods and beverages. *Trends Food Sci. Technol.* 10: 356-365.
- Lyhs, V.** (2002). Lactic acid bacteria associated with the spoilage of fish products. Academic Dissertation, University of Helsinki, Finland.
- Magliani, W., Conti, S., Gerloni, M., Bertolotti, D., Polonelli, L.** (1997). Yeast killer systems. *Clin. Microbiol. Rev.* 10: 369-400.
- Malherbe, D. F., du Toit, M., Otero, R. R. C., van Rensburg, P., Pretorius, I. S.** (2003). Expression of the *Aspergillus niger* glucose oxidase gene in *Saccharomyces cerevisiae* and its potential applications in wine production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 61: 502-511.
- Manca de Nadra, M. C., Strasser de Saad, A. M.** (1995). Polysaccharide production by *Pediococcus pentosaceus* from wine. *Int. J. Food Microbiol.* 27: 101-106.
- Marcos, J. F., Beachy, R. N., Houghten, R. A., Blondelle, S. E., Pérez-Payá, E.** (1995). Inhibition of a plant virus infection by analogs of melittin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92: 12466-12469.
- Marcos, J. F., Gandía, M.** (2009). Antimicrobial peptides: to membranes and beyond. *Expert Opin. Drug Discovery* 4: 659-671.
- Marcos, J. F., Muñoz, A., Pérez-Payá, E., Misra, S., López-García, B.** (2008). Identification and rational design of novel antimicrobial peptides for plant protection. *Ann. Rev. Phytopathol.* 46: 273-301.
- Martineau, B., Henick-Kling, T.** (1995). Performance and diacetyl production of commercial strains of malolactic bacteria in wine. *J. Appl. Bacteriol.* 78: 526-536.

- Martínez, M., Torres, M., Bobet, R., Cantarero, X., Álvarez, J. F., Rubires, X.** (2004). Application de l'impédance électrique pour le contrôle microbiologique des vins embouteillés. *Rev. Fr. Oenol.* 205: 34-36.
- Martorell, P., Barata, A., Malfeito-Ferreira, M., Fernández-Espinar, M. T., Loureiro, V., Querol, A.** (2006). Molecular typing of the yeast species *Dekkera bruxellensis* and *Pichia guilliermondii* recovered from wine related sources. *Int. J. Food Microbiol.* 106: 79-84.
- Masschalck, B., Deckers, D., Michiels, C. W.** (2002). Lytic and nonlytic mechanism of inactivation of Gram positive bacteria by lysozyme under atmospheric and high hydrostatic pressure. *J. Food Prot.* 65: 1916-1923.
- Masschalck, B., Van Houdt, R., Van Haver, E. G. R., Michiels, C. W.** (2001). Inactivation of Gram negative bacteria by lysozyme, denatured lysozyme, and lysozyme-derived peptides under high hydrostatic pressure. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 339-344.
- Matsuzaki, K., Yoneyama, S., Miyajima, K.** (1997). Pore formation and translocation of melittin. *Biophys. J.* 73: 831-838.
- Meincken, M., Holroyd, D. L., Rautenbach, M.** (2005). Atomic force microscopy study of the effect of antimicrobial peptides on the cell envelope of *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49: 4085-4092.
- Meisel, H.** (2005). Biochemical properties of peptides encrypted in bovine milk proteins. *Curr. Med. Chem.* 12: 1905-1919.
- Metz-Boutigue, M. H., Jolles, J., Mazurier, J., Schoentgen, F., Legrand, D., Spik, G., Montreuil, J., Jolles, P.** (1984). Human lactotransferrin: amino acid sequence and structural comparisons with other transferrins. *Eur. J. Biochem.* 145: 659-676.
- Miller, S. M., Simon, R. J., Ng, S., Zuckermann, R. N., Kerr, J. M., Moos, W. H.** (1995). Comparison of the proteolytic susceptibilities of homologous L-amino acid, D-amino acid, and N-substituted glycine peptide and peptoid oligomers. *Drug Dev. Res.* 35: 20-32.
- Mine, Y., Ma, F., Lauriau, S.** (2004). Antimicrobial peptides released by enzymatic hydrolysis of hen egg white lysozyme. *J. Agric. Food Chem.* 52: 1088-1094.
- Mira de Orduña, R., Liu, S. Q., Parchett, M. L., Pilone, G. J.** (2000). Ethyl carbamate precursor citrulline formation from arginine degradation by malolactic wine lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 183: 31-35.

- Mirleau, P., Delorme, S., Philippot, L., Meyer, J., Mazurier, S., Lemanceau, P.** (2000). Fitness in soil and rhizosphere of *Pseudomonas fluorescens* C7R12 compared with a C7R12 mutant affected in pyoverdine synthesis and uptake. *FEMS Microbiol. Ecol.* 34: 35-44.
- Monteiro, F. F., Bisson, L. F.** (1991). Amino acid utilization and urea formation during vinification fermentations. *Am. J. Enol. Vitic.* 42: 199-208.
- Montesinos, E.** (2007). Antimicrobial peptides and plant disease control. *FEMS Microbiol. Lett.* 270: 1-11.
- Moreno, A. B., Martínez del Pozo, A., San Segundo, B.** (2006). Biotechnologically relevant enzymes and proteins. Antifungal mechanism of the *Aspergillus giganteus* AFP against the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 72: 883-895.
- Moreno-Arribas, M. V., Polo, M. C.** (2005). Winemaking biochemistry and microbiology: current knowledge and future trends. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 45: 265-286.
- Moreno-Arribas, M. V., Polo, M. C.** (2009). Wine Chemistry and Biochemistry. Springer Science+Business Media, NY, USA.
- Moreno-Arribas, V., Torlois, S., Joyeux, A., Bertrand, A., Lonvaud-Funel, A.** (2000). Isolation, properties and behaviour of tyramine-producing lactic acid bacteria from wine. *J. Appl. Microbiol.* 88: 584-593.
- Mortimer, R. K., Romano, P., Suzzi, G., Polsinelli, M.** (1994). Genome renewal: a new phenomenon revealed from a genetic study of 43 strains of *Saccharomyces cerevisiae* derived from natural fermentation of grape musts. *Yeast* 10: 1543-1552.
- Muñoz, A.** (2008). Caracterización de distintos péptidos antimicrobianos con actividad frente a hongos fitopatógenos de interés agroalimentario. Tesis Doctoral. Universitat de València, España.
- Muñoz, A., López-García, B., Marcos, J. F.** (2006). Studies on the mode of action of the antifungal hexapeptide PAF26. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50: 3847-3855.
- Muñoz, A., Marcos, J. F.** (2006). Activity and mode of action against fungal phytopathogens of bovine lactoferricin-derived peptides. *J. Appl. Microbiol.* 101: 1199-1207.
- Mygind, P. H., Fischer, R. L., Schnorr, K. M., Hansen, M. T., Sonksen, C. P., Ludvigsen, S., Raventos, D., Buskov, S., Christensen, B., De Maria, L.,**

- Taboureau, O., Yaver, D., Elvig-Jorgensen, S. G., Sorensen, M. V., Christensen, B. E., Kjaerulff, S., Frimodt-Moller, N., Lehrer, R. I., Zasloff, M., Kristensen, H. H.** (2005). Plectasin is a peptide antibiotic with therapeutic potential from a saprophytic fungus. *Nature* 437: 975-980.
- Naidu, A. S.** (2002). Activated lactoferrin - a new approach to meat safety. *Food Technol.* 56: 40-45.
- Navarre, C., Langlade, F.** (2006). L'oenologie. 6th ed. Tec and Doc Lavoisier, Paris, France.
- Nehme, N., Mathieu, F., Taillandier, P.** (2010). Impact of the co-culture of *Saccharomyces cerevisiae*-*Oenococcus oeni* on malolactic fermentation and partial characterization of a yeast-derived inhibitory peptidic fraction. *Food Microbiol.* 27: 150-157.
- Nguyen, L. T., Schibli, D. J., Vogel, H. J.** (2005). Structural studies and model membrane interactions of two peptides derived from bovine lactoferricin. *J. Pept. Sci.* 11: 379-389.
- Nguyen, T. H., Fleet, G. H., Rogers, P. L.** (1998). Composition of the cell walls of several yeast species. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 50: 206-212.
- Nikawa, H., Fukushima, H., Makihira, S., Hamada, T., Samaranayake, L. P.** (2004). Fungicidal effect of three new synthetic cationic peptides against *Candida albicans*. *Oral Dis.* 10: 221-228.
- O'Sullivan, L., Ross, R. P., Hill, C.** (2002). Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality. *Biochimie* 84: 593-604.
- Odds, F. C., Brown, A. J., Gow, N. A.** (2003). Antifungal agents: mechanisms of action. *Trends Microbiol.* 11: 272-279.
- Oita, S., Ohnishi-Kameyama, M., Nagata, T.** (2000). Binding of barley and wheat α -thionins to polysaccharides. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 64: 958-964.
- Orsi, N.** (2004). The antimicrobial activity of lactoferrin: current status and perspectives. *Biometals* 17: 189-196.
- Osborne, J. P., Edwards, C. G.** (2007). Inhibition of malolactic fermentation by a peptide produced by *Saccharomyces cerevisiae* during alcoholic fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* 118: 27-34.

- Otvos, L.** (2000). Antibacterial peptides isolated from insects. *J. Pept. Sci.* 6: 497-511.
- Ough, C. S.** (1992). *Winemaking Basics*. The Haworth Press, Binghamton, USA.
- Ough, C. S., Amerine, M. A.** (1988). Nitrogen compounds. *En: Methods for analysis of musts and wines*. 2nd ed. Wiley Interscience, NY, USA, pp. 186-187.
- Ough, C. S., Crowell, E. A., Gutlove, B. R.** (1988a). Carbamyl compound reactions with ethanol. *Am. J. Enol. Vitic.* 39: 239-242.
- Ough, C. S., Crowell, E. A., Mooney, L. A.** (1988b). Formation of ethyl carbamate precursors during grape juice (Chardonnay) fermentation. I. Addition of amino acids, urea, and ammonia: effects of fortification on intracellular and extracellular precursors. *Am. J. Enol. Vitic.* 39: 243-249.
- Ough, C. S., Kunkee, R. E.** (1974). The effect of fumaric acid on malo-lactic fermentation in wines from warm areas. *Am. J. Enol. Vitic.* 25: 188-190.
- Palpacelli, V., Ciani, M., Rosini, G.** (1991). Activity of different 'killer' yeasts on strains of yeast species undesirable in the food industry. *FEMS Microbiol. Lett.* 68: 75-78.
- Papo, N., Braunstein, A., Eshhar, Z., Shai, Y.** (2004). Suppression of human prostate tumor growth in mice by a cytolytic D-, L-amino acid peptide: membrane lysis, increased necrosis, and inhibition of prostate-specific antigen secretion. *Cancer Res.* 64: 5779-5786.
- Pardo, M., Monteoliva, L., Vázquez, P., Martínez, R., Molero, G., Nombela, C., Gil, C.** (2004). PST1 and ECM33 encode two yeast cell surface GPI proteins important for cell wall integrity. *Microbiology* 150: 4157-4170.
- Parisien, A., Allain, B., Zhang, J., Mandeville, R., Lan, C. Q.** (2008). Novel alternatives to antibiotics: bacteriophages, bacterial cell wall hydrolases, and antimicrobial peptides. *J. Appl. Microbiol.* 104: 1-13.
- Park, T. J., Kim, J. S., Choi, S. S., Kim, Y.** (2009). Cloning, expression, isotope labeling, purification, and characterization of bovine antimicrobial peptide, lactophorin in *Escherichia coli*. *Protein Expr. Purif.* 65: 23-29.
- Paul, M., Somkuti, G. A.** (2010). Hydrolytic breakdown of lactoferricin by lactic acid bacteria. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 37: 173-178.
- Payne, K. D., Oliver, S. P., Davidson, P. M.** (1994). Comparison of EDTA and apo-lactoferrin with lysozyme on the growth of food-borne pathogenic and spoilage bacteria. *J. Food Prot.* 57: 62-65.

- Pellegrini, A.** (2003). Antimicrobial peptides from food proteins. *Curr. Pharm. Des.* 9: 1225-1238.
- Peng, Z., Duncan, B., Pocock, K. F., Sefton, M. A.** (1998). The effect of ascorbic acid on oxidative browning of white wines and model wines. *Aust. J. Grape Wine Res.* 4: 127-135.
- Pfeiffer, P., Radler, F.** (1984). Comparison of the killer toxin of several yeasts and the purification of a toxin of type K2. *Arch. Microbiol.* 137: 357-361.
- Philliskirk, G., Young, T. W.** (1975). The occurrence of killer character in yeasts of various genera. *Antonie Van Leeuwenhoek Int. J. Gen. Molec. Microbiol.* 41: 147-151.
- Pierce, A., Colavizza, D., Benaissa, M., Maes, P., Tartar, A., Montreuil, J., Spik, G.** (1991). Molecular cloning and sequence analysis of bovine lactotransferrin. *Eur. J. Biochem.* 196: 177-184.
- Polonelli, L., Archibusacci, C., Sestito, M., Morace, G.** (1983). Killer system: a simple method for differentiating *Candida albicans* strains. *J. Clin. Microbiol.* 17: 774-780.
- Porter, L. J., Ough, C. S.** (1982). The effects of ethanol, temperature, and dimethyl dicarbonate on viability of *Saccharomyces cerevisiae* Montrachet No. 522 in wine. *Am. J. Enol. Vitic.* 33: 222-225.
- Powers, J. P., Martin, M. M., Goosney, D. L., Hancock, R. E.** (2006). The antimicrobial peptide polyphemusin localizes to the cytoplasm of *Escherichia coli* following treatment. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50: 1522-1524.
- Pretorius, I. S., van der Westhuizen, T. J., Augustyn, O. P. H.** (1999). Yeast biodiversity in vineyard and wineries and its importance to the South African wine industry. A review. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 20: 61-74.
- Pretorius, I. S.** (2000). Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast* 16: 675-729.
- Pretorius, I. S., Bauer, F. F.** (2002). Meeting the consumer challenge through genetically customized wine-yeast strains. *Trends Biotechnol.* 20: 426-432.
- Pretorius, I. S., Hoj, P. B.** (2005). Grape and wine biotechnology: challenges, opportunities and potential benefits. *Aust. J. Grape Wine Res.* 11: 83-108.
- Querol, A., Barrio, E., Ramón, D.** (1992). A comparative study of different methods of yeast strain characterization. *Syst. Appl. Microbiol.* 15: 439-446.

- Radler, F.** (1990a). Possible use of nisin in winemaking .1. Action of nisin against lactic acid bacteria and wine yeasts in solid and liquid media. *Am. J. Enol. Vitic.* 41: 1-6.
- Radler, F.** (1990b). Possible use of nisin in winemaking .2. Experiments to control lactic acid bacteria in the production of wine. *Am. J. Enol. Vitic.* 41: 7-11.
- Rao, A. G.** (1995). Antimicrobial peptides. *Mol. Plant Microbe Interact.* 8: 6-13.
- Ray, B., Johnson, C., Wanismail, B.** (1984). Factors influencing lysis of frozen *Escherichia coli* cells by lysozyme. *Cryo Lett.* 5: 183-190.
- Raybaudi-Massilia, R. M., Mosqueda-Melgar, J., Soliva-Fortuny, R., Martín-Belloso, O.** (2009). Control of pathogenic and spoilage microorganisms in fresh-cut fruits and fruit juices by traditional and alternative natural antimicrobials. *Comp. Rev. Food Sci. Food Safety* 8: 157-180.
- Renouf, V., Lonvaud-Funel, A.** (2007). Development of an enrichment medium to detect *Dekkera/Brettanomyces bruxellensis*, a spoilage wine yeast, on the surface of grape berries. *Microbiol. Res.* 162: 154-167.
- Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B., Lonvaud, A.** (2006). Handbook of Enology, Volumen 1 - The Microbiology of Wine and Vinifications. 2nd ed. Wiley Interscience, West Sussex, UK.
- Riley, M. A., Wertz, J. E.** (2002). Bacteriocins: evolution, ecology, and application. *Annu. Rev. Microbiol.* 56: 117-137.
- Rodríguez, J. M., Martínez, M. I., Kok, J.** (2002). Pediocin PA-1, a wide-spectrum bacteriocin from lactic acid bacteria. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 42: 91-121.
- Rojo-Bezares, B., Sáenz, Y., Zarazaga, M., Torres, C., Ruiz-Larrea, F.** (2007). Antimicrobial activity of nisin against *Oenococcus oeni* and other wine bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 116: 32-36.
- Romano, P., Suzzi, G.** (1993). Sulfur dioxide and wine microorganisms. *En: Wine Microbiology and Biotechnology.* Fleet, G. H., ed. Harwood Academic Publishers, Chur, Switzerland, pp. 373-393.
- Rosini, G.** (1983). The occurrence of killer characters in yeasts. *Can. J. Microbiol.* 29: 1462-1464.
- Rosini, G., Cantini, M.** (1987). Killer character in *Kluyveromyces* yeasts: activity on *Kloeckera apiculata*. *FEMS Microbiol. Lett.* 44: 81-84.

- Ruiz-Giménez, P., Burguete, M. C., Castelló-Ruiz, M., Marcos, J. F., Salom, J. B., Vallés, S., Torregrosa, G., Alborch, E., Manzanares, P.** (2007). Bovine lactoferrin pepsin hydrolysate exerts inhibitory effect on angiotensin I-converting enzyme-dependent vasoconstriction. *Int. Dairy J.* 17: 1212-1215.
- Ruiz-Giménez, P., Ibáñez, A., Salom, J. B., Marcos, J. F., López-Díez, J. J., Vallés, S., Torregrosa, G., Alborch, E., Manzanares, P.** (2010). Antihypertensive properties of lactoferricin B-derived peptides. *J. Agric. Food Chem.* 58: 6721-6727.
- Ryan, C. A., Farmer, E. E.** (1991). Oligosaccharide signals in plants: a current assessment. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 42: 651-674.
- Rydlo, T., Miltz, J., Mor, A.** (2006). Eukaryotic antimicrobial peptides: promises and premises in food safety. *J. Food Sci.* 71: 125-135.
- Sahl, H. G., Bierbaum, G.** (1998). Lantibiotics: biosynthesis and biological activities of uniquely modified peptides from Gram positive bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 52: 41-79.
- Salazar, O., Asenjo, J. A.** (2007). Enzymatic lysis of microbial cells. *Biotechnol. Lett.* 29: 985-994.
- Santamaría, P., Gutiérrez, A. R., Epifanio, A. R., López, R., Garijo, P.** (1999). Ecología de la fermentación alcohólica espontánea durante varios años consecutivos. Influencia en la cinética fermentativa. *En: Jornadas Científicas 99. Grupos de Investigación Enológica. Centro de Investigación y Desarrollo Agrario de La Rioja (CIDA), Universidad de La Rioja, Logroño, España, pp. 15-16.*
- Santos, A., Navascués, E., Bravo, E., Marquina, D.** (2010). *Ustilago maydis* killer toxin as a new tool for the biocontrol of the wine spoilage yeast *Brettanomyces bruxellensis*. *Int. J. Food Microbiol.* 145: 147-154.
- Santos, A., San Mauro, M., Bravo, E., Marquina, D.** (2009). PMKT2, a new killer toxin from *Pichia membranifaciens*, and its promising biotechnological properties for control of the spoilage yeast *Brettanomyces bruxellensis*. *Microbiology* 155: 624-634.
- Schibli, D. J., Epand, R. F., Vogel, H. J., Epand, R. M.** (2002). Tryptophan-rich antimicrobial peptides: comparative properties and membrane interactions. *Biochem. Cell. Biol.* 80: 667-677.
- Schibli, D. J., Hwang, P. M., Vogel, H. J.** (1999). The structure of the antimicrobial active center of lactoferricin B bound to sodium dodecyl sulfate micelles. *FEBS Lett.* 446: 213-217.

- Schillinger, U., Geisen, R., Holzapfel, W. H.** (1996). Potential of antagonistic microorganisms and bacteriocins for the biological preservation of foods. *Trends Food Sci. Technol.* 7: 158-164.
- Schirmer, B. C., Langsrud, S.** (2010). Evaluation of natural antimicrobials on typical meat spoilage bacteria *in vitro* and in vacuum-packed pork meat. *J. Food Sci.* 75: 98-102.
- Schittek, B., Hipfel, R., Sauer, B., Bauer, J., Kalbacher, H., Stevanovic, S., Schirle, M., Schroeder, K., Blin, N., Meier, F., Rassner, G., Garbe, C.** (2001). Dermcidin: a novel human antibiotic peptide secreted by sweat glands. *Nat. Immunol.* 2: 1133-1137.
- Schneider, T., Kruse, T., Wimmer, R., Wiedemann, I., Sass, V., Pag, U., Jansen, A., Nielsen, A. K., Mygind, P. H., Raventós, D. S., Neve, S., Ravn, B., Bonvin, A. M., De Maria, L., Andersen, A. S., Gammelgaard, L. K., Sahl, H. G., Kristensen, H. H.** (2010). Plectasin, a fungal defensin, targets the bacterial cell wall precursor Lipid II. *Science* 328: 1168-1172.
- Schoeman, H., Vivier, M. A., du Toit, M., Dicks, L. M., Pretorius, I. S.** (1999). The development of bactericidal yeast strains by expressing the *Pediococcus acidilactici* pediocin gene (pedA) in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 15: 647-656.
- Seebah, S., Suresh, A., Zhuo, S., Choong, Y. H., Chua, H., Chuon, D., Beuerman, R., Verma, C.** (2007). Defensins knowledgebase: a manually curated database and information source focused on the defensins family of antimicrobial peptides. *Nucleic Acids Res.* 35: 265-268.
- Selitrennikoff, C. P.** (2001). Antifungal proteins. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 2883-2894.
- Selsted, M. E., Novotny, M. J., Morris, W. L., Tang, Y. Q., Smith, W., Cullor, J. S.** (1992). Indolicidin, a novel bactericidal tridecapeptide amide from neutrophils. *J. Biol. Chem.* 267: 4292-4295.
- Settanni, L., Corsetti, A.** (2008). Application of bacteriocins in vegetable food biopreservation. *Int. J. Food Microbiol.* 121: 123-138.
- Sherman, F., Fink, G. R., Hicks, J. B.** (1986). Laboratory course manual for methods in yeast genetics. Cold Spring Harbor, NY, USA.
- Silla, M. H.** (1996). Biogenic amines: their importance in foods. *Int. J. Food Microbiol.* 29: 213-231.

- Silva, L. R., Andrade, P. B., Valentão, P., Seabra, R. M., Trujillo, M. E., Velázquez, E.** (2005). Analysis of non-coloured phenolics in red wine: effect of *Dekkera bruxellensis* yeast. *Food Chem.* 89: 185-189.
- Smits, G. J., Kapteyn, J. C., van den Ende, H., Klis, F. M.** (1999). Cell wall dynamics in yeast. *Curr. Opin. Microbiol.* 2: 348-352.
- Splittstoesser, D. F., Churney, J. J.** (1992). The incidence of sorbic acid-resistant gluconobacters and yeasts on grapes grown in New York State. *Am. J. Enol. Vitic.* 43: 290-293.
- Sponholz, W. R.** (1993). Wine spoilage by microorganisms. *En: Wine Microbiology and Biotechnology.* Fleet, G. H., ed. Harwood Academic Publishers, Chur, Switzerland, pp. 395-420.
- Stevenson, D. D., Simon, R. A.** (1981). Sensitivity to ingested metabisulfites in asthmatic subjects. *J. Allergy Clin. Immunol.* 68: 26-32.
- Stintzi, A., Heitz, T., Prasad, V., Wiedemann-Merdinoglu, S., Kauffmann, S., Geoffroy, P., Legrand, M., Fritig, B.** (1993). Plant 'pathogenesis-related' proteins and their role in defense against pathogens. *Biochimie* 75: 687-706.
- Strom, M. B., Haug, B. E., Rekdal, O., Skar, M. L., Stensen, W., Svendsen, J. S.** (2002). Important structural features of 15-residue lactoferricin derivatives and methods for improvement of antimicrobial activity. *Biochem. Cell. Biol.* 80: 65-74.
- Strom, M. B., Rekdal, O., Svendsen, J. S.** (2000). Antibacterial activity of 15-residue lactoferricin derivatives. *J. Pept. Res.* 56: 265-274.
- Subbalakshmi, C., Nagaraj, R., Sitaram, N.** (1999). Biological activities of C-terminal 15-residue synthetic fragment of melittin: design of an analog with improved antibacterial activity. *FEBS Lett.* 448: 62-66.
- Tamborra, P.** (1993). Problems associated with production of white wines without addition of SO₂. *L'Enotecnico* 29: 39-46.
- Theis, T., Stahl, U.** (2004). Antifungal proteins: targets, mechanisms and prospective applications. *Cell. Mol. Life Sci.* 61: 437-455.
- Thomas, D. S.** (1993). Yeasts as spoilage organisms in beverages. *En: The Yeasts, Volumen 5 - Yeast Technology.* Rose, A. H., Harrison, J. S., eds. 2nd ed. Academic Press, London, UK, pp. 517-561.
- Thomas, D. S., Davenport, R. R.** (1985). *Zygosaccharomyces bailii* - a profile of characteristics and spoilage activities. *Food Microbiol.* 2: 157-169.

- Thomas, L. V., Ingram, R. E., Bevis, H. E., Brightwell, P., Wilson, N., Delves-Broughton, J.** (2005). Natamycin control of yeast spoilage of wine. *Food Prot. Trends* 25: 510-517.
- Threlfall, R. T., Morris, J. R.** (2002). Using dimethyldicarbonate to minimize sulfur dioxide for prevention of fermentation from excessive yeast contamination in juice and semi-sweet wine. *J. Food Sci.* 67: 2758-2762.
- Tomita, M., Bellamy, W., Takase, M., Yamauchi, K., Wakabayashi, H., Kawase, K.** (1991). Potent antibacterial peptides generated by pepsin digestion of bovine lactoferrin. *J. Dairy Sci.* 74: 4137-4142.
- Tomita, M., Takase, M., Bellamy, W., Shimamura, S.** (1994). A review: the active peptide of lactoferrin. *Acta Paediatr. Jpn.* 36: 585-591.
- Tomita, M., Wakabayashi, H., Shin, K., Yamauchi, K., Yaeshima, T., Iwatsuki, K.** (2009). Twenty-five years of research on bovine lactoferrin applications. *Biochimie* 91: 52-57.
- Tomita, M., Wakabayashi, H., Yamauchi, K., Teraguchi, S., Hayasawa, H.** (2002). Bovine lactoferrin and lactoferricin derived from milk: production and applications. *Biochem. Cell. Biol.* 80: 109-112.
- Tossi, A., Sandri, L., Giangaspero, A.** (2000). Amphipathic, α -helical antimicrobial peptides. *Biopolymers* 55: 4-30.
- Ulvatne, H., Samuelsen, O., Haukland, H. H., Kramer, M., Vorland, L. H.** (2004). Lactoferricin B inhibits bacterial macromolecular synthesis in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 237: 377-384.
- Usseglio-Tomasset, L.** (1992). Properties and use of sulphur dioxide. *Food Addit. Contam.* 9: 399-404.
- Vaara, M.** (1992). Agents that increase the permeability of the outer membrane. *Microbiol. Rev.* 56: 395-411.
- van Berkel, P. H., Welling, M. M., Geerts, M., van Veen, H. A., Ravensbergen, B., Salaheddine, M., Pauwels, E. K., Pieper, F., Nuijens, J. H., Nibbering, P. H.** (2002). Large scale production of recombinant human lactoferrin in the milk of transgenic cows. *Nat. Biotechnol.* 20: 484-487.
- van der Biezen, E. A.** (2001). Quest for antimicrobial genes to engineer disease-resistant crops. *Trends Plant Sci.* 6: 89-91.
- van der Kraan, M. I., Nazmi, K., van 't Hof, W., Amerongen, A. V., Veerman, E. C., Bolscher, J. G.** (2006). Distinct bactericidal activities of bovine lactoferrin

- peptides LFampin 268-284 and LFampin 265-284: Asp-Leu-Ile makes a difference. *Biochem. Cell. Biol.* 84: 358-362.
- van der Kraan, M. I., van Marle, J., Nazmi, K., Groenink, J., van 't Hof, W., Veerman, E. C., Bolscher, J. G., Amerongen, A. V.** (2005). Ultrastructural effects of antimicrobial peptides from bovine lactoferrin on the membranes of *Candida albicans* and *Escherichia coli*. *Peptides* 26: 1537-1542.
- van der Weerden, N. L., Hancock, R. E., Anderson, M. A.** (2010). Permeabilization of fungal hyphae by the plant defensin NaD1 occurs through a cell wall-dependent process. *J. Biol. Chem.* 285: 37513-37520.
- van Rensburg, P., Pretorius, I. S.** (2000). Enzymes in winemaking: harnessing natural catalysts for efficient biotransformations - a review. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 21: 52-70.
- Van Vuuren, H. J. J., Dicks, L. M. T.** (1993). *Leuconostoc oenos*: a review. *Am. J. Enol. Vitic.* 44: 99-112.
- Van Vuuren, H. J. J., Jacobs, C. J.** (1992). Killer yeasts in the wine industry: a review. *Am. J. Enol. Vitic.* 43: 119-128.
- Venkitanarayanan, K. S., Zhao, T., Doyle, M. P.** (1999). Antibacterial effect of lactoferricin B on *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef. *J. Food Prot.* 62: 747-750.
- Villettaz, J. C., Steiner, D., Trogus, H.** (1984). The use of a β -glucanase as an enzyme in wine clarification and filtration. *Am. J. Enol. Vitic.* 35: 253-256.
- Vivès, E., Brodin, P., Lebleu, B.** (1997). A truncated HIV-1 Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus. *J. Biol. Chem.* 272: 16010-16017.
- Vogel, H. J., Schibli, D. J., Jing, W. G., Lohmeier-Vogel, E. M., Epand, R. F., Epand, R. M.** (2002). Towards a structure-function analysis of bovine lactoferricin and related tryptophan- and arginine-containing peptides. *Biochem. Cell. Biol.* 80: 49-63.
- Wade, D., Boman, A., Wahlin, B., Drain, C. M., Andreu, D., Boman, H. G., Merrifield, R. B.** (1990). All-D amino acid-containing channel-forming antibiotic peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87: 4761-4765.
- Wakabayashi, H., Abe, S., Teraguchi, S., Hayasawa, H., Yamaguchi, H.** (1998). Inhibition of hyphal growth of azole-resistant strains of *Candida albicans* by triazole antifungal agents in the presence of lactoferrin-related compounds. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42: 1587-1591.

- Wakabayashi, H., Bellamy, W., Takase, M., Tomita, M.** (1992). Inactivation of *Listeria monocytogenes* by lactoferricin, a potent antimicrobial peptide derived from cows milk. *J. Food Prot.* 55: 238-240.
- Wakabayashi, H., Hiratani, T., Uchida, K., Yamaguchi, H.** (1996). Antifungal spectrum and fungicidal mechanism of an N-terminal peptide of bovine lactoferrin. *J. Infect. Chemother.* 1: 185-189.
- Wakabayashi, H., Matsumoto, H., Hashimoto, K., Teraguchi, S., Takase, M., Hayasawa, H.** (1999). N-Acylated and D enantiomer derivatives of a nonamer core peptide of lactoferricin B showing improved antimicrobial activity. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43: 1267-1269.
- Wakabayashi, H., Takakura, N., Yamauchi, K., Teraguchi, S., Uchida, K., Yamaguchi, H., Tamura, Y.** (2002). Effect of lactoferrin feeding on the host antifungal response in guinea pigs infected or immunised with *Trichophyton mentagrophytes*. *J. Med. Microbiol.* 51: 844-850.
- Wakabayashi, H., Uchida, K., Yamauchi, K., Teraguchi, S., Hayasawa, H., Yamaguchi, H.** (2000). Lactoferrin given in food facilitates dermatophytosis cure in guinea pig models. *J. Antimicrob. Chemother.* 46: 595-602.
- Wakabayashi, H., Yamauchi, K., Takase, M.** (2006). Lactoferrin research, technology and applications. *Int. Dairy J.* 16: 1241-1251.
- Walker, G. M., McLeod, A. H., Hodgson, V. J.** (1995). Interactions between killer yeasts and pathogenic fungi. *FEMS Microbiol. Lett.* 127: 213-222.
- Wang, S. L., Shih, I. L., Liang, T. W., Wang, C. H.** (2002). Purification and characterization of two antifungal chitinases extracellularly produced by *Bacillus amyloliquefaciens* V656 in a shrimp and crab shell powder medium. *J. Agric. Food Chem.* 50: 2241-2248.
- Wang, Z., Wang, G.** (2004). APD: the antimicrobial peptide database. *Nucleic Acids Res.* 32: 590-592.
- Ward, P. P., Lo, J. Y., Duke, M., May, G. S., Headon, D. R., Conneely, O. M.** (1992). Production of biologically active recombinant human lactoferrin in *Aspergillus oryzae*. *Bio/technology* 10: 784-789.
- Ward, P. P., Piddington, C. S., Cunningham, G. A., Zhou, X. D., Wyatt, R. D., Conneely, O. M.** (1995). A system for production of commercial quantities of human lactoferrin - a broad spectrum natural antibiotic. *Bio/technology* 13: 498-503.

- Watanabe, T., Kanai, R., Kawase, T., Tanabe, T., Mitsutomi, M., Sakuda, S., Miyashita, K.** (1999). Family 19 chitinases of *Streptomyces* species: characterization and distribution. *Microbiology* 145: 3353-3363.
- Weinberg, E. D.** (2007). Antibiotic properties and applications of lactoferrin. *Curr. Pharm. Des.* 13: 801-811.
- Wen-Hsiung Li** (1997). *Molecular Evolution*. Sinauer Associates, Sunderland, USA.
- Wessolowski, A., Bienert, M., Dathe, M.** (2004). Antimicrobial activity of arginine- and tryptophan-rich hexapeptides: the effects of aromatic clusters, D-amino acid substitution and cyclization. *J. Pept. Res.* 64: 159-169.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, E., Taylor, J.** (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *En: PCR protocols: A Guide to Methods and Applications*. Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J., White, T. J., eds. San Diego, CA, USA, pp. 315-322.
- Wibowo, D., Eschenbruch, R., Davis, C. R., Fleet, G. H., Lee, T. H.** (1985). Occurrence and growth of lactic acid bacteria in wine - a review. *Am. J. Enol. Vitic.* 36: 302-313.
- Wiedemann, I., Breukink, E., van Kraaij, C., Kuipers, O. P., Bierbaum, G., de Kruijff, B., Sahl, H. G.** (2001). Specific binding of nisin to the peptidoglycan precursor lipid II combines pore formation and inhibition of cell wall biosynthesis for potent antibiotic activity. *J. Biol. Chem.* 276: 1772-1779.
- Williams, J.** (1982). The evolution of transferrin. *Trends Biochem. Sci.* 7: 394-397.
- Wisniewski, M. E., Bassett, C. L., Artlip, T. S., Webb, R. P., Janisiewicz, W. J., Norelli, J. L., Goldway, M., Droby, S.** (2003). Characterization of a defensin in bark and fruit tissues of peach and antimicrobial activity of a recombinant defensin in the yeast, *Pichia pastoris*. *Physiol. Plant.* 119: 563-572.
- Wolfson, L. M., Sumner, S. S.** (1993). Antibacterial activity of the lactoperoxidase system - a review. *J. Food Prot.* 56: 887-892.
- Wolfson, L. M., Sumner, S. S.** (1994). Antibacterial activity of the lactoperoxidase system against *Salmonella typhimurium* in trypticase soy broth in the presence and absence of a heat treatment. *J. Food Prot.* 57: 365-368.
- Wolfson, L. M., Sumner, S. S., Froning, G. W.** (1994). Inhibition of *Salmonella typhimurium* on poultry by the lactoperoxidase system. *J. Food Safety* 14: 53-62.

- Xu, X., Jin, F., Yu, X., Ji, S., Wang, J., Cheng, H., Wang, C., Zhang, W.** (2007). Expression and purification of a recombinant antibacterial peptide, cecropin, from *Escherichia coli*. *Protein Expr. Purif.* 53: 293-301.
- Yamada, K., Nakajima, Y., Natori, S.** (1990). Production of recombinant sarcotoxin IA in *Bombyx mori* cells. *Biochem. J.* 272: 633-636.
- Yaron, S., Rydlo, T., Shachar, D., Mor, A.** (2003). Activity of dermaseptin K4-S4 against foodborne pathogens. *Peptides* 24: 1815-1821.
- Zasloff, M.** (2002). Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* 415: 389-395.
- Zhang, J., Zhang, S. Q., Wu, X., Chen, Y. Q., Diao, Z. Y.** (2006). Expression and characterization of antimicrobial peptide ABP-CM4 in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Process Biochem.* 41: 251-256.
- Zhao, H., Mattila, J. P., Holopainen, J. M., Kinnunen, P. K.** (2001). Comparison of the membrane association of two antimicrobial peptides, magainin 2 and indolicidin. *Biophys. J.* 81: 2979-2991.
- Zoecklein, B. W., Fugelsang, K. C., Gump, B. H., Nury, F. S.** (1995). Wine Analysis and Production. Chapman and Hall, NY, USA.
- Zumárraga, M., Barbero, F.** (2009). *Zygosaccharomyces*, discreta pero peligrosa en bodega. *La semana vitivinícola* 3288: 3014-3020.