

Mar GATELL MIRACLE

ESTUDI DE L'ACTIVITAT ANTIMICROBIANA PRODUÏDA PER LA  
SOCA C11 DE *LACTIPLANTIBACILLUS PLANTARUM*

TREBALL FINAL DE MÀSTER

Dirigit per Dra. Maria Carme Masqué Tell

Màster en BEGUDES FERMENTADES

Facultat d'Enologia



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Tarragona

14 de juny del 2021

**ESTUDI DE L'ACTIVITAT ANTIMICROBIANA PRODUÏDA PER LA SOCA C11 DE  
*LACTIPLANTIBACILLUS PLANTARUM***

Autors: Mar Gatell, Maria Carme Masqué, Cristina Reguant

Direcció: Estació Enològica – INCAVI (Institut Català de la Vinya i el Vi), Passeig de Sunyer, 4, 6,  
43202, Reus, Tarragona.

e-mail: [mar.gatellmiracle@gmail.com](mailto:mar.gatellmiracle@gmail.com), [cmasque@gencat.cat](mailto:cmasque@gencat.cat)

Paraules clau: bacteris làctics, *Lactiplantibacillus plantarum*, bacteriocines, C11.

# Índex

Abstract .....	3
1. Introducció.....	4
1.1. Bacteris làctics.....	4
1.2. Fermentació malolàctica.....	6
1.2.1. Efectes de la fermentació.....	7
1.3. Components i factors del vi que afecten al creixement dels bacteris làctics .....	9
1.3.1. Etanol .....	9
1.3.2. pH .....	9
1.3.3. Diòxid de sofre .....	10
1.3.4. Temperatura .....	10
1.3.5. Altres .....	11
1.4. Bacteriocines.....	11
1.4.1. Classificació .....	12
1.4.2. Mecanisme d'acció de les bacteriocines .....	13
1.5. <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> .....	14
1.5.1. Bacteriocines produïdes per <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> .....	15
2. Objectiu .....	15
3. Materials i mètodes.....	15
3.1. Medis de cultiu.....	15
3.2. Microorganismes .....	16
3.2.1. Soques productores .....	16
3.2.2. Soques indicadores .....	17
3.2.3. Llevats .....	18
3.3. Condicions de creixement.....	18
3.4. Tinció Gram.....	18
3.5. Mètode dels halos.....	19
3.5.1. Condicions d'estudi .....	19
3.5.2. Àcid L-màlic .....	20
3.5.3. Recompte de cèl·lules viables en placa.....	20
4. Resultats i discussió .....	20
4.1. Activitat dels diferents cultius de C11 per degradar l'àcid màlic i compatibilitat entre els diferents cultius de C11 amb les diferents soques de llevats. ....	20
4.2. Producció de bacteriocines en MRS, most i en most en co-inoculació.....	24
5. Conclusions i perspectives.....	27
6. Bibliografia .....	27
7. Annexos .....	31
7.1. Annex 1 .....	31
7.2. Annex 2 .....	32

## Resum

En l'elaboració del vi hi participen una gran diversitat de microorganismes, entre els quals destaquen llevats i bacteris, que poden provocar efectes beneficiosos i perjudicials en els processos fermentatius i en la conservació del vi. Els bacteris làctics són microorganismes que aporten grans característiques sensorials i tenen la capacitat de conservar els productes a causa de diferents metabòlits, com ara les bacteriocines. Les bacteriocines són pèptids d'origen ribosomal segregats al medi extracel·lular i tenen la capacitat d'inhibir el creixement d'altres microorganismes.

L'espècie *Lactiplantibacillus plantarum* es troba en diferents nínxols ecològics i destaca per la seva capacitat d'adaptació. Aquesta espècie és capaç de produir diverses bacteriocines i, per aquest motiu, es tracta d'un model excel·lent per la investigació. L'objectiu d'aquest treball és estudiar si la soca C11 de *Lactiplantibacillus plantarum* és capaç d'inhibir el creixement d'altres bacteris làctics i comprovar l'efecte sobre la producció de bacteriocines exposant-la a diferents condicions.

## Abstract

A wide variety of microorganisms take part during the process of winemaking, among which, yeasts and bacteria stand out, as they can bring both beneficial and harmful outcomes to the fermentative processes and wine conservation. The lactic bacteria are microorganisms which provide great sensory characteristics and have the ability to preserve products due to different metabolites, such as bacteriocins. Bacteriocins are peptides of ribosomal origin that are secreted into extracellular environment and have the ability to inhibit the growth of other microorganisms.

The *Lactiplantibacillus plantarum* species is found in different ecological niches and stands out for its ability to adapt. This species is capable of producing various bacteriocins and, due to this, is an excellent research model. The aim of this work is to study whether the C11 strain of *Lactiplantibacillus plantarum* is capable of inhibiting the growth of other lactic bacteria and to check for the effect on the production of bacteriocins by exposing it to a different arrangement of conditions.

# 1. Introducció

## 1.1. Bacteris làctics

Durant l'elaboració del vi, hi participen una gran diversitat de microorganismes, com els llevats i bacteris. Els llevats de l'espècie *Saccharomyces cerevisiae* són els encarregats de dur a terme la fermentació alcohòlica. Al final d'aquesta, té lloc la fermentació malolàctica desenvolupada pels bacteris làctics que converteixen l'àcid màlic en àcid làctic. Els bacteris làctics presents en el vi pertanyen als gèneres: *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* i *Oenococcus* (Lonvaud-Funel, 1999). Aquests bacteris comparteixen les següents característiques: són cocs o bacils grampositius, immòbils, anaeròbics facultatius, no esporulen, necessiten un medi ric en nutrients i sucres fermentables i la temperatura òptima de creixement se situa entre 20 – 30°C (Krieger-Weber S. , Historia de las bacterias ácido lácticas en el vino, 2016).

Els bacteris làctics depenent de la ruta o rutes que utilitzen per degradar els sucres es poden diferenciar en homofermentatius o heterofermentatius (**Taula 1**). Els bacteris homofermentatius transformen més del 85% de la glucosa o fructosa en àcid làctic. En canvi, els heterofermentatius a partir dels mateixos hidrats de carboni obtenen àcid làctic, diòxid de carboni, etanol i àcid acètic. En el grup dels *Lactobacillus* es poden trobar els dos tipus de metabolismes, per tant, aquests bacteris es divideixen en tres grups diferents:

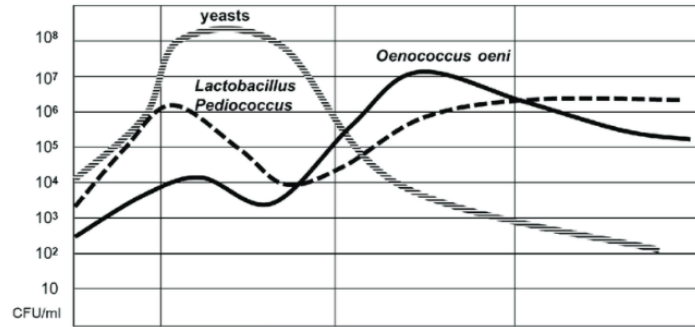
- Grup I: homofermentatius estrictes, no s'ha detectat aquest grup en el vi;
- Grup II: Heterofermentatius facultatius, no fermenten les pentoses i a partir d'una molècula de glucosa formen dues molècules d'àcid làctic;
- Grup III: Heterofermentatius obligats, la fermentació de la glucosa produeix àcid làctic, àcid acètic, etanol i CO<sub>2</sub>. La fermentació de les pentoses produeix àcid acètic i àcid làctic.

Els bacteris làctics es poden trobar en les fulles de la vid, en els raspons del raïm, com també en els equips de bodega. Estudis realitzats en diferents països indiquen que *Oenococcus oeni* és l'espècie que es produeix principalment durant la fermentació malolàctica; *Pediococcus cerevisiae* i *Pediococcus pentosaceus*, es pot trobar principalment després de la fermentació malolàctica i en vins amb pH més alts; i *Lactobacillus* spp., es produeix, també, després de la fermentació malolàctica (Wibowo, Eschenbrunch, Davis, Fleet, & Lee, 1985).

**Taula 1.** Llista d'espècies de bacteris làctics en els mostos de raïm i el vi (Ribéreau-Gayon, Peynaud, & Ribéreau-Gayon, 1975)

<b>Lactobacils</b>	Heterofermentatius facultatius (grup II)	<i>Lacticaseibacillus casei</i> <i>Lactiplantibacillus plantarum</i>
	Heterofermentatius obligats (grup III)	<i>Levilactobacillus brevis</i> <i>Lactobacillus hilgardii</i>
<b>Cocs</b>	Homofermentatius	<i>Pediococcus damnosus</i> <i>Pediococcus pentosaceus</i> <i>Pediococcus cerevisiae</i>
	Heterofermentatius	<i>Oenococcus oeni</i> ( <i>Leuconostoc oenos</i> ) <i>Leuconostoc mesenteroides</i> spp. <i>mesenteroides</i>

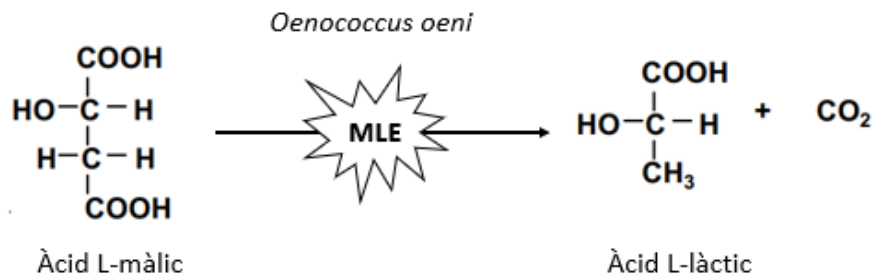
En la **Figura 1** es poden observar diverses etapes durant la vinificació on hi ha diferents espècies de bacteris làctics que es poden produir (Krieger-Weber S. , Historia de las bacterias ácido lácticas en el vino, 2016). Els mostos, després del premsat, contenen una població aproximada de  $10^3 - 10^4$  cèl·lules/ml i les espècies principals són *Lactiplantibacillus plantarum* i *Lacticaseibacillus casei* i en menor número *O. oeni* i *P. cerevisiae*. De forma general, aquestes espècies no acostumen a multiplicar-se i, durant la fermentació alcohòlica, moren a causa de la competència amb llevats i la sensibilitat a antimicrobians enològics com el sulfurós i l'etanol. Al final de la fermentació alcohòlica, l'espècie *O. oeni* és l'única identificada, ja que les espècies de *Lactobacillus*, *Leuconostoc* i *Pediococcus* desapareixen de manera progressiva o queden en concentracions no detectables en vi. En condicions normals, un cop acabada la fermentació, la població de bacteris làctics es troba en una fase estacionaria o latència durant 10 o 15 dies. En la fase inicial de la fermentació malolàctica podem trobar un recompte de bacteris d'aproximadament  $10^6$  cèl·lules/ml. La població, majoritàriament *O. oeni*, comença a créixer de forma exponencial fins a arribar a  $10^7 - 10^8$  cèl·lules/ml que posteriorment disminuirà fins a  $10^6$  cèl·lules/ml (Lonvaud-Funel, 1999).



**Figura 1.** Creixement dels bacteris làctics en el vi durant la vinificació. Yeast: llevats (Krieger-Weber, Heras, & Suarez, 2020)

## 1.2. Fermentació malolàctica

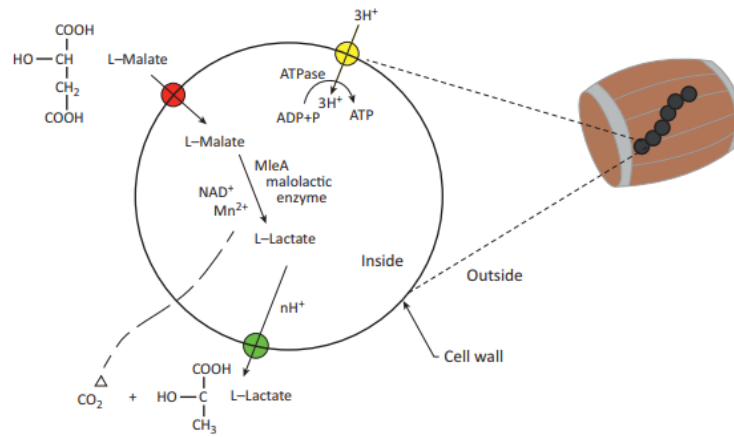
El terme “fermentació malolàctica” descriu la conversió enzimàtica de l'àcid L-màlic en àcid L-làctic i CO<sub>2</sub> realitzada pels bacteris làctics un cop han crescut (Wibowo, Eschenbrunch, Davis, Fleet, & Lee, 1985). Aquesta reacció es tracta d'una desacidificació biològica que constitueix una de les principals capacitats metabòliques dels bacteris làctics i és de gran importància en el procés d'elaboració del vi. *O. Oeni* és, majoritàriament, l'espècie responsable de dur a terme la fermentació malolàctica. Aquest procés es realitza mitjançant l'enzim malolàctic (MLE) (Figura 2).



**Figura 2.** Transformació de l'àcid màlic per *Oenococcus oeni*. MLE: enzim malolàctic

La conversió de l'àcid L-màlic a àcid L-làctic realitzada per l'enzim malolàctic permet obtenir energia de forma indirecta. Tot i això, s'ha demostrat que la fermentació malolàctica proporciona energia en forma d'ATP a les cèl·lules bacterianes. La fermentació malolàctica es duu a terme en tres etapes: a la primera etapa, un enzim específic de transport facilita l'entrada de l'àcid L-màlic a la cèl·lula bacteriana. En la segona etapa, l'enzim malolàctic descarboxila l'àcid L-màlic dins de la cèl·lula produint àcid L-làctic i CO<sub>2</sub> i augmentant el pH intracel·lular. En l'última etapa, l'àcid L-làctic i el CO<sub>2</sub> són expulsats per la cèl·lula. Per cada molècula d'àcid làctic que surt de la cèl·lula, un protó es desplaça fora d'ella. Això estableix un gradient de protons a través de

la membrana cel·lular entre el citoplasma i el medi. Aquest gradient, combinat a una ATPasa específica de la membrana cel·lular, facilita la producció de l'energia necessària per als processos de transport en forma d'ATP (Cox & Henick-Kling, 1989; Cox & Henick-Kling, 1990; Henick-Kling, 1993; Henick-Kling, 1995; Versari, Papinello, & Cattaneo, 1999)



**Figura 3.** Bioquímica de la fermentació malolàctica (Betteridge, Garbin, & Jiranek, 2015)

### 1.2.1. Efectes de la fermentació

Les conseqüències positives i negatives del desenvolupament de la fermentació malolàctica poden ser les següents

- 1. Reducció de l'acidesa total.** Per cada molècula d'àcid L-màlic convertida en àcid L-làctic, mitjançant la fermentació malolàctica, es produeix una pèrdua estequiomètrica d'un grup carboxil i la seva respectiva reducció d'acidesa en el vi. Aquests efectes depenen de la concentració d'àcid màlic inicial, de la capacitat tampó del vi i del pH inicial (Boulton, Singleton, Bisson, & Kunkee, 1999). La reducció de l'acidesa del vi generada per la fermentació malolàctica pot variar entre 1 i 3 g/L, i el pH pot augmentar de 0,1 a 0,3 unitats (Davis, Wibowo, Eschenbrunch, & Fleet, Practical implications of malolactic fermentation: a review, 1985).
- 2. Reducció de la intensitat del color del vi.** Existeixen diversos factors que s'associen a la disminució de la intensitat del color. L'augment del pH pot tenir una repercussió sobre l'equilibri dependent del pH dels antocians. L'activitat glicosidasa dels bacteris làctics també constitueix una potencial font de reducció del color. Els antocians glicosilats poden ser atacats enzimàticament per l'activitat glicosidasa i la glucosa alliberada per la reacció es pot convertir en una font d'energia pels bacteris. La reducció del color ve provocada per la precipitació dels antocians alliberats. Per últim, el metabolisme que els

bacteris làctics realitzen de carbonils, com ara l'acetaldehid, té influència sobre l'equilibri i estabilitat dels components cromàtics del vi (Vivas, Augustin, & Lonvaud-Funel, 1997; Bartowsky, Costello, & Henschke, 2002)

- 3. Producció de diacetil.** Els bacteris làctics destaquen per la seva producció de diacetil (2,3-butanediona) que es caracteritza pel seu aroma a mantega i nou. El diacetil és produït per *O. oeni* com a substància intermèdia en el metabolisme de l'àcid cítric. En concentracions baixes, entre 1 i 4 mg/l, el diacetil és considerat desitjable, ja que aporta un caràcter sensorial mantegós, però en concentracions elevades, entre 5 i 7 mg/l, el diacetil es considera perjudicial per a la qualitat del vi (Rankine, Fornachon, & Bridson, 1969; Davis, Wibowo, Eschenbrunch, & Fleet, 1985)
- 4. Modificació de les característiques organolèptiques.** La fermentació malolàctica pot accentuar l'aroma afruitat del vi i la sensació en boca. S'ha pogut veure un increment de certs ésters, com lactat d'etil i acetat d'isoamil (Dittrich, 1987; Laurent, Henick-Kling, & Acree, 1994). També s'ha pogut associar l'augment d'aromes afruitats a causa de la reducció d'aromes vegetals (Henick-Kling, 1993; Krieger, Henick-Kling, Fischer, Bach, & Pickering, 2004). Pel que fa al cos del vi, s'ha comprovat que afecta la percepció de l'acidesa, les sensacions tàctils i augmenta la percepció d'atributs com la untuositat (Krieger, Henick-Kling, Fischer, Bach, & Pickering, 2004).
- 5. Estabilitat microbiològica dels vins.** L'estabilitat és causada per l'empobriment de nutrients o factors de creixement, l'elevada presència en el medi d'inhibidors microbians formats per bacteris làctics, que transmeten al vi una immunitat enfront d'altres alteracions produïdes per microorganismes (Hidalgo, 2003).
- 6. Producció d'altres compostos.** Els bacteris làctics tenen la capacitat de metabolitzar altres compostos que exerceixen una influència positiva o negativa sobre el perfil sensorial del vi. Entre ells es troben els lípids, els aminoàcids i macromolècules com els pèptids i proteïnes (Bartowsky & Henschke, 1995; Bartowsky, Costello, & Henschke, 2002; Liu, 2002). Algunes de les reaccions de deteriorament que s'han produït en el vi s'han associat a l'activitat metabòlica dels bacteris làctics, com ara l'augment de l'acidesa volàtil, la contaminació amb manitol i producció excessiva de diacetil, formació d'acroleïna i síntesi d'olors a gerani (Sponholz, 1993).

### 1.3. Components i factors del vi que afecten al creixement dels bacteris làctics

Existeixen diferents factors que determinen la velocitat de creixement dels bacteris làctics en el vi. Els que tenen major influència són etanol, pH, temperatura i la concentració de sulfurós. Hi ha altres factors que també poden determinar el creixement però en graus inferiors i en certes condicions.

#### 1.3.1. Etanol

L'etanol és un agent molt tòxic per la majoria de microorganismes. Com la major part d'ells, els bacteris làctics són sensibles a l'etanol. Normalment, els bacteris aïllats del vi s'inhibeixen a partir d'un grau alcohòlic d'entre 8 i 10% vol, tot i que pot variar depenent del gènere, espècie i soca (Ribéreau-Gayon, Peynaud, & Ribéreau-Gayon, 1975). De forma general, els cocs (*Pediococcus*, *Oenococcus* i *Leuconostoc*) són els gèneres de bacteris làctics més sensibles a la presència d'etanol, mentre que *Lactobacillus* són més resistents, poden arribar a desenvolupar-se en un medi fins a 18-20% d'etanol (Hidalgo, 2003). De totes maneres, es pot dir que la fermentació malolàctica es duu a terme més ràpidament en vins amb un grau alcohòlic baix, ja que quan la concentració és elevada, s'alenteix el creixement dels bacteris làctics i, com a conseqüència, la degradació de l'àcid làctic va més lenta (Peynaud, 1999).

#### 1.3.2. pH

El pH és un altre factor primordial del vi. La majoria de bacteris, excepte els bacteris làctics, es desenvolupen en pH que es troben al voltant del neutral. Els bacteris làctics es desenvolupen de forma activa a pH reduïts, al voltant de 3,5. A pH inferiors (2,9 – 3,0) el creixement és possible, però serà més lent. En canvi a pH superiors (3,7 – 3,8) el creixement serà més ràpid. Els vins amb un pH relativament elevat presenten una microbiota làctica més abundant i variada que els vins àcids. Aquests vins es consideren microbiològicament més fràgils perquè entre els bacteris presents, n'hi ha alguns que es consideren agents d'alteració (Hidalgo, 2003).

A banda del creixement, el pH actua sobre l'activitat malolàctica. L'activitat malolàctica de les soques de *O. oeni* és òptima a un pH de 3,0 – 3,2 i fins a un màxim de 3,8. El rang habitual dels vins pertany a la de la millor activitat malolàctica de la cèl·lula bacteriana. Tot i això, la velocitat de la fermentació no depèn únicament de l'activitat, sinó de la quantitat de cèl·lules presents (Ribéreau-Gayon, Peynaud, & Ribéreau-Gayon, 1975).

### 1.3.3. Diòxid de sofre

El diòxid de sofre (SO<sub>2</sub>), en el vi, es troba en equilibri sota la forma lliure i combinada. La seva eficàcia com a antimicrobià i antioxidant està relacionada amb la constitució del vi i el seu pH. La forma activa és el SO<sub>2</sub> molecular que depèn de la concentració del SO<sub>2</sub> lliure i del pH (Hidalgo, 2003).

La inhibició dels bacteris, per una mateixa concentració de SO<sub>2</sub> total, depèn del poder de combinació del vi que determina el SO<sub>2</sub> lliure restant i del pH que fixa el SO<sub>2</sub> molecular actiu. Com a norma general, els bacteris es desenvolupen difícilment a partir de 100 mg/L de SO<sub>2</sub> i a partir de 10 mg/L de SO<sub>2</sub> lliure, tot i que varia depenent del pH i del tipus de soca. La sensibilitat de les soques depèn de les condicions del medi de creixement i de les possibilitats d'adaptació fisiològica.

Els cocs (*Pediococcus*, *Oenococcus* i *Leuconostoc*) són menys resistents a l'acció del sulfurós que els bacils (*Lactobacillus*) (Lafon-Lafourcade & Peynaud, 1974). De la mateixa manera, les espècies de tipus "filamentós" que causen la malaltia del greix o del fil són més resistents que la resta de bacteris làctics.

### 1.3.4. Temperatura

La temperatura influeix en la velocitat de creixement de tots els microorganismes. L'activitat cel·lular, i en conseqüència el creixement, varia en funció de la temperatura, segons la corba en campana. Com més alta és la temperatura, menor és el temps de generació. Aquesta corba varia en funció de l'espècie, la soca i el medi dins del qual es multipliquen els bacteris (Ribéreau-Gayon, Dubourdieu, Donèche, & Lonvaud, 2003).

Les soques de bacteris làctics són mesòfiles, és a dir, es multipliquen entre 15 – 45°C, però el creixement òptim és de 20 – 37°C. La temperatura òptima de creixement de *O. oeni* es de 27 – 30°C. Però no és el mateix en un medi amb etanol. Quan augmenta l'etanol fins a un 13 – 14%, la temperatura òptima disminueix. El creixement és més lent quan la temperatura és baixa i és quasi impossible quan es troba al voltant de 14 – 15°C.

La temperatura ideal pel creixement dels bacteris làctics és al voltant de 20°C. Una temperatura excessiva, disminueix la fermentació malolàctica, inhibint la biomassa bacteriana (Flanzy, 2000).

### 1.3.5. Altres

L'acció dels compostos fenòlics pot influir en el desenvolupament dels bacteris làctics. S'ha pogut demostrar l'efecte inhibidor de l'àcid vanílic, de les procianidines de les llavors, dels elagitanins estimulants de l'àcid gàl·lic i de les antocianines lliures (Vivas, Bellemère, Lonvaud-Funel, Glories, & Augustin, 1995). Entre els polifenols hi ha alguns favorables i altres desfavorables pel creixement i l'activitat dels bacteris làctics. Però el seu rol és secundari en relació amb els altres paràmetres.

L'oxigen també pot influir en la multiplicació dels bacteris làctics en el vi. Els bacteris làctics es comporten de diferent forma enfront de l'oxigen. Poden ser indiferents a la seva presència, acomodar-se millor en la seva absència (anaerobis facultatius), tolerar l'oxigen, però no són capaços d'utilitzar-lo (aerotolerants) o poden necessitar oxigen per un millor creixement (microarófiles). També pot variar la soca en funció del medi en el que es troba. *O. oeni* és el bacteri que millor tolera les condicions d'estrès del vi (Ribéreau-Gayon, Dubourdieu, Donèche, & Lonvaud, 2003).

### 1.4. Bacteriocines

Els microorganismes produeixen una gran quantitat de sistemes de defensa microbiana. Aquests inclouen antibiòtics clàssics d'ampli espectre, subproductes metabòlics, com ara l'àcid làctic produït pels *Lactobacillus*, agents lítics com les lisozimes, diferents tipus d'exotoxines proteiques, i bacteriocines, que són definides com a pèptids d'origen ribosomal que són segregats al medi extracel·lular. Les bacteriocines s'han pogut trobar en la majoria de bacteris. La diferència entre els antibiòtics clàssics d'ampli espectre i les bacteriocines és que aquestes últimes tenen un espectre de letalitat relativament estret i són tòxics únicament per bacteris estretament relacionats amb la soca productora (Riley & Chavan, 2007).

La primera vegada que es va detectar una bacteriocina va ser l'any 1925 per André Gratia, qui va observar la inhibició d'algunes soques d'*Escherichia coli* per l'acció d'un compost antibacterià que va denominar colicina V, alliberat al medi extracel·lular per una soca virulenta de *E. coli* (Oscáriz & Pisabarro, 2001). El 1928 es va observar que algunes soques de *Lactococcus* produïen un efecte inhibidor del creixement d'altres bacteris làctics (Rogers & Whittier, 1928). El 1993 es va descobrir la nisina, la primera substància antimicrobiana aïllada dels bacteris làctics, produïda per soques de l'espècie *Lactobacillus lactis* subespècie *lactis*. La nisina és la bacteriocina millor caracteritzada que s'utilitza com a conservant d'aliments i és una de les dues reconegudes per la FDA (Food and Drug Administration). S'utilitza en la producció de productes làctics com a

additiu per prevenir alteracions ocasionades per bacteris gram-positius, com *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Bacillus* i *Listeria* (González-Martínez, Gómez-Treviño, & Jiménez-Salas, 2003).

#### 1.4.1. Classificació

El 1993, Klaenhammer va classificar les bacteriocines dels bacteris làctics, proposant quatre classes principals (Rea, Paul Ross, Cotter, & Hill, 2011):

- **Classe I (bacteriocines post-traduccionament modificades):** també anomenat lantibiòtics, es tracten de pèptids petits (<5 kDa) de membrana activa que contenen els aminoàcids inusuals com la lantionina o  $\beta$ -metil-lantionina i residus deshidratats. La nisina es tracta de la bacteriocina més caracteritzada de la classe I. Aquest grup es divideix en diferents classes
  - **Classe Ia:** lantibiòtics
  - **Classe Ib:** laberintopeptines
  - **Classe Ic:** sactibiòtics
- **Classe II (bacteriocines no modificades):** es tracten de bacteriocines de mida petita (<10 kDa), estables a la calor i no contenen lantionina, per tant, no hi ha modificacions post-traduccionals. Aquesta classe es divideixen en diferents subclasses:
  - **Classe IIa:** bacteriocines similars a la pediocina que són produïdes per una àmplia gamma de bacteris grampositius. En els últims anys, s'ha reconegut que tenen potencial com a conservants naturals d'aliments i en possibles aplicacions biomèdiques a través de la inhibició de bacteris patògens com la *Listeria monocytogens* i *Staphylococcus aureus* i bacteris formadors d'espores com *Bacillus cereus* i *Clostridium perfringens* (Drider, Fimland, Hechard, McMullen, & Prevost, 2006).
  - **Classe IIb:** bacteriocines de dos pèptids
  - **Classe IIc:** bacteriocines circulars
  - **Classe IId:** bacteriocines no modificades, lineals, no semblants a la pediocina
- **Classe III o bacterolisines:** bacteriocines grans i termolàbils

**Taula 2.** Exemples de bacteriocines segons la classe a la que pertanyen (modificació de Kumariya, i altres, 2019; Riley & Chavan, 2007)

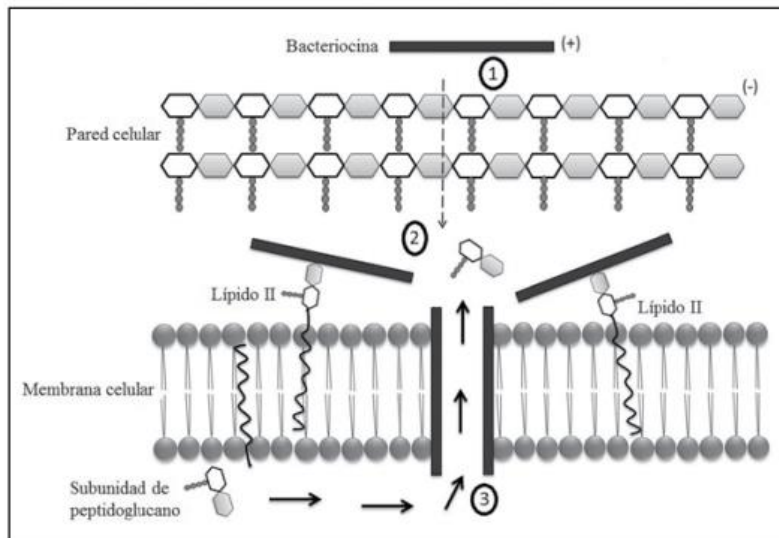
Classe	Subclasse	Bacteriocina	Espècie productora
I	Ia	Nisina A	<i>Lactococcus lactis</i>
		Nisina U	<i>Streptococcus uberis</i>
	Ib	Mersacidina	<i>Bacillus</i> spp.
		Cinamcina	<i>Streptomyces cinnamoneus</i>
	Ic	Lacticina 3147	<i>Lactococcus lactis</i>
		Smb	<i>Streptococcus mutans</i>
II	IIa	Pediocina PA1	<i>Pediococcus acidilactici</i>
		Listeriocina 743A	<i>Listeria innocua</i>
	IIb	Lactococcina G	<i>Lactococcus lactis</i>
		Plantaricina NC8	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>
	IIc	Gassericina A	<i>Lactobacillus gasseri</i>
		Enterocina AS-48	<i>Enterococcus faecalis</i>
	IId	Bactofencina A	<i>Lactobacillus salivarius</i>
		LsbB	<i>Lactococcus lactis</i>
III	Helveticina M	<i>Lactobacillus crispatus</i>	
	Helveticina J	<i>Lactobacillus helveticus</i>	

#### 1.4.2. Mecanisme d'acció de les bacteriocines

Existeixen molts estudis sobre la manera d'actuar de les bacteriocines, i la membrana ha sigut l'objectiu clau de la majoria d'ells. Les bacteriocines provoquen la permeabilitat de la membrana, que desencadena la fuga de compostos intracel·lulars i la dissipació de la força motriu del protó.

La majoria de bacteriocines actuen sobre la membrana de cèl·lules sensibles, desestabilitzant i permeabilitzant mitjançant la formació de canals o porus iònics que dona lloc a la sortida de compostos com el fosfat, potassi, aminoàcids, ATP. Això disminueix la síntesi de macromolècules i provoca, com a conseqüència, la mort cel·lular.

Les bacteriocines de classe I, com la nisina, és el mode d'acció dual (**figura 4**). La bacteriocina s'uneix a la paret cel·lular mitjançant atraccions electroestàtiques. Seguidament, la nisina s'uneix al lípid II, principal transportador de les subunitats de peptidoglicans, i utilitza aquesta molècula per ancorar-se a la membrana cel·lular. Després, la bacteriocina canvia la seva orientació en relació amb la membrana i s'insereix dins d'ella. Finalment, la unió de diversos pèptids en el lloc d'inserció provoca la formació d'un porus transmembranal que permet la sortida de molècules importants com aminoàcids i ATP, el que porta a la bacteriocina a una ràpida mort cel·lular.



**Figura 4.** Model de formació de porus a la membrana citoplasmàtica (Mondragón Preciado, i altres, 2013)

Les bacteriocines de classe II actuen desestabilitzant les funcions de la membrana cel·lular de les cèl·lules sensibles. I les bacteriocines de classe III promouen la lisi de la paret cel·lular del bacteri sensible (Mondragón Preciado, i altres, 2013).

### 1.5. *Lactiplantibacillus plantarum*

El gènere *Lactobacillus* és el grup principal de bacteris làctics. Els lactobacils es poden aïllar de diferents nínxols ecològics i diferents estudis mostren les diferències en els seus nivells genètic i fisiològic. Algunes espècies de *Lactobacillus*, com ara *Lactobacillus delbrueckii* o *Lactocaseibacillus rhamnosus*, només es poden trobar en nínxols ecològics limitats, però *L. plantarum*, el podem trobar en productes làctics, verdures, carn, vi, tractes gastrointestinals, vaginals... Aquest tret demostra la gran capacitat d'adaptació i la diversitat de vies metabòliques de *L. plantarum*. A més, aquesta espècie participa en la fermentació de productes làctics com el formatge, quefir, xucrut, productes carnis fermentats, verdures fermentades i begudes (Seddik, i altres, 2017).

*L. plantarum* té l'estatus de presumpció qualificada de seguretat (QPS) de les Autoritats Europees de Seguretat Alimentaria (EFSA) i l'estatus generalment reconegut com a segur (GRAS) de l'Administració de Drogues i Aliments de EE. UU. (US FDA) (Mongensen, i altres, 2002). Per tots aquests trets, s'ha investigat a *L. plantarum* per caracteritzar millor les seves característiques de seguretat i desvelar els seus atributs probiòtics.

### 1.5.1. Bacteriocines produïdes per *Lactiplantibacillus plantarum*

L'espècie *L. plantarum* produeix una gran varietat de bacteriocines, anomenades plantaricines. Entre elles podem trobar: plantaricina NA, produïda per *L. plantarum* sp. d'origen vegetal; plantaricina C19 produïda per *L. plantarum* C19 aïllat de cogombres fermentats; *L. plantarum* C11 produeix dos bacteriocines de dos pèptids, plantaricina EF i plantaricina JK; la plantaricina A induïx la producció de les dues bacteriocines de dos pèptids; les plantaricines S i T són produïdes per *L. plantarum* LCP010, aïllat de fermentacions d'olives verdes; la plantaricina 149 produïda per *L. plantarum* NRIC 149 i aïllada de la pinya; i la plantaricina D es produïda per *L. plantarum* BFE 905 (Todorov, 2009).

## 2. Objectiu

L'objectiu principal del treball és comprovar si la soca de *Lactiplantibacillus plantarum* C11, aïllada a l'INCAVI, és productora de bacteriocina. I, a més, estudiar l'efecte sobre la seva producció exposant-la a diferents condicions (most, most en coinoculació amb llevats). El motiu per realitzar l'estudi és per controlar microbiològicament els vins i evitar el creixement d'agents bacterians no desitjats.

## 3. Materials i mètodes

### 3.1. Medis de cultiu

Per poder recuperar les soques de bacteris làctics i llevats, i per realitzar l'assaig, es van utilitzar diferents medis de cultiu. Els medis utilitzats van ser: MRS, MLO, YPD i SA. La composició de cada un dels medis està especificat en l'Annex 1.

A continuació, es descriuen els medis utilitzats durant l'estudi:

- **Man, Rogosa and Sharpe (MRS)** (Sharlau): medi selectiu per l'aïllament de bacteris làctics. MRS es va utilitzar en una proporció de 52 g/L. Aquest medi es va complementar amb 10 g/L de fructosa, 25 mL/L de suc de tomàquet i 4 g/L de màlic, obtenint així el medi MRS<sub>mT</sub>. Un cop feta la barreja, es va ajustar el pH a 5 afegint entre 2-3 gotes de NaOH 10N. La fructosa es va afegir perquè alguns bacteris làctics tenen preferència per aquest sucre en comptes de la glucosa (Masqué, 1992). El suc de tomàquet es va utilitzar perquè conté una substància derivada de l'àcid pantotènic que actua com un precursor vitamínic i afavoreix el creixement dels bacteris làctics (Amachi i altres, 1971). I, per últim, l'àcid màlic serveix per afavorir l'activitat de l'enzim malolàctic (Masqué, 1992).

El medi MRSmT també es va realitzar afegint nistatina i obtenint el medi MRSmTN. La nistatina es tracta d'un antifúngic que s'utilitza per evitar el creixement de llevats. Abans d'afegir la nistatina al medi, es va esterilitzar aigua destil·lada i es van introduir 0,05 g/L de nistatina. El preparat es va col·locar al bany maria i seguidament es va afegir al medi preparat.

El medi MRSmT es va preparar de forma líquida, sòlida (2,2% agar) i semisòlida (1% agar). El medi MRSmTN només es va preparar de forma sòlida (2,2% agar).

- **MLO** (Sharlau): medi selectiu per l'aïllament de bacteris làctics. MLO es va utilitzar en una proporció de 35,2 g/L. Aquest medi es va complementar amb 10 g/L de fructosa obtenint el medi MLO T.

El medi MLO T es va preparar de forma líquida i sòlida (2,2% agar).

- **Yeast extract peptone dextrose (YEPD)** (Scharlau): medi ric per llevats. YEPD es va utilitzar en una proporció de 50 g/L.

El medi YEPD es va preparar de forma líquida i sòlida (2,2% agar).

- **Agar Sabouraud (SA)** (Scharlau): medi ric per llevats. SA es va utilitzar en una proporció de 65,5 g/L. Aquest medi ja porta l'agar i, per tant, només es va preparar en medi sòlid.

### 3.2. Microorganismes

Es van utilitzar soques indicadores i productores per poder detectar l'activitat antimicrobiana. Algunes de les soques eren de la mateixa col·lecció d'INCAVI, altres obtingudes de la CECT i altres comercials.

#### 3.2.1. Soques productores

El focus de l'estudi per la possible activitat antimicrobiana pertany a l'espècie *Lactiplantibacillus plantarum*, en concret la soca C11. Aquesta soca va ser aïllada a partir d'un most de raïm a la zona sud de Catalunya i seleccionada en altres estudis realitzats a l'INCAVI de Reus amb la col·laboració del Departament de Bioquímica de la URV (Masqué & Bordons, 1996).

S'han realitzat diferents estudis amb la soca C11 en els quals s'ha pogut detectar una possible activitat inhibidora enfront d'altres soques de bacteris làctics (Masqué, i altres, 2008).

En aquest estudi s'ha utilitzat la soca original C11 i diferents versions d'aquesta: C11 1-Step, C11 MBR 8, C11 MBR 7. Els tres últims cultius provenen d'un procés industrial de producció i s'han utilitzat com a productores per comprovar si el procés influeix en la capacitat de producció de la bacteriocina.

### 3.2.2. Soques indicadores

Les soques indicadores s'han escollit a partir dels resultats obtinguts en el seu projecte "*Comprobación de la capacidad de cepas de bacterias lácticas aisladas de mosto de generar bacteriocinas que afecten a otras cepas*" realitzat per la Noelia Cuadrado, 2009. S'han intentat recuperar aquells bacteris làctics que van ser inhibits per la soca C11. Tot i això, per problemes durant el procediment i impediments per poder recuperar les soques, només s'han pogut utilitzar quatre de les que va fer servir la Noelia en el seu treball.

Totes les soques utilitzades es recullen en aquesta taula on hi ha indicat el nom, l'espècie i l'origen:

**Taula 3.** Llistat de bacteris làctics utilitzats com a soques indicadores.

<b>Nom</b>	<b>Espècie</b>	<b>Origen</b>
Alpha 1-Step	<i>Oenococcus oeni</i>	Comercial (Lallemand)
Lc 475	<i>Lacticaseibacillus casei</i>	Colección Española de Cultivos Tipo (CECT)
Vitilactic D	<i>Oenococcus oeni</i>	Comercial (Martin Vialatte)
Soca D	<i>Oenococcus oeni</i>	INCAVI
Viniflora CH16	<i>Oenococcus oeni</i>	Comercial (CHR Hansen)
VP41	<i>Oenococcus oeni</i>	Comercial (Lallemand)
Viniflora CH11	<i>Oenococcus oeni</i>	Comercial (CHR Hansen)
ML Prime	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	Comercial (Lallemand)

### 3.2.3. Llevats

Els llevats utilitzats en l'estudi es van fer servir per coinocular-los amb les soques productores. A la taula següent s'indiquen les soques de llevat utilitzades, l'espècie i l'origen:

**Taula 4.** Llistat de llevats utilitzats per la co-inoculació amb els bacteris làctics

Nom	Espècie	Origen
Persy	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Comercial (Lallemand)
LT53	<i>Lachancea thermotolerans</i>	Comercial (AB Biotek)
Lalvin Clos	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Comercial (Lallemand)
Lalvin Rhône 2056	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Comercial (Lallemand)
Awri Obsession	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	Comercial (AB Biotek)

### 3.3. Condicions de creixement

Les soques teòricament productores es van obtenir a partir de cultius en placa i crioboles. Es van sembrar en plaques amb medi MRSmT i MLO T.

Les soques indicadores es van obtenir a partir de crioboles i de cultius liofilitzats. Les obtingudes a partir de crioboles es van sembrar en plaques amb medi MRSmT i MLO T. Les soques obtingudes a partir de cultius liofilitzats es van sembrar en medi MRSmT i MLO T líquid i, seguidament, es van sembrar en placa.

Els llevats es van sembrar en medi líquid YEPD i, a partir d'aquí, es va sembrar en placa en medi YEPD.

### 3.4. Tinció Gram

La tinció de gram ens diferencia bacteris en dos grups: els bacteris grampositius són els que retenen la tinció blau-violeta i els bacteris gramnegatius són els que es decoloren i es tenyeixen amb safranina (Beveridge, 2009).

A partir del cultiu de soques, es van preparar frotis i es va realitzar la tinció gram. Un cop tenyides totes les mostres, es van observar al microscopi amb l'objectiu d'immersió de 100x10 augments. Es va realitzar la tinció gram per comprovar que tant les soques productores com les indicadores tenien la morfologia esperada, és a dir, que les espècies com *Oenococcus* fossin cocs i *Lactobacillus* fossin bacils.

### 3.5. Mètode dels halos

Les soques indicadores recuperades es van sembrar en 5 mL de medi MRSmT líquid i les productores es van sembrar en 5 mL de medi MRSmT líquid o en most. A partir de les plaques, es van agafar les colònies mitjançant una nansa i es van introduir en el medi.

Un cop van créixer els bacteris, es van centrifugar les soques productores a 8500 rpm durant 10 minuts. Es va agafar el sobrenedant, es va filtrar (porus de 0,22 µm) i guardar a la nevera.

Per realitzar l'assaig, es van preparar plaques amb aproximadament 20 mL de medi MRSmT. Per avaluar l'efecte inhibitori, es van introduir 4 gotes de 5 µL cada una amb dues de les soques productores en cada placa. Es van col·locar de manera que no se superposessin entre elles. Es van deixar assecar les gotes aproximadament 30 min i es van abocar 10 mL de medi MRSmT semisòlid sembrat amb 100 µL de soca indicadora (Hurtado, Reguant, Bordons, & Rozès, 2011).

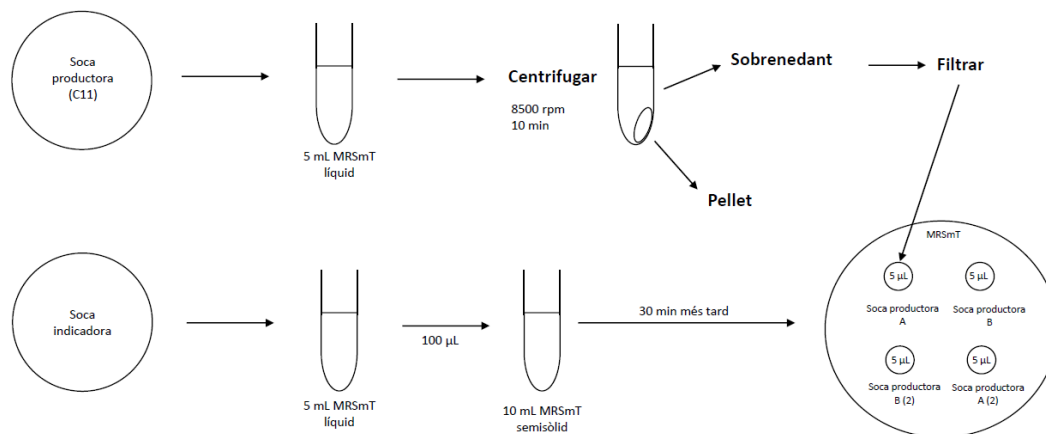


Figura 5. Esquema del mètode dels halos

#### 3.5.1. Condicions d'estudi

Es van voler fer tres condicions d'estudi diferents, totes per duplicat. En primer lloc, es va realitzar l'assaig en medi MRSmT de totes les soques indicadores per comprovar la inhibició enfront de les soques productores.

En segon lloc, es van inocular les soques productores de bacteriocina en most per comprovar si en aquest medi s'inhibien les indicadores.

I, en tercer lloc, es van coinocular les soques productores amb llevats en most per comprovar si existia l'efecte inhibitori.

Es van realitzar les tres condicions alhora, ja que es volia comprovar si el comportament de les soques indicadores enfront de les productores era variable depenent del medi on es trobaven.

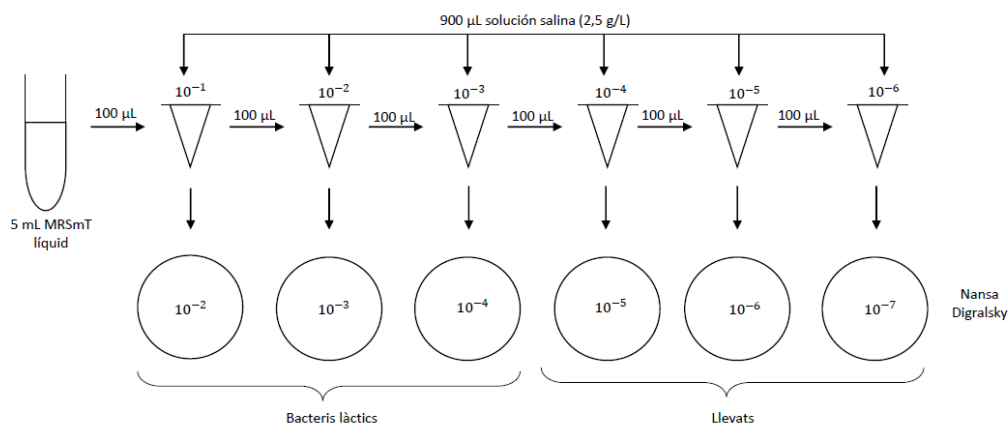
### 3.5.2. Àcid L-màlic

En el most amb bacteris làctics i en la coinoculació, es va analitzar la concentració d'àcid màlic mitjançant l'analitzador multiparamètric enzimàtic (Miura 200, TDI).

### 3.5.3. Recompte de cèl·lules viables en placa

Abans de realitzar l'assaig, es va fer un recompte de bacteris viables una vegada acabada la fermentació per conèixer des de quina població partíem en cada una de les condicions amb les soques productores i llevats.

Es van preparar diferents medis de cultiu MRSmT amb nistatina pels bacteris làctics i Agar Sabouraud pels llevats. Les dilucions utilitzades pels bacteris va ser de  $10^{-5}$  fins  $10^{-7}$  i pels llevats de  $10^{-2}$  fins a  $10^{-4}$ .



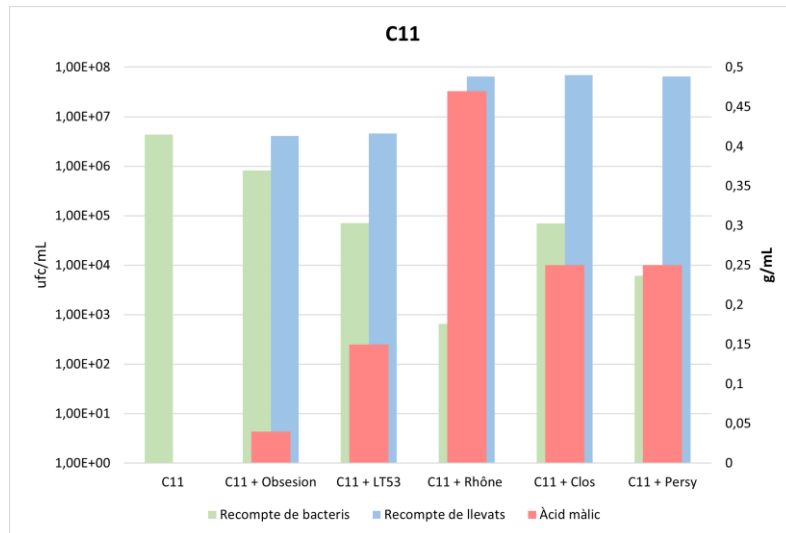
**Figura 6.** Bateria de dilucions per realitzar la sembra pel recompte de bacteris i llevats

El recompte de bacteris també es va realitzar en els que estaven sembrats en medi MRSmT. En aquest cas es va diluir més la mostra, de  $10^{-7}$  fins  $10^{-9}$ .

## 4. Resultats i discussió

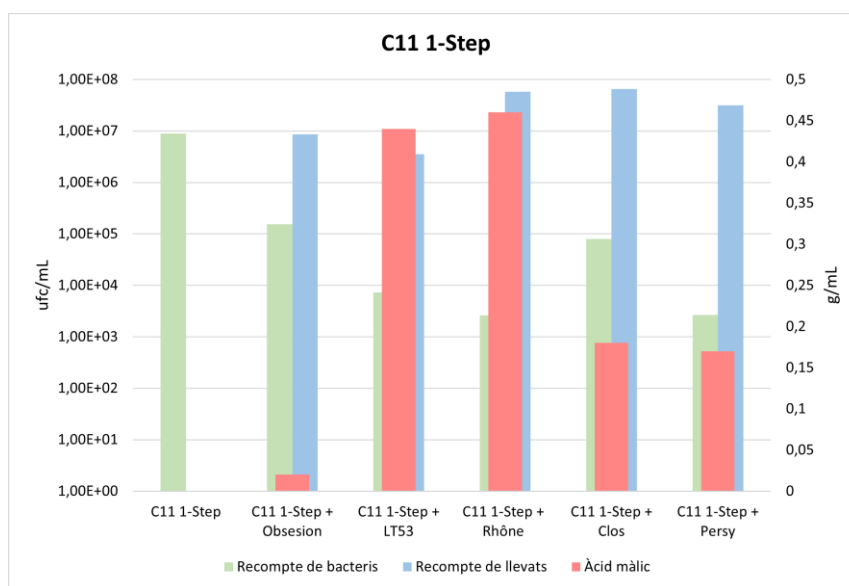
### 4.1. Activitat dels diferents cultius de C11 per degradar l'àcid màlic i compatibilitat entre els diferents cultius de C11 amb les diferents soques de llevats.

En les següents figures es recullen, de les diferents condicions estudiades, els resultats de les poblacions de bacteris i llevats al final de fermentar i la concentració d'àcid màlic final. Es parteix d'un àcid màlic inicial de 1,26 g/mL. Els resultats detallats es mostren en l'Annex 2.



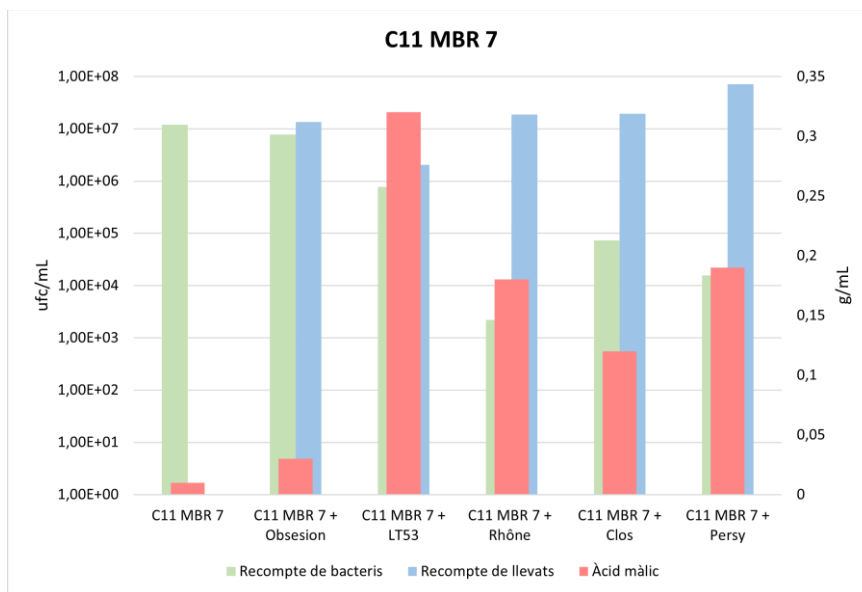
**Figura 7.** Resultat de la concentració d'àcid màlic final i del recompte de bacteris i llevats de la soca C11

En aquesta primera figura hi ha representada la C11 sola en most i en coinoculació amb diferents espècies de llevats. Com es pot observar, la població de bacteris és més elevada quan la C11 no està coinoculada. Per contra, amb la coinoculació es veu una disminució de la població que afecta la degradació de l'àcid màlic. En el primer cas, la soca C11 és capaç de degradar l'àcid màlic per complet, ja que no té cap competència en el medi i pot treballar sense problemes. Pel que fa a la població de llevats, es pot veure que hi ha més població de les soques de *Saccharomyces cerevisiae* (Rhône, Clos, Persy) que les no-*Saccharomyces* (LT53, Obsession) que possiblement han tingut més dificultats d'adaptació al medi. A més a més, la disminució de la població de no-*Saccharomyces* ha provocat una major imposició de la soca C11 en el medi afavorint la degradació de l'àcid màlic.



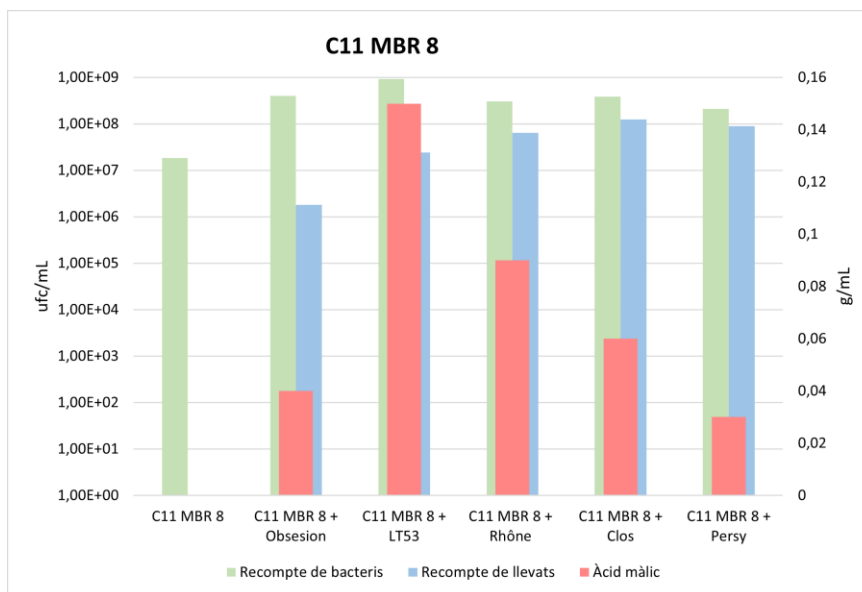
**Figura 8.** Resultat de la concentració d'àcid màlic final i del recompte de bacteris i llevats de la soca C11 1-Step

En aquesta segona figura hi ha representada la C11 1-Step en most i en coinoculació amb llevats. En aquest cas també hi ha una població de bacteris elevada quan la soca C11 1-Step no està en coinoculació i una disminució de la població quan es troba coinoculada. La degradació de l'àcid màlic torna a ser completa quan la soca C11 1-Step es troba sola en el most. La dificultat de degradació augmenta considerablement quan es troba coinoculada amb *Lachancea thermotolerans* (LT53) i *Saccharomyces cerevisiae* (Rhône) i això provoca una disminució de la població de bacteris làctics. En tots els casos de coinoculació, el bacteri làctic es veu amb més dificultat per poder degradar completament l'àcid màlic, però en coinoculació amb *Metschnikowia pulcherrima* (Obsesion) és capaç de degradar-lo un 98%.



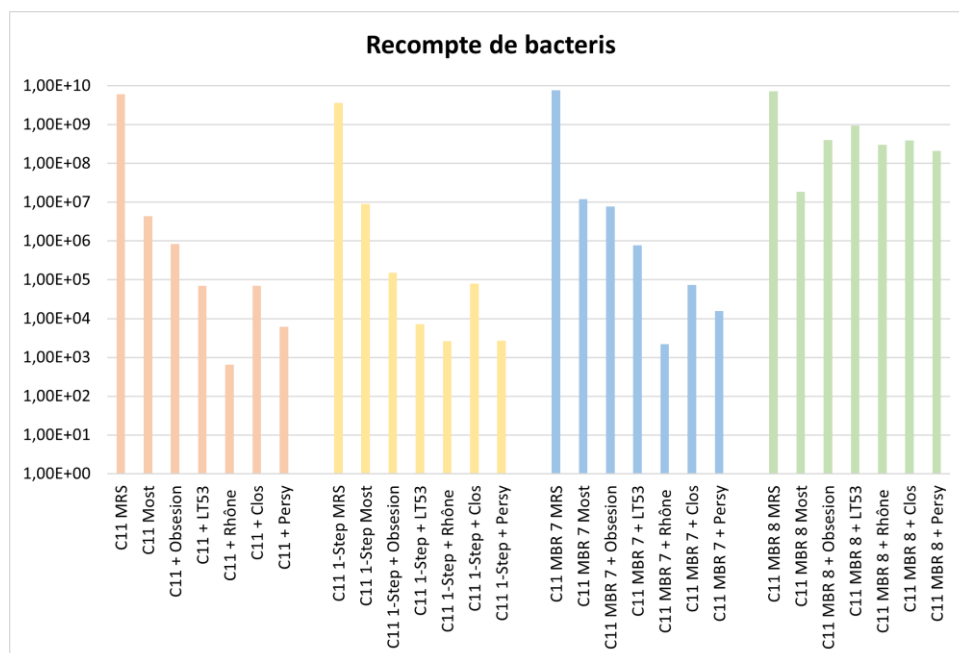
**Figura 9.** Resultat de la concentració d'àcid màlic final i del recompte de bacteris i llevats de la soca C11 MBR 7

En aquesta tercera figura es veu representada la C11 MBR 7 en most i en coinoculació amb llevats. Com en els casos anteriors, la població de bacteris làctics és més elevada quan la soca es troba sola en el most. Tot i així, en aquest cas, no ha sigut capaç de degradar al 100% l'àcid màlic del medi. Es torna a fer evident que la C11 MBR 7 en coinoculació amb *Lachancea thermotolerans* (LT53) té més dificultats per degradar l'àcid màlic tot i tenir una població més elevada que la majoria de coinoculacions. Segueix predominant l'elevada població de llevats enfront de bacteris i l'elevada població de *Saccharomyces cerevisiae* enfront *no-Saccharomyces*.



**Figura 10.** Resultat de la concentració d'àcid màlic final i del recompte de bacteris i llevats de la soca C11 MBR 8

En aquesta quarta figura es veu representada la C11 MBR 8 en most i en coinoculació amb llevats. Aquest es un dels casos més excepcionals, ja que la població més elevada de bacteris làctics es troba quan la soca està coinoculada amb els llevats. Tot i això, la degradació de l'àcid màlic en aquests casos segueix sent incompleta. *Lachancea thermotolerans* (LT53) torna a dificultar més la degradació de l'àcid màlic respecte la resta de llevats.



**Figura 11.** Recompte de bacteris en totes les condicions estudiades

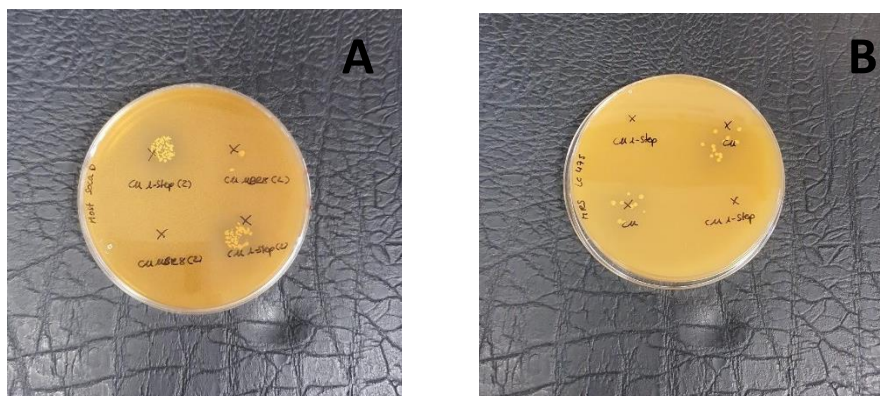
En aquesta figura es veu el recompte de bacteris de totes les condicions estudiades de la soca productora (medi MRS, most i most en coinoculació amb llevats). Per una banda, podem observar que en medi MRS la població de bacteris és més elevada, ja que es troben en unes

condicions ideals de creixement. En most, en canvi, hi ha factors com l'etanol que suposen un impediment per poder desenvolupar-se perquè els bacteris làctics són sensibles a aquest agent. Per altra banda, sembla que les soques C11 MBR 7 i C11 MBR 8, els cultius que provenen d'un procés industrial de producció, són els que més població han donat en totes les condicions. La C11 MBR 8 és la que sembla que és més tolerant a l'etanol, ja que ha sigut capaç de desenvolupar-se millor que les altres soques. I, per últim, com ja s'ha comentat en les altres figures, de forma general, excepte la soca C11 MBR 8, quan el bacteri làctic es troba en coinoculació la població és inferior que quan es troba sol en el most.

#### 4.2. Producció de bacteriocines en MRS, most i en most en co-inoculació

El mètode dels halos d'inhibició es va realitzar per conèixer si les diferents soques de *L. plantarum* C11 eren productores de bacteriocines i inhibien el creixement de les soques indicadores escollides. Per apropar-nos a la realitat, es va voler fer l'assaig amb most on només es van inocular bacteris làctics i en most amb co-inoculació amb llevats.

La primera vegada que es va realitzar l'assaig, les mostres de les diferents soques productores es van centrifugar, però el sobrenedant no es va filtrar. Quan va créixer la soca indicadora, també havia crescut la productora. Per tant, no s'havien eliminat totes les cèl·lules. En dues plaques es van poder veure uns halos d'inhibició (**figura 12**). No es pot assegurar que la inhibició sigui deguda per una bacteriocina, ja que hi ha creixement de la soca productora. Per tant, es possible que la inhibició s'hagi donat per competència de nutrients.



**Figura 12.** Plaques mètode dels halos d'inhibició. **A:** soca indicadora Lc 475 en medi MRS inhibida per la soca productora C11. **B:** soca indicadora soca D en most inhibida per la soca productora C11 1-Step

Per comprovar si es tractava o no d'una bacteriocina, es va voler tornar a realitzar l'assaig filtrant el sobrenedant. Passats uns dies, es va veure que no hi havia creixement, possiblement perquè

el cultiu estava mort, ja que feia molts dies que s'havia preparat. Per falta de temps, no es va poder tornar a realitzar aquesta prova.

De totes maneres, es va tornar a realitzar l'assaig utilitzant altres soques de les quals disposàvem. Aquest cop es va filtrar la mostra per evitar el creixement de la soca productora i eliminar la inhibició per competència de nutrients. D'aquesta manera, si hi ha una inhibició, podem suposar amb més certesa que es tracta d'una bacteriocina. Els resultats obtinguts estan representats a la Taula 5 i 6.

**Taula 5.** Resultats obtinguts de l'assaig realitzat en medi MRS i en most únicament amb el bacteri làctic teòricament productor.

Soca indicadora	Soca productora	Inhibició del creixement	
		Medi MRS	Most
Vitalactic D ( <i>Oenococcus oeni</i> )	C11	No	No
	C11 1-Step	No	No
	C11 MBR 7	No	No
	C11 MBR 8	No	No
Alpha 1-Step ( <i>Oenococcus oeni</i> )	C11	No	No
	C11 1-Step	No	No
	C11 MBR 7	No	No
	C11 MBR 8	No	No
VP41 ( <i>Oenococcus oeni</i> )	C11	No	No
	C11 1-Step	No	No
	C11 MBR 7	No	No
	C11 MBR 8	No	No
Viniflora CH11 ( <i>Oenococcus oeni</i> )	C11	No	No
	C11 1-Step	No	No
	C11 MBR 7	No	No
	C11 MBR 8	No	No
Viniflora CH16 ( <i>Oenococcus oeni</i> )	C11	No	No
	C11 1-Step	No	No
	C11 MBR 7	No	No
	C11 MBR 8	No	No
MLPrime ( <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> )	C11	No	No
	C11 1-Step	No	No
	C11 MBR 7	No	No
	C11 MBR 8	No	No

**Taula 6.** Resultats obtinguts de l'assaig realitzat en most amb els bacteris làctics teòricament productors en co-inoculació amb els llevats.

Soca indicadora	Llevat	Inhibició de creixement			
		C11	C11 1-Step	C11 MBR 7	C11 MBR 8
VP41 ( <i>Oenococcus oeni</i> )	Persy	No	No	No	No
	Clos	No	No	No	No
	Rhône	No	No	No	No
	Obsesion	No	No	No	No
	LT53	No	No	No	No
Alpha 1-Step ( <i>Oenococcus oeni</i> )	Persy	No	No	No	No
	Clos	No	No	No	No
	Rhône	No	No	No	No
	Obsesion	No	No	No	No
	LT53	No	No	No	No
Viniflora CH16 ( <i>Oenococcus oeni</i> )	Persy	No	No	No	No
	Clos	No	No	No	No
	Rhône	No	No	No	No
	Obsesion	No	No	No	No
	LT53	No	No	No	No
Viniflora CH11 ( <i>Oenococcus oeni</i> )	Persy	No	No	No	No
	Clos	No	No	No	No
	Rhône	No	No	No	No
	Obsesion	No	No	No	No
	LT53	No	No	No	No
Vitolactic D ( <i>Oenococcus oeni</i> )	Persy	No	No	No	No
	Clos	No	No	No	No
	Rhône	No	No	No	No
	Obsesion	No	No	No	No
	LT53	No	No	No	No
MLPrime ( <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> )	Persy	No	No	No	No
	Clos	No	No	No	No
	Rhône	No	No	No	No
	Obsesion	No	No	No	No
	LT53	No	No	No	No

Com es pot observar en les taules, no ha aparegut cap inhibició. Per tant, podem dir que les soques indicadores estudiades no són sensibles a la soca productora C11.

En el treball de la Noelia, les soques Vitolactic D i Alpha 1-Step sí que s'havien inhibit. En el procediment que va utilitzar per realitzar l'assaig no va centrifugar ni filtrar la mostra, per tant, hi havia creixement de la soca productora. Com he indicat anteriorment, en aquest cas, no es

pot assegurar que la inhibició sigui deguda per la presència d'una bacteriocina, ja que hi ha altres factors que poden provocar una inhibició, com podria ser competència de nutrients.

## 5. Conclusions i perspectives

Segons els resultats obtinguts s'ha pogut observar que en el medi MRS la població de bacteris làctics és més elevada, ja que es troba en les condicions ideals per desenvolupar-se. Quan els bacteris làctics es troben en el most, tenen més dificultat per desenvolupar-se però són capaços de degradar completament l'àcid màlic del medi. En canvi, quan es troben coinoculats amb els llevats, la dificultat augmenta degut a que existeix una competència i això afecta a la degradació de l'àcid màlic. En totes les condicions estudiades s'ha pogut comprovar que les soques que provenen d'un procés industrial de producció, C11 MBR 7 i C11 MBR 8, són les més resistents i les que han obtingut una població més elevada.

Al realitzar l'assaig, per comprovar l'efecte antimicrobià de la soca C11 de *Lactiplantibacillus plantarum*, es va veure que no era capaç d'inhibir el creixement de les soques estudiades. Degut als problemes que hi hagut durant l'assaig, no es pot concloure que la soca C11 no sigui productora de bacteriocina. En un futur, s'hauria de tornar a repetir l'estudi utilitzant altres soques com a indicadores. A més, s'hauria de comprovar si la inhibició observada en les soques Lc 475 i soca D era degut a la presència d'una bacteriocina.

## 6. Bibliografia

- Bartowsky, E., & Henschke, P. (1995). Malolactic fermentation and wine flavour. *Australian and New Zealand Grapegrower and Winemaker*, 1, 83-94.
- Bartowsky, E., Costello, P., & Henschke, P. (2002). Management of the malolactic fermentation – wine flavour manipulation. *Australian and New Zealand grapegrower and winemaker*, 461a, 7-8; 10-12.
- Betteridge, A., Garbin, P., & Jiranek, V. (2015). Improving *Oenococcus oeni* to overcome challenges of wine malolactic fermentation. *Trends in Biotechnology*.
- Beveridge, T. (2009). Use of the Gram strain in microbiology. *Journal Biotechnic & Histochemistry*, 76, 111-118.
- Boulton, R., Singleton, V., Bisson, L., & Kunkee, R. (1999). Malolactic fermentation. En *Principles and practices of winemaking*. New York: Chapman and Hall.
- Cox, D., & Henick-Kling, T. (1989). Chemiosmotic energy from malolactic fermentation. *Journal of Bacteriology*, 171, 5750-5752.

- Cox, D., & Henick-Kling, T. (1990). A comparison of lactic acid bacteria for energy-yielding (ATP) malolactic enzyme systems. *American Journal of enology and viticulture*, 41, 215-218.
- Cuadrado, N. (2009). *Comprobación de la capacidad de cepas de bacterias lácticas aisladas de mosto de generar bacteriocinas que afecten a otras cepas*. Proyecto en Empresas e Instituciones. Biotecnología.
- Davis, C., Wibowo, D., Eschenbrunch, T., & Fleet, G. (1985). Practical implications of malolactic fermentation: a review. *American Journal of enology and viticulture*, 36, 290-301.
- Davis, C., Wibowo, D., Eschenbrunch, T., & Fleet, G. (1985). Practical implications of malolactic fermentation: a review. *American Journal of enology and viticulture*, 36, 290-301.
- Dittrich, H. (1987). *Mikrobiologie des Weines*. Handbuch der Lebensmitteltechnologie.
- Drider, D., Fimland, G., Hechard, Y., McMullen, L., & Prevost, H. (2006). The continuing story of class IIa bacteriocins. *Microbiology an molecular biology reviews*, 70, 564-582.
- Flanzy, C. (2000). *Enología: Fundamentos científicos y tecnológicos*. Madrid: Mundi-Prensa.
- González-Martínez, B., Gómez-Treviño, M., & Jiménez-Salas, Z. (2003). Bacteriocinas de probióticos. *RESPYN*, 4.
- Henick-Kling, T. (1993). Malolactic fermentation. En G. Fleet, *Wine microbiology and biotechnology* (págs. 289-326). Harwood Academic Publishers.
- Henick-Kling, T. (1995). Control of malo-lactic fermentation in wine: energetics, flavour modification and methods of starter culture preparation. *Journal of Applied Bacteriology Symposium Supplement*, 79, 29S-37S.
- Hidalgo, J. (2003). *Tratado de enología. Tomos I y II*. Madrid: Mundi-Prensa.
- Hurtado, A., Reguant, C., Bordons, A., & Rozès, N. (2011). Expression of *Lactobacillus pentosus* B96 bacteriocin genes under saline stress. *Food microbiology*, 28, 1339-1344.
- Krieger, S., Henick-Kling, T., Fischer, U., Bach, H., & Pickering, G. (2004). Management of malolactic fermentation in white wine. *Actas del 14 International Symposium for Enology and Viticulture Intervitis/Interfructa*.
- Krieger-Weber, Heras, J., & Suarez, C. (2020). *Lactobacillus plantarum*, a new biological tool to control malolactic fermentation: a review and an outlook. *Beverages*, 23.
- Krieger-Weber, S. (2016). Historia de las bacterias ácido lácticas en el vino. En *La fermentación maloláctica del vino: importancia de las bacterias ácido lácticas en la enología*. Canadá: Lallemand.
- Krieger-Weber, S., Heras, J., & Suarez, C. (2020). *Lactobacillus plantarum*, a new biological tool to control malolactic fermentation: a review and an outlook. *Beverages*, 6, 23.
- Kumariya, R., Garsa, A., Rajput, Y., Sood, S., Akhtar, N., & Patel, S. (2019). Bacteriocins: classification, synthesis, mechanism of action and resistance development in food spoilage causing bacteria. *Microbial Pathogenesis*, 128, 171-177.
- Lafon-Lafourcade, S., & Peynaud, E. (1974). Sur l'action antibacterienne de l'anhydride sulfureux sous forme libre et sous forme combinée. *Connaissance de la Vigne et du Vin*, 1, 187-203.

- Laurent, M., Henick-Kling, T., & Acree, T. (1994). Changes in the aroma and odour of Chardonnay wine due to malolactic fermentation. *Wein-Wissenschaft*, 49, 3-10.
- Liu, S. (2002). Malolactic fermentation in wine – beyond deacidification. *Journal of Applied Microbiology*, 95, 589-601.
- Lonvaud-Funel, A. (1999). Lactic acid bacteria in the quality improvement and depreciation of wine. *Antoine van Leeuwenhoek*, 76, 317-331.
- Masqué, M. (1992). *Fermentació malolàctica en vins negres de les comarques del sud de Catalunya: aïllament, selecció i estudi de bacteris autòctons*. Tesis doctoral.
- Masqué, M., & Bordons, A. (1996). Isolation and selection of malolactic bacteria from southern Catalan wines. *Journal of Wine Research*, 2, 91-101.
- Masqué, M., Rico, S., Elórduy, X., Puig, A., Capdevila, F., Romero, S., . . . Palacios, A. (2008). Influencia del pH en la co-inoculación de bacterias lácticas y levaduras en mostos. 31 *Congreso Mundial de la Viña y el Vino (OIV)*. Verona.
- Mondragón Preciado, G., Escalante Minakata, P., Osuna Castro, J., Ibarra Junquera, V., Morlett Chávez, J., Aguilar González, C., & Rodríguez Herrera, R. (2013). Bacteriocinas: características y aplicación en alimentos. *Investigación y ciencia*, 59, 64-70.
- Mongensen, G., Salminen, S., O'Brien, J., Owenhand, A., Holzapefel, W., Shortt, C., . . . Donohue, D. P.-S.-9. (2002). Bulletin of the International Dairy Federation. 377, 4-9.
- Oscáriz, J., & Pisabarro, A. (2001). Classification and mode of action of membrane-active bacteriocins produced by gram-positive bacteria. *International microbiology*, 4, 13-19.
- Peynaud, E. (1999). *Enología práctica: conocimiento y elaboración del vino*. Madrid: Mundi-Prensa.
- Rankine, B., Fornachon, J., & Bridson, D. (1969). Diacetyl in Australian dry red wines and its significance in wine quality. *Vitis*, 8, 129-134.
- Rea, M., Paul Ross, R., Cotter, P., & Hill, C. (2011). Classification of bacteriocins from gram-positive bacteria. En *Prokaryotic Antimicrobial Peptides*. (págs. 29-53). New York: Springer.
- Ribéreau-Gayon, J., Peynaud, E., & Ribéreau-Gayon, P. (1975). *Traté d'oenologie; Science et Techniques du vind*. Dunod Ed.
- Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B., & Lonvaud, A. (2003). *Tratado de enologia: Microbiología del vino. Vinificaciones*. Madrid: Mundi-Prensa.
- Riley, M., & Chavan, M. (2007). *Bacteriocins: Ecology and Evolution*. Springer.
- Rogers, L., & Whittier, E. (1928). Limiting factors in lactic fermentation. *Journal of bacteriology*, 16, 211-229.
- Seddik, H., Bendali, F., Gancel, F., Fliss, I., Spano, G., & Drider, D. (2017). Lactobacillus plantarum and its probiotic and food potentialities. *Probiotics and antimicrobial proteins*, 9, 111-122.
- Sponholz, W. (1993). Wine spoilage by microorganisms. En G. Fleet, *Wine microbiology and biotechnology*. (págs. 394-420). Suiza: Harwood Academic Publishers.

- Todorov, S. (2009). Bacteriocins from *Lactobacillus plantarum* - production, genetic organization and mode of action. *Brazilian Journal of Microbiology*, *40*, 209-221.
- Versari, A., Papinello, G., & Cattaneo, M. (1999). *Leuconostoc oenos* and malolactic fermentation in wine: a review. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, *23*, 447-455.
- Vivas, Augustin, N., & Lonvaud-Funel, A. (1997). Influence of oak wood and grape tanins on the lactic acid bacterium *Oenococcus oeni* (*Leuconostoc oenos*, 8413). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *80*, 1675-1678.
- Vivas, N., Bellemère, L., Lonvaud-Funel, A., Glories, Y., & Augustin, M. (1995). Etudes sur la fermentation malolactique des vins rouges en barriques et en cuves. *Oenologie*, *151*, 39-45.
- Wibowo, D., Eschenbrunch, R., Davis, C., Fleet, G., & Lee, T. (1985). Occurrence and growth of lactic acid bacteria in wine: a review. *American journal of enology and viticulture*, *36*, 302-313.

## 7. Annexos

### 7.1. Annex 1

Composició dels diferents medis de cultius utilitzats en l'estudi

<b>MRS</b>	<b>g/L</b>
Proteosa peptona	10
Extracte de carn	8
Extracte de llevat	4
D(+)-Glucosa	20
Acetat de sodi	5
Citrat de triamoni	2
Sulfat de magnesi	0,20
Sulfat de manganés	0,05
Fosfat de dipotassi	2
Polisorbat 80	1

<b>MLO</b>	<b>g/L</b>
Triptona	10
Extracte de llevat	5
Dextrosa	10
Fructosa	5
L-Cisteïna HCl	0,5
Sulfat de magnesi	0,20
Sulfat de manganés	0,05
Citrat d'amoni	3,5
Polisorbat 80	1

<b>YEPD</b>	<b>g/L</b>
Peptona	20
Extracte de llevat	10
Dextrosa	20

<b>SA</b>	<b>g/L</b>
D(+)-Glucosa	40
Peptona de caseïna	5
Peptona de carn	5
Agar	15

## 7.2. Annex 2

Resultats població bacteris làctics i llevats, i de l'àcid màlic final.

Les cel·les amb color taronja s'han suprimit per realitzar la mitjana.

### ➤ C11

BACTERIS	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	Mitjana
C11			4,38E+06	4,38E+06
C11+Obsesion		8,35E+05	8,20E+05	8,28E+05
C11 + Rhône	3,00E+02	1,00E+03		6,50E+02
C11 + Clos	7,06E+04	6,80E+04	9,00E+04	6,93E+04
C11 + LT53	6,78E+04	7,30E+04	1,40E+05	7,04E+04
C11 + Persy	6,30E+03	6,00E+03	1,00E+04	6,15E+03

LLEVATS	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>	Mitjana
C11				0,00E+00
C11+Obsesion	2,20E+06	6,00E+06		4,10E+06
C11 + Rhône	8,16E+07	4,90E+07	1,00E+08	6,53E+07
C11 + Clos	6,97E+07	7,80E+07	6,00E+07	6,92E+07
C11 + LT53	3,20E+06	6,00E+06		4,60E+06
C11 + Persy	6,04E+07	4,50E+07	7,00E+07	6,52E+07

	C11	C11 + Obsesion	C11 + LT53	C11 + Rhône	C11 + Clos	C11 + Persy
Àcid L-màlic	0	0,04	0,15	0,47	0,25	0,25
Recompte de bacteris	4,38E+06	8,28E+05	7,04E+04	6,50E+02	6,93E+04	6,15E+03
Recompte de llevats	0	4,10E+06	4,60E+06	6,53E+07	6,92E+07	6,52E+07

➤ C11 1-Step

BACTERIS	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	Mitjana
C11 1-Step			8,95E+06	8,95E+06
C11 1-Step+Obsesion	1,40E+05	1,58E+05	1,60E+05	1,53E+05
C11 1-Step + Rhône	1,20E+03	4,00E+03		2,60E+03
C11 1-Step + clos	7,32E+04	8,60E+04	1,10E+05	7,96E+04
C11 1-Step + lt53	1,15E+04	3,00E+03		7,25E+03
C11 1-Step + persy	3,30E+03	2,00E+03		2,65E+03

LLEVATS	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>	Mitjana
C11 1-Step				0,00E+00
C11 1-Step+Obsesion	6,10E+06	1,10E+07		8,55E+06
C11 1-Step + Rhône	5,17E+07	6,30E+07	8,00E+07	5,74E+07
C11 1-Step + clos	5,40E+07	7,60E+07	1,00E+08	6,50E+07
C11 1-Step + lt53	3,10E+06	4,00E+06		3,55E+06
C11 1-Step + persy	2,70E+07	3,60E+07	1,20E+08	3,15E+07

	C11	C11 + Obsesion	C11 + LT53	C11 + Rhône	C11 + Clos	C11 + Persy
Àcid màlic	0	0,04	0,15	0,47	0,25	0,25
Recompte de bacteris	4,38E+06	8,28E+05	7,04E+04	6,50E+02	6,93E+04	6,15E+03
Recompte de llevats	0	4,10E+06	4,60E+06	6,53E+07	6,92E+07	6,52E+07

➤ C11 MBR 7

BACTERIS	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	Mitjana
C11 MBR 7			1,20E+07	1,20E+07
C11 MBR 7+Obsesion			7,76E+06	7,76E+06
C11 MBR 7 + Rhône	2,40E+03	2,00E+03		2,20E+03
C11 MBR 7 + Clos	5,93E+04	8,60E+04	1,20E+05	7,27E+04
C11 MBR 7 + LT53		6,63E+05	8,90E+05	7,77E+05
C11 MBR 7 + Persy	7,00E+03	2,10E+04	1,00E+04	1,55E+04

LLEVATS	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>	Mitjana
C11 MBR 7				0,00E+00
C11 MBR 7+Obsesion	1,70E+07	1,00E+07		1,35E+07
C11 MBR 7 + Rhône	1,23E+07	2,50E+07	1,70E+08	1,87E+07
C11 MBR 7 + Clos	1,55E+07	2,30E+07	9,00E+07	1,93E+07
C11 MBR 7 + LT53	2,10E+06	2,00E+06		2,05E+06
C11 MBR 7 + Persy	4,90E+07	7,20E+07	7,00E+07	7,10E+07

	C11 MBR 7	C11 MBR 7 + Obsesion	C11 MBR 7 + LT53	C11 MBR 7 + Rhône	C11 MBR 7 + Clos	C11 MBR 7 + Persy
Àcid màlic	0,01	0,03	0,32	0,18	0,12	0,19
Recompte de bacteris	1,20E+07	7,76E+06	7,77E+05	2,20E+03	7,27E+04	1,55E+04
Recompte de llevats	0	1,35E+07	2,05E+06	1,87E+07	1,93E+07	7,10E+07

➤ C11 MBR 8

BACTERIS	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	Mitjana
C11 MBR 8			1,83E+07	1,83E+07
C11 MBR 8+Obsesion		3,72E+08	4,30E+08	4,01E+08
C11 MBR 8 + Rhône		2,25E+08	3,80E+08	3,03E+08
C11 MBR 8 + Clos		2,88E+08	4,90E+08	3,89E+08
C11 MBR 8 + LT53		7,30E+08	1,14E+09	9,35E+08
C11 MBR 8 + Persy	1,45E+08	2,22E+08	2,60E+08	2,09E+08

LLEVATS	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>	Mitjana
C11 MBR 8				0,00E+00
C11 MBR 8+Obsesion	6,00E+05	3,00E+06		1,80E+06
C11 MBR 8 + Rhône	7,91E+07	8,00E+06	5,00E+07	6,46E+07
C11 MBR 8 + Clos	1,01E+08	3,40E+07	1,50E+08	1,26E+08
C11 MBR 8 + LT53	2,72E+07	2,50E+07	2,00E+07	2,41E+07
C11 MBR 8 + Persy	8,27E+07	9,50E+07	1,00E+08	8,89E+07

	C11 MBR 8	C11 MBR 8 + Obsesion	C11 MBR 8 + LT53	C11 MBR 8 + Rhône	C11 MBR 8 + Clos	C11 MBR 8 + Persy
Àcid màlic	0	0,04	0,15	0,09	0,06	0,03
Recompte de bacteris	1,83E+07	4,01E+08	9,35E+08	3,03E+08	3,89E+08	2,09E+08
Recompte de llevats	0	1,80E+06	2,41E+07	6,46E+07	1,26E+08	8,89E+07