



**APLICACIÓN DE MÉTODOS MOLECULARES PARA EL ESTUDIO DE LAS
BACTERIAS ACÉTICAS IMPLICADAS EN LA ELABORACIÓN DE VINAGRE
DE VINO TRADICIONAL**
Carlos Alfredo Vegas Pérez

ISBN:
Dipòsit Legal: T.1216-2011

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tesisenxarxa.net) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tesisenred.net) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tesisenxarxa.net) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

CARLOS ALFREDO VEGAS PÉREZ

**APLICACIÓN DE MÉTODOS MOLECULARES PARA EL
ESTUDIO DE LAS BACTERIAS ACÉTICAS IMPLICADAS
EN LA ELABORACIÓN DE VINAGRE DE VINO
TRADICIONAL**

TESIS DOCTORAL

Dirigida por las Dras. María Jesús Torija Martínez y Montse Poblet Icart

Departament de Bioquímica i Biotecnologia



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Tarragona

2010

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
APLICACIÓN DE MÉTODOS MOLECULARES PARA EL ESTUDIO DE LAS BACTERIAS ACÉTICAS IMPLICADAS EN LA ELABORACIÓN
DE VINAGRE DE VINO TRADICIONAL
Carlos Alfredo Vegas Pérez
ISBN:/DL: T.1216-2011



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Departament de Bioquímica i Biotecnologia

C/ Marcel·lí Domingo, s/n

43007 – Tarragona

Tel. 977558858

Fax. 977-558232

Les sotasignats, Dra. María Jesús Torija Martínez, Professora Lectora, i Dra. Montse Poblet, Professora Agregada, ambdues adscrites a la Universitat Rovira i Virgili

FAN CONSTAR

Que el present treball, amb títol “**Aplicación de métodos moleculares para el estudio de las bacterias acéticas implicadas en la elaboración de vinagre de vino tradicional**” que presenta el Sr. **Carlos Alfredo Vegas Pérez** per optar al grau de Doctor per la Universitat Rovira i Virgili ha estat realitzat sota la nostra direcció i que tots els resultats són fruit dels experiments duts a terme per l'esmentat doctorand.

I perquè se'n prengui coneixement i tingui els efectes que correspongui, signem aquesta certificació.

Dra. María Jesús Torija Martínez

Dra. Montse Poblet Icart

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
APLICACIÓN DE MÉTODOS MOLECULARES PARA EL ESTUDIO DE LAS BACTERIAS ACÉTICAS IMPLICADAS EN LA ELABORACIÓN
DE VINAGRE DE VINO TRADICIONAL
Carlos Alfredo Vegas Pérez
ISBN:/DL: T.1216-2011

AGRADECIMIENTOS

La presente tesis doctoral ha sido realizada gracias a la concesión de una beca pre-doctoral de la Univesitat Rovira i Virgili otorgada durante los años 2005-2009. En el momento de escribir este apartado, me vienen a la mente muchos recuerdos de muchas personas a quien me gustaría agradecer durante todo este periodo.

Primero, al profesor Albert Mas, por su incansable interés, desde los primeros mails de información sobre el doctorado desde Iquitos hasta hoy en las correcciones de un artículo. A mis dos directoras, las Dras. Montse Poblet y María Jesús Torija, gracias por compartir sus conocimientos, he aprendido mucho de vosotras, me llevo los mejores recuerdos. A Ángel González, has sido un gran apoyo al finalizar la tesis, gracias por tu predisposición y tu interés ante cualquier duda o comentario en todo momento.

Agradecer a todos los profesores del departamento de Bioquímica i Biotecnología, a los de la Finca Experimental, los técnicos del departamento, al personal de Conserjería, de limpieza. A todos, mis sinceros agradecimientos por sus conocimientos, amistad, y los buenos momentos.

Agradecer a mis compañeros de laboratorio o de pasillo (incluyendo al grupo de Nutrigenómica) y a los que ya no están por los buenos momentos, por lo que he aprendido de cada uno de vosotros. Nombrarlos sería un error, seguro me olvidaría de alguno/a y no lo quiero hacer.

Una mención especial a la familia Torres Villar, en especial a mi tío Roberto, sin ti tampoco podría haber sido posible estar aquí. Gracias por vuestro apoyo y el calor familiar que me brindaron a mi llegada, sinceramente hicieron que todo sea más fácil.

A mis padres, sin vuestro apoyo, simplemente no estaría aquí, los quiero mucho. A la creciente familia de mi hermana María Luisa (Dochy). A mi pequeño compañero, Gust. A mi compañera, mi amiga, Marian, gracias por tu apoyo, consejos, por estar siempre a mi lado, me diste ese puntito especial que necesitaba para sentirme como en casa. Gracias por darme todo tu cariño y afecto, *t'estimo molt.*

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
APLICACIÓN DE MÉTODOS MOLECULARES PARA EL ESTUDIO DE LAS BACTERIAS ACÉTICAS IMPLICADAS EN LA ELABORACIÓN
DE VINAGRE DE VINO TRADICIONAL
Carlos Alfredo Vegas Pérez
ISBN:/DL: T.1216-2011

*A Julio y María,
mis padres*

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
APLICACIÓN DE MÉTODOS MOLECULARES PARA EL ESTUDIO DE LAS BACTERIAS ACÉTICAS IMPLICADAS EN LA ELABORACIÓN
DE VINAGRE DE VINO TRADICIONAL
Carlos Alfredo Vegas Pérez
ISBN:/DL: T.1216-2011

ÍNDICE

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
APLICACIÓN DE MÉTODOS MOLECULARES PARA EL ESTUDIO DE LAS BACTERIAS ACÉTICAS IMPLICADAS EN LA ELABORACIÓN
DE VINAGRE DE VINO TRADICIONAL
Carlos Alfredo Vegas Pérez
ISBN:/DL: T.1216-2011

INDICE

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	15
PLANTEAMIENTO EXPERIMENTAL	21
INTRODUCCIÓN	25
1. Vinagres de vino	25
2. Métodos de producción de vinagres de vino	25
3. Las Bacterias Acéticas	28
3.1. Características generales	28
3.2. Taxonomía	29
3.3. Metabolismo	34
3.3.1. Metabolismo del etanol y otros alcoholes	34
3.3.2. Metabolismo de azúcares	36
3.3.3. Metabolismo de ácidos orgánicos	37
3.3.4. Metabolismo del nitrógeno	38
3.4. Aislamiento y cultivo	39
3.5. Cuantificación	41
3.6. Análisis por técnicas moleculares	43
3.6.1. Identificación a nivel de especie	44
3.6.2. Tipificación	50
3.7. Estudios ecológicos en vinagres	51
PRIMER CAPÍTULO:	
Efecto del tipo de madera y grosor de la barrica sobre la cinética de acetificación en la producción de vinagre tradicional	69
SEGUNDO CAPÍTULO:	
Estudio de la dinámica poblacional de bacterias acéticas durante la producción de vinagre de vino por el método tradicional	85
TERCER CAPÍTULO:	
Estudio de la inoculación de dos cepas de <i>Acetobacter pasteurianus</i> en condiciones de acetificación diferentes a las de su aislamiento	109

CUARTO CAPÍTULO:

Evaluación de la representatividad de las especies de bacterias acéticas
identificadas por métodos dependientes de cultivo durante la producción
de vinagre de vino por el método tradicional 125

DISCUSIÓN GENERAL 149

CONCLUSIONES 163

ANEXO 167

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
APLICACIÓN DE MÉTODOS MOLECULARES PARA EL ESTUDIO DE LAS BACTERIAS ACÉTICAS IMPLICADAS EN LA ELABORACIÓN
DE VINAGRE DE VINO TRADICIONAL
Carlos Alfredo Vegas Pérez
ISBN:/DL: T.1216-2011

La presente tesis doctoral ha sido realizada en el Departament de Bioquímica i Biotecnologia de la Facultat d'Enologia de la Universitat Rovira i Virgili (URV, Tarragona-España) entre los años 2005-2009, bajo la dirección de las Dras. Montse Poblet y M^a Jesús Torija. Durante los primeros dos años de mi tesis, el trabajo realizado estuvo enmarcado dentro de los objetivos del Proyecto Europeo WINEGAR (Wood Solutions to Excessive Acetification Length in Traditional Vinegar Production), teniendo como resultado la publicación de dos artículos. Los resultados de uno de ellos fueron presentados para la obtención del Diploma de Estudios Avanzado (DEA) del programa de Doctorat en Enologia de la URV. Posteriormente, los trabajos realizados durante los dos años siguientes se financiaron mediante los proyectos: RM2004-00009-00-00 (Aislamiento y Mantenimiento de una Colección de Cepas de Bacterias Acéticas en la Producción de Vinagre de Vino por el Método Tradicional financiado por el Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) y AGL2007-66417-C02-02/ALI (Análisis y control microbiológico del proceso de elaboración de condimentos a partir de frutas financiado por el Ministerio de Educación y Ciencia).

La información disponible al inicio de la tesis sobre la producción de vinagre de vino por el sistema tradicional era escasa. Ésta se limitaba a que era un proceso lento en el que se obtenía un vinagre de gran calidad y del cual había un gran desconocimiento a nivel microbiológico. Por tanto, resultaba evidente la necesidad de realizar un estudio en profundidad de este proceso desde un punto de vista tecnológico y sobretodo microbiológico, para poner las bases para una posible mejora y control de este proceso. La hipótesis planteada es que **el proceso tradicional de elaboración de vinagre se puede mejorar mediante la utilización de diferentes tipos de barricas y el estudio de la microbiota implicada para un mejor control del proceso microbiológico.**

Para demostrarlo la tesis doctoral planteó los siguientes objetivos:

1. Evaluación del efecto sobre la cinética de la acetificación del uso de diferentes maderas y grosores en las barricas utilizadas para la producción de vinagre de vino por el sistema tradicional.
2. Análisis de la ecología microbiana del proceso de acetificación tradicional.
3. Análisis de la inoculación de cepas de bacterias acéticas en condiciones de acetificación diferentes a las de su aislamiento.
4. Estudio de la representatividad de la microbiota analizada en medios de cultivo con respecto a la población microbiana total.

El estudio del efecto que tenía la modificación de las barricas sobre la cinética de acetificación se analizó en el primer capítulo de esta tesis, incidiendo en dos parámetros, el tipo de madera y el grosor. Ambos parámetros están involucrados en la difusión de oxígeno a través de la barrica y por tanto en su disponibilidad por parte de las bacterias acéticas.

¿Por qué realizar un estudio con diferentes tipos de madera y grosores?

La producción tradicional de vinagre de vino es un proceso muy lento debido principalmente al acceso limitado al oxígeno que tienen las bacterias acéticas, que son los microorganismos responsables de la oxidación del etanol a ácido acético. El vinagre ha sido habitualmente considerado como un subproducto del vino, y por tanto se ha prestado muy poca atención a su proceso de elaboración. Así, las barricas empleadas para la producción de vinagre son barricas viejas que previamente han sido utilizadas en la crianza del vino, lo que hace que no sean las más adecuadas para la elaboración del vinagre por varios motivos:

(i) las barricas para la conservación y envejecimiento del vino están diseñadas para minimizar el contacto entre el oxígeno y el vino y así evitar su oxidación, por lo que se utilizan maderas poco porosas.

(ii) al ser barricas reutilizadas, contienen sedimentos, principalmente de tartratos, y depósitos de materia colorante en la superficie interna que hacen que la porosidad sea prácticamente nula.

Todas estas características son contrarias a las deseadas en las barricas para la producción de vinagre donde se ha de buscar una máxima disponibilidad de oxígeno para el desarrollo de las bacterias acéticas.

En el segundo capítulo, se analizó la población de bacterias acéticas implicadas en la producción de vinagre tradicional tanto a nivel de cepa como de especie.

¿Por qué llevar a cabo un estudio ecológico?

Un estudio ecológico es un proceso de biotransformación que nos permite conocer la microbiota presente y al mismo tiempo el grado de participación de ésta sobre el proceso. Hasta el desarrollo del presente trabajo, pocos estudios ecológicos de bacterias acéticas se habían realizado en vinagres (vinagre balsámico tradicional, vinagre de arroz, etc.), y ninguno durante la producción de vinagre de vino por el método tradicional. Los estudios ecológicos tienen un aspecto aplicado importante ya que permiten el aislamiento de cepas, que, tras una caracterización adecuada de su potencial biotecnológico, pueden ser la base de cultivos iniciadores en la industria. Por lo tanto, estos estudios son importantes porque permiten disponer de microorganismos, bien caracterizados y conservados como cultivos puros, para futuras aplicaciones.

El seguimiento de la inoculación de dos cepas que habían sido aisladas en el estudio ecológico anterior se llevó a cabo en el tercer capítulo. Estas cepas se inocularon en una vinagrería diferente y por tanto, en condiciones distintas a la de su aislamiento.

¿Por qué inocular las cepas en condiciones de acetificación diferentes a la de su aislamiento?

En los procesos fermentativos, la inoculación de microorganismos es una práctica común que permite controlar mejor el proceso. Habitualmente, estos microorganismos se aíslan de diferentes orígenes y se distribuyen comercialmente por todo el mundo. Sin embargo, la inoculación de éstos en zonas diferentes de donde se aíslan se ha criticado ya que puede ocasionar el desplazamiento de los microorganismos autóctonos propios de la zona e influir en la pérdida de tipicidad del producto. En vinagres, son muy pocos los estudios realizados sobre la inoculación de bacterias acéticas, y además, en ninguno de ellos se ha probado inocular estas cepas en condiciones de acetificación diferentes a las de su aislamiento, una práctica muy común con otros microorganismos como las levaduras. Por tanto, estudiar si estas cepas son capaces de llevar a cabo las acetificaciones o si son desplazadas por la microbiota autóctona es de vital importancia para la selección de cultivos iniciadores adecuados para la producción de vinagres de vino por el sistema tradicional.

El estudio comparativo de la identificación de bacterias acéticas mediante métodos dependientes e independientes de cultivo durante un proceso de acetificación fue realizado en el cuarto capítulo.

¿Por qué llevar a cabo un estudio comparativo entre métodos dependientes e independientes de cultivo?

Durante el desarrollo de los estudios ecológicos se ratificó la poca recuperación de la población de bacterias acéticas en medio de cultivo, como ya se había citado en la bibliografía existente. Este hecho también observado en otros procesos fermentativos, resulta en importantes diferencias cuantitativas entre los microorganismos cultivados y los detectados directamente mediante técnicas independientes de cultivo. Esto es debido a que en la mayoría de los procesos, los microorganismos recuperados en placa sólo representan un pequeño porcentaje del total de la población. Por tanto, resulta imprescindible comprobar si las especies de bacterias acéticas recuperadas en placa son representativas de las principales especies del vinagre, o por el contrario, sólo se está recuperando aquellas bacterias acéticas que son capaces de crecer en unas condiciones de cultivo particulares y de sobrevivir a un cambio de estrés. Esta información es esencial para saber si será posible seleccionar alguna cepa de las recuperadas en placa para su utilización como inóculo.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
APLICACIÓN DE MÉTODOS MOLECULARES PARA EL ESTUDIO DE LAS BACTERIAS ACÉTICAS IMPLICADAS EN LA ELABORACIÓN
DE VINAGRE DE VINO TRADICIONAL
Carlos Alfredo Vegas Pérez
ISBN:/DL: T.1216-2011

PLANTEAMIENTO EXPERIMENTAL

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
APLICACIÓN DE MÉTODOS MOLECULARES PARA EL ESTUDIO DE LAS BACTERIAS ACÉTICAS IMPLICADAS EN LA ELABORACIÓN
DE VINAGRE DE VINO TRADICIONAL
Carlos Alfredo Vegas Pérez
ISBN:/DL: T.1216-2011

Con el propósito de conseguir nuestros objetivos, se realizó el siguiente planteamiento experimental:

PRIMER CAPÍTULO: Efecto del tipo de madera y grosor de la barrica sobre la cinética de acetificación en la producción de vinagre tradicional

Este estudio fue realizado en dos vinagreras: Viticultors Mas d'en Gil (Bellmunt del Priorat, Tarragona – España) y La Guinelle (Banyuls, Francia).

Las maderas estudiadas fueron: acacia, castaño, cerezo y roble (control), mientras que los grosores fueron 15, 20 y 25 mm (control). Por tanto, la combinación de las diferentes condiciones llevó al análisis de un total de 36 barricas para cada una de las vinagreras (cada condición por triplicado).

La madre del vinagre fue producida espontáneamente en cada vinagrera, representando un 10% de la mezcla final.

El muestreo realizado durante el proceso de acetificación fue el siguiente: mezcla, 2% (p/v), 4% (p/v) y 6% (p/v) de ácido acético (final de la acetificación). También, se analizaron muestras de la madre del vinagre y del vino.

Se analizaron los siguientes parámetros físico-químicos: acidez total, etanol y azúcares residuales mediante kits enzimáticos, temperatura, pH y el contenido de anhídrido sulfuroso en el vino y se determinó la velocidad de acetificación (g de ácido acético/L.día).

SEGUNDO CAPÍTULO: Estudio de la dinámica poblacional de bacterias acéticas durante la producción de vinagre de vino por el método tradicional

El diseño experimental anterior también se utilizó para llevar a cabo un estudio microbiológico.

Los puntos de muestreo fueron los mismos indicados en el capítulo anterior. Las muestras se sembraron en medio glucosa (GY). El criterio de selección para determinar las colonias a analizar fue la formación de halo en medio GYC.

Para la identificación de las colonias seleccionadas se utilizaron las siguientes técnicas de Biología Molecular (Apartado 5 del Anexo):

- Identificación a nivel de especie: RFLP-PCR del gen 16S rRNA.
- Tipificación: ERIC-PCR y (GTG)₅-PCR.

TERCER CAPÍTULO: Estudio de la inoculación de dos cepas de *Acetobacter pasteurianus* en condiciones de acetificación diferentes a las de su aislamiento

Este estudio fue realizado en la Finca Experimental Mas dels Frares de la URV, dentro de una cámara cerrada y a temperatura controlada (25 °C).

Se realizaron tres acetificaciones: dos inoculadas con dos de las cepas mayoritarias del estudio ecológico anterior (Bp1 y Pp16) y una espontánea (control) a partir de una madre de vinagre

producida previamente en la misma vinagrería. Estas acetificaciones se realizaron por duplicado en barricas de madera.

Los puntos de muestreo fueron: la madre del vinagre, el vino y durante el proceso de acetificación: mezcla, mitad (3%, p/v de ácido acético) y final de la acetificación (6%, p/v de ácido acético).

El seguimiento de la acetificación se realizó midiendo la producción de ácido acético y el consumo de etanol a lo largo del proceso.

Las muestras se sembraron en medio GY, y las colonias se analizaron mediante las mismas técnicas de biología molecular utilizadas en el capítulo 2.

CUARTO CAPÍTULO: Evaluación de la representatividad de las especies de bacterias acéticas identificadas por métodos dependientes de cultivo durante la producción de vinagre de vino por el método tradicional

Para este estudio se realizaron dos acetificaciones en barricas de madera. Tanto los puntos de muestreo como el seguimiento de la acetificación fueron los mismos indicados en el capítulo 3.

Las técnicas empleadas para llevar a cabo la comparación fueron las siguientes:

- Dependiente de cultivo: las muestras se sembraron en 4 medios de cultivo: medio GY, manitol (MM), V50 (etanol) y V50 con 0.5% (v/v) de ácido acético. Las colonias fueron recuperadas, seleccionadas y posteriormente analizadas mediante técnicas de biología molecular tanto a nivel de cepa como de especie (ver capítulo 2).
- Independiente de cultivo: Se realizó una extracción de DNA directo de las diferentes muestras y se analizaron con las siguientes técnicas (Apartado 5 del Anexo):
 - o DGGE-PCR,
 - o RFLP-PCR del gen 16S rRNA,
 - o RT-PCR: usando el protocolo con SYBR Green para la enumeración de la población total y las sondas TaqMan-MGB para la detección y cuantificación de algunas especies de bacterias acéticas.

INTRODUCCIÓN

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
APLICACIÓN DE MÉTODOS MOLECULARES PARA EL ESTUDIO DE LAS BACTERIAS ACÉTICAS IMPLICADAS EN LA ELABORACIÓN
DE VINAGRE DE VINO TRADICIONAL
Carlos Alfredo Vegas Pérez
ISBN:/DL: T.1216-2011

INTRODUCCIÓN

1. Vinagres de vino

La palabra vinagre deriva del francés “Vin” que significa vino y “aigre” que significa agrio. Sin embargo el origen real de la palabra proviene de la voz latina “Vinum Acre”. Históricamente, el vinagre era el producto obtenido por el picado acético espontáneo del vino o de otras bebidas alcohólicas como la cerveza o la sidra. Actualmente, el vinagre se define, según el Codex Alimentarius (1987), como “un líquido apto para el consumo humano, producido exclusivamente con productos idóneos que contengan almidón o azúcares, o almidón y azúcares por el procedimiento de doble fermentación, alcohólica y acética, y que contiene una cantidad específica de ácido acético”.

Así, en España, el Real Decreto 2070/1993, B.O.E.: 8/12/93 establece que el contenido en acidez total de los vinagres, expresados en ácido acético, no será inferior a 50 g/L, excepto para el vinagre de vino, que será, al menos, de 60 g/L, mientras que el contenido residual de alcohol no será superior al 0.5% (v/v). Igualmente, establecen las distintas denominaciones de los vinagres en función de la materia prima de la que se han obtenido: vinagre de vino, de frutas, de sidra, de alcohol, de cereales, de malta, de miel, de suero de leche, entre otros.

El vinagre de vino es el principal tipo de vinagre producido en España y en la mayoría de los países mediterráneos. Se utiliza como condimento, acidificante y/o agente preservante de los alimentos.

La normativa general para el vinagre no se aplica a los amparados en Denominaciones de Origen, como son en Italia el Vinagre Balsámico Tradicional y en España el Vinagre de Jerez, el Vinagre del Condado de Huelva y el más reciente Vinagre de Montilla-Moriles, que están regulados por su propia normativa.

2. Métodos de producción de vinagres de vino

En la actualidad, existen dos métodos bien diferenciados para la producción de vinagres de vino: el método tradicional (lento) y los métodos rápidos (Tsfaye et al., 2002).

Método Tradicional

El sistema de producción de vinagre por cultivo superficial, también llamado de Orleáns o Tradicional, es el método más antiguo utilizado para la elaboración de vinagres. En el año 1864, Luis Pasteur en Orleáns (Francia) explicó por primera vez el proceso de elaboración de vinagres en barricas de madera, por lo que también es conocido como el método de Pasteur.

Se denomina método por cultivo superficial porque las bacterias acéticas (BA), que son los microorganismos responsables de la transformación del etanol en ácido acético (acetificación), se encuentran en la superficie del vino a acetificar formando una película de celulosa llamada “madre del vinagre”. La presencia de BA en la superficie se debe a que al ser aerobios estrictos es la única forma que tienen estos microorganismos de obtener oxígeno y poder oxidar el etanol a ácido acético (Figura 1).



Fig. 1. Madre del vinagre en el interior de una barrica de madera durante el proceso de acetificación en la vinagrería de La Guinelle (Francia)

La utilización de barricas de madera permite que se realice la acetificación y envejecimiento del vinagre simultáneamente, por esta razón estos vinagres presentan mayor calidad organoléptica que los vinagres producidos por otros métodos (Tsfaye et al., 2002). Sin embargo, el limitado aporte de oxígeno a las BA conlleva que el proceso de acetificación sea muy lento y por tanto sea poco atractivo para su elaboración por el elevado coste productivo. Una de las posibles causas de que estos procesos sean lentos, es el uso de barricas poco adecuadas provenientes de procesos de envejecimiento de vino, y que por tanto, están diseñadas para impedir una rápida oxidación del vino así como el desarrollo de las BA.

En esta tesis se analizó el efecto de utilizar barricas de diferentes maderas y grosores sobre la duración del proceso de acetificación (Capítulo 1).

Métodos rápidos

Con el propósito de reducir el tiempo necesario para la producción de vinagres, se diseñaron nuevos métodos como el Luxemburgués y Schützenbach o los sistemas por cultivo sumergido.

En los métodos Luxemburgués y Schützenbach se aumenta la velocidad de acetificación incrementando la superficie de contacto de las BA utilizando virutas de madera como material de soporte bacteriano (Laguno, 1991).

Por su parte, el sistema por cultivo sumergido, también conocido como método moderno, se comenzó a utilizar a partir del año 1940. Desde entonces, varios métodos han sido diseñados y patentados, como Cavitator, el fermentador de columna de burbuja, fermentadores con diferentes sistemas de aireación como Jet o Effigis Turbina y acetificador Frings (Adams, 1998); siendo este último el acetificador más utilizado en la actualidad (Figura 2).

A diferencia del cultivo superficial, con este método se pueden obtener vinagres con un elevado grado acético en periodos muy cortos de tiempo (24-48 h). Esto se debe a que al haber un continuo aporte de oxígeno (inyección de aire) al vino, las BA se encuentran sumergidas y en contacto con el aire durante todo el proceso, lo que conlleva una oxidación más rápida del etanol a ácido acético. Una de las principales desventajas de este método es que precisamente esta mayor velocidad de oxidación del etanol provoca un aumento de la temperatura, a pesar de estar regulada por el acetificador, que junto con la fuerte agitación y aireación repercute negativamente en la composición volátil del vinagre. Esto da lugar a un producto final de inferior calidad que el obtenido por el método tradicional.



Fig. 2. Acetificador Frings. Modelo Acetator V50 automático (www.bevtec.es/Frings.html)

3. Las Bacterias Acéticas

Las BA son las responsables del proceso de producción de vinagres, ya que realizan la oxidación del etanol a ácido acético. Por tanto, para conseguir un mejor control del proceso de producción del vinagre de vino es esencial tener el máximo conocimiento de estas bacterias. Por ello, en este apartado trataremos de resumir la información disponible sobre las BA a nivel bioquímico y taxonómico así como las técnicas disponibles actualmente para su identificación y tipificación.

3.1. Características generales

Las BA pertenecen a la familia *Acetobacteraceae*, son gram negativas o gram variables, de forma elipsoidal o cilíndrica, y pueden encontrarse, al observarlas al microscopio, solas, en parejas o formando cadenas (Figura 3). Su tamaño varía entre 0.4 a 1 μm de ancho y de 0.8 a 4.5 μm de longitud. Son móviles debido a la presencia de flagelos polares o peritricos. No forman endosporas como formas de resistencias. Son aerobias estrictas, presentando por tanto, un metabolismo exclusivamente respiratorio con el oxígeno como aceptor final de electrones. Presentan actividad catalasa positiva y oxidasa negativa. Su temperatura óptima de crecimiento es de 25-30 $^{\circ}\text{C}$ aunque también pueden crecer entre 38-40 $^{\circ}\text{C}$ (Saeki et al., 1997a; Ndoye et al., 2006) y débilmente a 10 $^{\circ}\text{C}$ (Joyeux et al., 1984). Su pH óptimo es de 5-6 (Holt et al., 1994), aunque pueden crecer también a pH inferiores de 4 (De Ley et al., 1984) e incluso a pH de 2-2.2 (Du Toit y Pretorius, 2002). Pueden presentar pigmentación en medios de cultivos sólidos y producir diferentes tipos de polisacáridos

(De Ley et al., 1984). Se suelen encontrar en sustratos azucarados y/o en presencia de alcohol, tales como: zumos de frutas, vino, sidra, cerveza y vinagre (excepto *Granulibacter bethesdensis* que fue aislada en los ganglios de pacientes con la enfermedad granulomatosa crónica (Greenberg et al., 2006)). Sobre estos sustratos, las BA llevan a cabo una oxidación incompleta de los azúcares y los alcoholes, produciendo una acumulación de ácidos orgánicos como productos finales. Cuando el sustrato es el etanol, se produce ácido acético; de ahí deriva el nombre corriente con el que se conocen estas bacterias.

Las BA tienen un gran interés para la industria biotecnológica ya que se utilizan para la producción de sorbosa a partir del sorbitol y para la producción de celulosa, siendo éstas, las principales aplicaciones industriales de las BA junto con la más conocida y tradicional, la producción de vinagre (Guillamón et al., 2003).



Fig. 3. Microfotografía electrónica de las BA (*A. pasteurianus*)

3.2. Taxonomía

Históricamente, las BA se conocían como “bacterias del vinagre” porque los primeros estudios se realizaron en vinagres y después en vinos y cervezas fermentadas (Gullo y Giudici, 2009). La primera clasificación del grupo de BA se le atribuye a Peerson en 1822, que las denominó *Mycoderma*. Sin embargo, fue Luis Pasteur quien en 1868 publicó el primer estudio sistemático que describía la “madre del vinagre” como una masa de microorganismos vivos - *Mycoderma aceti* - que llevaban a cabo la fermentación acética por el método de Orleáns (cultivo superficial), demostrando así que el ácido acético proviene de la oxidación del etanol y que a largo plazo puede ser oxidado a CO₂ y H₂O.

Tradicionalmente, la taxonomía de las BA se ha construido en base a criterios morfológicos, fisiológicos y bioquímicos, siendo Visser't Hooft, en 1925, el primero en proponer una clasificación de acuerdo a estos criterios. Posteriormente, Asai (1935) clasificó las BA en dos géneros: *Acetobacter* (propuesto por Beijerinck en 1898) y *Gluconobacter*. Unos años más tarde, en 1950, Frateur propuso una nueva clasificación basada en criterios fisiológicos que subdividía el género *Acetobacter* en cuatro grupos: *peroxydans*, *oxydans*, *mesoxydans* y *suboxydans*.

En la 8^{va} edición del Manual de Bergey de Determinación Bacteriológica (1974) continuaban apareciendo únicamente dos géneros: *Acetobacter* y *Gluconobacter* (De Ley y Frateur, 1974a,b), de acuerdo a la capacidad de oxidar el acetato y lactato a CO₂ y H₂O (*Acetobacter*, positivo; *Gluconobacter*, negativo) y según el tipo de flagelos (*Acetobacter*, peritrico; *Gluconobacter*, polar). El género *Acetobacter*, el cual no estaba incluido en ninguna familia, comprendía 3 especies: *A. aceti*, *A. pasteurianus* y *A. peroxydans*. Por su parte, el género *Gluconobacter*, incluido en la familia *Pseudomonadaceae*, estaba formado por una única especie, *G. oxydans*.

Posteriormente, el uso de métodos quimiotaxonómicos y técnicas moleculares fueron introduciendo grandes cambios en la taxonomía de BA. Así, Gillis y De Ley (1980) propusieron la asignación de los géneros *Acetobacter* y *Gluconobacter* a la familia *Acetobacteraceae* en base a los resultados de hibridación rRNA-DNA complementados con pruebas fenotípicas. *Acetobacter* y *Gluconobacter* mostraron una alta similitud en su rRNA, formando una rama separada dentro de la subdivisión α de la *Proteobacteria* (Stackebrandt et al., 1988).

En los años noventa, se publicaron los primeros estudios filogenéticos de BA basados en secuencias de 16S rDNA que mostraron que estos organismos pertenecían a la subclase α de *Proteobacteria* (Sievers et al., 1994a,b, 1995) confirmando los resultados obtenidos previamente por Stackebrandt et al. (1988).

Cambios importantes en la clasificación de las BA se han introducido en los últimos años. Así, Yamada et al. (1997) consolidaron como género el subgénero propuesto años antes (Yamada y Kondo, 1984) *Gluconacetobacter* (*Ga.*) basándose en las secuencias del 16S rRNA y en comparaciones quimiotaxonómicas de los sistemas ubiquinonas. Esto tuvo como resultado la transferencia de especies incluidas en el género *Acetobacter* (*A. xylinus* (Yamada, 1983), *A. liquefaciens* (Gosselé et al., 1983), *A. hansenii* (Gosselé et al., 1983), *A. diazotrophicus* (Gillis et al., 1989) y *A. europaeus* (Sievers et al., 1992) al nuevo género *Gluconacetobacter* por la presencia de la ubiquinona Q-10.

Tal y como se ha comentado, la taxonomía de las BA ha experimentado muchos cambios en los últimos 20 años de acuerdo con el desarrollo y el uso de nuevas tecnologías. Desde finales del siglo XX, estudios polifásicos de la taxonomía de las BA aisladas de diferentes nichos (como frutas, flores, plantas, tierra, alimentos fermentados e incluso en seres humanos) y de las presentes en las diferentes colecciones han llevado a la descripción de nuevos géneros y nuevas especies. Actualmente, las BA están clasificadas en 12 géneros y 55 especies (Tabla 1): *Acetobacter* (19 especies), *Acidomonas* (1 especie), *Ameyamaea* (1 especie), *Asaia* (4 especies), *Gluconacetobacter* (15 especies), *Gluconobacter* (9 especies), *Granulibacter* (1 especie), *Kozakia* (1 especie), *Neoasaia* (1 especie), *Saccharibacter* (1 especie), *Swaminathania* (1 especie), *Tanticharoenia* (1 especie).

Tabla 1. Reciente reorganización de géneros y especies de BA y fuente donde fueron aisladas por primera vez
 (Adaptada de Vinegars of the World. Gullo, M. y Giudici, P., 2009)

Géneros y especies	Fuente	Referencia
ACETOBACTER (A.)		Beijerinck, 1898
<i>A. aceti</i>	Vinagre	(Pasteur, 1864) Beijerinck (1898)
<i>A. cerevisiae</i>	Cerveza	Cleenwerck et al. (2002)
<i>A. cibirongensis</i>	Guanábana	Lisdiyanti et al. (2001)
<i>A. estunensis</i>	Sidra	(Carr 1958) Lisdiyanti et al. (2000)
<i>A. fabarum</i>	Grano de cacao	Cleenwerck et al. (2008)
<i>A. ghanensis</i>	Grano de cacao	Cleenwerck et al. (2007)
<i>A. indonesiensis</i>	Frutas y flores de guanábana	Lisdiyanti et al. (2000)
<i>A. lovaniensis</i>	Aguas residuales de la tierra	(Frateur 1950) Lisdiyanti et al. (2000)
<i>A. malorum</i>	Manzana	Cleenwerck et al. (2002)
<i>A. nitrogenifigens</i>	Té de Kombucha	Dutta and Gachhui et al. (2006)
<i>A. oeni</i>	Vino	Silva et al. (2006)
<i>A. orientalis</i>	Flor de Canna	Lisdiyanti et al. (2001)
<i>A. orleanensis</i>	Cerveza	(Henneberg 1906) Lisdiyanti et al. (2000)
<i>A. pasteurianus</i>	Cerveza	(Hansen 1879) Beijerinck y Folpmers (1916)
<i>A. peroxydans</i>	Agua de la zanja	(Visser't Hooft, 1925) Lisdiyanti et al. (2000)
<i>A. pomorum</i>	Vinagre industrial (de sidra)	Sokollek et al. (1998a)
<i>A. senegalensis</i>	Fruta de mango	Ndoye et al. (2007)
<i>A. sysygyi</i>	Zumo de manzana orgánico	Lisdiyanti et al. (2001)
<i>A. tropicalis</i>	Coco	Lisdiyanti et al. (2000)
ACIDOMONAS (Ac.)		(Urakami et al., 1989 corregido) Yamashita et al. (2004)
<i>Ac. methanolica</i>	Fermentación de levaduras	(Uhlig et al., 1986) Urakami et al. (1989 corregido) Yamashita et al. (2004)
AMEYAMAEA (Am.)		Yukphan et al. (2009)
<i>Am. chiangmaiensis</i>	Flores del jengibre rojo	Yukphan et al. (2009)
ASAIA (As.)		Yamada et al. (2000)
<i>As. bogorensis</i>	Flor del árbol de orquídea	Yamada et al. (2000)
<i>As. krungthepensis</i>	Flor de la Heliconia	Yukphan et al. (2004a)
<i>As. lannensis</i>	Flor de Lycoris	Malimas et al. (2008a)
<i>As. siamensis</i>	Flores tropicales	Katsura et al. (2001)
GLUCONACETOBACTER (Ga.)		Yamada et al. (1997)
<i>Ga. azotocaptans</i>	Planta del café	Fuentes-Ramirez et al. (2001)
<i>Ga. diazotrophicus</i>	Caña de azúcar	(Gillis et al., 1989) Yamada et al. (1997)
<i>Ga. entanii</i>	Vinagre industrial (acidez alta)	Schüller et al. (2000)

continúa en la siguiente página

Géneros y especies	Fuente	Referencia
<i>Ga. europaeus</i>	Vinagre industrial (acidez alta)	(Sievers et al., 1992) Yamada et al. (1997)
<i>Ga. hansenii</i>	Vinagre	(Gosselé et al., 1983) Yamada et al. (1997 corregido) Lisdiyanti et al. (2006)
<i>Ga. intermedius</i>	Bebida de Kombucha	(Boesch et al., 1998) Yamada (2000)
<i>Ga. johannae</i>	Planta del café	Fuentes-Ramirez et al. (2001)
<i>Ga. liquefaciens</i>	Fruta	(Asai, 1935) Yamada et al. (1997)
<i>Ga. nataicola</i>	Nata de coco	Lisdiyanti et al. (2006)
<i>Ga. oboediens</i>	Vinagre de vino industrial	(Sokkollek et al., 1998a) Yamada (2000)
<i>Ga. rhaeticus</i>	Zumo de manzana orgánica	Dellaglio et al. (2005)
<i>Ga. sacchari</i>	Caña de azúcar	Franke et al. (1999)
<i>Ga. saccharivorans</i>	Zumo de remolacha	Lisdiyanti et al. (2006)
<i>Ga. swingsii</i>	Zumo de manzana orgánica	Dellaglio et al. (2005)
<i>Ga. xylinus</i>	Bayas de la ceniza de montaña	(Brown, 1886) Yamada et al. (1997)
GLUCONOBACTER (G.)		Asai, 1935
<i>G. albidus</i>	Flor de dalia	(ex Kondo and Ameyama, 1958) Yukphan et al. (2004b)
<i>G. cerinus</i>	Cereza	Katsura et al. (2002)
<i>G. frateurii</i>	Fresa	Mason and Claus (1989)
<i>G. japonicus</i>	Frutos del bayberry chino	Malimas et al. (2009)
<i>G. kondonii</i>	Fresa	Malimas et al. (2007)
<i>G. oxydans</i>	Cerveza	Mason and Claus (1989)
<i>G. sphaericus</i>	Uva fresca	Malimas et al. (2008b)
<i>G. roseus</i>	Fruto del caqui	Malimas et al. (2008c)
<i>G. thailandicus</i>	Flores del árbol de corcho indio	Tanasupawat et al. (2004)
GRANULIBACTER (Gr.)		Greenberg et al. (2006)
<i>Gr. bethesdensis</i>	Pacientes con enfermedad granulomatosa crónica, ganglio	Greenberg et al. (2006)
KOZAKIA (K.)		Lisdiyanti et al. (2002)
<i>K. baliensis</i>	Azúcar marrón de la palma	Lisdiyanti et al. (2002)
NEOSAIA (N.)		Yukphan et al. (2005)
<i>N. chiangmaiensis</i>	Flores del jengibre rojo	Yukphan et al. (2005)
SACCHARIBACTER (Sa.)		Jojima et al. (2004)
<i>Sa. floricola</i>	Polen de las flores	Jojima et al. (2004)
SWAMINATHANIA (S.)		Loganathan and Nair (2004)
<i>S. salitolerans</i>	Mangle asociado con arroz salvaje	Loganathan and Nair (2004)
TANTICHAEOENIA (T.)		Yukphan et al. (2008)
<i>T. sakaeratensis</i>	Tierra	Yukphan et al. (2008)

3.3. Metabolismo

Las BA tienen un metabolismo estrictamente aerobio, por lo que para su desarrollo necesitan disponer de oxígeno molecular, que actúa como aceptor terminal de electrones. No obstante, se ha observado que también pueden sobrevivir en condiciones muy cercanas a la anaerobiosis, debido a la posibilidad de utilizar quinonas, como aceptores terminales de electrones, en lugar del oxígeno. En estas condiciones, su crecimiento y desarrollo es muy limitado y por tanto, cualquier proceso que involucre una aireación facilita enormemente su desarrollo (Drysdale y Fleet, 1989).

Una de las principales características de las BA es su capacidad de oxidar una extensa variedad de sustratos y acumular los productos de su metabolismo en el medio sin provocar ninguna toxicidad para la bacteria (De Ley y Swings, 1984; De Ley et al., 1984). Por ello, las BA pueden considerarse como “catalizadores oxidativos vivos” ya que se utilizan en una amplia variedad de procesos biotecnológicos donde realizan reacciones de oxidación que son imposibles o más costosas utilizando la química orgánica clásica (Gupta et al., 2001; Deppenmeier et al., 2002).

3.3.1. Metabolismo del etanol y otros alcoholes

La oxidación del etanol a ácido acético la llevan a cabo todos los géneros de BA, con excepción de *Asaia* y *Saccharibacter* (Yamada et al., 2000; Jojima et al., 2004). Esta oxidación la realizan mediante dos reacciones consecutivas: primero el etanol es transformado en acetaldehído por la alcohol deshidrogenasa (ADH) y posteriormente el acetaldehído es oxidado a ácido acético por acción de la aldehído deshidrogenasa (ALH). Ambas enzimas están localizadas en la membrana citoplasmática y orientadas hacia el espacio periplasmático (Figura 4). Son independientes de NADP⁺ y en el caso de la ADH necesita como cofactor la quinona de pirroloquinolina (PQQ).

Además también se ha detectado otra forma de ADH en el citoplasma, se trata de una enzima dependiente de NAD(P)⁺ que presenta muy baja actividad, por lo que su importancia en la oxidación del etanol se cree que es muy limitada (Matsushita et al., 1994). Sin embargo, la relación entre la quinoproteína ADH y la ADH dependiente de NAD⁺ nunca ha sido aclarado (Chinnawirotpisan et al., 2003).

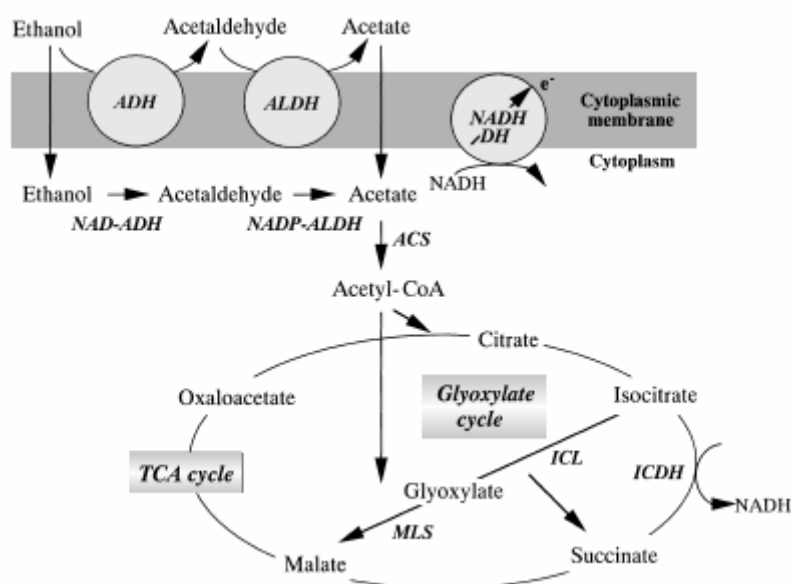


Fig. 4. Vías metabólicas de la asimilación oxidativa del etanol: Ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) y del glioxilato vía acetil-CoA. Las enzimas involucradas en la asimilación del etanol están abreviadas en la figura. ADH, alcohol deshidrogenasa; NAD-ADH, alcohol deshidrogenasa dependiente de NAD⁺; ALDH, aldehído deshidrogenasa; NADP-ALDH, aldehído deshidrogenasa dependiente de NADP⁺; NADH DH: NADH deshidrogenasa; ACS, acetil-CoA sintetasa; ICL, isocitrato liasa; ICDH, isocitrato deshidrogenasa; MLS: malato sintasa. (Chinnawirotpisan et al., 2003)

La tolerancia al ácido acético de las BA está relacionada con la actividad de su enzima ADH-PQQ. Así, Trecek et al. (2006) observó que *Ga. europaeus* producía niveles más altos de la enzima ADH-PQQ que *A. pasteurianus* cuando ambas BA eran cultivadas a elevadas concentraciones de ácido acético. Además se observaron diferencias entre las diferentes especies no sólo en la cantidad de enzima sino también en sus características. Así, la ADH-PQQ de *Ga. europaeus* es más resistente al ácido acético que la de *A. pasteurianus* y *Ga. intermedius*. Además, en *Ga. europaeus*, esta enzima conserva aproximadamente el 70% de su actividad en presencia de 10% de ácido acético, mientras que en *A. pasteurianus* y *Ga. intermedius* sólo conserva el 3% y 15% de actividad, respectivamente. Por tanto, la elevada resistencia al ácido acético de *Ga. europaeus* y su predominancia en vinagres de vino por el método sumergido (>10% (p/v) de ácido acético) parece estar relacionada con la actividad de su enzima ADH-PQQ.

Además, las cepas pertenecientes a los géneros *Acetobacter* y *Gluconacetobacter* pueden oxidar completamente el acetato a CO₂ y H₂O mediante el ciclo de los ácidos tricarboxílicos o el ciclo del glioxilato (Figura 4), aunque esta reacción sólo sucede cuando no hay etanol en el medio. En cambio, la oxidación del acetato no es posible en las cepas de *Gluconobacter* ya que estas vías

(ciclo de los ácidos tricarbóxicos y ciclo del glioxilato) no son funcionales (Greenfield y Claus, 1972; Prust et al., 2005). Incluso, en un estudio de Saeki et al. (1997b) se observó como cepas de diferentes especies de *Acetobacter* eran capaces de utilizar el ácido acético como única fuente de carbono y energía, aunque después de una larga fase de latencia o adaptación. Esta fase se podía acortar adicionando pequeñas cantidades de etanol que producen energía lo que favorece el crecimiento de las BA.

El glicerol, después del etanol, es el alcohol más utilizado por las BA. Sin embargo, el proceso de oxidación del glicerol está inhibido cuando hay elevadas concentraciones de etanol en el medio, es decir, al inicio del proceso de acetificación en el caso de vinagres (Yamada et al., 1979). Las BA también pueden oxidar otros alcoholes primarios y polialcoholes en azúcares, como el manitol en fructosa, el sorbitol en sorbosa y eritritol en eritruosa.

3.3.2. Metabolismo de azúcares

Las BA pueden utilizar diferentes carbohidratos como fuente de carbono, siendo la glucosa la más utilizada. Sin embargo, las BA no pueden metabolizar la glucosa por la vía de la glucólisis o Embden-Meyerhof Parnas por la falta de la enzima fosfofructoquinasa. Por lo que, la glucosa debe ser metabolizada por vías alternativas: después de una fosforilación inicial puede ser oxidada por la vía de la glucosa-6-fosfato (Warburg-Dickens, WD) hasta gliceraldehído-3-fosfato o por la vía Entner-Doudoroff (ED) hasta gliceraldehído-3-fosfato o piruvato (Figura 5). El gliceraldehído-3-fosfato procedente de las vías de WD y ED es primero metabolizado a piruvato, y posteriormente oxidado a acetato. Algunos géneros de BA pueden, como ya se ha comentado anteriormente, oxidar completamente este acetato a CO₂ y H₂O por el ciclo de los ácidos tricarbóxicos.

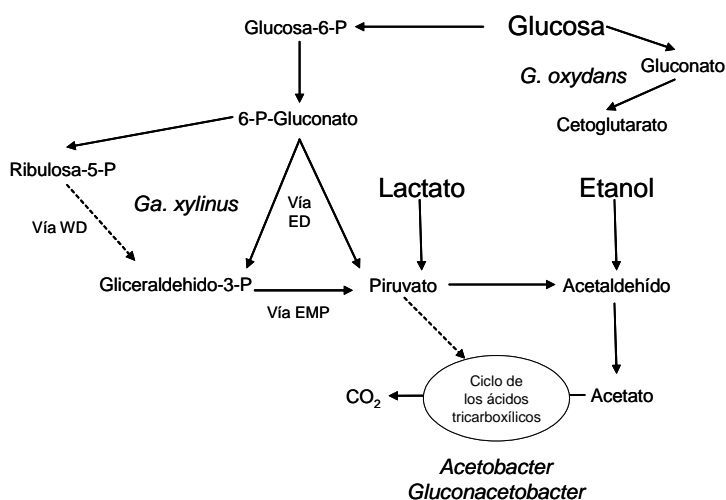


Fig. 5. Representación esquemática del metabolismo de los azúcares de las BA (WD: Warburg-Dickens; ED: Entner-Doudoroff; EMP: Embden-Meyerhoff Parnas) (Guillamón y Mas, 2005)

En algunos casos, la glucosa puede ser parcialmente oxidada a gluconato o cetoglutarato, produciéndose la acumulación de estos productos en el medio (Drysdale y Fleet, 1988). Esta reacción es especialmente activa en *G. oxydans*, siendo característica de sustratos azucarados como las uvas y el mosto.

De todas maneras, las BA pueden también metabolizar otros carbohidratos, como la arabinosa, fructosa, galactosa, manosa, ribosa, y xilosa (De Ley et al., 1984), así como producir a partir de ellos una gran variedad de exopolisacáridos (Moonmangmee et al., 2002) como levano (a partir de sacarosa), celulosa y acetano (un polisacárido ácido similar al xantano). Estos polisacáridos son los responsables de la formación del biofilm y la retención de las BA en la superficie del líquido a acetificar durante la producción de vinagres.

De todos ellos, la celulosa es la más importante y es producida por las BA como un componente extracelular para protegerse de agentes mecánicos y químicos, así como para facilitar la adhesión de sus células a tejidos huéspedes. *Ga. xylinus* ha sido el modelo para el estudio de la síntesis de la celulosa bacteriana, ya que produce celulosa pura como producto extracelular (Brown et al., 1976; Cannon y Anderson, 1991). La vía metabólica para la síntesis de la celulosa en BA se muestra en la Figura 6.

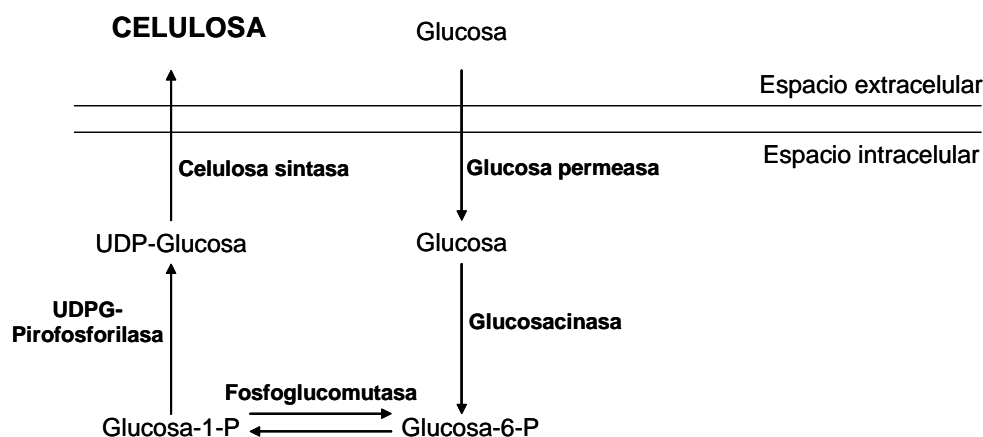


Fig. 6. Reacciones involucradas en la síntesis de la celulosa (Méndez-Ortiz y Membrillo-Hernández, 2004)

3.3.3. Metabolismo de ácidos orgánicos

Las BA pueden metabolizar una gran variedad de ácidos orgánicos. Esta oxidación se produce mediante el ciclo de los ácidos tricarbónicos que los transforma en CO₂ y H₂O (Figura 4). Sin embargo, las cepas del género *Gluconobacter* no pueden oxidar la mayoría de estos ácidos

orgánicos, debido a la falta de un ciclo de los ácidos tricarboxílicos funcional (Holt et al., 1994). Algunos de los ácidos orgánicos que pueden ser completamente oxidados por las BA son el ácido acético, cítrico, fumárico, láctico, málico, pirúvico y succínico.

De todas maneras, a pesar de que estos ácidos pueden ser metabolizados completamente, también es posible una degradación incompleta con la formación de metabolitos intermedios que son excretados al medio.

3.3.4. Metabolismo del nitrógeno

El efecto que tiene la fuente de nitrógeno sobre el crecimiento y desarrollo de las BA está críticamente influenciado por la disponibilidad de fuentes de carbono y energía (Drysdale y Fleet, 1988). A pesar de que existen varias especies de *Gluconacetobacter* (*Ga. diazotrophicus*, *Ga. johannae* y *Ga. azotocaptans*) que son diazótrofas (Sievers y Swings, 2005), es decir, que poseen la capacidad de fijar el nitrógeno atmosférico (N₂) y reducirlo a amonio, la mayoría de BA utilizan el amonio inorgánico como única fuente de nitrógeno y, a partir de éste pueden sintetizar todos los aminoácidos y compuestos nitrogenados (Belly y Claus, 1972; Gosselé et al., 1981; De Ley et al., 1984). Sin embargo, se ha detectado que la presencia de algunos aminoácidos como el glutamato, glutamina, prolina o histidina tiene un efecto estimulador sobre el crecimiento de BA (Belly y Claus, 1972), mientras que otros aminoácidos pueden inhibir su crecimiento, como es el caso de la valina para *G. oxydans* (Kerwar et al., 1964; Belly y Claus, 1972) o la treonina y homoserina para *A. aceti* (O'Sullivan, 1974a,b).

Aunque no se han realizado estudios concretos sobre los requerimientos nutricionales de las BA, se ha observado que un pH bajo y una alta concentración de etanol, como ocurre al inicio de la acetificación del vinagre tradicional, podría alterar los requerimientos de nitrógeno de las BA (Gosselé et al., 1981), y que estas bacterias presenten un preferencia selectiva por algunos aminoácidos durante la producción de vinagre (Valero et al., 2003).

Posteriormente, Callejón et al. (2008) relacionó el consumo de aminoácidos con los diferentes procesos de acetificación, siendo mayor el consumo en vinagres tradicionales que en vinagres por cultivo sumergido. Además, la prolina fue el aminoácido más consumido en el método tradicional donde la especie principal era *A. pasteurianus* y la arginina en el método sumergido donde *Ga. europaeus* era la especie mayoritaria.

3.4. Aislamiento y cultivo

La pobre cultivabilidad obtenida en medios de cultivo ha sido uno de los principales problemas para poder estudiar las BA provenientes de medios naturales o procesos fermentativos. Así, en vinagres, esta baja cultivabilidad de las BA se ha relacionado con el estrés causado por el cambio que supone pasar de un medio con elevadas concentraciones de etanol y/o de ácido acético a uno de laboratorio (Entani et al., 1985; Sievers et al., 1992). De hecho, varios trabajos han relacionado la falta de cultivos iniciadores para la producción de vinagres de vino con estos problemas de aislamiento, mantenimiento y preservación de las BA (Kittleman et al., 1989; Sievers et al., 1992; Sokollek y Hammes, 1997). Así, las diferencias fisiológicas y los diferentes orígenes de las BA han llevado al desarrollo de medios de cultivo para su aislamiento con diferentes fuentes de carbono, como glucosa, manitol o etanol (Swings y De Ley, 1981; De Ley et al., 1984) (Tabla 2).

Los medios glucosa (GYC), descrito por Carr y Passmore (1979), y manitol (YPM) han sido los más utilizados para el aislamiento de BA procedentes de mostos, vinos (Drysdale y Fleet, 1988; Du Toit y Lambrechts, 2002; Du Toit y Pretorius, 2002; Bartowsky et al., 2003; González et al., 2004) y vinagres (Sokollek et al., 1998b; Schüller et al., 2000; Gullo et al., 2006; Ilabaca et al., 2008; Gullo et al., 2009). Sin embargo, aunque ambos medios han resultado adecuados para el aislamiento y cultivabilidad de las BA procedentes de vino, se han detectado problemas para la recuperación de las BA procedentes de vinagre (Sokollek et al., 1998b). La adición de carbonato de calcio (CaCO_3) al medio GYC permite detectar si las colonias aisladas producen ácido, una característica importante de las BA.

El difícil aislamiento de las BA, sobretodo de aquéllas procedentes de vinagres con elevadas concentraciones de ácido acético (10-15%), se resolvió parcialmente con el desarrollo de medios con doble capa de agar, como el medio AE (ácido acético-etanol) y el medio RAE (ácido acético-etanol reforzado) (Entani et al., 1985; Sokollek y Hammes, 1997). Además, estos medios, al incluir en su composición ácido acético y etanol, simulan el medio de donde proceden y por tanto, favorecen el aislamiento y cultivo de las BA. Recientemente, se ha descrito un nuevo medio, el V50 (50% de vino sintético) (Quintero et al., 2009), que debido a su composición simula mejor las condiciones en que se encuentran las BA al inicio de la acetificación.

Tabla 2. Composición de los diferentes medios de cultivo utilizados para BA

Componentes	GYC	YPM	AE	EM	RAE	V50
Extracto de levadura	1%	0.50%	0.30%	1%	0.10%	0.40%
Peptona		0.30%	0.40%			0.10%
Glucosa	5%		0.75%		0.40%	
Manitol		2.50%				
CaCO ₃	2%			2%		
Ácido acético			3%			
Etanol			3%	2%	0-4%	6%
Glicerol						0.20%
K ₂ HPO ₄						0.05%
MgSO ₄ ·7H ₂ O						0.05%
MnSO ₄ ·H ₂ O						0.02%
Na acetato						0.10%
CaCl ₂						0.01%
Na ₂ HPO ₄					0.03%	
Ácido cítrico					0.015%	

GYC: Medio Glucosa; **YPM:** Medio Manitol; **AE:** Medio Ácido acético-Etanol; **EM:** Medio Etanol; **RAE:** Medio enriquecido con ácido acético y etanol; **V50:** medio vino sintético (50%) (Jara, 2009)

Los medios de enriquecimiento también se han utilizado como una alternativa para el aislamiento de una mayor biodiversidad de BA en función de las preferencias que tienen estas BA por el uso de algunos nutrientes. Lisdiyanti et al. (2003) realizó un estudio sobre el aislamiento de BA de frutos, flores y alimentos fermentados tras un previo paso de enriquecimiento en 5 medios diferentes (Tabla 3), observando preferencias de los diferentes géneros de BA por determinados nutrientes. Así, las especies del género *Acetobacter*, *Gluconacetobacter* y *Kozakia* crecieron mejor en el medio I, *Gluconobacter* en los medios I y II, *Asaia* en los medios II y IV, y *Frateuria* en los medios II, IV y V. Así mismo, determinaron que las especies del género *Acetobacter* y *Gluconacetobacter* son aisladas principalmente de productos fermentados, *Gluconobacter* de frutos y flores, *Asaia* de flores y *Frateuria* de frutos.

Tabla 3. Medios de enriquecimiento para el aislamiento de BA

Composición	Medios de enriquecimiento a pH 3.5				
	I	II	III	IV	V
Glucosa	1%				0.15%
Sorbitol		2%			
Manitol			2%		
Dulcitol				2%	
Metanol					2%
Etanol	0.5%				
Peptona	1.5%	0.5%	0.5%	0.5%	0.5%
Extracto de levadura	0.8%	0.3%	0.3%	0.3%	0.3%
Ácido acético	0.3%		0.2%		
Ciclohexamida	0.01%	0.01%	0.01%	0.01%	0.01%

I: Medio Glucosa, Etanol y Ácido acético; II: Medio Sorbitol; III: Medio Manitol y Ácido acético; IV: Medio Dulcitol; V: Medio con pequeñas cantidades de glucosa y metanol (Lisdiyanti et al., 2003)

3.5. Cuantificación

Tradicionalmente, las BA se han cuantificado por el recuento de las colonias que crecían en medios de cultivo sólidos. Como se ha comentado anteriormente, diversos trabajos se han enfocado en la búsqueda de medios de cultivo capaces de recuperar el máximo número de colonias y así reducir al mínimo el problema de cultivabilidad de BA procedentes de medios naturales. Sin embargo, en el caso del vinagre, aún no se ha encontrado ningún medio capaz de recuperar en placa el mismo orden de magnitud que lo cuantificado por microscopio (Mesa et al., 2003; Trcek, 2005; Baena-Ruano et al., 2006; Torija et al., 2010), dificultando de esta manera el conocimiento global de las BA presentes en el proceso de acetificación ya que sólo se recupera una pequeña parte de la población (<1-5% de la población total). Además de la falta de medios de cultivo adecuados, esta pobre recuperación también ha sido asociada a la formación de agregados y a la presencia de células en el estado “viable no cultivable” (VNC). Debido a su metabolismo aerobio, las BA tienden a agregarse para permanecer en la superficie del líquido formando lo que se conoce como velo o madre del vinagre. Por tanto, la formación de estos agregados complica enormemente la enumeración de BA en medios de cultivos (Janssen et al., 2002; Ilabaca et al., 2008). Por su parte, el estado “viable no cultivable” (VNC) consiste en que aunque las células no puedan crecer en medios de cultivo rutinarios en los cuales crecerían y se convertirían normalmente en colonias, están vivas y tienen una actividad metabólica renovada (Millet y Lonvaud-Funel, 2000). Las células pueden entrar en este estado VNC como respuesta a alguna forma natural de estrés, como la inanición, incubación fuera del rango de temperatura de crecimiento, elevadas concentraciones osmóticas, poca disponibilidad de oxígeno, o exposición a la luz blanca (Oliver, 2005).

Por tanto, debido a la imposibilidad de cuantificar correctamente las BA mediante métodos dependientes de cultivo se han desarrollado técnicas independientes de cultivo que ya han sido aplicadas a la enumeración de BA como la epifluorescencia (DEFT, direct epifluorescence filter technique), la PCR cuantitativa (RT-PCR) y el FISH (Fluorescence in situ hybridization). Las dos últimas técnicas como también permiten la identificación de BA serán explicadas en detalle en el apartado (3.6.1.) de la introducción.

La cuantificación por epifluorescencia se basa en el uso de marcadores fluorescentes que permiten la cuantificación de las células viables y no viables de forma simultánea. Para ello, se utiliza entre otros, un kit de viabilidad bacteriana (LIVE/DEAD BacLight bacterial viability kit (Molecular Probes) que se fundamenta en la diferente permeabilidad de la membrana plasmática dependiendo del estado fisiológico de la célula. Este sistema es un método rápido de tinción de epifluorescencia que utiliza dos marcadores fluorescentes, el SYTO9 y el yoduro de propidio, que se diferencian por sus características espectrales y su capacidad de penetrar en las células bacterianas viables. El fluorocromo SYTO9 tiñe todas las células, independientemente del estado de su membrana citoplasmática. En contraste, el yoduro de propidio penetra sólo en las células que tienen la membrana dañada, causando una reducción en la intensidad fluorescente del SYTO9 cuando ambos marcadores están presentes. Por tanto las células que tienen la membrana citoplasmática intacta se tiñen de verde y se considerarán viables mientras que las bacterias que tienen dañada la membrana se visualizan de color rojo y se considerarán no viables (Figura 7).

Esta técnica ha sido utilizada para la cuantificación de BA viables y no viables de muestras de vinagres (Mesa et al., 2003; Baena-Ruano et al., 2006; Fernández-Pérez et al., 2010).

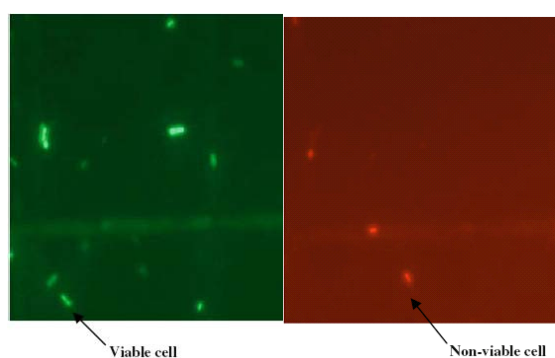


Fig. 7. Muestra de vinagre observada al microscopio de fluorescencia Células de BA viables (Verdes) y no viables (Rojas) (Fernández-Pérez et al., 2010)

3.6. Análisis por técnicas moleculares

Las BA han sido tradicionalmente identificadas al nivel de género y especie de acuerdo a una gran variedad de pruebas morfológicas, fisiológicas y bioquímicas (De Ley et al., 1984), pero estos métodos no son totalmente confiables y resultan muy tediosos. Estas pruebas fenotípicas actualmente se complementan o han sido reemplazadas por técnicas de biología molecular, tales como los métodos de hibridación DNA-DNA (Urakami et al., 1989) o el análisis de secuenciación de genes ribosomales (Yamada y Kondo, 1984). Sin embargo, estas técnicas moleculares no son muy útiles para la identificación rutinaria de BA debido a que son largas, tediosas y caras. Por ello, se han desarrollado técnicas moleculares rápidas, fiables y económicas basadas principalmente en el uso de la PCR (Ruiz et al., 2000; González et al., 2004; Trcek et al., 2005; Torija et al., 2010). En la actualidad, las técnicas de biología molecular desarrolladas se pueden agrupar según si se aplican como métodos dependientes o independientes de cultivo (Figura 8).

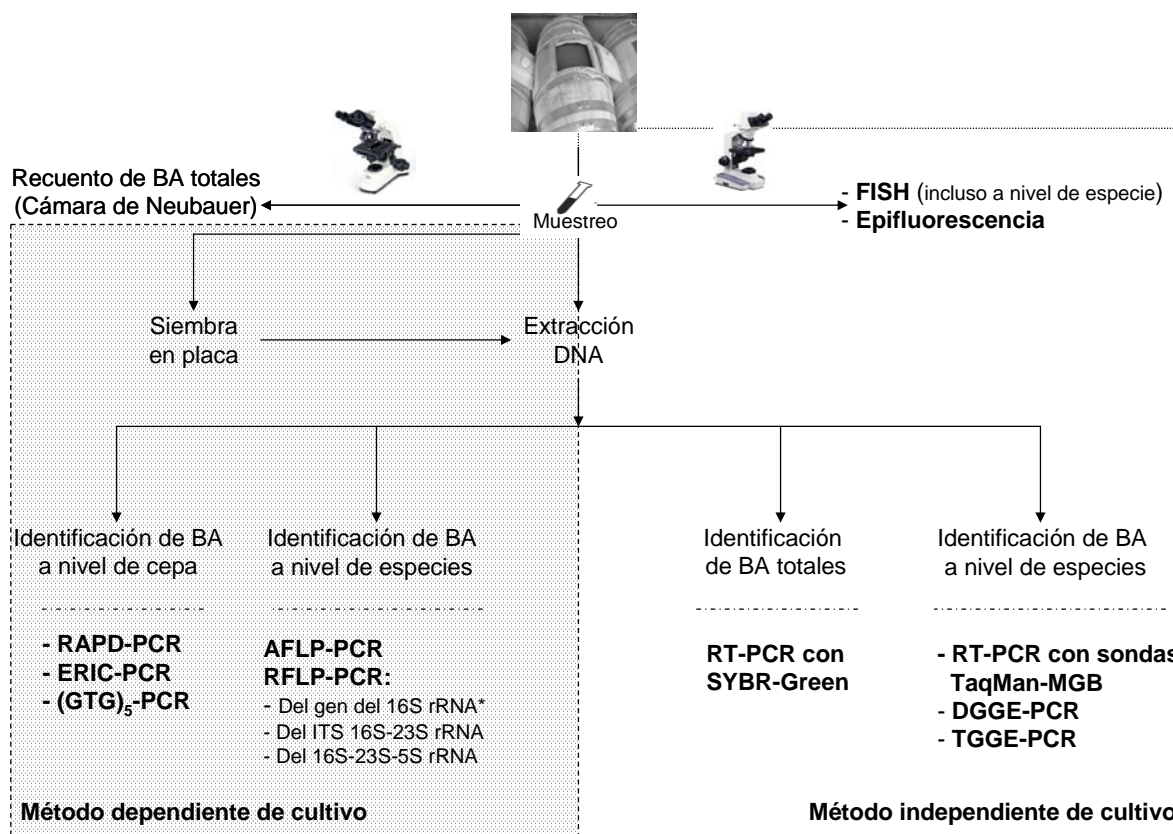


Fig. 8. Esquema de la aplicación de las técnicas de identificación de BA como métodos dependiente e independiente de cultivo. * Técnica utilizada como dependiente e independiente de cultivo

3.6.1. Identificación a nivel de especie

Análisis de restricción del amplificado (RFLP-PCR) de genes ribosomales

RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)-PCR de los genes ribosomales consiste en la comparación de patrones de restricción de diferentes regiones de la zona ribosomal (Figura 9). Para obtener una gran cantidad de copias de la región de interés, se amplifica ésta mediante PCR y posteriormente el fragmento amplificado se digiere con diferentes enzimas de restricción produciendo así un patrón de fragmentos específico para cada especie. El patrón de restricción resultante sirve de referencia para la identificación de nuevos aislados pero para confirmar dicha identificación es necesario secuenciar algunos amplificados.

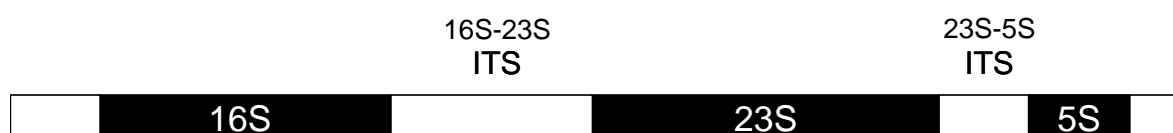


Fig. 9. Esquema de los genes que codifican para rRNA en procariotas y sus regiones espaciadoras ITS

- RFLP-PCR del gen 16S rRNA

En la actualidad, las secuencias del gen del 16S rRNA son las más utilizadas para estudios de relación filogenética y taxonómica de BA. La técnica consiste en amplificar el gen ribosomal 16S y después digerir el fragmento amplificado (~1450 pb) con diversas enzimas de restricción (Poblet et al., 2000; Ruiz et al., 2000; González et al., 2004; Torija et al., 2010). La combinación de diferentes enzimas permite agrupar los aislados y por comparación con los patrones de las cepas tipo obtener la identificación de las especies de BA (González et al., 2006a; Torija et al., 2010).

Esta técnica permite la identificación de las BA tanto a nivel de género como a nivel de especie. Se trata de un método rápido, fiable y en el que se invierte poco tiempo (González et al., 2004), siendo su principal inconveniente que no discrimina entre especies muy próximas por el alto grado de similitud en la secuencia del gen ribosomal 16S. Esta técnica ha sido utilizada tanto como método dependiente (Giudici et al., 2003; Hidalgo et al., 2010; Torija et al., 2010) como independiente de cultivo (Ilabaca et al., 2008; Jara et al., 2009) para la identificación de BA procedentes de vinagres. La única diferencia es que cuando se aplica como independiente de

cultivo la extracción de DNA se hace directamente de la muestra de vinagre sin aislar colonias en medio sólido (Figura 8).

En esta tesis, esta técnica fue utilizada para el agrupamiento e identificación de BA de vinagre de vino (Capítulo 2, 3 y 4).

- RFLP-PCR del espaciador intergénico 16S-23S rRNA

Aunque la capacidad discriminante de esta técnica no se ha estudiado extensamente, parece que la mayor variabilidad existente en la secuencia de esta región intergénica (ITS; Internal transcribed spacer) respecto a la del gen ribosomal 16S permite discriminar entre especies de BA próximas que no se pueden diferenciar por la técnica anterior (Trcek, 2005). Esta técnica consiste en la amplificación de la región intergénica situada entre los genes del 16S y 23S rRNA (675-800 pb), seguida de una digestión de los productos amplificados con enzimas de restricción (Ruiz et al., 2000). Esta técnica se ha aplicado a la identificación de BA cultivables tanto en cepas de colección como en aislados procedentes de vino y vinagre (Sievers et al., 1996; Ruiz et al., 2000; Trcek y Teuber, 2002; González et al., 2004; Kretová y Grones, 2005; Trcek, 2005).

- RFLP-PCR del 16S-23S-5S rRNA

Esta técnica consiste en amplificar los genes ribosomales del 16S, 23S y 5S junto con las zonas intergénicas correspondientes (Figura 9). El producto amplificado (4500 pb aprox.) se digiere posteriormente con *RsaI*. La principal desventaja de esta técnica es el gran tamaño del amplificado obtenido.

Esta técnica ha sido utilizada por Gullo et al. (2006) para identificar las BA cultivables del vinagre balsámico tradicional.

Análisis del gen que codifica la subunidad I de la alcohol deshidrogenasa dependiente de la quinona de pirroloquinolina (PQQ-ADH)

Esta técnica se basa en que la secuencia parcial de la *adhA* (subunidad I de PQQ-ADH) presenta tanto zonas conservadas como variables entre las diferentes especies de BA, lo que permitió a Trcek (2005) el diseño de los cebadores para detectar BA de forma general y *A. aceti* de forma específica en vinagres de sidra, donde ésta es la principal especie aislada. En este mismo estudio, se sugiere que la secuencia parcial de la *adhA* es más discriminante a nivel de especie que la secuencia del gen ribosomal 16S pero menos que la región intergénica entre los genes ribosomales 16S y 23S.

Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP-PCR)

Esta técnica ha sido ampliamente utilizada por su alto poder discriminante y buena reproducibilidad (Janssen et al., 1996; Savelkoul et al., 1999). Se basa en la producción de perfiles de DNA altamente complejos que son generados por la digestión con enzimas de restricción (Vos et al., 1995). El DNA de las BA es extraído y digerido con dos enzimas de restricción, *MseI* (enzima de corte frecuente) y *EcoRI* (enzima de corte infrecuente). Posteriormente, los fragmentos de restricción generados se unen a adaptadores de doble cadena y se amplifican con unos cebadores, la secuencia de los cuales es homóloga a la de los adaptadores. Estos cebadores tienen además una extensión aleatoria de 1 a 3 bases en el extremo 3' que es lo que permite una amplificación selectiva de una fracción de los fragmentos de restricción generados. Para visualizar los fragmentos amplificados, uno de los cebadores puede estar marcado radioactivamente o con un fluorocromo, también pueden visualizarse en geles de agarosa (Olive y Bean, 1999). Aunque esta técnica ha permitido en otros microorganismos la diferenciación a nivel de cepa (Thompson et al., 2001; Willems et al., 2001; On et al., 2003; Brady et al., 2007), en BA ha mostrado menor capacidad discriminante, llegando únicamente a especie (Cleenwerck et al., 2009).

Denaturing Gradient Gel Electrophoresis-PCR (DGGE-PCR) y Temperature Gradient Gel Electrophoresis-PCR (TGGE-PCR)

El DGGE-PCR es probablemente la técnica más utilizada para la detección de poblaciones microbianas aisladas directamente de muestras ambientales y de alimentos (Muyzer y Smalla, 1998; Cocolin et al., 2000; Ercolini, 2004; Randazzo et al., 2005). Esta técnica se basa en la amplificación de una región del genoma y su posterior separación mediante electroforesis en gel desnaturizante. En el caso de las BA, se amplifica un fragmento del gen 16S rRNA (330 pb) que aunque presenta el mismo tamaño para todas las especies tiene pequeñas diferencias a nivel de secuencia que permite realizar la separación de los fragmentos al detenerse en diferentes posiciones del gel. Los amplificados son separados por electroforesis en un gel de poliacrilamida con un gradiente lineal desnaturizante ascendente y vertical (mezcla de urea y formamida).

Como la separación se basa en el distinto comportamiento frente a la desnaturización de los fragmentos de DNA con diferente secuencia, para la identificación de los géneros/especies es necesario construir unos marcadores con las cepas tipo de los diferentes microorganismos que queremos detectar. De todas maneras, la identificación mediante estos marcadores ha de confirmarse mediante secuenciación. Esta técnica ha sido utilizada para la detección directa de BA del vinagre (De Vero et al., 2006; Haruta et al., 2006; Gullo et al., 2009).

En esta tesis, se ha utilizado la técnica DGGE-PCR para la identificación directa de BA del vinagre de vino (Capítulo 4).

El TGGE-PCR es una técnica muy similar a la anterior con la única diferencia que se utiliza un gradiente lineal de temperatura en lugar de uno desnaturizante. Por tanto, las bandas con diferente secuencia tendrán una temperatura de desnaturalización diferente y quedarán retenidas en diferentes posiciones a lo largo del gel de poliacrilamida (Muyzer, 1999). Esta técnica fue utilizada por Ilabaca et al. (2008) para el estudio de BA aisladas de vinagre de vino tradicional.

Ambas técnicas (DGGE-PCR y TTGE-PCR) se han utilizado como métodos independientes de cultivo (Figura 8).

PCR a tiempo real (RT-PCR)

La RT-PCR o PCR cuantitativa (qPCR) permite monitorizar en cada ciclo la amplificación del fragmento de interés mediante el uso de sondas o moléculas fluorescentes, cuantificando de forma simultánea la cantidad de DNA sintetizado, ya que la fluorescencia producida durante la reacción es proporcional a la cantidad de producto de PCR. Para realizar esta cuantificación es necesario construir una curva patrón utilizando controles externos de concentraciones conocidas y crecientes de DNA o células.

Los sistemas de detección por fluorescencia pueden ser de dos tipos:

- Agentes intercalantes:

Son fluorocromos que se unen al DNA, intercalándose en la doble hélice, y que generan una señal fluorescente cuando la muestra es excitada por una fuente de luz (Figura 10), siendo el SYBR Green el más utilizado. La principal ventaja de este sistema es su fácil optimización y que es más barato que las sondas específicas, mientras que la falta de especificidad es su principal inconveniente. Esta baja especificidad se debe a que al emplear este tipo de moléculas, la fluorescencia observada puede ser causada tanto por el amplificado esperado como por amplificaciones inespecíficas o dímeros de los cebadores, ya que se unirán a todo el DNA de doble hélice presente en la reacción, independientemente de su secuencia. Esta técnica ha sido utilizada para la cuantificación directa de BA en muestras de vino y vinagre (González et al., 2006b; Andorrà et al., 2008; Torija et al., 2010).

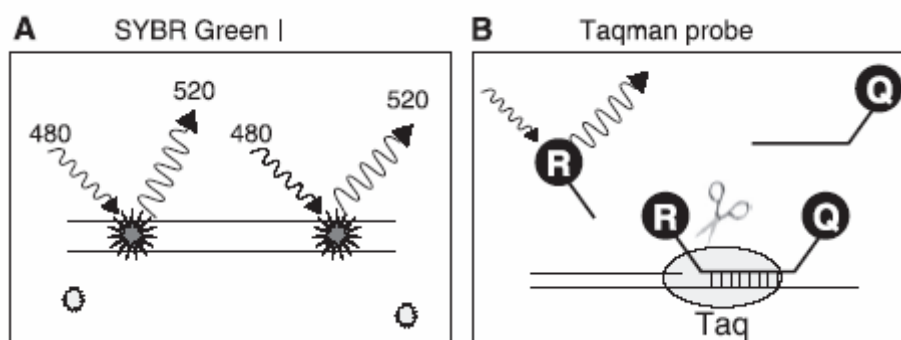


Fig. 10. Sistemas de detección por fluorescencia utilizados en la RT-PCR: A) SYBR Green: emite fluorescencia (absorción a 480 nm de longitud de onda y emisión a 520 nm de longitud de onda) cuando está unido al DNA de doble hélice. B) Sondas TaqMan: Constan de un fluorocromo donador (R) que emite a la longitud de onda que absorbe el fluorocromo aceptor (Q). Durante la amplificación de la PCR, la *Taq* polimerasa rompe la sonda, por tanto libera el fluorocromo donador del aceptor, permitiendo la detección de la fluorescencia (Valasek y Repa, 2005)

- Sondas de hibridación específicas

Estas sondas están marcadas con dos fluorocromos, un donador y un aceptor, entre los que se produce una transferencia de energía fluorescente mediante resonancia (FRET). Las más utilizadas son las sondas de hidrólisis, denominadas también sondas TaqMan, las sondas *molecular beacons* y las sondas FRET. En este estudio se ha trabajado con las primeras.

Las sondas TaqMan están marcadas en el extremo 5' con un fluorocromo donador que emite fluorescencia cuando es excitado, y en el extremo 3' un aceptor que absorbe la fluorescencia emitida por el donador (Figura 10). Para que esta absorción se produzca ambas moléculas deben estar espacialmente próximas. Mientras la sonda está intacta no se detecta fluorescencia en la PCR ya que la que emite el donador es captada por el aceptor. En el momento que empieza la amplificación, la sonda se hibrida en su cadena complementaria y la *Taq polimerasa* durante su acción de síntesis, hidroliza el extremo 5' de la sonda, liberando el fluorocromo donador. Como el fluorocromo donador y el aceptor se encuentran ahora espacialmente separados, el aceptor no es capaz de absorber la fluorescencia emitida por el donador y esta fluorescencia es captada por el detector de la PCR.

Para aumentar la especificidad de estas sondas, se diseñaron las sondas TaqMan-MGB (“Minor Groove Binder”), que presentan la particularidad de que se unen al surco pequeño de la hebra de DNA, aumentando la temperatura de hibridación de la sonda (T_m), mejorando así su especificidad y permitiendo el uso de sondas más cortas.

Por tanto, la principal ventaja del uso de sondas TaqMan o TaqMan-MGB es su gran especificidad mientras que su mayor problema es su elevado coste.

La utilización de estas sondas en BA se reduce a dos trabajos; Gammon et al. (2007) diseñaron sondas TaqMan para detectar mediante la RT-PCR las poblaciones de *Gluconobacter* y *Gluconacetobacter* presentes en bebidas isotónicas. Torija et al. (2010) diseñaron sondas TaqMan-MGB para la detección y cuantificación mediante la RT-PCR de las especies mayoritarias de BA aisladas en vino y vinagre: *A. pasteurianus*, *A. aceti*, *Ga. hansenii*, *Ga. europaeus* y *G. oxydans*.

En esta tesis, se ha utilizado la RT-PCR con los dos sistemas de detección (SYBR Green y sondas TaqMan-MGB) para la identificación y cuantificación directa de BA de vinagre de vino (Capítulo 4).

Fluorescence in situ hybridization (FISH)

Esta técnica permite la identificación y cuantificación “in situ” de los microorganismos mediante el diseño de sondas de DNA marcadas por fluorescencia que hibridan de forma específica con el género o especie que queremos determinar. La detección se realiza por microscopia de fluorescencia o citometría de flujo. Los pasos básicos del protocolo del FISH se muestran en la Figura 11. La principal ventaja de esta técnica es que permite identificar y cuantificar de forma rápida y directa los microorganismos sin necesidad de cultivo previo ni de extracción de DNA. Mientras que los principales inconvenientes son su coste y que la presencia de algunos compuestos como los polisacáridos, compuestos fenólicos, etc. presentes en el vinagre pueden interferir o enmascarar la fluorescencia.

En BA, esta técnica ha sido utilizada para la detección de varias especies de *Gluconacetobacter* (*Ga. sacchari*, *Ga. diazotrophicus* y *Ga. liquefaciens*) aisladas de forma directa de insectos de la caña de azúcar (Franke et al., 2000; Franke-Whittle et al., 2005) y para el seguimiento de varias especies de BA (*A. aceti*, *A. pasteurianus/A. pomorum*, *G. oxydans*, *Ga. hansenii* y *Ga. liquefaciens*) en diferentes vinificaciones (Blasco, 2009).

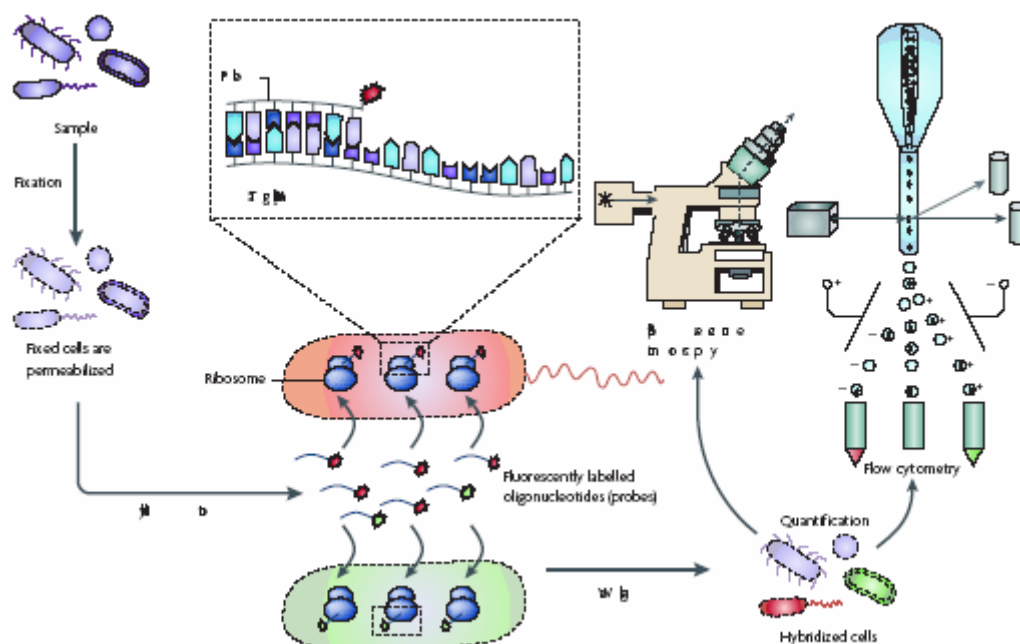


Fig.11. Pasos básicos del FISH. La muestra se fija para estabilizar las células y permeabilizar las membranas celulares.

La sonda marcada se añade y se permite que hibride con su diana. La muestra se lava para eliminar el exceso de la sonda. La muestra ya está lista para la identificación y cuantificación por microscopio de epifluorescencia o citometría de flujo (Amann y Fuchs, 2008).

3.6.2. Tipificación

Random Amplified Polymorphic DNA-PCR (RAPD-PCR)

Esta técnica consiste en realizar una amplificación a partir de un único cebador de secuencia corta (10 nucleótidos) y arbitraria y en unas condiciones de hibridación poco restrictivas (37 °C). Debido a estas particularidades, el cebador hibrida al azar en muchos puntos a lo largo del genoma del microorganismo, produciéndose un gran número de bandas muy polimórficas que permiten la diferenciación a nivel de cepa. El principal problema de esta técnica es la baja reproducibilidad debido a las condiciones utilizadas. El RAPD-PCR es útil para llevar a cabo estudios de diversidad genética y poder estimar la relación genética entre cepas. Esta técnica ha sido utilizada para el estudio de BA en vinagres (Trcek et al., 1997; Nanda et al., 2001).

Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus-PCR (ERIC-PCR) y Repetitive Extragenic Palindromic-PCR (REP-PCR)

Los ERIC y REP han sido descritos como secuencias consenso derivadas de regiones repetitivas altamente conservadas encontradas en bacterias entéricas (Pooler et al., 1996). Sin embargo, parece

que estas secuencias pueden estar ampliamente distribuidas en el genoma de varios grupos bacterianos (González et al., 2004). Esta técnica consiste en la amplificación de las secuencias que se encuentran entre dicha zonas repetitivas mediante cebadores que hibridan sobre estos elementos, obteniéndose así patrones únicos a nivel de cepa. Estas técnicas han sido utilizadas para la tipificación de BA en vinagres (Nanda et al., 2001; Gullo et al., 2009; Fernández-Pérez et al., 2010; Wu et al., 2010).

En esta tesis, se ha utilizado el ERIC-PCR para la tipificación de BA de vinagres de vino (Capítulo 2, 3 y 4).

(GTG)₅-PCR

Esta técnica es similar a las anteriores, ya que también se basa en la amplificación de las secuencias entre zonas repetitivas distribuidas a lo largo del genoma utilizando, en este caso, el cebador (GTG)₅ (Versalovic et al., 1994; Gevers et al., 2001). Esta técnica ha sido utilizada para la tipificación de BA del cacao (Camu et al., 2007; 2008; De Vuyst et al., 2008), y recientemente, Papalexandratou et al. (2009) han mostrado que este método también es útil para determinar relaciones taxonómicas y filogenéticas entre BA, así como para estudiar la diversidad de BA en ecosistemas complejos.

El (GTG)₅-PCR ha sido utilizado, en esta tesis, para la caracterización de BA de vinagres de vino (Capítulo 2, 3 y 4).

3.7. Estudios ecológicos en vinagres

Las principales especies aisladas de los procesos de producción de vinagres de vino pertenecen a los géneros *Acetobacter* y *Gluconacetobacter*. Así, en acetificaciones realizadas por el método sumergido, se han aislado mayoritariamente especies pertenecientes al género *Gluconacetobacter* como *Ga. oboediens*, *Ga. europaeus* y *Ga. intermedius* (Sokollek et al., 1998a; Treck et al., 2000; Fernández-Pérez et al., 2010; Hidalgo et al., 2010). En cambio, en los sistemas tradicionales, *A. pasteurianus* parece ser la principal especie involucrada en el proceso de producción de vinagre de vino (Ilabaca et al., 2008; Jara, 2009). Finalmente, en la producción del vinagre balsámico tradicional, Giudici et al. (2003) identificaron *Ga. xylinus* como la especie mayoritaria aunque otras especies también fueron detectadas (*A. aceti*, *A. pasteurianus* y *A. malorum*) (De Vero et al., 2006; Gullo et al., 2006).

Recientemente, se han realizado dos estudios de inoculación con cepas de *A. pasteurianus* para la elaboración tradicional de vinagres de vino y del vinagre balsámico tradicional (Gullo et al., 2009; Hidalgo et al., 2010). Gullo et al. (2009) observaron que la cepa de *A. pasteurianus* iniciaba la acetificación pero que era una de *Ga. europaeus* la que la finalizaba. Por su parte, en el trabajo de Hidalgo et al. (2010) *A. pasteurianus* fue la especie mayoritaria en la mitad de la acetificación, pero en cambio al final del proceso hubo imposición de cepas de *A. pasteurianus* o *Ga. intermedius* dependiendo de las condiciones en las que se desarrollaban las diferentes acetificaciones. Esta imposición de cepas de especies de *Gluconacetobacter* al final de la acetificación se ha relacionado con su mayor tolerancia a altas concentraciones de ácido acético y con la necesidad de que haya una cierta concentración de acidez para su correcto desarrollo. Estos resultados contradicen la idea de que estas especies sean características únicamente de vinagres obtenidos por sistemas sumergidos.

REFERENCIAS

- Adams, M.R., 1998. Vinegars. In: Wood B.J.B, editor. *Microbiology of fermented foods*. 2nd ed. London, UK: Thomson Science, pp. 1-44.
- Amann, R., Fuchs, B.M., 2008. Single-cell identification in microbial communities by improved fluorescence in situ hybridization techniques. *Nature Reviews* 6, 339-348.
- Andorrà, I., Landi, S., Mas, A., Guillamón, J.M., Esteve-Zarzoso, B., 2008. Effect of oenological practices on microbial populations using culture-independent techniques. *Food Microbiology* 25, 849-856.
- Asai, T., 1935. Taxonomic studies on acetic acid bacteria and allied oxidative bacteria isolated from fruits. A new classification of the oxidative bacteria. *Journal of the Agricultural Chemical Society of Japan* 11, 674-708.
- Baena-Ruano, S., Jimenez-Ot, C., Santos-Dueñas, I.M., Cantero-Moreno, D., Barja, F., Garcia-Garcia, I., 2006. Rapid method for total, viable and non-viable acetic acid bacteria determination during acetification process. *Process Biochemistry* 41, 1160-1164.
- Bartowsky, E.J., Xia, D., Gibson, R.L., Fleet, G.H., Henschke, P.A., 2003. Spoilage of bottled red wine by acetic acid bacteria. *Letters in Applied Microbiology* 36, 307-314.
- Beijerinck, M.W., 1898. Über die Arten der Essigbakterien. *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene. Zweite Abteilung* 4, 209-216.
- Beijerinck M.W., Folpmers, T., 1916. Verslagen van de gewone vergadering der wis- en natuurkundige afdeling. *K. Akad. Wet. (Amsterdam)* 18: 1198-1200.
- Belly, R.T., Claus, G.W., 1972. Effect of amino acids on the growth of *Acetobacter suboxydans*. *Archives Microbiology* 83, 237-245.
- Blasco Escrivá, L., 2009. Aplicación de las técnicas FISH, PCR específica y 16S-ARDRA al estudio de la población bacteriana asociada al proceso de vinificación. Tesis Doctoral. Departament de Microbiologia i Ecologia. Facultat de Ciències Biològiques. Universitat de València.
- Boesch, C., Treck, J., Sievers, M., Teuber, M., 1998. *Acetobacter intermedius*, sp. nov. *Systematic and Applied Microbiology* 21, 220-229.
- Brady, C., Venter, S., Cleenwerck, I., Vancanneyt, M., Swings, J., Coutinho, T., 2007. A FAFLP system for the improved identification of plant-pathogenic and plant-associated species of the genus *Pantoea*. *Systematic and Applied Microbiology* 30, 413-417.
- Brown, A.J., 1886. On an acetic ferment which forms cellulose. *Journal of the Chemical Society* 49, 432-439.

- Brown, R., Willison, J.H., Richardson, C.L., 1976. Cellulose biosynthesis in *Acetobacter xylinum*: visualization of the site of synthesis and direct measurement of the *in vivo* process. Proceedings of the National Academy of Sciences 73, 4565-4569.
- Callejón Fernández, R.M., 2008. Caracterización química y sensorial del aroma del vinagre de vino. Tesis Doctoral. Departamento de Bioquímica, Bromatología, Toxicología y Medicina Legal. Facultad de Farmacia. Universidad de Sevilla.
- Camu, N., De Winter, T., Verbrugghe, K., Cleenwerck, I., Vandamme, P., Takrama, J.S., Vancanneyt, M., De Vuyst, L., 2007. Dynamics and biodiversity of populations of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria involved in spontaneous heap fermentation of cocoa beans in Ghana. Applied and Environmental Microbiology 73, 1809-1824.
- Camu, N., González, A., De Winter, T., Van Schoor, A., De Bruyne, K., Vandamme, P., Takrama, J.S., Addo, S.K., De Vuyst, L., 2008. Influence of turning and environmental contamination on the dynamics of populations of lactic acid and acetic acid bacteria involved in spontaneous cocoa bean heap fermentation in Ghana. Applied and Environmental Microbiology 74, 86-98.
- Cannon, R.E., Anderson, S.M., 1991. Biogenesis of bacterial cellulose. Critical Reviews in Microbiology 17, 435-447.
- Carr, J.G., 1958. *Acetobacter estunense* nov. spec.: an addition to Frateur's ten basic species. Antonie van Leeuwenhoek 24, 157-160.
- Carr, J.G., Passmore, S.M., 1979. Methods for identifying acetic acid bacteria, p. 333-47. In Skinner, F.A., Lovelock, D.W. (Eds). Identification methods for microbiologists. Academic Press, London.
- Chinnawirotpisan, P., Theeragool, G., Limtong, S., Toyama, H., Adachi, O., Matsushita, K., 2003. Quinoprotein Alcohol Dehydrogenase is involved in catabolic acetate production, while NAD-Dependent Alcohol Dehydrogenase in ethanol assimilation in *Acetobacter pasteurianus* SKU1108. Journal of Bioscience and Bioengineering 96, 564-571.
- Cleenwerck, I., Vandemeulebroecke, K., Janssens, D., Swings, J., 2002. Reexamination of the genus *Acetobacter*, with descriptions of *Acetobacter cerevisiae* sp. nov. and *Acetobacter malorum* sp. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 52, 1551-1558.
- Cleenwerck, I., Camu, N., Engelbeen, K., De Winter, T., Vandemeulebroecke, K., De Vos, P., De Vuyst, L., 2007. *Acetobacter ghanensis* sp. nov., a novel acetic acid bacterium isolated from traditional heap fermentations of Ghanaian cocoa beans. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 57, 1647-1652.
- Cleenwerck, I., González, A., Camu, N., Engelbeen, K., De Vos, P., De Vuyst, L., 2008. *Acetobacter fabarum* sp. nov., a Ghanaian cocoa bean heap fermentation acetic acid bacterium. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 58, 2180-2185.

- Cleenwerck, I., De Wachter, M., González, A., De Vuyst, L., De Vos, P., 2009. Differentiation of species of the family *Acetobacteraceae* by AFLP DNA fingerprinting: *Gluconacetobacter kombuchae* is a later heterotypic synonym of *Gluconacetobacter hansenii*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 59, 1771-1786.
- Cocolin, L., Manzano, M., Cantoni, C., Comi, G., 2000. Development of a rapid method for the identification of *Lactobacillus* spp. isolated from naturally fermented Italian sausage using a polymerase chain reaction-temperature gradient gel electrophoresis. *Letters in Applied Microbiology* 30, 126-129.
- Codex Alimentarius., 1987. Codex Regional Standard for vinegar. Codex Standard 162. Geneva: FAO/OMS.
- De Ley, J., Frateur, J., 1974a. Genus *Gluconobacter*, In: Buchanan, R.E., Gibbons, N.E. (Eds.), *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th Ed. Williams and Wilkins, Baltimore, Maryland, pp. 251-253.
- De Ley, J., Frateur, J., 1974b. Genus *Acetobacter*, In: Buchanan, R.E., Gibbons, N.E. (Eds.), *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th Ed. Williams and Wilkins, Baltimore, Maryland, pp. 276-278.
- De Ley J, Swings J, 1984. Genus I. *Acetobacter* ; in Krieg N.R., Holt, J.G. (Eds): *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Baltimore, Williams and Wilkins, vol 1, pp 268-274.
- De Ley, J., Gosselé, F., Swings, J., 1984. Genus *Acetobacter*. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 1, Williams and Wilkins, Maryland, U.S.A., pp. 268-274.
- De Vero, L., Gala, E., Gullo, M., Solieri, L., Landi, S., Giudici, P., 2006. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) analysis to evaluate acetic acid bacteria in traditional balsamic vinegar. *Food Microbiology* 23, 809-813.
- De Vuyst, L., Camu, N., De Winter, T., Vandemeulebroecke, K., Van de Perre, V., Vancanneyt, M., De Vos, P., Cleenwerck, I., 2008. Validation of the (GTG)₅-rep-PCR fingerprinting technique for rapid classification and identification of acetic acid bacteria, with a focus on isolates from Ghanaian fermented cocoa beans. *International Journal of Food Microbiology* 125, 79-90.
- Dellaglio, F., Cleenwerck, I., Felis, G.E., Engelbeen, K., Janssens, D., Marzotto, M., 2005. Description of *Gluconacetobacter swingsii* sp. nov., and *Gluconacetobacter rhaeticus* sp. nov., isolated from Italian apple fruit. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55, 2365-2370.
- Deppenmeier, U., Hoffmeister, M., Prust, C., 2002. Biochemistry and biotechnological applications of *Gluconobacter* strains. *Applied Microbiology and Biotechnology* 60, 233-242.
- Drysdale, G.S., Fleet, G.H., 1988. Acetic acid bacteria in winemaking: A Review. *American Journal Enology and Viticulture* 39, 143-154.

- Drysdale, G.S., Fleet, G.H., 1989. The effect of acetic acid bacteria upon the growth and metabolism of yeasts during the fermentation of grape juice. *Journal of Applied Bacteriology* 67, 471-481.
- Du Toit, W.J., Lambrechts, M.G., 2002. The enumeration and identification of acetic acid bacteria from South African red wine fermentations. *International Journal of Food Microbiology* 74, 57-64.
- Du Toit, W.J., Pretorius, I.S., 2002. The occurrence, control and esoteric effect of acetic acid bacteria in winemaking. *Annals of Microbiology* 52, 155-179.
- Dutta, D., Gachhui, R., 2006. Novel nitrogen-fixing *Acetobacter nitrogenifigens* sp. nov., isolated from Kombucha tea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 56, 1899-1903.
- Entani, E., Ohmori, S., Masai, H., Suzuki, K. I., 1985. *Acetobacter polyoxogenes* sp. nov., a new species of an acetic acid bacterium useful for producing vinegar with high acidity. *The Journal of General and Applied Microbiology* 31, 475-490.
- Ercolini, D., 2004. PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food. *Journal of Microbiological Methods* 56, 297-314.
- Fernández-Pérez, R., Torres, C., Sanz, S., Ruiz-Larrea, F., 2010. Strain typing of acetic acid bacteria responsible for vinegar production by the submerged elaboration method. *Food Microbiology* 27, 973-978.
- Franke, I.H., Fegan, M., Hayward, C., Leonard, G., Stackebrandt, E., Sly, L.I., 1999. Description of *Gluconacetobacter sacchari* sp. nov., a new species of acetic acid bacterium isolated from the leaf sheath of sugar cane and from the pink sugar-cane mealy bug. *International Journal of Systematic Bacteriology* 49, 1681-1693.
- Franke, I.H., Fegan, M., Hayward, C., Leonard, G., Sly, L.I., 2000. Molecular detection of *Gluconacetobacter sacchari* associated with the pink sugarcane mealybug *Saccharicoccus sacchari* (Cockerell) and the sugarcane leaf sheath microenvironment by FISH and PCR. *FEMS Microbiology Ecology* 31, 61-71.
- Franke-Whittle, I.H., O'Shea, M.G., Leonard, G.J., Sly, L., 2005. Design, development, and use of molecular primers and probes for the detection of *Gluconacetobacter* species in the pink sugarcane mealybug. *Microbiology Ecology* 50, 128-139.
- Frateur, L., 1950. Essai sur la systématique des *Acetobacters*. *La Cellule* 53, 287-392.
- Fuentes-Ramírez, L.E., Bustillos-Cristales, R., Tapia-Hernandez, A., Jimenez-Salgado, T., Wang, E.T., Martinez-Romero, E., Caballero-Mellado, J., 2001. Novel nitrogen-fixing acetic acid bacteria, *Gluconacetobacter johannae* sp. nov. and *Gluconacetobacter azotocaptans* sp. nov., associated with coffee plants. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51, 1305-1314.

- Gammon, K.S., Livens, S., Pawlowsky, K., Rawling, S.J., Chandra, S., Middleton, A.M., 2007. Development of real-time PCR methods for the rapid detection of low concentrations of *Gluconobacter* and *Gluconacetobacter* species in an electrolyte replacement drink. *Letters in Applied Microbiology* 44, 262-267.
- Gevers, D., Huys, G., Swings, J., 2001. Applicability of rep-PCR fingerprinting for differentiation of *Lactobacillus* species. *FEMS Microbiology Letters* 205, 31-36.
- Gillis, M., De Ley, J., 1980. Intra- and intergeneric similarities of the ribosomal ribonucleic acid cistrons of *Acetobacter* and *Gluconobacter*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 30, 7-27.
- Gillis, M., Kersters, K., Hoste, B., Janssens, D., Kroppenstedt, M., Stephan, M.P., Teixeira, K.R.S., Dobereiner, J., De Ley, J., 1989. *Acetobacter diazotrophicus* sp. nov., a nitrogen-fixing acetic acid bacterium associated with sugarcane. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 39, 361-364.
- Giudici, P., Gullo, M., Pulvirenti, A., Solieri, L., De Vero, L., 2003. Microflora y la tecnología de producción del vinagre balsámico tradicional. Pp 59-69. In: Mas A, Guillamón J.M. (Eds) Primeras jornadas en I+D+i en la elaboración de vinagres de vino. Servei de publicacions, Tarragona.
- González, A., Hierro, N., Poblet, M., Rozès, N., Mas, A., Guillamón, J.M., 2004. Application of molecular methods for the differentiation of acetic acid bacteria in a red wine fermentation. *Journal of Applied Microbiology* 96, 853-860.
- González, A., Guillamón, J.M., Mas, A., Poblet, M., 2006a. Application of molecular methods for routine identification of acetic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology* 108, 141-146.
- González, A., Hierro, N., Poblet, M., Mas, A., Guillamón, J.M., 2006b. Enumeration and detection of acetic acid bacteria by real-time and nested polymerase chain reactions. *FEMS Microbiology Letters* 254, 123-128.
- Gosselé, F., Van den Mooter, M., Verdonck, L., Swings, J., De Ley, J., 1981. The nitrogen requirements of *Gluconobacter*, *Acetobacter* and *Frateuria*. *Antonie van Leeuwenhoek* 47, 289-96.
- Gosselé, F., Swings, J., Kersters, K., Pauwels, P., De Ley, J., 1983. Numerical analysis of phenotypic features and protein gel electropherograms of a wide variety of *Acetobacter* strains. Proposal for the improvement of the taxonomy of the genus *Acetobacter* Beijerinck 1898, 215. *Systematic and Applied Microbiology* 4, 338-368.
- Greenberg, D.E., Porcella, S.F., Stock, F., Wong, A., Conville, P.S., Murray, P.R., Holland, S.M., Zelazny, A.M., 2006. *Granulibacter bethesdensis* gen. nov., sp. nov., a distinctive pathogenic acetic acid bacterium in the family *Acetobacteraceae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 56, 2609-2616.

- Greenfield, S., Claus, G.W., 1972. Nonfunctional tricarboxylic acid cycle and the mechanism of glutamate biosynthesis in *Acetobacter suboxydans*. *The Journal of Bacteriology* 112, 1295-1301.
- Guillamón, J.M., Mas, A., 2005. Bacterias acéticas. Pp. 273-297. In: Carrascosa, A.V., Muñoz, R., González, R. (Eds). *Microbiología del vino*. AMV Ediciones, Madrid-España.
- Guillamón, J.M., González, A., Hierro, N., Rozès, N., Mas, A., Poblet, M., 2003. Técnicas de identificación de bacterias acéticas. Pp. 9-15. In: Mas, A. y Guillamón, J.M. (Eds). *Primeras Jornadas de I+D+i en la elaboración de vinagres de vino*. Servei de publicacions, Tarragona.
- Gullo, M., Caggia, C., De Vero, L., Giudici, P., 2006. Characterisation of acetic acid bacteria in “traditional balsamic Vinegar”. *International Journal of Food Microbiology* 106, 209-212.
- Gullo, M., De Vero, L., Giudici, P., 2009. Succession of selected strains of *Acetobacter pasteurianus* and other acetic acid bacteria in traditional balsamic vinegar. *Applied and Environmental Microbiology* 75, 2585-2589.
- Gullo, M., Giudici, P., 2009. Acetic acid bacteria taxonomy from early descriptions to molecular techniques. Pp. 41-60. In: Solieri, L. y Giudici, P. (Ed.). *Vinegars of the world*. Springer-Verlag Italia, Italia.
- Gupta, A., Singh, V.K., Qazi, G.N., Kumar, A., 2001. *Gluconobacter oxydans*: its biotechnological applications. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 3, 445-456.
- Hansen, E.C., 1879. *Mycodermo acetii* (Kütz) Pasteur et Myc. *Pasteurianum*. C. R. Trav. Lab. Carlsberg 1, 96-100.
- Haruta, S., Ueno, S., Egawa, I., Hashiguchi, K., Fujii, A., Nagano, M., Ishii, M., Igarashi, Y., 2006. Succession of bacterial and fungal communities during a traditional pot fermentation of rice vinegar assessed by PCR-mediated denaturing gradient gel electrophoresis. *International Journal of Food Microbiology* 109, 79-89.
- Henneberg, W., 1906. Zur Kenntniss der Schnellessig und Weinessigbakteriën. *Dtsch. Essigind* 10: 106-108.
- Hidalgo, C., Vegas, C., Mateo, E., Tesfaye, W., Cerezo, A.B., Callejón, R.M., Poblet, M., Guillamón, J.M., Mas, A., Torija, M.J., 2010. Effect of barrel design and the inoculation of *Acetobacter pasteurianus* in wine vinegar production. *International Journal of Food Microbiology* 141, 56-62.
- Holt, J.M., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.Y., Williams, S.T., 1994. Genus *Acetobacter* and *Gluconobacter*. In: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9th edn, Williams and Wilkins, Maryland, U.S.A. Pp, 71-84.
- Ilabaca, C., Navarrete, P., Mardones, P., Romero, J., Mas A., 2008. Application of culture independent molecular methods to evaluate acetic acid bacteria diversity in vinegarmaking process. *International Journal of Food Microbiology* 126, 245-249.

- Janssen, P., Coopman, R., Huys, G., Swings, J., Bleeker, M., Vos, P., Zabeau, M., Kersters, K., 1996. Evaluation of the DNA fingerprinting method AFLP as a new tool in bacterial taxonomy. *Microbiology* 142, 1881-1893.
- Janssen, P.H., Yates, P.S., Grinton, B.E., Taylor, P.M., Sait, M., 2002. Improved culturability of soil bacteria and isolation in pure culture of novel members of the divisions *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria* and *Verrucomicrobia*. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 2391-2396.
- Jara Campos, C.I., 2009. Desarrollo de métodos de biología molecular para el análisis directo de bacterias acéticas del vinagre. Tesis Doctoral. Departament de Bioquímica i Biotecnologia. Facultat d'Enologia. Universitat Rovira i Virgili.
- Jojima, Y., Mihara, Y., Suzuki, S., Yokozeki, K., Yamanaka, S., Fudou, R., 2004. *Saccharibacter floricola* gen. nov., sp. nov., a novel osmophilic acetic acid bacterium isolated from pollen. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54, 2263-2267.
- Joyeux, A., Lafon-Lafourcade, S., Ribereu-Gayon, P., 1984. Evolution of Acetic acid bacteria during fermentation and storage of wine. *Applied and Environmental Microbiology* 48, 153-156.
- Katsura, K., Kawasaki, H., Potacharoen, W., Saono, S., Seki, T., Yamada, Y., Uchimura, T., Komagata, K., 2001. *Asaia siamensis* sp. nov., an acetic acid bacterium in the α -*Proteobacteria*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51, 559-563.
- Katsura, K., Yamada, Y., Uchimura, T., Komagata, K., 2002. *Gluconobacter asaii* Mason and Claus 1989 is a junior subjective synonym of *Gluconobacter cerinus* Yamada and Akita 1984. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52, 1635-1640.
- Kerwar, S.S., Cheldelin, V.H., Parks, L.W., 1964. Valine-leucine metabolism in *Acetobacter suboxydans* and the inhibition of growth by valine. *The Journal of Bacteriology* 88, 179-86.
- Kittleman, M., Stamm, W.W., Follman, H, Trüper, H.G., 1989. Isolation and classification of acetic acid bacteria for higher percentage vinegar fermentations. *Applied Microbiology and Biotechnology* 30, 47-52.
- Kondo, K., Ameyama, M., 1958. Carbohydrate metabolism by *Acetobacter* species. Part I. Oxidative activity for various carbohydrates. *Bulletin of the Chemical Society of Japan* 22, 369-372.
- Kretová, M., Grones, J., 2005. Molecular analysis of 16S-23S spacer regions of *Acetobacter* species. *Folia Microbiologica* 50, 288-292.
- Lisdiyanti, P., Kawasaki, H., Seki, T., Yamada, Y., Uchimura, T., Komagata, K., 2000. Systematic study of the genus *Acetobacter* with descriptions of *Acetobacter indonensiensis* sp. nov., *Acetobacter tropicalis* sp. nov., *Acetobacter orleanensis* (Henneberg 1906) comb. nov., *Acetobacter lovaniensis* (Frateur 1950) comb. nov., and *Acetobacter estunensis* (Carr 1958) comb. nov. *Journal of General and Applied Microbiology* 46, 147-165.

- Lisdiyanti, P., Kawasaki, H., Seki, T., Yamada, Y., Uchimura, T., Komagata, K., 2001. Identification of *Acetobacter* strains isolated from Indonesian sources, and proposals of *Acetobacter syzygii* sp. nov., *Acetobacter cibinongensis* sp. nov., and *Acetobacter orientalis* sp. nov. *Journal of General and Applied Microbiology* 47, 119-131.
- Lisdiyanti, P., Kawasaki, H., Widyastuti, Y., Saono, S., Seki, T., Yamada, Y., Uchimura, T., Komagata, K., 2002. *Kozakia baliensis* gen. nov., sp. nov., a novel acetic acid bacterium in the α -*Proteobacteria*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52, 813-818.
- Lisdiyanti, P., Katsura, K., Potacharoen, W., Navarro, R.R., Yamada, Y., Uchimura, T., Komagata, K., 2003. Diversity of acetic acid bacteria in Indonesia, Thailand, and the Philippines. *Microbiology and Culture Collections* 19, 91-99.
- Lisdiyanti, P., Navarro, R.R., Uchimura, T., Komagata, K., 2006. Reclassification of *Gluconacetobacter hansenii* strains and proposals of *Gluconacetobacter saccharivorans* sp. nov. and *Gluconacetobacter nataicola* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 56, 2101-2111.
- Llaguno, C., 1991. Antecedentes históricos. In: Llaguno C. y Polo, C. (Eds.). *El vinagre de vino* (pp. 1-23). Madrid: CSIC.
- Loganathan, P., Nair, S., 2004. *Swaminathania salitorans* gen. nov., sp. nov., a salt-tolerant, nitrogen-fixing and phosphate-solubilizing bacterium from wild rice (*Porterisia coarctata* Tateoka). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54, 1185-1190.
- Malimas, T., Yukphan, P., Takahashi, M., Kaneyasu, M., Potacharoen, W., Tanasupawat, S., Nakagawa, Y., Tanticharoen, M., Yamada, Y., 2007. *Gluconobacter kondonii* sp. nov., an acetic acid bacterium in the α -*Proteobacteria*. *The Journal of General and Applied Microbiology* 53, 301-307.
- Malimas, T., Yukphan, P., Takahashi, M., Kaneyasu, M., Potacharoen, W., Tanasupawat, S., Nakagawa, Y., Tanticharoen, M., Yamada, Y., 2008a. *Asaia lannaensis* sp. nov., a new acetic acid bacterium in the *Alphaproteobacteria*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 72, 666-671.
- Malimas, T., Yukphan, P., Takahashi, M., Muramatsu, Y., Kaneyasu, M., Potacharoen, W., Tanasupawat, S., Nakagawa, Y., Tanticharoen, M., Yamada, Y., 2008b. *Gluconobacter sphaericus* (Ameyama 1975) comb. nov., a brown pigment-producing acetic acid bacterium in the *Alphaproteobacteria*. *The Journal of General and Applied Microbiology* 54, 211-220.
- Malimas, T., Yukphan, P., Takahashi, M., Muramatsu, Y., Kaneyasu, M., Potacharoen, W., Tanasupawat, S., Nakagawa, Y., Tanticharoen, M., Yamada, Y., 2008c. *Gluconobacter roseus* (ex Asai 1935) sp. nov., nom. rev., a pink-colored acetic acid bacterium in the *Alphaproteobacteria*. *The Journal of General and Applied Microbiology* 54, 119-125.

- Malimas, T., Yukphan, P., Takahashi, M., Muramatsu, Y., Kaneyasu, M., Potacharoen, W., Tanasupawat, S., Nakagawa, Y., Tanticharoen, M., Yamada, Y., 2009. *Gluconobacter japonicus* sp. nov., an acetic acid bacterium in the *Alphaproteobacteria*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 59, 466-471.
- Mason, L.M., Claus, G.W., 1989. Phenotypic characteristics correlated with deoxyribonucleic acid sequence similarities for three species of *Gluconobacter*: *G. oxydans* (Henneberg 1897) De Ley 1961, *G. frateurii* sp. nov., and *G. asaii* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 39, 174-184.
- Matsushita, K., Toyama, H., Adachi, O., 1994. Respiration chains and bioenergetics of acetic acid bacteria. *Advances in Microbial Physiology* 36, 247-301.
- Méndez-Ortiz, M.M., Membrillo Hernández, J., 2004. Mecanismos moleculares de la síntesis de celulosa en bacterias. *Tip Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas* 7, 26-34.
- Mesa, M.M., Macias, M., Cantero, D., Barja, F., 2003. Use of the direct epifluorescent filter technique for the enumeration of viable and total acetic acid bacteria from vinegar fermentation. *The Journal of Fluorescence* 13, 261-265.
- Millet, V., Lonvaud-Funel, A., 2000. The viable but non-culturable state of wine microorganisms during storage. *Letters in Applied Microbiology* 30, 126-141.
- Moonmangmee, S., Kawabata, K., Tanaka, S., Toyama, H., Adachi, O., Matsushita, K., 2002. A novel polysaccharide involved in the pellicle formation of *Acetobacter aceti*. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 93, 192-200.
- Muyzer, G., Smalla, K., 1998. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie Van Leeuwenhoek* 73, 127-141.
- Muyzer, G., 1999. DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. *Current Opinion in Microbiology* 2, 317-322.
- Nanda, K., Taniguchi, M., Ujike, S., Ishihara, N., Mori, H., Ono, H., Murooka, Y., 2001. Characterization of acetic acid bacteria in traditional acetic acid fermentation of rice vinegar (komesu) and unpolished rice vinegar (kurosu) produced in Japan. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 986-990.
- Ndoye, B., Lebecque, S., Dubois-Dauphin, R., Tounkara, L., Guiro, A.T., Kere, C., Diawara, B., Thonart, P., 2006. Thermoresistant properties of acetic acid bacteria isolated from tropical products of Sub-Saharan Africa and destined to industrial vinegar. *Enzyme and Microbial Technology* 39, 916-923.
- Ndoye, B., Cleenwerck, I., Engelbeen, K., Dubois-Dauphin, R., Guiro, A.T., Van Trappen, S., Willems, A., Thonart, P., 2007. *Acetobacter senegalensis* sp. nov., a thermotolerant acetic acid

- bacterium isolated in Senegal (sub-Saharan Africa) from mango fruit (*Mangifera indica* L.). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57, 1576-1581.
- Olive, D. M., Bean, P., 1999. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. *Journal of Clinical Microbiology* 37, 1661-1669.
- Oliver, J.D., 2005. The viable but nonculturable state in bacteria. *The Journal of Microbiology* 43, 93-100.
- On, S.L.W., Harrington, C.S., Atabay, H.I., 2003. Differentiation of *Arcobacter* species by numerical analysis of AFLP profiles and description of a novel *Arcobacter* from pig abortions and turkey faeces. *Journal of Applied Microbiology* 95, 1096-1105.
- O'Sullivan, J., 1974a. The effect of some amino acids on the growth of *Acetobacter aceti*. *Pathology and Microbiology* 41, 179-80.
- O'Sullivan, J., 1974b. Growth inhibition of *Acetobacter aceti* by L-threonine and L-homoserine: the primary regulation of the biosynthesis of amino acids of the aspartate family. *Journal of General Microbiology* 85, 153-159.
- Papalexandratou, Z., Cleenwerck, I., De Vos, P., De Vuyst, L., 2009. (GTG)₅-PCR reference framework for acetic acid bacteria. *FEMS Microbiology Letters* 301, 44-49.
- Pasteur, L., 1864. Memoire sur la fermentatione acetique. *Annales Scientifiques de l'ENS. Paris* 1, 113-158.
- Poblet, M., Rozès, N., Guillamón, J.M., Mas, A., 2000. Identification of acetic acid bacteria by restriction fragment length polymorphism analysis of a PCR-amplified fragment of the gene coding for 16S rRNA. *Letters in Applied Microbiology* 31, 63-67.
- Pooler, M.R., Ritchie, D.F., Hatung, J.S., 1996. Genetic relationships among strains of *Xanthomonas fragariae* based on Random Amplified Polymorphic DNA PCR, Repetitive Extragenic Palindromic PCR and Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus PCR data and generation of multiplexed PCR primers useful for the identification of this phytopathogen. *Applied and Environmental Microbiology* 62, 3121-3127.
- Prust, C., Hoffmeister, M., Liesegang, H., Wiezer, A., Fricke, W.F., Ehrenreich, A., Gottschalk, G., Deppenmeier, U., 2005. Complete genome sequence of the acetic acid bacterium *Gluconobacter oxydans*. *Nature Biotechnology* 23, 195-200.
- Quintero, Y., Poblet, M., Guillamón, J.M., Mas, A., 2009. Quantification of the expression of reference and alcohol dehydrogenase genes of some acetic acid bacteria in different growth conditions. *Journal of Applied Microbiology* 106, 666-674.
- Randazzo, C.L., Heilig, H., Restuccia, C., Giudici, P., Caggia, C., 2005. Bacterial population in traditional sourdough evaluated by molecular methods. *Journal of Applied Microbiology* 99, 251-258.

- Ruiz, A., Poblet, M., Mas, A., Guillamón, J.M., 2000. Identification of acetic acid bacteria by RFLP of PCR-amplified 16S rDNA and 16S-23S rDNA intergenic spacer. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50, 1981-1987.
- Saeki, A., Theeragool, G., Matsushita, K., Toyama, H., Lotong, N., Adachi, O., 1997a. Development of thermotolerant acetic acid bacteria useful for vinegar fermentation at higher temperatures. *Journal Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 61, 138-145.
- Saeki, A., Theeragool, G., Matsushita, K., Toyama, H., Lotong, N., Adachi, O., 1997b. Microbiological aspects of acetate oxidation by acetic acid bacteria, unfavourable phenomena in vinegar fermentation. *Journal Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 61, 317-323.
- Savelkoul, P.H.M., Aarts, H.J.M., De Haas, J., Dijkshoorn, L., Duim, B., Otsen, M., Rademaker, J.L.M., Schouls, L., Lenstra, A., 1999. Amplified-Fragment Length Polymorphism Analysis: the state of an art. *Journal of Clinical Microbiology* 37, 3083-3091.
- Schüller, G., Hertel, C., Hammes, W.P., 2000. *Gluconacetobacter entanii* sp nov. isolated from submerged high-acid industrial vinegar fermentations. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50, 2013-2020.
- Sievers, M., Sellmer, S., Teuber, M., 1992. *Acetobacter europaeus* sp-nov a main component of industrial vinegar fermenters in Central-Europe. *Systematic and Applied Microbiology* 15, 386-392.
- Sievers, M., Ludwig, W., Teuber, M., 1994a. Phylogenetic positioning of *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Rhodopila* and *Acidiphilium* species as a branch of acidophilic bacteria in the α -subclass of Proteobacteria based on 16S ribosomal DNA sequences. *Systematic and Applied Microbiology* 17, 189-196.
- Sievers, M., Ludwig, W., Teuber, M., 1994b. Revival of the species *Acetobacter methanolicus* (ex Uhlig et al., 1986) nom. rev. *Systematic and Applied Microbiology* 17, 352-354.
- Sievers, M., Gaberthüel, C., Boesch, C., Ludwig, W., Teuber, M., 1995. Phylogenetic position of *Gluconobacter* species as a coherent cluster separated from all *Acetobacter* species on the basis of 16S ribosomal RNA sequences. *FEMS Microbiology Letters* 126, 123-126.
- Sievers, M., Lorenzo, A., Gianotti, S., Boesch, C., Teuber, M., 1996. 16-23S ribosomal RNA spacer regions of *Acetobacter europaeus* and *A. xylinum*, tRNA genes and antitermination sequences. *FEMS Microbiology Letters* 142, 43-48.
- Sievers, M., Swings, J., 2005. Family *Acetobacteraceae*. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd edn, vol. 2, pp. 41-95. Edited by G. M. Garrity. New York: Springer.
- Silva, L.R., Cleenwerck, I., Rivas, R., Swings, J., Trujillo, M.E., Willems, A., Velázquez, E., 2006. *Acetobacter oeni* sp. nov., isolated from spoiled red wine. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 56, 21-24.

- Sokollek, S.J., Hammes, W.P., 1997. Description of a starter culture preparation for vinegar fermentation. *Systematic and Applied Microbiology* 20, 481-491.
- Sokollek, S.J., Hertel, C., Hammes, W.P., 1998a. Description of *Acetobacter oboediens sp. nov.* and *Acetobacter pomorum sp. nov.*, two new species isolated from industrial vinegar fermentations. *International Journal of Systematic Bacteriology* 48, 935-940.
- Sokollek, S.J., Hertel, C., Hammes, W.P., 1998b. Cultivation and preservation of vinegar bacteria. *Journal of Biotechnology* 60, 195-206.
- Stackebrandt, E., Murray, R.G.E., Trüper, H.G., 1988. *Proteobacteria* classis nov., a name for the phylogenetic taxon that includes the "purple bacteria and their relatives". *International Journal of Systematic Bacteriology* 38, 321-325.
- Swings, J., De Ley, J., 1981. The genera *Acetobacter* and *Gluconobacter*. In: Starr M.P., ed., *The Prokaryotes*. Springer-Verlag, pp. 771-778, Berlin, Germany.
- Tanasupawat, S., Thawai, C., Yukphan, P., Moonmangmee, D., Itoh, T., Adachi, O., Yamada, Y., 2004. *Gluconobacter thailandicus sp. nov.*, an acetic acid bacterium in the α -*Proteobacteria*. *Journal of General and Applied Microbiology* 50, 159-167.
- Tesfaye, W., Morales, M.L., Garcia-Parrilla, M.C., Troncoso, A.M., 2002. Wine vinegar: technology, authenticity and quality evaluation. *Trends in Food Science and Technology* 13, 12-21.
- Thompson, F.L., Hoste, B., Vandemeulebroecke, K., Swings, J., 2001. Genomic diversity amongst *Vibrio* isolates from different source determined by fluorescent amplified fragment length polymorphism. *Systematic and Applied Microbiology* 24, 520-538.
- Torija, M.J., Mateo, E., Guillamón, J.M., Mas, A. 2010. Identification and quantification of acetic acid bacteria in wine and vinegar by TaqMan-MGB probes. *Food Microbiology* 27, 257-265.
- Trcek, J., Ramus, J., Raspor, P., 1997. Phenotypic characterization and RAPD-PCR profiling of *Acetobacter sp.* isolated from spirit vinegar production. *Food Technology and Biotechnology* 35, 63-67.
- Trcek, J., Raspor, P., Teuber, M., 2000. Molecular identification of *Acetobacter* isolates from submerged vinegar production, sequence analysis of plasmid pJK2-1 and application in the development of a cloning vector. *Applied Microbiology and Biotechnology* 53, 289-295.
- Trcek, J., Teuber, M., 2002. Genetic restriction analysis of the 16S-23S rDNA internal transcribed spacer regions of the acetic acid bacteria. *FEMS Microbiology Letters* 208, 69-75.
- Trcek, J., 2005. Quick identification of acetic acid bacteria based on nucleotide sequences of the 16S-23S rDNA internal transcribed spacer region and of the PQQ-dependent alcohol dehydrogenase gene. *Systematic and Applied Microbiology* 28, 735-745.

- Trcek, J., Toyama, H., Czuba, J., Misiewicz, A., Matsushita, K., 2006. Correlation between acetic acid resistance and characteristics of PQQ-dependent ADH in acetic acid bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology* 70, 366-373.
- Urakami, T., Tamaoka, J., Suzuki, K., Komagata, K., 1989. *Acidomonas* gen. nov., incorporating *Acetobacter methanolicus* as *Acidomonas methanolica* comb. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 39, 50-55.
- Uhlig, H., Karbaum, K., Steudel, A., 1986. *Acetobacter methanolicus* sp. nov., and acidophilic facultatively methylotrophic bacterium. *International Journal of Systematic Bacteriology* 36, 317-322.
- Valasek, M.A., Repa, J.J., 2005. The power of real-time PCR. *Advances in Physiology Education* 29, 151-159.
- Valero, E., Roldan, P., Jimenez, C., Garcia, I., Mauricio, J.C., 2003. Contenido en aminoácidos libres en vinagres procedentes de diferentes sustratos. P 53-58. In Mas, A. y Guillamon, J.M. (Ed). Primeras jornadas de I+D+i en la elaboración de vinagre de vino. Servei de publicacions, Tarragona.
- Versalovic, J., Schneider, M., de Bruijn, F.J., Lupski, J.R., 1994. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods in Molecular and Cellular Biology* 5, 25-40.
- Visser't Hooft, F., 1925. Biiiochemische Onderzoekingen over het geslacht *Acetobacter*. Dissertation, Technical University, Delft, Meinema.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M., 1995. AFLP: a new concept for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* 21, 4407-4414.
- Willems, A., Coopman, R., Gillis, M., 2001. Comparison of sequence analysis of 16S-23S rDNA spacer regions, AFLP analysis and DNA-DNA hybridizations in *Bradyrhizobium*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51, 623-632.
- Wu, J., Gullo, M., Chen, F., Giudici, P., 2010. Diversity of *Acetobacter pasteurianus* strains isolated from solid-state fermentation of cereal vinegars. *Current Microbiology* 60, 280-286.
- Yamada, S., Nabe, K., Izuo, M., Chibata, I., 1979. Enzymic production of dihydroxyacetone by *Acetobacter suboxydans* ATCC 621. *Journal of Fermentation Technology* 57,321-326.
- Yamada, Y., 1983. Taxonomic studies on acetic acid bacteria and allied organisms. 6. *Acetobacter xylinus* sp. nov. nom. rev., for the celluloseforming and cellulose-less, acetate oxidizing acetic acid bacteria with the Q-10 system. *Journal of General and Applied Microbiology* 29, 417-420.
- Yamada, Y., Kondo, K., 1984. *Gluconacetobacter*, a new subgenus comprising the acetateoxidizing acetic acid bacteria with ubiquinone-10 in the genus *Acetobacter*. *Journal of Genetic and Applied Microbiology* 30, 297-303.

- Yamada, Y., Hoshino, K., Ishikawa, T., 1997. The phylogeny of acetic acid bacteria based on the partial sequences of 16S ribosomal RNA: the elevation of the subgenus *Gluonoacetobacter* to the generic level. *Bioscience Biotechnology Biochemistry* 61, 1244-1251.
- Yamada, Y., Katsura, K., Kawasaki, H., Widyastuti, Y., Saono, S., Seki, T., Uchimura, T., Komagata, K., 2000. *Asaia bogorensis* gen. nov., sp. nov., an unusual acetic acid bacterium in the α -*Proteobacteria*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50, 823-829.
- Yamada, Y., Katsura, K., Kawasaki, H., Widyastuti, Y., Saono, S., Seki, T., Uchimura, T., Komagata, K., 2000. *Asaia bogorensis* gen. nov., sp. nov., an unusual acetic acid bacterium in the α -*Proteobacteria*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50, 823-829.
- Yamashita, S., Uchimura, T., Komagata, K., 2004. Emendation of the genus *Acidomonas* Urakami, Tamaoka, Suzuki and Komagata 1989. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54, 865-870.
- Yukphan, P., Potacharoen, W., Tanasupawat, S., Tanticharoen, M., Yamada, Y., 2004a. *Asaia krungthepensis* sp. nov., an acetic acid bacterium in the alpha-*Proteobacteria*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54, 313-316.
- Yukphan, P., Takahashi, M., Potacharoen, W., Tanasupawat, S., Nakagawa, Y., Tanticharoen, M., Yamada, Y., 2004b. *Gluconobacter albidus* (ex Kondo and Ameyama 1958) sp. nov., nom. rev., an acetic acid bacterium in the α -*Proteobacteria*. *Journal of General and Applied Microbiology* 50, 235-242.
- Yukphan, P., Malimas, T., Potacharoen, W., Tanasupawat, S., Tanticharoen, M., Yamada, Y., 2005. *Neoasaia chiangmaiensis* gen. nov., sp. nov., a novel osmotolerant acetic acid bacterium in the α -*Proteobacteria*. *Journal of General and Applied Microbiology* 51, 301-311.
- Yukphan, P., Malimas, T., Muramatsu, Y., Takahashi, M., Kaneyasu, M., Tanasupawat, S., Naagawa, Y., Suzuki, K-i., Potacharoen, W., Yamada, Y., 2008. *Tanticharoenia sakaeratensis* gen. nov., sp. nov., a New Osmotolerant Acetic Acid Bacterium in the α -*Proteobacteria*. *Bioscience Biotechnology Biochemistry* 72, 672-676.
- Yukphan, P., Malimas, T., Muramatsu, Y., Takahashi, M., Kaneyasu, M., Potacharoen, W., Tanasupawat, S., Nakagawa, Y., Hamana, K., Tahara, Y., Suzuki, K-i., Tanticharoen, M., Yamada, Y., 2009. *Ameyamaea chiangmaiensis* gen. nov., sp. nov., an Acetic Acid Bacterium in the α -*Proteobacteria*. *Bioscience, Biotechnoloy, and Biochesmistry* 73, 2156-2162.

Primer capítulo

Efecto del tipo de madera y grosor de la barrica sobre la cinética de acetificación en la producción de vinagre tradicional

Effect of wood type and thickness on acetification kinetics in traditional
vinegar production

Maria Jesús Torija, Estibaliz Mateo, Carlos Alfredo Vegas, Carla Jara, Ángel González, Montse Poble, Cristina Reguant, José Manuel Guillamón, Albert Mas.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
APLICACIÓN DE MÉTODOS MOLECULARES PARA EL ESTUDIO DE LAS BACTERIAS ACÉTICAS IMPLICADAS EN LA ELABORACIÓN
DE VINAGRE DE VINO TRADICIONAL
Carlos Alfredo Vegas Pérez
ISBN:/DL: T.1216-2011

ABSTRACT

Traditional vinegar production is a lengthy process which implies high operational risks and jeopardizes the organoleptic characteristics of the final product. In an effort to solve these problems without changing the traditional model, we modified the wood type and thickness of vinegar barrels. We acetified in triplicate in barrels made of acacia, cherry, chestnut, and oak and in three wood thicknesses (15, 20, and 25 mm) in two different vinegar plants. The operating volume was set at 60 L. Reducing wood thickness improved neither maximum acetification velocity nor the total length of the process, and in some cases even worsened them. The process took longer in oak barrels than in other types of wood barrel in one of the vinegar plants. Therefore, the choice of wood is a parameter to be considered in the wine vinegar production.

Keywords: acacia, cherry, chestnut, oak, acetic acid bacteria

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
APLICACIÓN DE MÉTODOS MOLECULARES PARA EL ESTUDIO DE LAS BACTERIAS ACÉTICAS IMPLICADAS EN LA ELABORACIÓN
DE VINAGRE DE VINO TRADICIONAL
Carlos Alfredo Vegas Pérez
ISBN:/DL: T.1216-2011

INTRODUCTION

Wine vinegar is a wine by-product that has come to play an important role in salad dressings, ketchup and other sauces. From a technological point of view, there are two processes for vinegar production: the traditional or superficial method (slow, the best known is the Orleans method), and the submerged method (quick, different acetification devices).^{1,2} Traditional wine vinegar is made in wood barrels with the primary transforming microorganisms, acetic acid bacteria (AAB), placed on the surface of the wine substrate and therefore in contact with atmospheric air.²⁻⁴ The quantity of oxygen available for the AAB is therefore limited, resulting in a lengthy process. However, several processes take place during the long period in which the product is in contact with the wood cask. On one hand, a complex bacterial metabolism releases several secondary metabolites such as acetoin⁵ into the vinegar. Also, aging occurs at the same time as acetification, meaning that vinegars produced by means of this method take on a higher degree of organoleptic complexity. Finally, the lengthy process allows the compounds in the vinegar to more thoroughly blend. These products are therefore highly appreciated over submerged vinegars, and are sold at higher market prices.^{3,6,7} Nevertheless, the most serious threat to the survival of this sector is that this lengthy process entails several risks which considerably limit the production of these high-quality vinegars.

Wine and other beverages have traditionally been stored and aged in wood barrels.⁸ Much research has been done into the effect of wood barrels on wine quality, and the compound transfer and positive effects of wood, especially oak, is well established.⁹⁻¹³ Meanwhile, as vinegar is generally considered to be a by-product associated with spoiled wine, little or no attention has been paid to which type of barrel is the most suitable for its production. Consequently, the wood barrels used for vinegar production tend to be handed down, having previously been used for wine aging. Such barrels are not the most appropriate for vinegar production because whereas vinegar production requires a higher degree of oxygen transfer,⁴ in wine aging high wood porosity is avoided to limit oxidation.¹⁴

It is well known that while vinegars are produced and aged in barrels, their volatile compounds are enriched mainly as a result of two important processes: they are concentrated as water is lost through the wood pores; and new compounds, such as esters, are formed.^{15,16} To date, oak is most frequently used in the aging of wines or vinegars¹⁷ although occasionally chestnut and more rarely acacia, cherry, or mulberry are also used. However, the influence of wood type on vinegar development – its kinetics and microbiology – has not yet been studied.

The differing porosities and chemical compositions of each type of wood may affect the development of the process and the resulting product. Empirical data collected suggest that mulberry has a higher porosity than other woods such as acacia, cherry, or chestnut, although the porosity of these last three is superior to that of oak. Higher porosity is related to higher oxygen diffusion and might therefore result in a quicker transformation of ethanol into acetic acid by AAB. The aim of this work was to analyze different variables in an attempt to reduce the time needed for the production of traditional wine vinegar. To do this we tested two strategies for increasing oxygen transfer: (i) using barrels made of wood with different porosities and (ii) decreasing barrel thickness. We studied the effect of both parameters on the kinetics of the process, evaluating the time needed to complete acetification. The study was carried out in two vinegar plants using four different types of wood – cherry, chestnut and acacia with oak as the control – and three barrel thicknesses: 15 and 20 mm with a thickness of 25 mm as the control.

MATERIALS AND METHODS

The study was conducted in two vinegar plants: Viticultors Mas d'en Gil (MG, Bellmunt del Priorat, Tarragona, Spain) and La Guinelle (LG, Banyuls, France). There are differences between the two plants in terms of wine characteristics, climate, and the period of time each has been in operation. MG uses dry wine in their production process whereas LG uses sweet wine (70 g residual sugar/L). The MG plant is housed in a relatively cold, closed building whereas the LG plant is in the open air and subject to dramatic changes in temperature. Finally, LG had operated as a vinegar plant for five years prior to the study, whereas MG is a new vinegar plant (less than one year in production).

The barrels were constructed by Botería Torner (Barcelona, Spain) and specifically designed for this experiment. Briefly, they had the typical design of 60 L barrels and were constructed in various thicknesses of 25 (standard thickness, used as control), 20 and 15 mm. The woods selected were acacia, chestnut, cherry, and oak, the last of which was used as a control. All the barrels had a broad top hole, which was covered by a cloth to prevent the inadvertent introduction of insects, dust, etc. The acetifications in each wood were done by triplicate.

The vinegar mothers were produced using both plants' own acetifying vinegars mixed with wine and water in a proportion of 25:50:25. These vinegar mothers (10%) mixed with diluted wine were the initial mixture for the acetification process. The alcohol content of these mixtures was 11.3% (MG) and 9.5% (LG) and the acetic acid content was 9 g/L in both vinegar plants.

Acetic acid was determined by titration with NaOH and reducing sugars and ethanol with enzymatic kits (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany). Oxygen dissolved was measured using a LDOTM HQ10 Portable Dissolved Oxygen Meter (HACH Company, Loveland, CO, USA).

Acetification rate (g acetic acid/L* day) was the maximal slope obtained from the representation of acetic acid production towards acetification time.

Statistical analysis

We evaluated the effect of the vinegar plant and wood type and thickness using a three-way ANOVA with Sheffe's and b-Tukey's post hoc tests (except for vinegar plant variable since we had only two values). All statistical analyses were performed using SPSS version 15.0 for Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). A suitable control was considered for each variable. For the vinegar plant effect, the control was LG. For the wood type and thickness, the controls were oak and 25 mm, respectively.

RESULTS

All the barrels used in this study were new and cleaned with warm water and allowed to equilibrate with young wine prior to use. The research design set out to analyze two variables: wood type and thickness. As a general criterion we considered final acetification at 60 g acetic acid/L.

Wood type

La guinelle

The differences found between wood types were minimal when process duration was compared in woods of the same thickness (Figure 1). In 15 mm barrels, wood type did not have any discernible effect on the vinegar production, with the exception of the chestnut barrels in which stuck acetification occurred in the last stages of the process. Complete acetification took 79 days.

Some differences between wood types were found in 20 mm barrels. In acacia barrels the process took the shortest amount of time (49 days) and in oak the longest (76 days). At 25 mm, all wood types allowed for faster acetification (49 days) except oak, in which acetification was slower (76 days). Therefore, in this thickness the use of woods other than oak would reduce process time by approximately one third.

Mas d'en gil

When the same processes were carried out in the other vinegar plant, no differences were found according to wood type (Figure 2). Similar acetification evolution and development was observed in all cases. It is important to mention that in this vinegar plant we found a clear decrease in the acetification rate when acetic acid values were near five degrees, which ultimately resulted in stuck acetification in all woods and thicknesses. The acetification processes required to achieve six-degree acetic acid were therefore very lengthy at around 250 days.

Wood thickness

La guinelle

In general a thickness of 25 mm exhibited the fastest acetification (46 days) in all wood types except for oak, in which all acetification, regardless of barrel thickness, presented the same slow behaviour (76 days) (Figure 1). So, with the exception of oak, the effect of thickness on acetification velocity was contrary to the expected effect; the acetification rate slowed as barrel thickness decreased. The use of 15-mm-thick barrels resulted in a 35% increase in acetification time over typical casks (25 mm).

Mas d'en gil

No differences were observed in acetification as a result of barrel thicknesses; the same amount of time was required to complete the process in all cases (Figure 2).

Acetification rate

Significant differences emerged when comparing the acetification rate at the two vinegar plants, with the exception of oak at 25 mm (Table 1). Acetification at LG occurred faster and the complete process consequently required less time than at MG (Figures 1 and 2).

The acetification rate at MG was practically identical in the 36 processes studied, while acetification at LG showed interesting differences (Table 1). In all thicknesses, acacia presented the fastest acetification rate. In fact, this wood presented a significantly different acetification rate with respect to the control wood (oak) both in 20 and 25 mm.

On the other hand, 15 mm barrels accounted for the slowest acetification rate, except in oak where surprisingly, 25 mm barrels were the slowest, although these values only were statistically different in the case of acacia. It is important to remark that in some cases, the acetification rate at 20 mm (oak and acacia) was significantly higher than the one at 25 mm (control thickness), although this fact was not matched by a faster process.

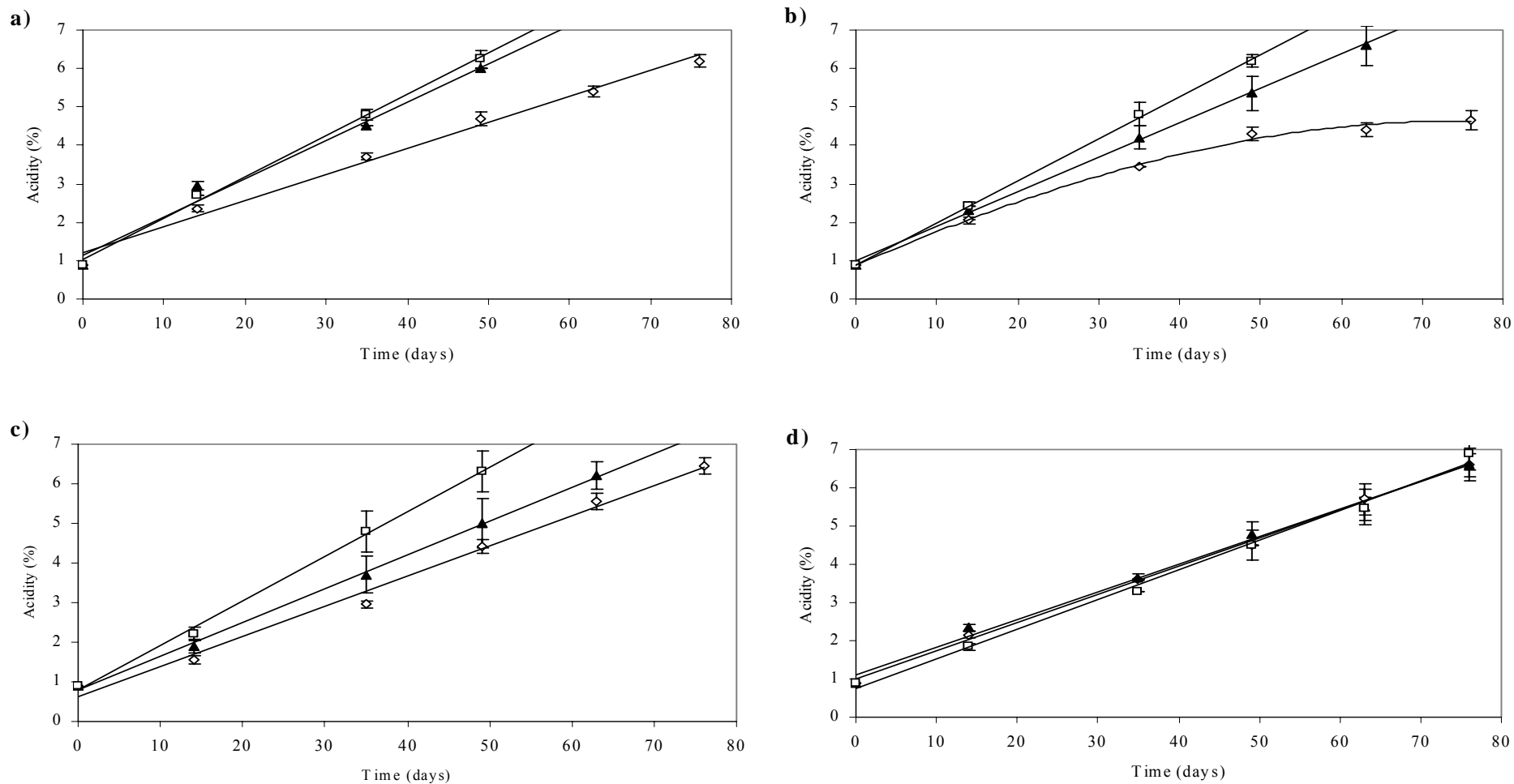


Fig. 1. Variation of acidity in wood barrels (**a**, acacia; **b**, chestnut; **c**, cherry; and **d**, oak) during acetification process according to the different thicknesses (\diamond 15 mm barrels; \square 20 mm barrels; \triangle 25 mm barrels) in La Guinelle vinegar plant. The acidity values fitted to a linear regression except in chestnut 15 mm where a polinomic regression fit was needed.

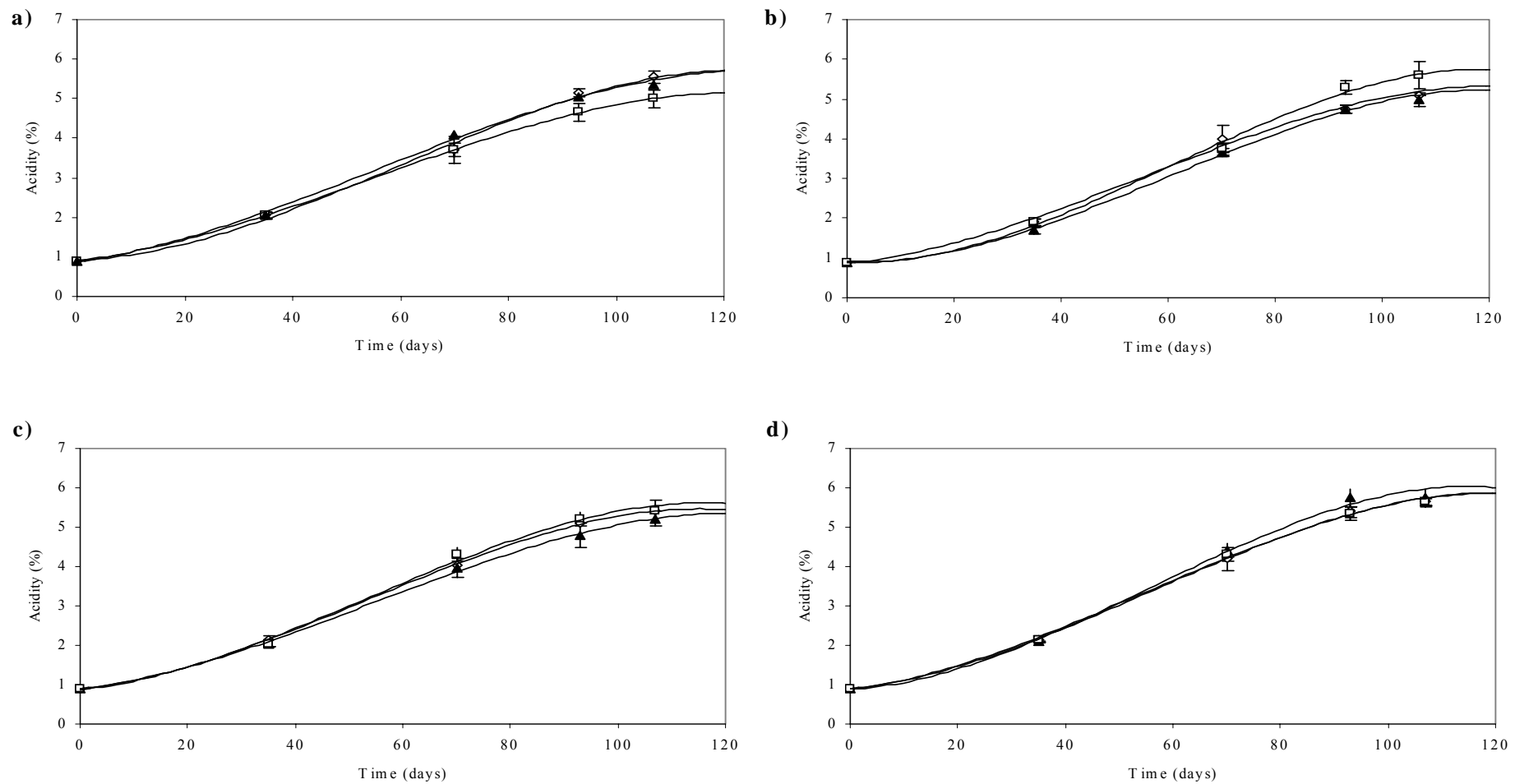


Fig. 2. Variation of acidity in wood barrels (**a**, acacia; **b**, chestnut; **c**, cherry; and **d**, oak) during acetification process according to the different thicknesses (\diamond 15 mm barrels; \square 20 mm barrels; \triangle 25 mm barrels) in Mas d'en Gil vinegar plant. The acidity values fitted to a polynomial regression. The figure shows the exponential acetification until the process was stuck.

DISCUSSION

In this study, two variables related to increasing oxygen diffusion through the barrel were tested as possible ways to reduce the time required for the production of traditional wine vinegar. The parameters studied were wood type and thickness.

The barrels used for aging wine are usually made of oak.^{17,18} In the wine-aging process, oxygenation is limited in order to prevent spoiled aerobic microorganisms such as AAB from developing.¹⁹ Oak is well known for its limited porosity and permeability and is therefore a very suitable wood in which to age wine. However, vinegar production requires oxygen during the process to facilitate AAB development and the transformation of ethanol into acetic acid. Therefore, the common practice of using recycled wine barrels for the production of vinegar is clearly counterproductive. Wine barrels are made from oak, a wood that is not very porous to begin with and even less so after being used for aging wine, a process which causes most of the wood's pores to become clogged with tartrates and other sediments generated during wine processing. For these reasons, strategies to improve oxygen transfer are the most viable for shortening the acetification process.

In this study, both of the variables proposed were evaluated in two vinegar plants and the duration of the process and acetification rate were analyzed.

Comparing the two plants, acetification at LG was clearly faster than at MG and in the latter no differences were found between the conditions tested. This different acetification development between vinegar plants could be explained by differences in the microbiota responsible for the process and in the wine used for acetification. It is well established that different AAB strains can present differences in tolerance to ethanol and acetic acid and in the efficiency of transforming ethanol into acetic acid.²⁰ In our case, indigenous AAB strains from LG clearly seemed to be better adapted to the process conditions than the MG strains, and this is reflected in a higher transformation rate at LG. Furthermore, the composition of the initial media also determines which species and strains of AAB are capable of growing throughout the process.²¹ In our case, the wine used in LG acetification was rich in residual sugars while the MG wine was dry and presented a higher content of ethanol, which could explain the MG acetification problems.

Table 1. Comparison of acetification rate ($R \pm SD$; g acetic acid/L * day) considering different woods and thicknesses in both vinegar plants

Wood	Thickness (mm)	Vinegar Plant	
		LG	MG
ACACIA	15	1.03 ± 0.06^a	0.47 ± 0.07^c
	20	1.46 ± 0.06^{ab}	0.47 ± 0.04^{bc}
	25	1.29 ± 0.00^b	0.59 ± 0.09^c
CHESTNUT	15	0.82 ± 0.06	0.60 ± 0.07^c
	20	1.00 ± 0.16	0.56 ± 0.00^c
	25	1.14 ± 0.14	0.53 ± 0.02^c
CHERRY	15	0.84 ± 0.06	0.54 ± 0.02^c
	20	0.89 ± 0.06	0.54 ± 0.05^{bc}
	25	1.24 ± 0.22^b	0.64 ± 0.04^c
OAK	15	0.89 ± 0.06	0.59 ± 0.07^c
	20	1.03 ± 0.06^a	0.66 ± 0.05^c
	25	0.76 ± 0.09	0.61 ± 0.07

Notes: ^aSignificant differences due to the wood thickness using 25 mm as control;

^bSignificant differences due to the wood type using oak as control;

^cSignificant differences due to the vinegar plant using LG as control

Abbreviations: LG, LaGuinelle, MG, Mas d'en Gil; SD, standard desviation.

Acetification at MG, which was slower, presented no differences based on wood type or thickness whereas the same process done at LG, which resulted in faster acetification, presented some clear differences according to wood type and thickness. One possible explanation might be related to the ethanol transformation rate. In theory, for faster acetification to occur more oxygen is required over a short time, and different strains have different oxygen needs. Therefore, we hypothesized that in slow acetification, where a slow conversion of ethanol into acetic acid occurred, AAB oxygen needs were covered by atmospheric oxygen and therefore no differences were observed based on wood porosity, as in the case of the MG acetification. However, when rapid acetification occurred, this fast transformation of ethanol into acetic acid required more oxygen, which became the limiting substrate. Therefore, the amount of oxygen provided through the barrel could account for differences in acetification. Thus, in these cases, wood porosity may determine the time needed to complete the acetification process when the conversion of ethanol into acetic acid is suitably efficient. In fact, the concentration of dissolved oxygen throughout the process was minimal in all

acetification (0.04–0.09 mg/mL), except during the stuck acetifications where an accumulation of oxygen was detected (0.96–2.34 mg/mL). This indicates that while AAB was active, all the oxygen was being used for vinegar production and AAB development.

Focusing on the LG results, we were surprised that reducing the thickness of the wood barrel did not improve the process in any case and even had a negative effect on the acetification rate and process duration. The explanation for why in these conditions a thicker barrel was better is completely unknown, and with our results attempting to explain why reduced thickness did not improve the acetification process would be too speculative.

On the other hand, the effect of wood type was consistent with its porosity. In fact, it is known that oxygen diffusion through wood is higher in less compact woods¹⁴ such as acacia and chestnut. In the case of the 25 mm casks, the control for thickness, the worst wood was oak, so the choice of the wood for vinegar-aging barrels must be a compromise between increased porosity to accelerate the process and the effect that the wood has on vinegar quality.

In this study, we tested two variables related to increasing oxygenation during the vinegar production process. Although the type of wood in which the product was aged seemed to have more importance than the thickness of the barrel, perhaps the best solution is to increase the surface/volume ratio, thereby increasing the contact between AAB and atmospheric oxygen, since the amount of oxygen provided through the barrel seems to be limited.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful for financial assistance from the Spanish Government (Project AGL2007-66417-C02-02) and the European Commission (Project WINEGAR, Cooperative Research under the Sixth Framework Programme of the European Community, 2005–2007). We thank the Language Service of the Rovira i Virgili University for revising the manuscript.

DISCLOSURE

The authors report no conflicts of interest in this work.

REFERENCES

1. Llaguno C. Antecedentes históricos. In: Llaguno C, Polo MC, editors. *El vinagre de vino*. Madrid, Spain: CSIC; 1991; p. 1–23.
2. Adams MR. Vinegars. In: Wood BJB, editor. *Microbiology of fermentated foods*. 2nd ed. London, UK: Thomson Science; 1998. p. 1–44.
3. Tesfaye W, Morales ML, García-Parrilla MC, Troncoso AM. Wine vinegar: technology, authenticity and quality evaluation. *Trends Food Sci Technol*. 2002;13(1):12–21.
4. Mas A, Torija MJ, González A, Poblet M, Guillamón JM. Acetic acid bacteria in oenology. *Contributions to Science*. 2007;3(4):511–521.
5. Caligiani A, Silva G, Palla G. Determination of 2,3-butanediol and 2-hydroxybutanone stereoisomers in batteries of tradicional Balsamic vinegar. *J Agric Food Chem*. 2007;55:7810–7815.
6. Gonzáles-Viñas MA, Salvador MD, Cabezudo MD. Taste group thresholds and sensory evaluation of Spanish wine vinegars. *J Sens Stud*. 1996;11:129–140.
7. Tesfaye W, Morales ML, Benítez B, García-Parrilla MC, Troncoso AM. Evolution of wine vinegar composition during accelerated aging with oak chips. *Anal Chim Acta*. 2004;513:239–245.
8. Waterhouse AL, Towey JP. Oak lactone isomer ratio distinguishes between wines fermented in American and French oak barrels. *J Agric Food Chem*. 1994;42:1971–1974.
9. Spillman PJ, Pollnitz AP, Liacopoulos D, Skouroumounis GK, Sefton MA. Accumulation of vanillin during barrel aging of white, red and model wines. *J Agric Food Chem*. 1997;45:2584–2589.
10. Sauvageot F, Feuillat F. The influence of oak wood (*Quercus robur* L., *Q. petraea* Liebl.) on the flavor of Burgundy Pinot noir. An examination of variation among individual trees. *Am J Enol Vitic*. 2000;50:447–455.
11. Fernández de Simón B, Cadahía E, Galocha J. Volatile compounds in a Spanish red wine aged in barrels made of Spanish, French, and American oak wood. *J Agric Food Chem*. 2003;51:7671–7678.
12. Ortega-Heras M, González-Huerta C, Herrera P, González-Sanjosé ML. Changes in wine volatile compounds of varietal wines during ageing in wood barrels. *Anal Chim Acta*. 2004;513:341–350.
13. Arfelli G, Santini E, Corzani C, Fabiani A, Natali N. Impact of wooden barrel storage on the volatile composition and sensorial profile of red wine. *Food Sci Technol Int*. 2007;13(4):293–299.
14. Ribéreau-Gayon P, Dubourdieu D, Donèche B, Lonvaud A. *Handbook of Enology. The microbiology of wine and vinifications*. West Sussex, England: Wiley; 2000.p. 183–192.

15. Morales ML, Tesfaye W, García-Parrilla MC, Casas JA, Troncoso AM. Evolution of the aroma profile of Sherry wine vinegars during an experimental aging in wood. *J Agric Food Chem.* 2002; 50(11):3173–3178.
16. Callejón RM, Tesfaye W, Torija MJ, Mas A, Troncoso AM, Morales ML. Volatile compounds in red wine vinegars obtained by submerged and surface acetification in different woods. *Food Chem.* 2009;113:1252–1259.
17. Singleton VL. Maturation of wines and spirits: comparisons, facts, and hypotheses. *Am J Enol Vitic.* 1995;46(1):98–115.
18. Hernández T, Estrella I, Dueñas M, Fernández de Simón B, Cadahía E. Influence of wood origin in the polyphenolic composition of a Spanish red wine aging in bottle, after storage in barrels of Spanish, French and American oak wood. *Eur Food Res Technol.* 2007;224:695–705.
19. Joyeux A, Lafon-Lafourcade S, Ribéreau-Gayon P. Evolution of acetic acid bacteria during fermentation and storage of wine. *Appl Environ Microbiol.* 1984;48(1):153–156.
20. De Ley J, Gosselé F, Swings J. Genus I. *Acetobacter*. In: Kreig NR, Holt JC, editors. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 1. Maryland: Williams and Wilkens; 1984. p. 268–274.
21. Callejón RM, Tesfaye W, Torija MJ, Mas A, Troncoso AM, Morales ML. HPLC determination of amino acids with AQC derivatization in vinegars along submerged and surface acetifications and its relation to the microbiota. *Eur Food Res Technol.* 2008;227:93–102.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
APLICACIÓN DE MÉTODOS MOLECULARES PARA EL ESTUDIO DE LAS BACTERIAS ACÉTICAS IMPLICADAS EN LA ELABORACIÓN
DE VINAGRE DE VINO TRADICIONAL
Carlos Alfredo Vegas Pérez
ISBN:/DL: T.1216-2011

Segundo capítulo

Estudio de la dinámica poblacional de bacterias acéticas durante la producción de vinagre de vino por el método tradicional

Population dynamics of acetic acid bacteria during traditional wine vinegar
production

Carlos Vegas, Estibaliz Mateo, Ángel González, Carla Jara, José Manuel Guillamón, Montse Poblet,
María Jesús Torija, Albert Mas

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
APLICACIÓN DE MÉTODOS MOLECULARES PARA EL ESTUDIO DE LAS BACTERIAS ACÉTICAS IMPLICADAS EN LA ELABORACIÓN
DE VINAGRE DE VINO TRADICIONAL
Carlos Alfredo Vegas Pérez
ISBN:/DL: T.1216-2011

ABSTRACT

The population dynamics of acetic acid bacteria in traditional vinegar production was determined in two independent vinegar plants at both the species and strain level. The effect of barrels made of four different woods upon the population dynamics was also determined. Acetic acid bacteria were isolated on solid media and the species were identified by RFLP-PCR of 16S rRNA genes and confirmed by 16S rRNA gene sequencing, while strains were typed by ERIC-PCR and (GTG)₅-rep-PCR. The most widely isolated species was *Acetobacter pasteurianus*, which accounted for 100% of all the isolates during most of the acetification. *Gluconacetobacter europaeus* only appeared at any notable level at the end of the process in oak barrels from one vinegar plant. The various *A. pasteurianus* strains showed a clear succession as the concentration of acetic acid increased. In both vinegar plants the relative dominance of different strains was modified as the concentrations of acetic acid increased, and strain diversity tended to reduce at the end of the process.

Keywords: *Acetobacter pasteurianus*, *Gluconacetobacter europaeus*, Oak, Cherry, Acacia, Chestnut

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
APLICACIÓN DE MÉTODOS MOLECULARES PARA EL ESTUDIO DE LAS BACTERIAS ACÉTICAS IMPLICADAS EN LA ELABORACIÓN
DE VINAGRE DE VINO TRADICIONAL
Carlos Alfredo Vegas Pérez
ISBN:/DL: T.1216-2011

INTRODUCTION

Known by most ancient civilizations, wine vinegar was considered to be a food by-product of wine and it was mainly produced in Mediterranean countries with an oenological tradition (Tesfaye et al., 2002). Wine vinegar can be obtained by two well defined methods: the traditional and the submerged. In the latter, acetic acid bacteria (AAB) are submerged in the liquid and oxygen is constantly added.

This vinegar is produced in a short time (24–48 h) and is of lower quality than that produced by the surface culture method, which is also known as traditional vinegar. This method involves AAB growing on the air–liquid interface in direct contact with atmospheric air (oxygen). Therefore, a considerable amount of time has to pass before the acetic acid degree is high. This method allows not only simultaneous acetification and ageing, but also metabolic by-products from AAB that increase the sensorial complexity of the vinegar (Tesfaye et al., 2002). The resulting vinegar, then, is of high quality, but as production time is lengthy, the cost is also high.

Traditional wine vinegar is obtained by spontaneous wine acetification in which ethanol, initially produced by yeast is oxidized to acetic acid by AAB (De Ley et al., 1984). This process is carried out in wood barrels and usually started by the “seed vinegar”, also called “mother of vinegar”, an undefined starter culture obtained from previous vinegar.

In fact, few ecological studies of AAB in vinegars have been made, and those were mainly focused on industrial vinegars (Schüller et al., 2000; Sokollek et al., 1998), persimmon vinegar (Jin-Nam et al., 2005), rice vinegar (Haruta et al., 2006; Nanda et al., 2001), wine vinegar (Ilabaca et al., 2008) and traditional balsamic vinegar (De Vero et al., 2006; Gullo et al., 2006, 2009). These studies relate the presence of *Acetobacter pasteurianus* to the production of vinegars with a low acetic acid content (Haruta et al., 2006; Ilabaca et al., 2008; Nanda et al., 2001) and the presence of *Gluconacetobacter* species (*Gluconacetobacter xylinus*, *Gluconacetobacter europaeus*, *Gluconacetobacter oboediens* and *Gluconacetobacter intermedius*) to high acidity industrial vinegars (Schüller et al., 2000; Sokollek et al., 1998). In traditional balsamic vinegar, which can be considered to be amid-acidity vinegar, *A. pasteurianus*, *Ga. europaeus* and *Ga. xylinus* are the main species (De Vero et al., 2006; Gullo et al., 2006, 2009).

The fundamental limitation of ecological studies is that AAB are difficult to isolate, cultivate and maintain in pure culture. This is especially true of those strains isolated from sources with a high

concentration of acetic acid (Entani et al., 1985; Gullo et al., 2006) since they adapt to the extreme media and are therefore difficult to recover on culture plates (Millet and Lonvaud-Funel, 2000; Sievers et al., 1992; Sokollek et al., 1998; Trcek, 2005). This means that there are significant differences between enumeration by plating and enumeration by microscopy (Ilabaca et al., 2008; Mesa et al., 2003).

These culturability problems have been associated to the absence of a suitable culture medium and the existence of a “viable but non culturable” state (VBNC) (Fleet, 1999; Giraffa and Neviani, 2001; Millet and Lonvaud-Funel, 2000). An additional problem is that in these media AAB occur in pairs, chains or aggregates, which probably represent a single colony when plating. One way of getting round this limitation is to use culture-independent methods (De Vero et al., 2006; González et al., 2006a). However, culturing is still essential if vinegar microbiota is to be further identified and characterised at the strain level.

One of the biggest hurdles for studying AAB has been the lack of quick and reliable methods needed for routine analysis in ecological studies. During the last ten years, quick and easy molecular biology methods that are based on the phylogenetic relationships between AAB have been developed. Polymorphisms of both ribosomal genes and their spacers have been used for characterisation at the species level using RFLP-PCR techniques (González et al., 2006b; Gullo et al., 2006; Ruiz et al., 2000; Sievers et al., 1996; Trcek and Teuber, 2002).

However, in vinegar production, as in any fermentation industry, strain identification is critical and methods for strain typing have been developed for AAB. Several PCR techniques have been proposed for typing AAB strains: Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus-PCR (ERIC-PCR; González et al., 2004; Gullo et al., 2009; Nanda et al., 2001; Versalovic et al., 1991) and Repetitive Extragenic Palindromic-PCR (REP-PCR; González et al., 2004), (GTG)₅-rep-PCR fingerprinting (De Vuyst et al., 2008; Gevers et al., 2001; Versalovic et al., 1994) and RAPD-PCR (Bartowsky et al., 2003; Prieto et al., 2007).

The aim of the present study was to make an in-depth analysis of the evolution of the population of AAB during traditional wine vinegar production. The process was followed in two independent vinegar plants, which had different backgrounds of vinegar production and produced different vinegars (from sweet or dry wine). The production process was performed in barrels made of four different types of wood in order to analyse the possible effect of the woods and the different porosity on the evolution of the AAB population. AAB were analysed at the species level by the

RFLP-PCR 16S rRNA gene (González et al., 2006b; Ruiz et al., 2000) and typed at the strain level by ERIC-PCR (González et al., 2004; Versalovic et al., 1991) and (GTG)₅-rep-PCR methods (Versalovic et al., 1994).

MATERIALS AND METHODS

Acetification conditions and sampling

The study was conducted in two vinegar plants: Viticultors Mas d'en Gil (P, Bellmunt del Priorat, Tarragona, Spain) and La Guinelle (B, Banyuls, France). The two plants were different in terms of the characteristics of the wine produced, the climate and the period of time they had been in operation. P used dry wine in its production process whereas B used sweet wine (70 g residual sugar/L). P was housed in a relatively cold, closed building whereas B was in the open air and subject to dramatic changes in temperature. Finally, B had been producing vinegar for five years prior to the study, whereas P was new and had only been in operation for a year.

The barrels were constructed by Boteria Torner (Barcelona, Spain) and specifically designed for this experiment. Briefly, they had the typical design of 60 L barrels and were made of different woods: acacia, chestnut, cherry and oak (which was used as a control). All the barrels had a broad top hole, which was covered by a cloth to prevent insects, dust, etc. from inadvertently getting in.

The acetifications in both vinegar plants started in August 2005. The mother of vinegar was produced using the two plants' own vinegars mixed with wine and water in a proportion of 25:50:25 in a plastic container (P) or a wood barrel (B). This mother of vinegar (10%) mixed with diluted wine was the initial mixture for the acetification process. Barrels were filled with 40 L of the initial mixture, leaving an air chamber of 20 L. The acetifications were carried out in triplicate for each type of wood.

For the microbiological study, samples were taken at different moments during the acetification: initial mixture (T₀), 2% (w/v) acidity (T₁), 4% (w/v) acidity (T₂) and 6% (w/v) acidity (T₃). Samples of the mother of vinegar and wine were also analysed.

Chemical analysis

The acetifications in both vinegar plants were carried out at room temperature. The dissolved oxygen, temperature, pH and the concentration of ethanol, acetic acid, and residual sugars were analysed throughout the process (in the samples mentioned above).

Temperature and dissolved oxygen were measured using a LDO™ HQ10 Portable Dissolved Oxygen Meter (HACH Company, Colorado, USA). Total titratable acidity (which was mostly due to acetic acid) was determined by titration with 0.1 N NaOH and phenolphthalein as the indicator (Ough and Amerine, 1987). Ethanol and residual sugars (glucose and fructose) were measured with enzymatic kits (Boehringer, Mannheim, Germany). Free and total sulphur dioxide was determined by the Ripper Method (García Barceló, 1990).

Enumeration of AAB

Total AAB cells were counted by light microscopy using a Neubauer improved counting chamber (0.0025mm² and 0.02 mm deep). AAB were isolated by plating diluted samples on GY (1% yeast extract; 5% glucose; 1.5% Agar) supplemented with natamycin (100 mg/L) (Delvocid, DSM; Delft; The Netherlands) with an automatic spiral platter (WASP II. DonWhitley Scientific Limited, England). After incubation at 28 °C for 4–7 days, ten colonies were randomly isolated at each point and plated on GYC (10% glucose, 1% yeast extract, 2% CaCO₃, 1.5% Agar). The production of acid was tested by the dissolution of CaCO₃ precipitates on the plates.

Identification of AAB

Total DNA was extracted by the CTAB method (Cetyltrimethylammonium bromide) described by Ausubel et al. (1992).

AAB species grouping by the RFLP-PCR 16S rRNA gene

The 16S rRNA gene was amplified using the method described by Ruiz et al. (2000). Primers were designed on the basis of conserved regions of the 5'-end (16Sd, 5'-GCTGGCGGCATGCTTAACACAT-3') and the 3'-end (16Sr, 5'-GGAGGTGATCCAGCCGCAGGT-3') of the 16S rRNA gene (Ruiz et al., 2000). The reactions were carried out in the Gene Amp PCR System 2700 (Applied Biosystems, Foster City, USA). In all cases, amplified DNA was detected by electrophoresis on a 1.0% (w/v) agarose gel in TBE buffer. The gels were stained with ethidium bromide and photographed. The amplified products were digested with two restriction enzymes: *TaqI* and *AluI* (González et al., 2006b; Ruiz et al., 2000). Additionally, the *BccI* restriction enzyme was used to differentiate between the

Gluconacetobacter hansenii, *Ga. europaeus* and *Ga. xylinus* species (Torija et al., 2010). Restriction fragments generated by *TaqI*, *AluI* and *BccI* were detected by 3% (w/v) agarose electrophoresis gel. Lengths of amplification products and restriction fragments were detected by comparison with a VC 100 bp Plus DNA ladder (M_1 ; Vivantis Technologies Sdn.Bhd, Selangor D.E., Malaysia). The patterns obtained were then compared with patterns reported by Ruiz et al. (2000) and González et al. (2006b).

In order to confirm the results obtained by RFLP-PCR, the 16S rRNA gene amplicons of some representative clones of each species grouping were purified and sequenced by Macrogen Inc. facilities (Seoul, South Korea) using an ABI3730 XL automatic DNA sequencer. The sequences obtained were compared with those in the GenBank databases.

AAB typing

For AAB characterization, we used the ERIC-PCR (Versalovic et al., 1991) and the (GTG)₅-rep-PCR fingerprinting technique (Gevers et al., 2001; Versalovic et al., 1994).

For the ERIC-PCR, the primers used were ERIC1R: ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC and ERIC2: AAGTAAGTGAAGTGGGGTGAGCG and for (GTG)₅-rep-PCR only one primer was used (5'-GTGGTGGTGGTGGTGGTGGT-3'). The reactions were carried out in Gene Amp PCR System 2700 (Applied Biosystems, Foster City, USA). ERIC and (GTG)₅ amplification products were detected by electrophoresis gels on a 1.5% and 0.8% agarose (w/v), respectively. In both cases, pattern band lengths were determined by comparison with M_1 (abovementioned) for the smallest bands and by the mixture of λ phage DNA digested with *HindIII*-*EcoRI* and *HindIII* (M_2 ; Boehringer Mannheim) for the largest bands. The gels were stained with ethidium bromide and photographed.

In order to determine the number of profiles obtained in this study, similar profiles in agarose gels were compared by a Bionalyzer Agilent 2100 (Agilent Technologies, Böblingen, Germany) using the 7500 Labchip. The DNA sample size was estimated by comparison with external standards (DNA sizing ladder) and internal standards (DNA markers), an accurate and reproducible method (Nachamkin et al., 2001; Panaro et al., 2000) that made comparison between profiles more precise and reliable.

Strain biodiversity was calculated using Simpson's index, which shows the probability that two randomly selected isolates are the same strain. Biodiversity was calculated as $1 - \sum p_i^2$, where p_i is the number of same strain isolates divided by the total number of isolates.

RESULTS

Starting wine and mother culture

The characteristics of the wines used for the vinegar production were significantly different (Table 1). The wine used in B was a sweet fortified wine with a considerable amount of reducing sugars, mostly fructose. The wine used in P, however, was a dry wine with ca. 1 g residual sugar per litre, also mostly in the form of fructose. Both wines presented similar levels of free SO₂, although the sweet wine used in B contained more sulphite to prevent spoilage.

The mixtures (T₀) from both cellars were set at similar acetic acid levels: that is, slightly less than 1% (w/v). Sugar and ethanol levels from the two cellars were different because of the starting wine characteristics and mother cultures.

Acetification

Acetifications were considered to have finished when they reached 6% (w/v) acetic acid (Table 1). Both the acetic acid levels and pH values were the same in the two plants. The levels of dissolved oxygen, throughout the process, were very low and no differences were detected between woods. Ethanol reduction was similar in both plants (6.2–6.4%, v/v) and the approximate transformation value was 1 g ethanol per 1 g acetic acid. Ageing in barrels brought the ethanol levels to below 1% (v/v) (results not shown).

Table 1. Chemical analysis of starting wines, mother cultures (MC), initial mixture (T₀) and final vinegar (6% (w/v), T₃)

Samples	Total titratable acidity (% w/v)	Residual sugars (g/L)		Ethanol concentration (% v/v)	pH	SO ₂ (mg/L)	
		Glucose	Fructose			Free SO ₂	Total SO ₂
BANYULS (B) Wine	0.6	27.21	57.90	14.86	3.56	13	35
MC	6	26.34	46.86	2.56	2.64	-	-
T ₀	0.9	20.90	43.38	9.62	3.37	5	9
T ₃ ^a	6,33±0,59	19,07±0,78	41,12±0,72	3,47±1,20	2,85±0,03	-	-
PRIORAT (P) Wine	0.45	0.34	0.75	13.30	3.22	9	18
MC	3.3	0.46	0.92	4.20	3.08	-	-
T ₀	0.9	0.35	0.78	11.34	3.26	6	12
T ₃ ^a	6,11±0,29	0,34 ±0,67	0,76±0,70	4,81±0,69	2,84±0,05	-	-

-, not analyzed

^aT₃ is the average of the 12 acetifications ± standard deviation.

The acetifications in plant B finished in a period between 49 and 76 days and the acetification rate was maintained throughout the period (Fig. 1). The acetifications in P clearly had two phases. The

first phase, with active acetification, finished at 4.5% (w/v) acetic acid in approximately 100 days, whereas the second phase was characterised by a stuck acetification, which meant that it took up to 272 days to reach 6% (w/v) acetic acid. Part of this effect could be attributed to cold winter conditions, which together with the plant's poor insulation and lack of temperature control yielded average temperatures below 15 °C for 5 months.

Microbial analysis

The bacterial counts were performed by both microscopy and plating. The starting wines presented bacterial populations ranging from 10^6 (B) to 10^7 cells/mL (P) by microscope counting, but recovery from the plates was very poor. None of the colonies grown on plates showed the formation of a clear halo around the colony and they were not identified as AAB. The mother cultures had populations of 10^8 (B) and 10^7 cells/mL (P), and yielded a starting mixture culture of 3×10^7 (B) and 5×10^7 cells/mL (P). As soon as acetification started, the population size remained constant at about $7-9 \times 10^7$ (B) and $1-2 \times 10^8$ cells/mL (P) according to the optical microscope counts. However, when plated in GY medium the population recovery was in the range 10^4 to 10^5 CFU/mL. Thus, a considerable reduction was observed and the colonies recovered were further analysed for AAB identification and typing.

Identification of AAB species

During acetification a total of 349 and 395 colonies were isolated from B and P, respectively. All the colonies were analysed although only some of them produce a clear halo when grown on GYC medium: in this case, 262 and 308 in B and P, respectively. All the halo-forming colonies were Gram-negative and identified as AAB, but the non-halo-forming colonies were identified by molecular methods as other non-AAB species (data not shown).

Species were identified after restriction analysis of the 16S rRNA gene amplicons and compared to those of the type strains. Once they had been associated to a species pattern, this same region was sequenced in several representative colonies of each species. In all cases the sequences confirmed the species level identification made by RFLP-PCR.

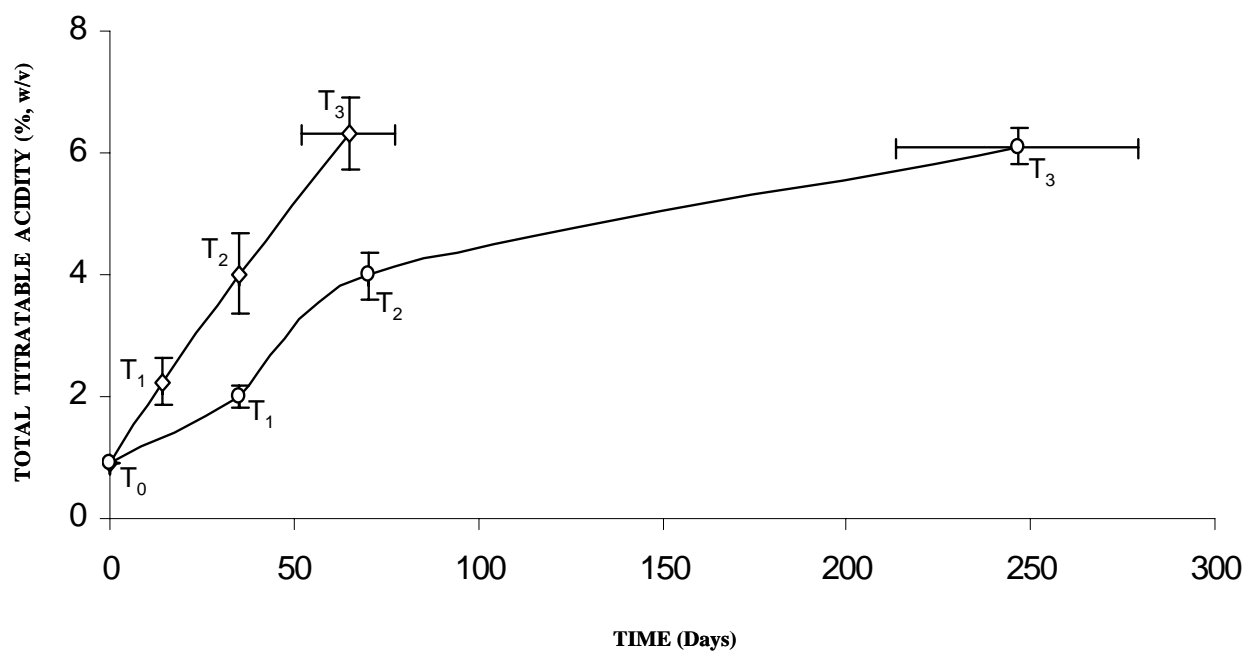


Fig. 1. Progression of the acetification process in the Banyuls (◊) and Priorat (○) vinegar plants

No AAB were isolated from the starting wines. Two different species were isolated from the two mother cultures: *A. pasteurianus* and *Ga. europaeus* from B, and *A. pasteurianus* and *Ga. xylinus* from P. However, in the mix with wine (T₀) all the colonies recovered in B were of the *A. pasteurianus* species and in P they were of three different species: *A. pasteurianus*, *Gluconobacter oxydans* and *Ga. europaeus* (Table 2).

During acetification (samples taken at times T₁, T₂ and T₃) *A. pasteurianus* was the only species to be recovered in P and the main one recovered in B. *Ga. europaeus* was found at the end of one acetification only in B. This species was the only one to be found in one of the oak triplicates where the acetification had been delayed (by 76 days). This would explain the delay in the process (49 days was the average length of acetification in B).

AAB typing

Both ERIC-PCR and (GTG)₅-rep-PCR were used for typing at the strain level (Fig. 2). The results of both techniques were similar, although ERIC-PCR yielded slightly higher polymorphism. All the strains sharing the same pattern in ERIC-PCR also had the same pattern in (GTG)₅-rep-PCR, yet the opposite was not always true.

In B samples, up to 27 different electrophoretic patterns were clearly identifiable (Table 2). In the mother culture and during the subsequent acetification process a single *A. pasteurianus* strain (Bp1) was clearly predominant (always more than 50% of the total number of colonies recovered). Surprisingly, this strain was not recovered in the final vinegar, in which the main strain was Bp16 (the percentage of which increased as the acetification progressed). Other minor *A. pasteurianus* were recovered during the acetification, especially in the intermediate stages (T₁ and T₂) when the number of strains was at its highest. However, the strain diversity was lower than in T₃ as many of these strains were found in very low percentages (<5%). Only two strains of other species were isolated, both of which belonged to *Ga. europaeus*. These strains were identified in the mother culture (Be2) and in one of the oak triplicates where *Ga. europaeus* took over the acetification.

The type of wood can influence the recovery of strains, especially the minor strains (Fig. 3). For instance, Bp10 was only recovered in chestnut and cherry barrels, whereas Bp6 was the main strain in oak and was seldom found in cherry barrels. Some other strains seem to be wood specific: for example, Bp22 in cherry, Be23 in oak, Bp24 in acacia and Bp12 in chestnut barrels.

Table 2. Species and strain identification of AAB during acetification

Samples	Number of isolates studied	Number of different	Species (%)	Strains (%)	Strain biodiversity Simpson's index
BANYULS (B) MC	12	2	92% <i>A. pasteurianus</i> 8% <i>Ga. europaeus</i>	Bp1 (92%) Be2 (8%)	0.15
T ₀	20	2	100% <i>A. pasteurianus</i>	Bp1 (95%), Bp3 (5%)	0.10
T ₁	70	12	100% <i>A. pasteurianus</i>	Bp1 (55%), Bp10 (20%), Bp12 (9%), Bp6 (6%), Bp7 (3%), Bp4/Bp5/Bp8/Bp9/Bp11/Bp13/Bp14 (1% every one)	0.64
T ₂	72	11	100% <i>A. pasteurianus</i>	Bp1 (65%), Bp6 (10%), Bp5 (7%), Bp18 (6%), Bp16 (4%), Bp7 (3%), Bp15/Bp17/Bp19/Bp20/Bp21 (1% every one)	0.56
T ₃	88	9	89% <i>A. pasteurianus</i> 11% <i>Ga. europaeus</i>	Bp16 (51%), Bp22 (14%), Bp6 (11%), Bp24 (10%), Bp25/Bp26/Bp27 (1% every one) Be23 (8%), Be2 (3%)	0.69
PRIORAT (P) MC	11	4	82% <i>A. pasteurianus</i> 18% <i>Ga. xylinus</i>	Pp4 (36%), Pp2 (28%), Pp1 (18%) Px3 (18%)	0.73
T ₀	12	3	50% <i>A. pasteurianus</i> 42% <i>G. oxydans</i> 8% <i>Ga. europaeus</i>	Pp1 (50%) Po5 (42%) Pe6 (8%)	0.57
T ₁	83	6	100% <i>A. pasteurianus</i>	Pp7 (64%), Pp4 (24%), Pp10 (9%), Pp8/Pp9/Pp11 (1% every one)	0.52
T ₂	94	5	100% <i>A. pasteurianus</i>	Pp4 (96%), Pp12/Pp13/Pp14/Pp15 (1% every one)	0.08
T ₃	108	2	100% <i>A. pasteurianus</i>	Pp16 (82%), Pp17 (18%)	0.30

MC: Mother culture; T₀: Initial mixture; T₁: 2% (w/v) acidity; T₂: 4% (w/v) acidity; T₃: 6% (w/v) acidity.

In P there were fewer different strains (17) (Table 2) and the points with the most different strains were the same as in B. However, in this case, the diversity was greatest at the beginning of the process due to the dominance of two strains (Pp4 and Pp16) at the end of acetification. In this

vinegar plant, a succession of *A. pasteurianus* strains was clearly observed: Pp7 was the main strain at the beginning of acetification; Pp4 was predominant in the middle, and Pp16 was found exclusively at the end.

The effect of wood type in P was very limited: the main strains mentioned above were over 90% of those found in cherry, chestnut and oak barrels (Fig. 3). In acacia barrels Pp7 was absent so the two remaining main strains were almost 80% of the total. Only one other strain (Pp17) was found in a significant percentage (18%).

Finally, diversity was higher in the older vinegar plant (B) than in the more modern one (P), especially during acetification (Table 2). This is particularly important when it is taken into account that the number of colonies recovered was generally higher in plant P.

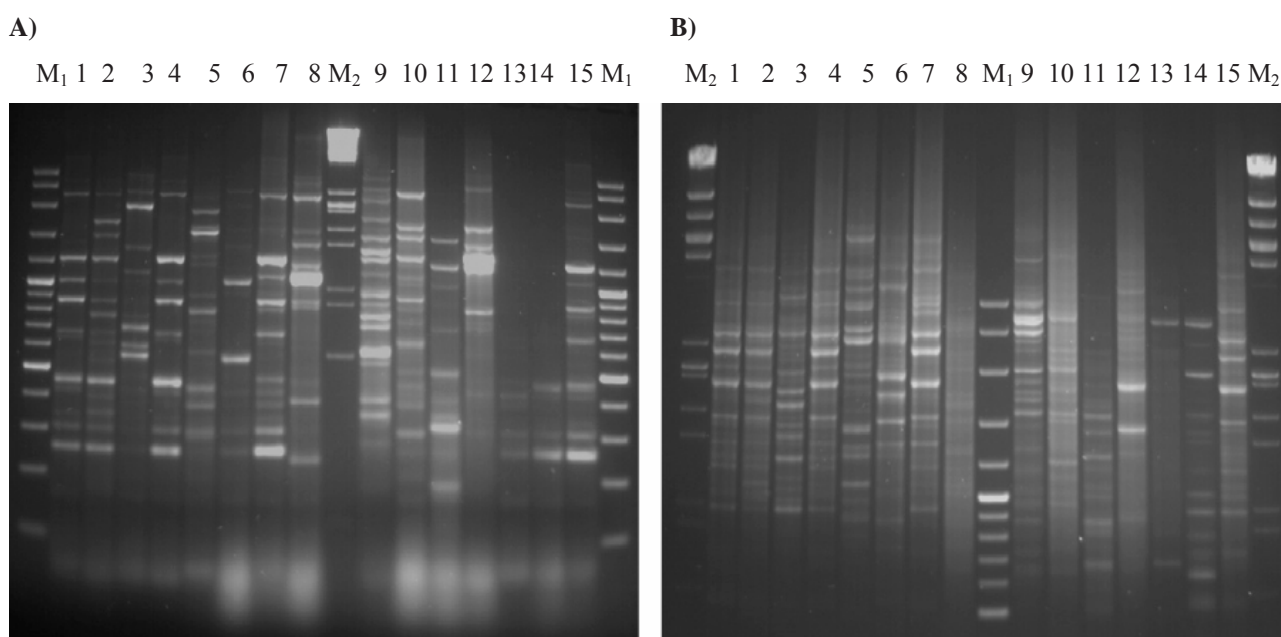


Fig. 2. Electrophoretic patterns of different AAB Priorat strains. (A) ERIC-PCR (B) (GTG)₅-rep-PCR. The same 15 AAB strains were analyzed by both techniques (Lanes: 1: Pp1; 2: Pp2; 3: Px3; 4: Pp4; 5: Po5; 6: Pe6; 7: Pp7; 8: Pp8; 9: Pp9; 10: Pp10; 11: Pp12; 12: Pp13; 13: Pp14; 14: Pp16; 15: Pp17). M₁ and M₂ refer to molecular size markers.

DISCUSSION

In this study, we aimed to analyse the AAB population dynamics during traditional vinegar production in two independent vinegar plants. Basically, the main differences between them were the length of time they had been operating (P was new whereas B had been producing continuously

and intensively for five years), the starting wine (P was dry and B sweet and more sulphited) and exposure to changes in the weather (considerable in B as it operated in the open air, and more limited in P, which was in a building with poor insulation and generally colder). Both plants were provided with new barrels made from four different woods so that the effect of wood on the succession of microbiota could be analysed. In both cases we started with a new wine and for inoculation we used a mother of vinegar prepared from the vinegar available at each plant. The concentration of residual sugars did not change throughout the acetifications, which confirmed a preference for ethanol as the carbon source of the AAB present in vinegar. The effect of wood on the progress of acetification was slight and it has been reported elsewhere (Torija et al., 2009).

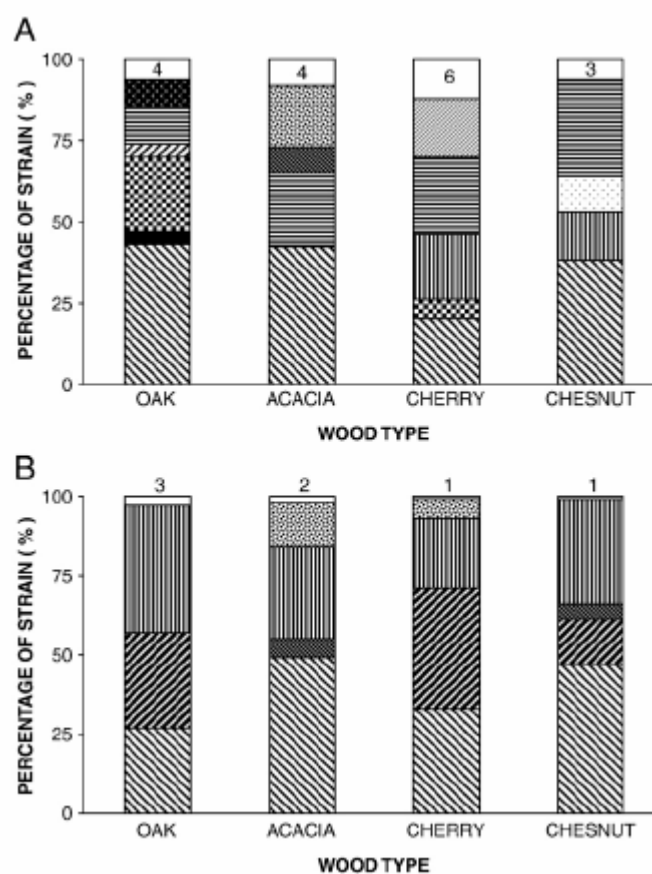


Fig. 3. Percentages of the different strains isolated in both vinegar plants in the barrels made with different woods. A) Banyuls: ▨ Bp1, ■ Be2, ▩ Bp6, ▧ Bp7, ▨ Bp10, ▨ Bp12, ▨ Bp16, ▨ Bp18, ▨ Bp22, ▨ Be23, ▨ Bp24, □ OTHERS (The number on top of the bars represents the number of different minor AAB strains). B) Priorat: ▨ Pp4, ▨ Pp7, ▨ Pp10, ▨ Pp16, ▨ Pp17, □ OTHERS (As in A).

Although the wines were contaminated with bacteria, easily visible under the microscope, no AAB colonies were recovered on plates. It is well known that it is difficult to culture AAB from wine (Bartowsky et al., 2003; Millet and Lonvaud-Funel, 2000), but it is even more difficult from vinegar

(Entani et al., 1985; González et al., 2006a; Ilabaca et al., 2008; Sievers et al., 1992; Sokollek et al., 1998; Trcek, 2005). The recovery of AAB from wine depends on SO₂ levels (Du Toit et al., 2005) and the length of fermentation or ageing (Millet and Lonvaud-Funel, 2000), which we could not control in our samples. Furthermore, not all the media support growth equally and they are selective for one strain or another (Gullo et al., 2006). GYC was proposed as a medium that enabled most strains to be recovered in traditional vinegars (Gullo et al., 2006) and it was therefore chosen as the preferred medium. However, in a liquid medium such as wine with high alcohol content, the presence of free SO₂ and the low availability of oxygen subject the microorganisms to serious stress and they probably need some recovery before they can grow on a solid medium with a different carbon source. In fact, oxygen enrichment has been proposed as a way of improving culturability, or of putting an end to the Viable But Not Culturable (VBNC) status (Millet and Lonvaud-Funel, 2000). AAB are fastidious microorganisms because their ability to grow is easily impaired when they are placed in a different medium, probably because of their metabolic activity. As a consequence, ecological studies of AAB are always difficult and often biased because of this inability of much of the population to grow on a culture plate. Although the colonies recovered are only part of the total population, it must be taken into account that they are the most metabolically flexible (and probably the most active) strains. Thus, those AAB strains that are able to grow on solid media may have greater metabolic fitness. The halo formation that is one of the basic characteristics that associates a given colony to the AAB group (Cleenwerck and De Vos, 2008) was not produced in 20–25% of the colonies recovered in this study. Although it is also well known that most AAB lose their ability to produce acetic acid when plated (Sievers and Teuber, 1995), this is not our case, as none of the non-haloforming colonies were identified as AAB.

In both vinegar plants, either the mother of vinegar or the starting cultures for vinegar production contained not only several strains but also different species, as has already been recognised in several studies (Gullo et al., 2006; Sokollek et al., 1998). The species enrichment that was observed in P after the wine and the mother of vinegar had been mixed could be related to the aeration that occurred during the mixing, which might facilitate the recovery of some species that would otherwise be in a VBNC status (Millet and Lonvaud-Funel, 2000). However, the recovery of *G. oxydans* was unexpected as it has been reported that it is absent from or scarcely present in final wines or vinegars (Drysdale and Fleet, 1988; González et al., 2005; Joyeux et al., 1984).

The main species throughout the process in both vinegar plants was *A. pasteurianus* as has also been mentioned in a previous study in traditional wine vinegar (Ilabaca et al., 2008) and rice vinegar production (Haruta et al., 2006; Nanda et al., 2001). The common feature of the production

of these traditional vinegars is the concentration of acetic acid, which is low (4–7% w/v). In submerged vinegar production, on the other hand, the acetic acid concentration can be much higher (up to 15–20%). In this case, the AAB recovered mostly belong to the genus *Gluconacetobacter*: *Ga. europaeus* (Callejón et al., 2008; Sievers et al., 1992; Trcek et al., 2000), *Gluconacetobacter entanii* (Schüller et al., 2000), *Ga. oboediens* (Sokollek et al., 1998) and *Ga. intermedius* (Boesch et al., 1998; Trcek et al., 2000). This predominance may be because of the high production of, and tolerance to, acetic acid. In fact, these species have been described in traditional processes in which acetic acid reaches high concentrations (for example, in some cases of “Traditional Balsamic Vinegar” the acetic acid content can be easily over 7% (w/v) (Gullo et al., 2006)). It has been proposed that *A. pasteurianus* pioneers the production of vinegar, and is followed by *Ga. europaeus* which may be more resistant to acetic acid and less resistant to ethanol (Gullo et al., 2009). In our case, the massive presence of *A. pasteurianus* throughout the process confirmed the previous observations that suggested that this species is the major producer of acetic acid at the start of traditional processes and remains so while acetic acid is at low levels (6%, w/v). However, the presence of *Ga. europaeus* at the end of one acetification (oak in B) might indicate that 6% (w/v) acetic acid could be the point at which the transition from one species to another occurs.

The analysis at species level can overlook an undergoing process of strain succession. To the best of our knowledge there are no culture independent methods available for simultaneous AAB typing and quantification, so recovery on solid media will still be necessary. In both plants it had become evident that there was a succession of *A. pasteurianus* strains. In B, Bp1 clearly dominated the initial steps, in what we should consider as the “starting strain”, and at the end of fermentation other *A. pasteurianus* strains appeared (Bp16). In P, however, different strains dominated each phase: Pp7 at 2% (w/v), Pp4 at 4% (w/v) and Pp16 at 6% (w/v) acetic acid concentrations. Thus, it became clear that the starting strains were better prepared to survive at low acetic acid concentrations and high ethanol, whereas the ones that finished the acetification might be more acetic acid tolerant. The observation made by Gullo et al. (2009) regarding the succession of species, then, in fact might cover another succession at the strain level. The length of time that the two plants had been operating may also be related to an increase in strain diversity. Repeated vinegar production seems to provide an ecological niche for the survival of more strains, which secure the process. The process, then, was faster as the greater variability of strains can cope with the changes in wines or the environment (temperature, wood, oxygen, etc.).

The effect of the wood upon AAB species and strains has never been tested before. The desired effect was that the wood should increase the oxygen available to AAB so that the acetification

process would be more time-efficient. This effect, however, was slight (Torija et al., 2009), although it seems that other effects upon chemical vinegar composition were stronger (Callejón et al., 2008, 2009). Wood was seen to have two basic effects on chemical composition: compounds are released from wood, as has been clearly seen in both wines and vinegars (Arfelli et al., 2007; Callejón et al., 2009; Fernández de Simón et al., 2003; Hernández et al., 2007; Morales et al., 2002; Ortega-Heras et al., 2004) and the strains and species undergo changes (Callejón et al., 2008). As far as this latter point is concerned, some woods clearly influence the succession of strains and the predominance of some over others: the appearance of *Ga. europaeus* only in oak in B may be indicative of a more “mature” plant (higher biodiversity) and a species that has already adapted to a particular wood (oak was the only wood to have been used in both plants).

In conclusion, we used barrels made with four different woods to produce vinegar in two operational vinegar plants and analysed the AAB population at both the species and strain levels. We found a clear predominance of *A. pasteurianus* throughout the process, although *Ga. europaeus* proliferated when the acetic acid concentration was above 6% (w/v) and the conditions were appropriate. At the strain level, however, a clear succession occurred, and the recovery of different strains depended on the acetic acid concentration. Finally, the longer a plant has been operating may lead to a greater diversity of AAB strains, which improves the chances of a good acetification process. However, it should be emphasized that the strains monitored were those that were recovered on plates, which are only a small proportion of the total AAB present. Despite these problems, in our opinion, these ecological studies have an important role to play in improving industrial processes. Similar studies have been made of different fermented foods. In the case of wine, for instance, understanding the evolution of yeast species and strains has led to greater knowledge of the process and strains can now be selected to be used as fermentation starters. Inoculating wine with selected yeasts improves fermentation and the final quality of wine. A similar outcome may be expected in the vinegar industry which, so far, is completely ignorant of the microorganisms involved in the acetification process. Nowadays new microbiological analysis tends to culture independent methods. These methods need to be implemented in the industrial monitoring of AAB if the problem of culturing these microorganisms is to be avoided.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants AGL2007-66417-C02-02/ALI from the Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología, Spain, RM2004-00009 from the Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (Inia, Spain), and the European Project WINEGAR (COOP-CT-2005/017269). The authors thank the Language Service of the Rovira i Virgili University for revising the manuscript.

REFERENCES

- Arfelli, G., Santini, E., Corzani, C., Fabiani, A., Natali, N., 2007. Impact of wooden barrel storage on the volatile composition and sensorial profile of red wine. *Food Science and Technology International* 13, 293–299.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K., 1992. *Short Protocols in Molecular Biology*. Jonh Willey and Sons Inc, London.
- Bartowsky, E.J., Xia, D., Gibson, R.L., Fleet, G.H., Henschke, P.A., 2003. Spoilage of bottled red wine by acetic acid bacteria. *Letters in Applied Microbiology* 36, 307–314.
- Boesch, C., Trcek, J., Sievers, M., Teuber, M., 1998. *Acetobacter intermedius*, sp. nov. *Systematic and Applied Microbiology* 21, 220–229.
- Callejón, R.M., Tesfaye, W., Torija, M.J., Mas, A., Troncoso, A.M., Morales, M.L., 2008. HPLC determination of amino acids with AQC derivatization in vinegars along submerged and surface acetifications and its relation to the microbiota. *European Food Research and Technology* 227, 93–102.
- Callejón, R.M., Tesfaye, W., Torija, M.J., Mas, A., Troncoso, A.M., Morales, M.L., 2009. Volatile compounds in red wine vinegars obtained by submerged and surface acetification in different woods. *Food Chemistry* 113, 1252–1259.
- Cleenwerck, I., De Vos, P., 2008. Polyphasic taxonomy of acetic acid bacteria: an overview of the currently applied methodology. *International Journal of Food Microbiology* 125, 2–14.
- De Ley, J., Gosselé, F., Swings, J., 1984. Genus I *Acetobacter*. In: Kreig, N.R., Holt, J.C. (Eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 1. Williams and Wilkens, Maryland, pp. 268–274.
- De Vero, L., Gala, E., Gullo, M., Solieri, L., Landi, S., Giudici, P., 2006. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) analysis to evaluate acetic acid bacteria in traditional balsamic vinegar. *Food Microbiology* 23, 809–813.
- De Vuyst, L., Camu, N., DeWinter, T., Vandemeulebroecke, K., Van de Perre, V., Vancanneyt, M., De Vos, P., Cleenwerck, I., 2008. Validation of the (GTG)₅-rep-PCR fingerprinting technique for rapid classification and identification of acetic acid bacteria, with a focus on isolates from Ghanaian fermented cocoa beans. *International Journal of Food Microbiology* 125, 79–90.
- Drysdale, G.S., Fleet, G.H., 1988. Acetic acid bacteria in winemaking: a review. *American Journal of Enology and Viticulture* 39, 143–154.
- Du Toit, W.J., Pretorius, I.S., Lonvaud-Funel, A., 2005. The effect of sulphur dioxide and oxygen on the viability and culturability of a strain of *Acetobacter pasteurianus* and a strain of *Brettanomyces bruxellensis* isolated from wine. *Journal of Applied Microbiology* 98, 862–871.

- Entani, E., Ohmori, S., Masai, H., Suzuki, K.J., 1985. *Acetobacter polyoxogenes* sp. nov., a new species of an acetic acid bacterium useful for producing vinegar with high acidity. *Journal of General and Applied Microbiology* 31, 475–490.
- Fernández de Simón, B., Cadahía, E., Galocha, J., 2003. Volatile compounds in a Spanish red wine aged in barrels made of Spanish, French, and American oak wood. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51, 7671–7678.
- Fleet, G.H., 1999. Microorganisms in food ecosystems. *International Journal of Food Microbiology* 50, 101–117.
- García Barceló, J., 1990. In: García Barceló, J. (Ed.), *Técnicas analíticas para vinos*. GAB, Barcelona.
- Gevers, D., Huys, G., Swings, J., 2001. Applicability of rep-PCR fingerprinting for differentiation of *Lactobacillus* species. *FEMS Microbiology Letters* 205, 31–36.
- Giraffa, G., Neviani, E., 2001. DNA-based, culture-independent strategies for evaluating microbial communities in food-associated ecosystems. *International Journal of Food Microbiology* 67, 19–34.
- González, A., Hierro, N., Poblet, M., Rozès, N., Mas, A., Guillamón, J.M., 2004. Application of molecular methods for the differentiation of acetic acid bacteria in a red wine fermentation. *Journal of Applied Microbiology* 96, 853–860.
- González, A., Hierro, N., Poblet, M., Mas, A., Guillamón, J.M., 2005. Application of molecular methods to demonstrate species and strain evolution of acetic acid bacteria population during wine production. *International Journal of Food Microbiology* 102, 295–304.
- González, A., Hierro, N., Poblet, M., Mas, A., Guillamón, J.M., 2006a. Enumeration and detection of acetic acid bacteria by real-time PCR and nested PCR. *FEMS Microbiology Letters* 254, 123–128.
- González, A., Guillamón, J.M., Mas, A., Poblet, M., 2006b. Application of molecular methods for routine identification of acetic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology* 108, 141–146.
- Gullo, M., Caggia, C., De Vero, L., Giudici, P., 2006. Characterization of acetic acid bacteria in “traditional balsamic vinegar”. *International Journal of Food Microbiology* 106, 209–212.
- Gullo, M., De Vero, L., Giudici, P., 2009. Succession of selected strains of *Acetobacter pasteurianus* and other acetic acid bacteria in traditional balsamic vinegar. *Applied and Environmental Microbiology* 75, 2585–2589.
- Haruta, S., Ueno, S., Egawa, I., Hashiguchi, K., Fujii, A., Nagano, M., Ishii, M., Igarashi, Y., 2006. Succession of bacterial and fungal communities during a traditional pot fermentation of rice vinegar assessed by PCR-mediated denaturing gradient gel electrophoresis. *International Journal of Food Microbiology* 109, 79–87.

- Hernández, T., Estrella, I., Dueñas, M., Fernández de Simón, B., Cadahía, E., 2007. Influence of wood origin in the polyphenolic composition of a Spanish red wine aging in bottle, after storage in barrels of Spanish, French and American oak wood. *European Food Research and Technology* 224, 695–705.
- Ilabaca, C., Navarrete, P., Mardones, P., Romero, J., Mas, A., 2008. Application of culture independent molecular methods to evaluate acetic acid bacteria diversity in vinegarmaking process. *International Journal of Food Microbiology* 126, 245–249.
- Jin-Nam, K., Jong-Sok, Ch., Young-Jung, W., Jong-Sun, Y., Hwa-Won, R., 2005. Culture medium optimization for acetic acid production by a persimmon vinegar-derived bacterium. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 123, 1–3.
- Joyeux, A., Lafon-Lafourcade, S., Ribéreau-Gayon, P., 1984. Evolution of acetic acid bacteria during fermentation and storage of wine. *Applied and Environmental Microbiology* 48, 153–156.
- Mesa, M.M., Macías, M., Cantero, D., Barja, F., 2003. Use of the direct epifluorescence filter technique for the enumeration of viable and total acetic acid bacteria from vinegar fermentation. *Journal of Fluorescence* 13, 261–265.
- Millet, V., Lonvaud-Funel, A., 2000. The viable but non-culturable state of wine microorganisms during storage. *Letters in Applied Microbiology* 30, 136–141.
- Morales, M.L., Tesfaye, W., García-Parrilla, M.C., Casas, J.A., Troncoso, A.M., 2002. Evolution of the aroma profile of Sherry wine vinegars during an experimental aging in wood. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 3173–3178.
- Nachamkin, I., Panaro, N.J., Li, M., Ung, H., Yuen, P.K., Kricka, J., Widing, P., 2001. Agilent 2100 bioanalyzer for restriction fragment length polymorphism analysis of the *Campylobacter jejuni* flagellin gene. *Journal of Clinical Microbiology* 39, 754–757.
- Nanda, K., Taniguchi, M., Ujike, S., Ishihara, N., Mori, H., Ono, H., Murooka, Y., 2001. Characterization of acetic acid bacteria in traditional acetic acid fermentation of rice vinegar (komesu) and unpolished rice vinegar (kurosu) produced in Japan. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 986–990.
- Ortega-Heras, M., González-Huerta, C., Herrera, P., González-Sanjosé, M.L., 2004. Changes in wine volatile compounds of varietal wines during ageing in wood barrels. *Analytica Chimica Acta* 513, 341–350.
- Ough, C.S., Amerine, M.A., 1987. *Methods for Analysis of Must and Wines*. Wiley-Interscience. Publication, California.
- Panaro, N.J., Yuen, P.K., Sakazume, T., Fortina, P., Kricka, L.J., Widing, P., 2000. Evaluation of DNA fragment sizing and quantification by the Agilent 2100 Bioanalyzer. *Clinical Chemistry* 46, 1851–1853.

- Prieto, C., Jara, C., Mas, A., Romero, J., 2007. Application of molecular methods for analysing the distribution and diversity of acetic acid bacteria in Chilean vineyards. *International Journal of Food Microbiology* 115, 348–355.
- Ruiz, A., Poblet, M., Mas, A., Guillamón, J.M., 2000. Identification of acetic acid bacteria by RFLP of PCR-amplified 16 rDNA and 16S–23S rDNA intergenic spacer. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50, 1981–1987.
- Schüller, G., Hertel, C., Hammes, W.P., 2000. *Gluconacetobacter entanii* sp. nov., isolated from submerged high-acid industrial vinegar fermentations. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50, 2013–2020.
- Sievers, M., Teuber, M., 1995. The microbiology and taxonomy of *Acetobacter europaeus* in commercial vinegar production. *Journal of Applied Bacteriology* 79, 84–95.
- Sievers, M., Sellmer, S., Teuber, M., 1992. *Acetobacter europaeus* sp. nov., a main component of industrial vinegar fermenters in Central Europe. *Systematic and Applied Microbiology* 15, 386–392.
- Sievers, M., Lorenzo, A., Gianotti, S., Boesch, C., Teuber, M., 1996. 16–23S ribosomal RNA spacer regions of *Acetobacter europaeus* and *A. xylinum*, tRNA genes and antitermination sequences. *FEMS Microbiology Letters* 142, 43–48.
- Sokollek, S.J., Hertel, C., Hammes, W.P., 1998. Description of *Acetobacter oboediens* sp. nov. and *Acetobacter pomorum* sp. nov., two new species isolated from industrial vinegar fermentation. *International Journal of Systematic Bacteriology* 48, 935–940.
- Tesfaye, W., Morales, M.L., García-Parrilla, M.C., Troncoso, A.M., 2002. Wine vinegar: technology, authenticity and quality evaluation. *Trends in Food Science and Technology* 13, 12–21.
- Torija, M.J., Mateo, E., Vegas, C.A., Jara, C., González, A., Poblet, M., Reguant, C., Guillamón, J.M., Mas, A., 2009. Effect of wood type and thickness on acetification kinetics in traditional vinegar production. *International Journal of Wine Research* 1, 155–160.
- Torija, M.J., Mateo, E., Guillamón, J.M., Mas, A., 2010. Design and optimisation of TaqMan-MGB probes for the identification and quantification of acetic acid bacteria. *Food Microbiology* 27, 257–265.
- Treck, J., 2005. Quick identification of acetic acid bacteria based on nucleotide sequences of the 16S–23S rDNA internal transcribed spacer region and of the PQQ-dependent alcohol dehydrogenase gene. *Systematic and Applied Microbiology* 28, 735–745.
- Treck, J., Teuber, M., 2002. Genetic restriction analysis of the 16S–23S rDNA internal transcribed spacer regions of the acetic acid bacteria. *FEMS Microbiology Letters* 19, 69–75.
- Treck, J., Raspor, P., Teuber, M., 2000. Molecular identification of *Acetobacter* isolates from submerged vinegar production, sequence analysis of plasmid pJK2-1 and application in the development of a cloning vector. *Applied Microbiology and Biotechnology* 53, 289–295.

Versalovic, J., Koeuth, T., Lupski, R.J., 1991. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Research* 19, 6823–6831.

Versalovic, J., Schneider, M., De Bruijn, F.J., Lupski, J.R., 1994. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods in Molecular and Cellular Biology* 5, 25–40.

Tercer capítulo

Estudio de la inoculación de dos cepas de *Acetobacter pasteurianus* en condiciones de acetificación diferentes a las de su aislamiento

Carlos Vegas, Ángel González, Estibaliz Mateo, Albert Mas, Montse Poblet y M^a Jesús Torija

Manuscrito en preparación

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
APLICACIÓN DE MÉTODOS MOLECULARES PARA EL ESTUDIO DE LAS BACTERIAS ACÉTICAS IMPLICADAS EN LA ELABORACIÓN
DE VINAGRE DE VINO TRADICIONAL
Carlos Alfredo Vegas Pérez
ISBN:/DL: T.1216-2011

1. INTRODUCCIÓN

La producción tradicional de vinagres de vino es un proceso que se realiza por la acetificación del vino de manera espontánea, es decir, sin control microbiológico. Este proceso se inicia con lo que se conoce como “madre del vinagre”, que es un cultivo iniciador no definido de bacterias acéticas (BA) obtenido a partir de vinagres en proceso (Holzapfel, 2002). En procesos de fermentación de alimentos, el principal objetivo de la utilización de cultivos iniciadores es tener un mejor control tanto a nivel microbiológico, asegurando el proceso y evitando el desarrollo de microorganismos no deseados, como a nivel sensorial, manteniendo la calidad del producto (Holzapfel, 1997). Sin embargo, en el caso del vinagre, el uso de la madre del vinagre, al tratarse de un cultivo mixto no definido, no asegura el control del proceso, por lo que tiene gran interés el estudio de cultivos iniciadores con cepas puras de BA. En este aspecto, son pocos los trabajos de inoculación de BA que se han realizado en vinagres tradicionales (Gullo et al., 2009; Hidalgo et al., 2010). En el estudio de Gullo et al. (2009), en vinagre balsámico tradicional, la cepa de *Acetobacter pasteurianus* inoculada se imponía hasta la mitad del proceso pero luego era una cepa de *Gluconacetobacter europaeus* la que finalizaba el proceso. Mientras que en el trabajo de Hidalgo et al. (2010) se observó que la cepa de *A. pasteurianus* inoculada se imponía cuando se utilizaban las mismas condiciones que en la acetificación de la cual había sido aislada (misma vinagrería y tipo de barrica). Incluso, se observó una reducción del tiempo de acetificación (52 días) respecto a los procesos espontáneos donde se aisló (76 días) (Vegas et al., 2010).

Durante el proceso de producción de vinagres, la temperatura es un parámetro importante a controlar, ya que las BA son muy sensibles a cambios de temperatura. Sin embargo, en la producción tradicional de vinagres de vino, no se acostumbra a controlar la temperatura, lo que influye en la lentitud del proceso e incluso puede ocasionar paradas de acetificación (Vegas et al., 2010). En el trabajo de inoculación realizado por nuestro grupo (Hidalgo et al., 2010), el estudio se llevó a cabo a temperatura ambiente en una vinagrería de construcción abierta sujeta a cambios bruscos de temperatura. El hecho de que no se controlase la temperatura pudo favorecer la sucesión de BA y tener como resultado la falta de imposición de la cepa inoculada en determinadas condiciones.

Por todo ello, el presente trabajo tiene como objetivo comprobar si dos cepas de *A. pasteurianus* aisladas en un trabajo anterior (Vegas et al., 2010) pueden utilizarse como cultivos iniciadores en condiciones distintas de aquéllas en las que fueron aisladas y donde el proceso de acetificación se lleva a cabo en una cámara a temperatura controlada. Además, el desarrollo de estas acetificaciones

se comparó con una acetificación espontánea, iniciada con una madre mixta, que se consideró el control del proceso. El seguimiento de las acetificaciones se realizó mediante técnicas moleculares tanto a nivel de especie (RFLP-PCR del gen ribosomal 16S) como de cepa ((GTG)₅-PCR y ERIC-PCR).

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Preparación de los inóculos

Las dos cepas de *A. pasteurianus* utilizadas en este estudio se aislaron en un estudio ecológico anterior (Vegas et al., 2010). La cepa Bp1 se aisló en la vinagrera La Guinelle (Francia) y la cepa Pp16 en la vinagrera Mas d'en Gil (España). Para producir la madre inicial, las cepas crecidas en 25 mL de medio GY (5% (p/v) de glucosa, 1% (p/v) de extracto de levadura) se mezclaron con vino diluido procedente de la vinagrera. El volumen del inóculo se fue aumentando a medida que el etanol se iba consumiendo, añadiendo vino a la mezcla en proporción 50:50 (vino:inóculo). La multiplicación de los inóculos se realizó inicialmente en el laboratorio y posteriormente en la vinagrera para conseguir el volumen suficiente para las diferentes acetificaciones.

2.2. Condiciones de acetificación

Las tres acetificaciones (dos inoculadas y una espontánea) se realizaron en la Finca Experimental Mas dels Frares de la Universitat Rovira i Virgili (España) en una cámara (sistema cerrado) con temperatura controlada a 25 °C. Para la acetificación espontánea se utilizó como madre un vinagre que estaba ya en proceso en la misma cámara. Todas las acetificaciones se realizaron por duplicado en barricas de madera de 60 L, previamente limpiadas con agua y vapor de agua. Estas barricas se llenaron con 40 L de mezcla inicial, en una proporción 50:50 de los inóculos o madre del vinagre y vino. Para evitar contaminaciones o la entrada de polvo, insectos, etc, la abertura superior de la barrica se cubrió con un paño de tela.

Para los análisis químicos y microbiológicos se tomaron muestras del vino, de la preparación del inóculo y en diferentes puntos de la acetificación: mezcla inicial (T₀), mitad de la acetificación (T₁) y final de la acetificación (T₂). En estos puntos se realizaron controles de acidez total, etanol, pH y recuento de BA por microscopía y siembra en placa.

2.3. Análisis químicos

El seguimiento de la preparación de los inóculos y de las diferentes acetificaciones se realizó mediante el análisis del etanol y de la acidez total. El consumo del etanol se determinó mediante un kit enzimático comercial (Boehringer, Mannheim, Alemania) y la acidez total por valoración ácido-base utilizando la fenolftaleína como indicador (Ough y Amerine, 1987).

2.4. Análisis microbiológicos

Las muestras se sembraron en medio agar GY (GY líquido con 1.5% (p/v) de agarosa) suplementado con natamicina (100 mg/L) (Delvocid, DSM; Delft; Holanda) y se incubaron durante 4-7 días a 28 °C. Posteriormente, en cada punto de muestreo, se seleccionaron aleatoriamente las colonias a estudio y se sembraron nuevamente en placas de GY con 2% de CaCO₃ con el propósito de asegurar que las colonias aisladas producían ácido acético.

La extracción del DNA total se realizó por el método del CTAB (cetyltrimethylammonium bromide) descrito por Ausubel et al. (1992). Para la identificación a nivel de especie, se utilizó la técnica del RFLP-PCR del gen del 16S rRNA descrita por Ruiz et al. (2000). Los productos amplificados (~1450 pb) se digirieron con tres enzimas de restricción: *TaqI*, *AluI* y *BccI* (Roche Diagnostics, GmBh). Adicionalmente, se utilizó el enzima *XbaI* para diferenciar la especie *Ga. saccharivorans* de las especies *Ga. europaeus/Ga. intermedius* que presentaban el mismo perfil con los tres enzimas anteriores y el enzima *XmaI* para diferenciar estas dos últimas especies. Esta técnica permitió agrupar los aislados en diferentes perfiles, pero para confirmar las identificaciones, el gen ribosomal 16S de varios representantes de cada perfil diferente fue secuenciado por la empresa Macrogen Inc. (Seúl, Corea del Sur). Además, se realizó un análisis filogenético con las secuencias del gen ribosomal 16S de todas las cepas diferentes mediante el software MEGA4 descrito por Tamura et al. (2007).

Por su parte, la tipificación se realizó mediante las técnicas ERIC-PCR y (GTG)₅-PCR (Versalovic et al., 1991; Versalovic et al., 1994; Gevers et al., 2001). La biodiversidad de cepas se calculó utilizando el índice de Simpson (Moreno, 2001).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este estudio se quiere determinar si dos cepas de *A. pasteurianus* son capaces de imponerse en condiciones distintas de aquéllas de donde fueron aisladas. Para ello, ambas cepas se inocularon en

la vinagrería de la Finca Experimental Mas dels Frares de la Universitat Rovira i Virgili, donde se dispone de una cámara cerrada con temperatura controlada. Estas acetificaciones se compararon con una acetificación espontánea (donde se utilizó como madre un vinagre espontáneo que estaba en proceso de acetificación).

3.1. Cinética de las acetificaciones

Debido a las diferencias en la composición de las madres, las acetificaciones presentaron pequeñas variaciones en la concentración de etanol y acidez al inicio de los procesos (Tabla 1). La acetificación espontánea o control fue la única que alcanzó un 6% (p/v) de acidez final, a pesar de partir de una acidez inicial inferior (aproximadamente medio grado menos de acidez inicial), y presentando un contenido similar de etanol. Por tanto, el proceso control fue el más eficiente en la transformación del etanol en ácido acético, además presentó la velocidad máxima más elevada de los tres procesos (Tabla 1).

Tabla 1. Análisis físico- químicos y cuantificación de las BA de las diferentes acetificaciones. Las BA totales se determinaron por microscopía y las BA viables por siembra en placa

Muestras	Acidez total (%, p/v)	Etanol (%, v/v)	Velocidad máxima de acetificación (g ácido acético/L * día)	pH	Microscopio (cél/mL)	Placas (UFC/mL)	
Vino	0.6	14.86		3.56	0	0	
Acetificación con Pp16	Inóculo	4.5	1.11	0.73	2.75	2.10E+08	4.33E+04
	T ₀	2.4	7.31		2.96	5.20E+07	1.10E+04
	T ₁	3.38	3.57		2.81	4.43E+08	4.60E+04
	T ₂	5.7	0.08		2.61	7.50E+08	4.53E+04
Acetificación con Bp1	Inóculo	4.8	1.03	0.69	2.74	1.10E+08	2.75E+03
	T ₀	2.48	7.08		2.91	2.45E+08	4.30E+03
	T ₁	3.45	3.72		2.77	9.00E+08	2.40E+05
	T ₂	5.55	0.06		2.58	4.80E+08	6.50E+03
Acetificación control	Madre	3.9	0.96	1.16	2.74	3.70E+08	6.20E+04
	T ₀	1.9	7.63		3.01	3.00E+08	4.10E+03
	T ₁	3.53	3.1		2.82	4.80E+08	6.50E+03
	T ₂	6.15	0.03		2.52	1.80E+08	1.53E+04

Entre las dos acetificaciones inoculadas, la inoculada con la cepa Pp16 fue la que consumió más rápidamente todo el etanol disponible (49 días), mientras que la otra acetificación inoculada necesitó el mismo tiempo que la control (55 días) (Figura 1). Sin embargo, como ya hemos comentado, ninguna de las dos acetificaciones inoculadas alcanzó el 6% (p/v) de acidez final.

3.2. Cuantificación de las BA durante las acetificaciones

A nivel poblacional, las BA se cuantificaron por contaje al microscopio y siembra en placa. En la muestra del vino no se recuperó ninguna colonia en placa ni se observó ninguna célula al microscopio. En el resto de muestras, el contaje al microscopio fue del orden de 10^8 cél/mL, mientras la recuperación en placa variaba de 10^3 a 10^5 UFC/mL, es decir, que, en la mayoría de los casos, la recuperación de colonias fue inferior al 0.1% de la población de BA observada al microscopio (Tabla 1). Esta baja cultivabilidad de las BA en medios de cultivo ya se había observado en otros estudios en vinagres (Entani et al., 1985; Sievers et al., 1992; Sokollek et al., 1998; Trcek, 2005; Ilabaca et al., 2008; Torija et al., 2010), y se ha relacionado con diferentes causas como la asociación celular o el estado de “viable pero no cultivable” (VNC). El vinagre se considera un medio estresante para las BA debido principalmente a la alta concentración de ácido acético, lo que hace que el posterior cultivo de estas BA en condiciones de crecimiento poco o nada estresantes, como la de los medios convencionales de laboratorio, sea muy limitado. Por tanto, este cambio de estrés que sufren las BA se ha asociado con la posible entrada de estas bacterias en un estado VNC (Millet y Lonvaud-Funel, 2000). La formación de agregados por parte de las BA también se ha relacionado con su baja recuperación en placa. En el vinagre, estas bacterias suelen agruparse formando parejas, cadenas de diferentes tamaños o grumos, y es muy posible que cuando estas células se siembren en medios sólidos representen una única colonia (Ilabaca et al., 2008; Torija et al., 2010). Sin embargo, la principal causa de la baja cultivabilidad de las BA es la falta de medios de cultivo adecuados. Por tanto, para mejorar la recuperación de BA en placa se deberían diseñar nuevos medios de cultivo sólidos que simulen las condiciones del vinagre de vino, para intentar favorecer así su desarrollo.

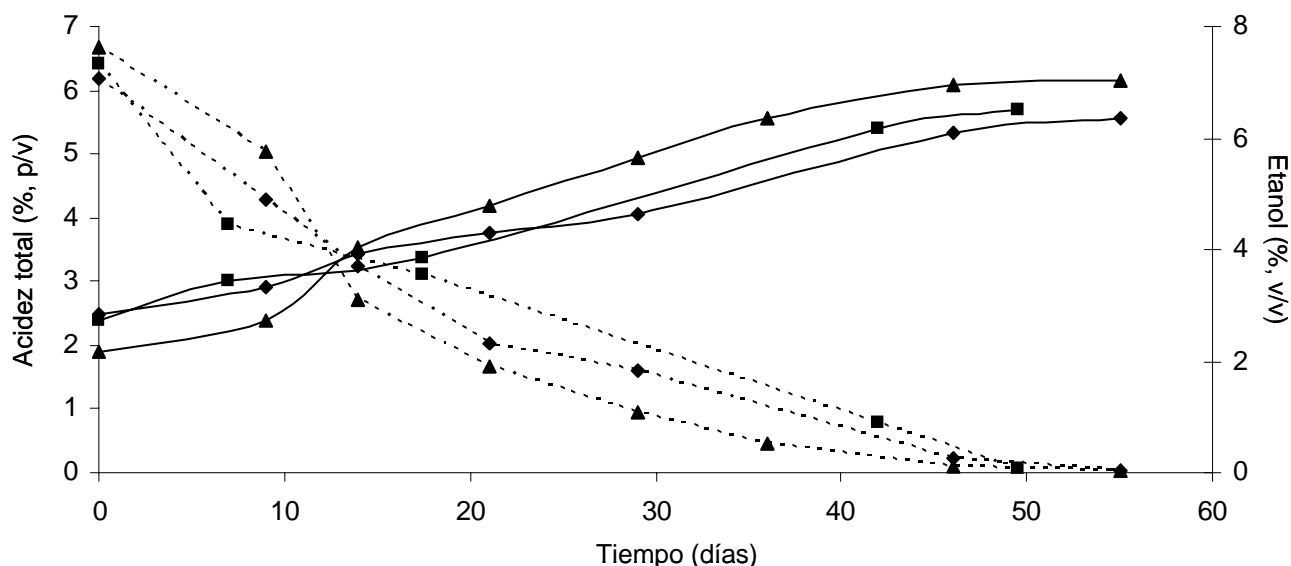


Fig. 1. Variación de la acidez total (línea continua) y etanol (línea discontinua) durante las acetificaciones. Acetificación con Pp16 (■), Bp1 (◆), control (▲)

3.3. Identificación de las BA durante las acetificaciones

Antes de iniciar las acetificaciones, se preparó una madre de cada una de las cepas. Como se necesitaban unos 40 L de inóculo, la multiplicación de la madre se inició en el laboratorio (hasta aproximadamente los 8 L) y se continuó en la vinagrería hasta obtener el volumen final necesario. Durante este proceso se aislaron colonias para comprobar si éstas tenían el mismo perfil de tipado que las cepas inoculadas. En las muestras tomadas durante la multiplicación en el laboratorio, únicamente se detectaron los perfiles de las cepas inoculadas, pero en cambio en el punto inicial de la acetificación (T_0), es decir, en la mezcla del inóculo con el vino, se detectaron otras cepas. El caso más sorprendente fue el de la inoculación con la cepa Bp1, ya que en este punto no se recuperó ninguna colonia que presentara el perfil de la cepa inoculada. En el caso de la inoculación con la cepa Pp16, ésta seguía siendo la cepa mayoritaria al inicio del proceso, pero se detectaron 4 cepas más (Tabla 2).

Tabla 2. Identificación de especies y cepas de BA a lo largo de las tres acetificaciones

	Puntos de muestreo	Nº de colonias estudiadas	Nº de cepas diferentes	Especies (%)	Cepas (%)	Diversidad de cepa (Índice de Simpson)
Acetificación con Pp16	T ₀	28	5	64% <i>A. pasteurianus</i>	Pp16 (64%)	0.54
	T ₁			21% <i>Ga. europaeus</i>	Te1 (21%)	
				11% <i>Ga. saccharivorans</i>	Ts2 (7%), Ts3 (4%)	
T ₂	27	2	100% <i>Ga. europaeus</i>	Te1 (97%), Te8 (3%)	0.06	
Acetificación con Bp1	T ₀	56	2	84% <i>Ga. europaeus</i>	Te1 (84%)	0.48
	T ₁			16% <i>Gluconacetobacter</i> sp.	Tu6 (16%)	
				61% <i>Gluconacetobacter</i> sp.	Tu6 (61%)	
T ₂	38	3	39% <i>Ga. europaeus</i>	Te1 (39%)	0.64	
Acetificación control	T ₀	39	4	45% <i>Ga. europaeus</i>	Te1 (45%)	0.45
	T ₁			34% <i>Gluconacetobacter</i> sp.	Tu6 (34%)	
				21% <i>Ga. intermedius</i>	Ti9 (21%)	
T ₂	52	4	39% <i>Ga. europaeus</i>	Te1 (39%)	0.72	
Acetificación control	T ₀	39	4	30% <i>Ga. hansenii</i>	Th10 (30%)	0.45
	T ₁			18% <i>Gluconacetobacter</i> sp.	Tu6 (18%)	
				13% <i>Ga. intermedius</i>	Ti11 (9%), Ti12 (4%)	
T ₂	52	4	72% <i>Gluconacetobacter</i> sp.	Tu6 (72%)	0.61	
Acetificación control	T ₀	52	4	20% <i>Ga. intermedius</i>	Ti11 (15%), Ti9 (5%)	0.61
	T ₁			8% <i>Ga. europaeus</i>	Te1 (8%)	
				50% <i>Ga. europaeus</i>	Te1 (50%)	
T ₂	52	4	36% <i>Gluconacetobacter</i> sp.	Tu6 (36%)	0.61	
				14% <i>Ga. intermedius</i>	Ti9 (10%), Ti11 (4%)	

En cada acetificación, se analizaron entre 102 y 125 colonias, obteniéndose un total de 13 perfiles de tipado diferentes (Figura 2). Las dos técnicas utilizadas para esta tipificación (ERIC-PCR y (GTG)₅-PCR) presentaron el mismo polimorfismo, a diferencia de lo que se había descrito en el estudio anterior (Vegas et al., 2010) donde el ERIC-PCR era más polimórfico. Estos 13 perfiles diferentes se identificaron a nivel de especie por la técnica RFLP-PCR del gen ribosomal 16S. El uso secuencial de 5 enzimas de restricción (Tabla 3), permitió reagrupar las 13 cepas diferentes en 7 especies: *A. pasteurianus*, *A. tropicalis*, *Ga. europaeus*, *Ga. saccharivorans*, *Ga. intermedius*, *Ga. hansenii* y un perfil no descrito para BA que correspondía a una única cepa (Tu6). Para confirmar estas identificaciones se secuenció el gen ribosomal 16S de las cepas diferentes, y con estas secuencias se realizó un análisis filogenético. Estos análisis confirmaron las identificaciones realizadas por el RFLP-PCR del gen ribosomal 16S, mientras que la cepa perteneciente a la especie

desconocida se agrupó en el cluster del género *Gluconacetobacter* (Figura 3), siendo *Ga. entanii* la especie más cercana (99.71% de similitud en la secuencia). Sin embargo, la difícil cultivabilidad de *Ga. entanii* descrita por Lisdiyanti et al. (2006), a diferencia de lo que sucede con la cepa aislada en este trabajo, sugiere la posibilidad de que sea una nueva especie. De todas maneras, serán necesarios estudios bioquímicos y taxonómicos más específicos para confirmar esta posibilidad. Por otro lado, la detección de *Ga. saccharivorans*, aislada por primera vez en zumo de remolacha (Lisdiyanti et al., 2006), fue inesperada ya que esta especie nunca se había descrito en vinagres. En cambio, *A. tropicalis*, aunque aislada del coco en regiones tropicales (Lisdiyanti et al., 2000), ya se había sido detectado, en Austria, en fermentaciones espontáneas de vino que posteriormente fueron acetificadas (Silhavy y Mandl, 2006).

Tabla 3. Tamaño de los fragmentos de restricción del amplificado del gen ribosomal 16S de diferentes especies de BA

Especies de BA	Perfiles de restricción de acuerdo a la enzima utilizada				
	<i>TaqI</i>	<i>AluI</i>	<i>BclI</i>	<i>XbaI</i>	<i>XmaI</i>
<i>A. pasteurianus</i>	500-375-350-210	450-320-290-200-120-50	1074-405	1048-288	771-510-55
<i>A. tropicalis</i>	650-375-210-180	330-280-250-210-200-120-50	946-256-249	1087-364	771-549-131
<i>Ga. hanseni</i>	650-350-210-175	740-470-120-70-50	746-501-180	1450	772-528-127
<i>Ga. sp.</i>	650-350-210-175	756-456-190-42	928-516	1450	772-530-142
<i>Ga. saccharivorans</i>	650-350-210-175	790-490-120-50	948-370-128	1092-389	1325-156
<i>Ga. europaeus</i>	650-350-210-175	790-490-120-50	948-370-128	1450	1325-156
<i>Ga. intermedius</i>	650-350-210-175	790-490-120-50	948-370-128	1450	772-550-159

Durante las acetificaciones, no hubo imposición de las dos cepas inoculadas, ya que ambas cepas fueron rápidamente desplazadas como cepas mayoritarias por las cepas autóctonas de la vinagrería (Tabla 2), siendo la cepa Bp1 la más sensible a las condiciones de acetificación, ya que ésta no se aisló ya desde el final del proceso de preparación del inóculo en la vinagrería. En su lugar, se aislaron dos cepas del género *Gluconacetobacter* (Te1 y Tu6), que fueron las responsables del proceso, alternándose como cepas mayoritarias. En la acetificación con la cepa Pp16, al inicio del proceso, además de esta cepa, se detectaron otras 4 cepas, entre ellas una cepa de *Ga. europaeus* (Te1), que fue la mayoritaria en el resto del proceso (78% en T₁ y 97% en T₂). Por su parte, en la acetificación control, al inicio del proceso, se aislaron 5 cepas, todas ellas del género *Gluconacetobacter*, donde las cepas Te1 y Tu6, mencionadas anteriormente, suponían el 57%, mientras que una cepa de *Ga. hanseni* (Th10) representaba el 30%. A mitad de acetificación, la cepa Tu6 era la cepa mayoritaria (72%), mientras que a final del proceso, esta cepa representaba el 36%, y Te1 era la cepa mayoritaria (50%) (Tabla 2).

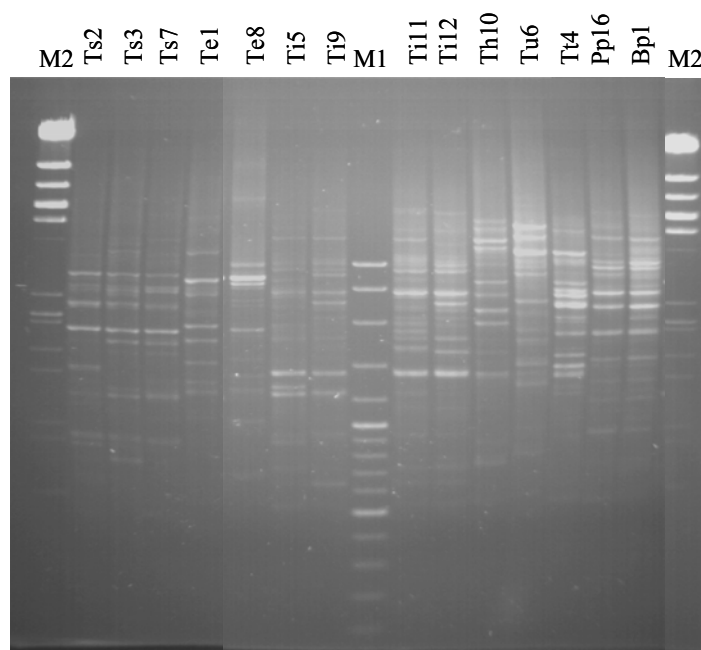


Fig. 2. Perfiles de $(GTG)_5$ -PCR de todas las cepas aisladas durante este estudio

Así, parece que el control de temperatura no favoreció la imposición de los cultivos iniciadores y que hay una serie de cepas que son propias de nuestra vinagrería y que son capaces de imponerse al cultivo iniciador y convertirse en las responsables de llevar a cabo las acetificaciones. Dos cepas del género *Gluconacetobacter* (Te1 y Tu6) se detectaron en las tres acetificaciones y además fueron las cepas que se impusieron a lo largo del proceso, lo que las convierte en buenas candidatas para ser utilizadas como posibles cultivos iniciadores. Este primer estudio de inoculación de cepas de BA en una vinagrería diferente de donde se habían aislado sugiere que la imposición de cepas procedentes de otros orígenes es complicado porque las cepas autóctonas, mejor adaptadas a las condiciones del proceso se imponen con facilidad. Por tanto, se puede hablar de una microbiota de BA residente, que es característica de la vinagrería y que está bien adaptada a esas condiciones particulares. Estos resultados parecen dar sentido a la utilización de cultivos iniciadores locales, ya que se cree que es más efectivo el uso de cultivos puros procedentes de la microzona donde se van a utilizar. Esto está ampliamente extendido en otros microorganismos como las levaduras (Martini y Martini, 1990), donde en los últimos años se han realizado un gran número de estudios ecológicos para la selección de cepas de levaduras características de una zona, denominación de origen e incluso de una bodega (Querol et al., 1994; Torija et al., 2001; Beltran et al., 2002; Di Maro et al., 2007).

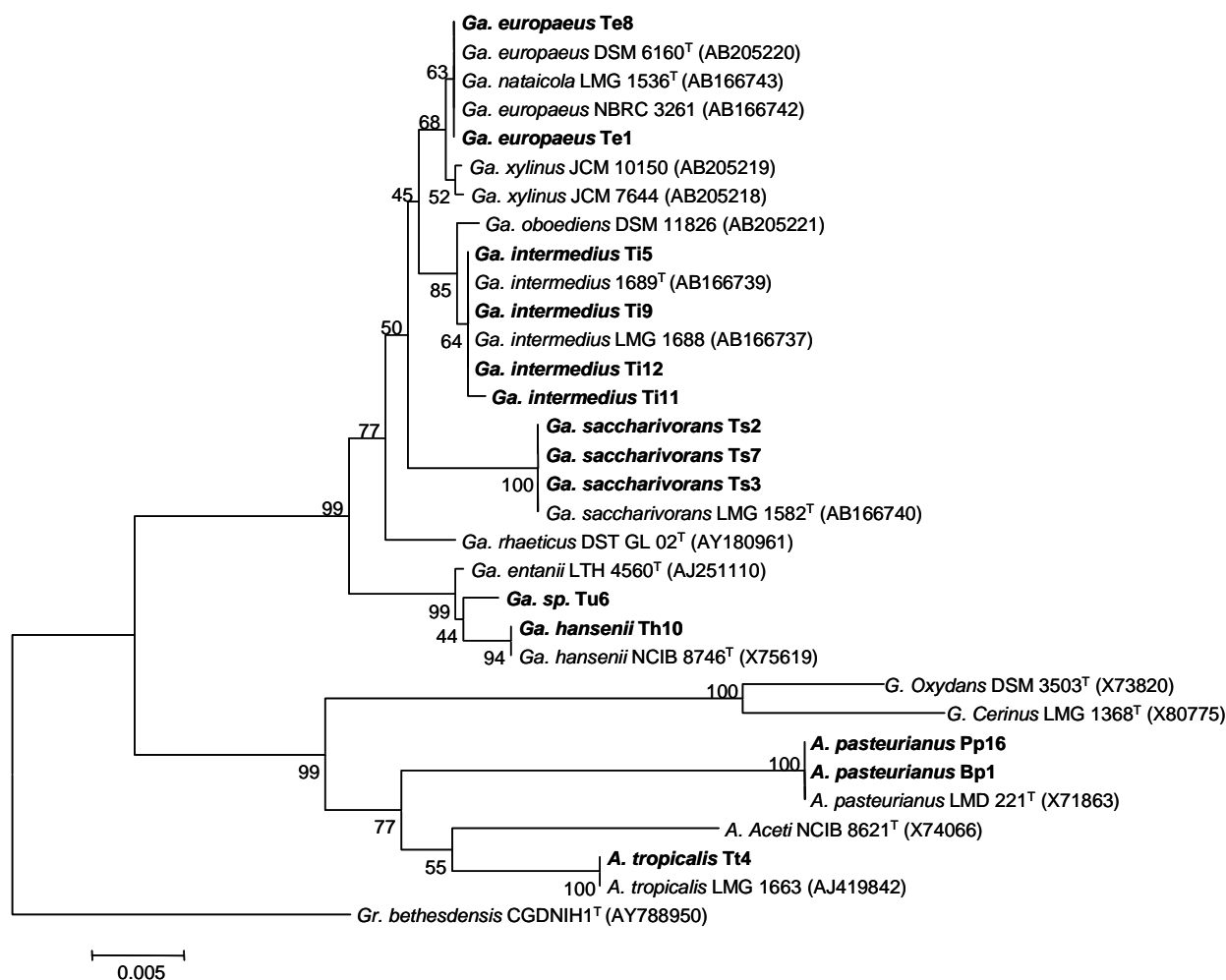


Fig. 3. Relación filogenética de los aislados obtenidos en las tres acetificaciones junto con las cepas tipo de algunas especies de BA. El árbol filogenético se ha construido en base a las secuencias del 16S rDNA usando el método “neighbour-joining”. La robustez de las raíces está indicada por los valores de “bootstrap” (%) calculado para 1000 repeticiones.

Además, los resultados del estudio de inoculación previo realizado con una de las cepas utilizadas en este trabajo (Hidalgo et al., 2010) mostraron que esta cepa, incluso en la vinagrería donde se había aislado, sólo se imponía cuando se repetían las condiciones de su aislamiento. En cambio, al modificar las barricas, el tipo de madera o la forma, esta cepa era la mayoritaria a la mitad de la acetificación pero en cambio otras cepas y especies se imponían al final de proceso. De hecho, algo similar sucedía en el trabajo de Gullo et al. (2009) por lo que este grupo ha propuesto la posibilidad de utilizar cultivos mixtos, de forma que una cepa de *A. pasteurianus* sea la responsable de iniciar el proceso y una de *Ga. europaeus* de finalizarlo. Por tanto, es importante destacar que en este trabajo, de forma similar a lo que se ha detectado en los últimos estudios realizados en vinagres tradicionales (Gullo et al., 2009; Hidalgo et al., 2010), ha habido imposición de cepas del género

Gluconacetobacter al final del proceso. Estas especies (*Ga. europaeus* y *Ga. intermedius*) habitualmente se han asociado con los vinagres sumergidos, es decir, con procesos más oxigenados y con mayor contenido de ácido acético inicial (Sievers et al., 1992, Sokollek et al., 1998, Trcek et al., 2000; Callejón et al., 2008; Hidalgo et al., 2010). Sin embargo, en estas acetificaciones, cepas de estas especies han sido las mayoritarias durante todo el proceso a pesar de empezar con una acidez alrededor del 2-3%. Por tanto, se pone en duda la idea de que *A. pasteurianus* sea la especie principal en los procesos de producción de vinagres tradicionales. De todas maneras, no se debe olvidar el dato de la cultivabilidad, ya que la información disponible es de un porcentaje muy pequeño de la población total y por tanto, seguramente las cepas inoculadas seguirán presentes en el proceso aunque probablemente en proporciones minoritarias. Por tanto, la idea de los cultivos mixtos con cepas de las dos especies (*A. pasteurianus* y *Ga. europaeus* u otra especie de *Gluconacetobacter*) propuesto por Gullo et al. (2009) puede ser una buena alternativa.

Como conclusión de este trabajo, podemos decir que la posible utilización de cultivos iniciadores de BA está todavía en sus estudios preliminares. Los resultados actuales sugieren que la utilización de cultivos iniciadores de BA sólo es eficaz en un ámbito reducido, es decir, donde han sido aisladas y se plantea la alternativa de cultivos mixtos. De todas maneras, el número de cepas estudiado es muy limitado y por tanto, nuevos estudios de selección e inoculación serán necesarios para comprobar si es posible encontrar cepas que sean más aptas y que se adapten mejor a diferentes condiciones para sacar conclusiones definitivas sobre la inoculación con BA en los procesos de acetificación.

REFERENCIAS

- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K. (Eds.), 1992. *Short Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons Inc, London.
- Beltran, G., Torija, M.J., Novo, M.T., Ferrer, N., Poblet, M., Guillamón, J.M., Rozès, N., Mas, A., 2002. Analysis of yeast populations during alcoholic fermentations: a six year follow-up study. *Systematic and Applied Microbiology* 25, 287-293.
- Callejón, R.M., Tesfaye, W., Torija, M.J., Mas, A., Troncoso, A.M., Morales, M.L., 2008. HPLC determination of amino acids with AQC derivatization in vinegars along submerged and surface acetifications and its relation to the microbiota. *European Food Research and Technology* 227, 93-102.
- Di Maro, E., Ercolini, D., Coppola, S., 2007. Yeast dynamics during spontaneous wine fermentation of the Catalanesca Grape. *International Journal of Food Microbiology* 117, 201-210.
- Entani, E., Ohmori, S., Masai, H., Suzuki, K. I., 1985. *Acetobacter polyoxogenes* sp. nov., a new species of an acetic acid bacterium useful for producing vinegar with high acidity. *The Journal of General and Applied Microbiology* 31, 475-490.
- Gevers, D., Huys, G., Swings, J., 2001. Applicability of rep-PCR fingerprinting for differentiation of *Lactobacillus* species. *FEMS Microbiology Letters* 205, 31-36.
- Gullo, M., De Vero, L., Giudici, P., 2009. Succession of selected strains of *Acetobacter pasteurianus* and other acetic acid bacteria in traditional balsamic vinegar. *Applied and Environmental Microbiology* 75, 2585-2589.
- Hidalgo, C., Vegas, C., Mateo, E., Tesfaye, W., Cerezo, A.B., Callejón, R.M., Poblet, M., Guillamón, J.M., Mas, A., Torija, M.J., 2010. Effect of barrel design and the inoculation of *Acetobacter pasteurianus* in wine vinegar production. *International Journal of Food Microbiology* 141, 56-62.
- Holzappel, W.H., 1997. Use of starter cultures in fermentation on a household scale. *Food Control* 8, 241-258.
- Holzappel, W.H., 2002. Appropriate starter culture technologies for small-scale fermentation in developing countries. *International Journal of Food Microbiology* 75, 197-212.
- Ilabaca, C., Navarrete, P., Mardones, P., Romero, J., Mas A., 2008. Application of culture culture-independent molecular methods to evaluate acetic acid bacteria diversity in vinegarmaking process. *International Journal of Food Microbiology* 126, 245-249.
- Lisdiyanti, P., Kawasaki, H., Seki, T., Yamada, Y., Uchimura, T., Komagata, K., 2000. Systematic study of the genus *Acetobacter* with descriptions of *Acetobacter indonensiensis* sp. nov., *Acetobacter tropicalis* sp. nov., *Acetobacter orleanensis* (Henneberg 1906) comb. nov., *Acetobacter*

- lovaniensis* (Frateur 1950) comb. nov., and *Acetobacter estunensis* (Carr 1958) comb. nov. *Journal of General and Applied Microbiology* 46, 147-165.
- Lisdiyanti, P., Navarro, R.R., Uchimura, T., Komagata, K., 2006. Reclassification of *Gluconacetobacter hansenii* strains and proposals of *Gluconacetobacter saccharivorans* sp. nov. and *Gluconacetobacter nataicola* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 56, 2101-2111.
- Martini, A., Martini, A.V., 1990. Grape must fermentation past and present. En: *Yeast Technology*. (Eds. J.F.T. Spencer y D.M. Spencer) pp. 105-123. Springer Verlag: Berlin.
- Millet, V., Lonvaud-Funel, A., 2000. The viable but non-culturable state of wine microorganisms during storage. *Letters in Applied Microbiology* 30, 126-141.
- Moreno, C.E., 2001. *Métodos para medir la biodiversidad*. First edition. M and T SEA, Zaragoza – Spain.
- Ough, C.S., Amerine, M.A., 1987. *Methods for Analysis of Must and Wines*. Wiley-Interscience Publication, California.
- Querol, A., Barrio, E., Ramón, D., 1994. Population dynamics of natural *Saccharomyces* strains during wine fermentation. *International Journal of Food Microbiology* 21, 315-323.
- Ruiz, A., Poblet, M., Mas, A., Guillamón, J.M., 2000. Identification of acetic acid bacteria by RFLP of PCR-amplified 16S rDNA and 16S-23S rDNA intergenic spacer. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50, 1981-1987.
- Sievers, M., Sellmer, S., Teuber, M., 1992. *Acetobacter europaeus* sp-nov a main component of industrial vinegar fermenters in Central-Europe. *Systematic and Applied Microbiology* 15, 386-392.
- Silhavy, K., Mandl, K., 2006. *Acetobacter tropicalis* in spontaneously fermented wines with vinegar fermentation in Austria. *Mitteilungen Klosterneuburg* 56, 102-107.
- Sokollek, S.J., Hertel, C., Hammes, W.P., 1998. Cultivation and preservation of vinegar bacteria. *Journal of Biotechnology* 60, 195-206.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S., 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24, 1596-1599.
- Torija, M.J., Rozès, N., Poblet, M., Guillamón, J.M., Mas, A., 2001. Yeast population dynamics in spontaneous fermentations: Comparison between two different wine-producing areas over a period of three years. *Antonie van Leeuwenhoek* 79, 345-352.
- Torija, M.J., Mateo, E., Guillamón, J.M., Mas, A. 2010. Identification and quantification of acetic acid bacteria in wine and vinegar by TaqMan-MGB probes. *Food Microbiology* 27, 257-265.
- Trcek, J., Raspor, P., Teuber, M., 2000. Molecular identification of *Acetobacter* isolates from submerged vinegar production, sequence analysis of plasmid pJK2-1 and application in the development of a cloning vector. *Applied Microbiology and Biotechnology* 53, 289-295.

Treck, J., 2005. Quick identification of acetic acid bacteria based on nucleotide sequences of the 16S-23S rDNA internal transcribed spacer region and of the PQQ-dependent alcohol dehydrogenase gene. *Systematic and Applied Microbiology* 28, 735-745.

Vegas, C., Mateo, E., González, A., Jara, C., Guillamón, J.M., Poblet, M., Torija, M.J., Mas, A., 2010. Population dynamic of acetic acid bacteria during traditional wine vinegar production. *International Journal of Food Microbiology* 138, 130-136.

Versalovic, J., Koeth, T., Lupski, R.J., 1991. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Research* 19, 6823-6831.

Versalovic, J., Schneider, M., de Bruijn, F.J., Lupski, J.R., 1994. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods in Molecular and Cellular Biology* 5, 25-40.

Cuarto capítulo

Evaluación de la representatividad de las especies de bacterias acéticas identificadas por métodos dependientes de cultivo durante la producción de vinagre de vino por el método tradicional

**Evaluation of the representativity of acetic acid bacteria species identified by the culture-
dependent method during a traditional wine vinegar production**

Carlos Vegas, Ángel González, Estibaliz Mateo, Albert Mas, Montse Poblet y M^a Jesús Torija

Enviado a la revista Food Microbiology

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
APLICACIÓN DE MÉTODOS MOLECULARES PARA EL ESTUDIO DE LAS BACTERIAS ACÉTICAS IMPLICADAS EN LA ELABORACIÓN
DE VINAGRE DE VINO TRADICIONAL
Carlos Alfredo Vegas Pérez
ISBN:/DL: T.1216-2011

ABSTRACT

The low recovery of acetic acid bacteria (AAB) on solid media is one of the biggest hurdles to studying the microbiota present in vinegar production. For this reason, we carried out a comparative analysis between culture-dependent and culture-independent methods to evaluate if the main AAB species isolated by plating are representative of the microbiota present.

265 colonies isolated from two different culture media were identified and characterized by the RFLP-PCR 16S rRNA gene, ERIC-PCR and (GTG)₅-rep-PCR. Additionally, a phylogenetic analysis using the 16S rRNA gene was performed. Finally, qualitative and quantitative culture-independent techniques (DGGE-PCR, RFLP-PCR 16S rRNA gene and RT-PCR) were used for detecting and quantifying the AAB directly from the vinegar.

In general, the main species recovered by the culture-dependent method were the same as those detected by culture-independent method, confirming that plating could provide a valid initial approach for determining the diversity of microbiota. Furthermore, plating allowed us to detect some putative new *Gluconacetobacter* species that would have remained undetected with culture-independent techniques.

Keywords: DGGE-PCR, RT-PCR, TaqMan-MGB probes, *Gluconacetobacter*, *Acetobacter*

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
APLICACIÓN DE MÉTODOS MOLECULARES PARA EL ESTUDIO DE LAS BACTERIAS ACÉTICAS IMPLICADAS EN LA ELABORACIÓN
DE VINAGRE DE VINO TRADICIONAL
Carlos Alfredo Vegas Pérez
ISBN:/DL: T.1216-2011

1. INTRODUCTION

Until new molecular methods emerged in the last two decades, fermentative processes were generally studied using classical methods. However, still the molecular methods have been mostly applied as culture dependent techniques, that is after plating, colony recovery and further analysis (Fleet, 1999). In the last decade, various laboratories have started to substitute the culture-dependent method with more integrative culture-independent molecular method. Although for some microorganisms and for certain processes both methods seem to produce similar results (Hierro et al., 2006), other microorganisms are particularly difficult to grow on plates, which means that culture-dependent and culture-independent methods are more likely to produce different results. Of these microorganisms, acetic acid bacteria (AAB) in the production of vinegar seem to be especially difficult to recover on plates, a difficulty which has been long recognized (Sievers et al., 1992; Sokollek et al., 1998; Mesa et al., 2003; Trcek, 2005; Torija et al., 2010). Although a large number of AAB species have been described to date, only a few have been described in the production of vinegar. In the traditional method of wine vinegar production (slow acetification performed in wood barrels), *Acetobacter pasteurianus* seemed to be the AAB species responsible of the wine acetification (Ilabaca et al., 2008; Vegas et al., 2010). However, some species of the genus *Gluconacetobacter* (*Ga.*), such as *Ga. europaeus* and *Ga. intermedius*, have also been shown to participate in these processes, mainly at the end of acetification when the acetic acid concentration is high (Gullo et al., 2009; Hidalgo et al., 2010; Vegas et al., 2010).

Over the years, the food industry has developed starter cultures to control the process, thus improving the sanitary quality and sensory profile (Holzapfel, 1997). To select an appropriate starter, isolation on culture media is generally a requirement. However, this is the main drawback with AAB, because only a low percentage of the total population is recovered (Mesa et al., 2003; Trcek, 2005; Torija et al., 2010). There are several reasons that can account for the low culturability of AAB, such as the existence of a Viable But Non Culturable (VBNC) state (Millet and Lonvaud-Funel, 2000), or the fact that AAB frequently occur in pairs, chains or form aggregates which probably represent a single colony when plated (Ilabaca et al., 2008; Torija et al., 2010). However, the main reason is probably the lack of suitable solid media, which is mostly the case when the samples come from an extreme medium such as vinegar. In fact, several culture media based on different carbon source such as glucose, mannitol, ethanol, etc. have been tested to improve the recovery of AAB colonies and their later maintenance in pure culture (Entani et al., 1985; Gullo et al., 2006). Nevertheless, the total AAB recovery on these media has always been lower than that obtained from microscopy counting (Sievers et al., 1992; Sokollek et al., 1998; Trcek, 2005).

To solve these culturability problems, different culture-independent techniques have been developed. Some of these techniques, such as Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) and Temporal Temperature Gradient Gel Electrophoresis (TTGE), only allow the detection of the microbiota, whereas others, such as Fluorescence In Situ Hybridisation (FISH), Epifluorescence, Real Time PCR (RT-PCR), also allow their quantification (Mesa et al., 2003; López et al., 2003; Du Toit et al., 2005; Franke-Whittle et al., 2005; González et al., 2006; Gammon et al., 2007; De Vero et al., 2008; Ilabaca et al., 2008; Torija et al., 2010). Most of these techniques are based on 16S rRNA gene analysis because this allows the different species to be directly distinguished from complex communities. RFLP-PCR 16S rRNA gene analysis is another technique used for the fast identification of AAB species (Ruiz et al., 2000). This technique was widely used as a culture-dependent technique in ecological studies of AAB in traditional vinegar (Hidalgo et al., 2010; Vegas et al., 2010), although it can also be used as a culture-independent technique (Ilabaca et al., 2008).

The aim of the present study was to compare the results from culture-dependent and culture-independent methods to evaluate whether the AAB population obtained from culture media is representative of the wine acetification process. For this purpose, samples from a traditional wine vinegar production were analysed. Culture-dependent techniques included ERIC-PCR and (GTG)₅-rep-PCR for typing at strain level, RFLP-PCR 16S rRNA gene analysis for species grouping and 16S rRNA gene sequencing and phylogenetic analysis for species identification. The culture-independent techniques DGGE-PCR and RT-PCR were used, and RFLP-PCR 16S rRNA gene analysis was also applied without plating.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Acetification conditions and sampling

Wine was acetified by the traditional surface method in which it was placed in two 60 L wood barrels (B1 and B2) at a controlled temperature of 25 °C. The wood barrels were filled with 40 L of the initial mixture, leaving an air chamber of 20 L. The initial mixture was produced using a previous vinegar (3% acetic acid, w/v) mixed with dry wine (0.14 g/L residual sugars) and water in a proportion of 20:60:20, respectively. This was prepared in a plastic container and placed in both barrels. The wood barrels had a broad top hole, which was covered by a cloth to prevent the inadvertent introduction of insects, dust, etc.

Samples from the initial mixture and wine were analyzed as well as the samples that were taken at different points of the acetification: ~3% (w/v) acetic acid (T₁) and ~6% (w/v) acetic acid (T₂).

2.2. Chemical analysis

Ethanol and total titratable acidity analysis was used to monitor the acetifications. The ethanol concentration was measured with enzymatic kits (Boehringer, Mannheim, Germany) and the total titratable acidity was determined by titration with 0.5 N NaOH, and phenolphthalein was used as the indicator (Ough and Amerine, 1987).

2.3. Enumeration of AAB

We counted the total AAB cells under light microscopy using a Neubauer improved counting chamber (0.0025 mm² and 0.02 mm deep). The different samples were plated out with an automatic spiral platter (WASPII, Don Whitley Scientific Limited, England) on four specific media: GY (5% glucose, 1% yeast extract, w/v), MM (2.5% mannitol, 0.3% peptone, 0.5% yeast extract, w/v), V50 (0.4% yeast extract, 0.2% glycerol, 0.2% tartaric acid, 0.05% K₂HPO₄, 0.05% MgSO₄·7H₂O, 0.1% Na acetate, 0.02% MnSO₄, 0.01% CaCl₂, 6% ethanol (v/v), w/v, pH 5) and V50 with 0.5% (v/v) acetic acid. The agar concentration was always 1.5% (w/v). The solid culture media were supplemented with natamycin (100 mg/L) (Delvocid, DSM; Delft; Netherlands) to inhibit the growth of yeasts and moulds. After incubation for 4-7 days at 28 °C, 24-27 colonies were randomly isolated at each point and plated on the same culture medium as that from which they had been recovered.

2.4. DNA extraction

Total DNA was extracted using the CTAB method (Cetyltrimethylammonium bromide) described by Ausubel et al. (1992). In the case of the culture-independent analysis, samples were previously treated with cellulase from *Trichoderma reesei* (Sigma-Aldrich, Steinheim; Germany) at 37 °C for approximately 2 h in order to degrade the cellulose produced by the AAB. Afterwards, the samples were washed twice with EDTA-PVP 2% (Jara et al., 2008) before direct DNA extraction.

2.5. AAB species grouping by the PCR- RFLP 16S rRNA gene

The 16S rRNA gene was amplified using the method described by Ruiz et al. (2000). PCR reactions were carried out in the Gene Amp PCR System 2700 (Applied Biosystems, Foster City, USA). The amplified products were digested with four restriction enzymes: *TaqI*, *AluI*, *BccI* and *XmaI* (Roche Diagnostics, GmBh). The restriction fragments generated were detected using 3% (w/v) agarose electrophoresis gel. Lengths of amplification products and restriction fragments were detected by

comparison with a VC 100 bp Plus DNA ladder (Vivantis Technologies Sdn.Bhd, Selangor D.E., Malaysia). The size of the restriction fragments was determined by running selected samples in a Bioanalyzer Agilent 2100 (Agilent Technologies, Böblingen, Germany) using the 7500 Labchip.

In order to confirm the results obtained by RFLP-PCR, the 16S rRNA gene amplicons of different strains were purified and sequenced by Macrogen Inc. (Seoul, South Korea) using an ABI3730 XL automatic DNA sequencer. All sequenced strains were deposited in the GenBank database with the accession numbers from HQ400665 to HQ400673. A phylogenetic analysis using MEGA4 software was conducted to determine the closest known relatives of the partial 16S rRNA sequence of AAB species (Tamura et al., 2007). The accession numbers for the 16S rRNA gene sequence of the AAB type strains used for the phylogenetic analysis were obtained from the European Molecular Biology Laboratory (EMBL).

2.6. AAB species population analysis by DGGE-PCR

The conditions and primers used for amplifying a region of 16S rRNA gene were the same as those described by López et al. (2003). The reactions were performed in the Gene Amp PCR System 2700 (Applied Biosystems). DGGE-PCR analysis was carried out with the Code Universal Mutation Detection System (BioRad, Hercules, CA). The electrophoretic runs were subjected to a constant voltage of 170 V for 4 h at a constant temperature of 60 °C in TAE buffer 0.5X, and in a denaturing gradient from 45% to 60% of urea and formamide. The DNA fragments from the DGGE-PCR gel were excised and purified according to Omar and Ampe (2000).

2.7. Total AAB and AAB species enumeration by RT-PCR

For the total AAB enumeration, we followed the SYBR Green RT-PCR protocol proposed by González et al. (2006). Some AAB species (*A. pasteurianus*, *Acetobacter aceti*, *Gluconobacter oxydans*, *Ga. europaeus* and *Ga. hansenii*) were quantified by RT-PCR with specific TaqMan-MGB probes (Torija et al., 2010). When the direct RT-PCR did not detect a given species, the process was repeated after PCR enrichment (Torija et al., 2010).

In both techniques, RT-PCR analyses were performed on an ABI Prism 7300 sequence detection system (Applied Biosystems). The C_T was determined automatically by the instrument. Standard curves were created using a 10-fold serially diluted genomic DNA extracted from 10^8 cells/ml. For the SYBR Green RT-PCR, we used the standard curve generated with *G. oxydans* (DSM 7145^T), whereas for the RT-PCR with specific TaqMan-MGB probes, we constructed a standard curve for each species.

2.8. AAB typing

We used the ERIC-PCR (Versalovic et al., 1991) and the (GTG)₅-rep-PCR fingerprinting technique (Versalovic et al., 1994; Gevers et al., 2001) for typing AAB isolates. Strain biodiversity was calculated using Simpson's index, which shows the probability of two randomly selected isolates being the same strains. Biodiversity was calculated as $1 - \sum p_i^2$, where p_i is the number of same species isolates divided by the total number of isolates (Moreno, 2001).

3. RESULTS

3.1. Chemical changes during the acetifications

The acetification lasted between 62 and 70 days for barrels B2 and B1, respectively, and both had similar kinetic pattern (Fig. 1). The initial acetic acid and ethanol content were 1.05% (w/v) and 8% (v/v), respectively. The acetifications were considered finished when the total acidity reached at least 6% (w/v). The residual ethanol content was always lower than 0.6% (v/v) (Fig. 1).

3.2. Culture-dependent analysis

The bacterial counts were performed both by microscopy and plating. The AAB were spread on four culture media: GY, MM, V50 and V50 with 0.5% (v/v) acetic acid. In the starting wine, no bacterial populations were detected by microscope or recovered from plates. In the initial mixture and acetification samples, AAB were only recovered in two culture media: GY and MM. The recovered populations in both media were in the range between 10^4 and 10^5 CFU/ml, AAB counts being higher in GY than in MM.

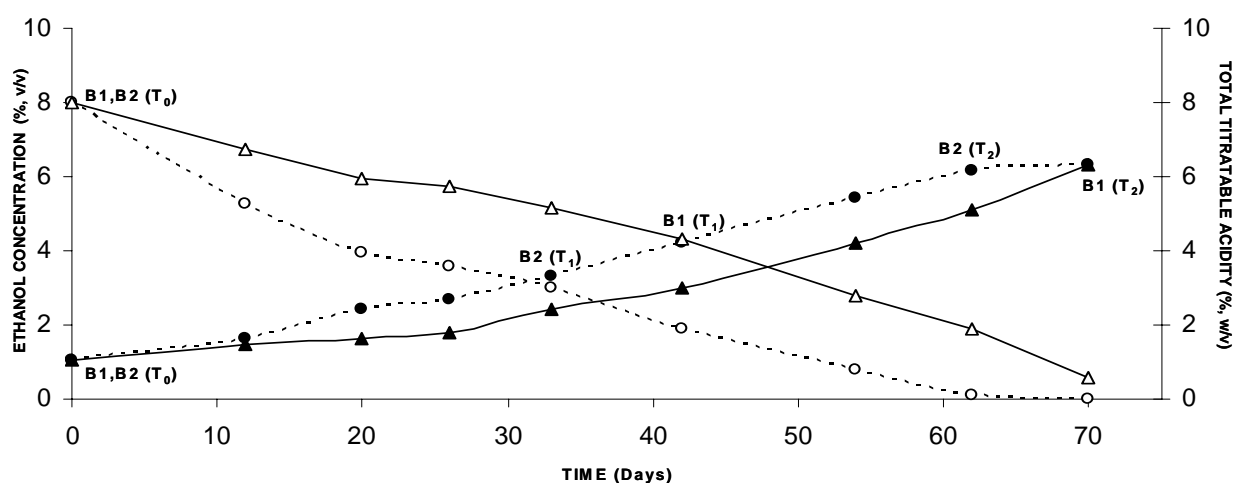


Fig.1. Evolution of the acetification process. Acetic acid production: B1 (—▲—) and B2 (---●---). Ethanol consumption: B1 (—△—) and B2 (---○---)

A total of 265 colonies were analyzed during the acetifications on both culture media. Prior to the acetification, we took samples from the starting wine and initial mixture. All these recovered colonies were grouped into 9 different strains according to the profiles obtained by (GTG)₅-rep-PCR and ERIC-PCR (Table 1). The two techniques showed no differences when the colonies were ascribed into the strain groups (results not shown). The different strain profiles were initially grouped into species by 16S rRNA gene restriction analysis. This led to an initial identification of 5 strains (1, 2, 6, 7 and 8) into 3 species (all of them of the *Gluconacetobacter* genus, *Ga. xylinus*, *Ga. europaeus* and *Ga. intermedius*) and 4 strains with unidentified species-patterns. Representative 16S rRNA gene amplicons of all the strains and species were sequenced and the sequences were phylogenetically analyzed to determine their identity or closest relatives. The four unidentified strains could be ascribed to the *Gluconacetobacter* genus (*Gluconacetobacter* sp.) (Fig. 2) as the other AAB genera were in different subgroups. The closest relative was *Ga. entanii* with a 99.75% sequence similarity. Furthermore, three of these strains had 100% sequence similarity among them. The other strain (Gs4) had a 99.71% sequence similarity with the first three. We named the group of the three unidentified strains *Ga. sp. 1* and the single strain *Ga. sp. 2*.

Table 1. Identification of AAB species and strains during the acetifications

Samples	Total titratable acidity (% w/v)	Number of isolates studied	Species (%)	Strains (%)	Strain biodiversity Simpson's index
T ₀	1.05	24	58% <i>Ga. xylinus</i>	Gx1 (58%)	0.49
			42% <i>Ga. europaeus</i>	Ge2 (42%)	
		27	52% <i>Ga. europaeus</i>	Ge2 (52%)	0.50
			48% <i>Ga. xylinus</i>	Gx1 (48%)	
GY:					
T ₁	3	26	39% <i>Ga. sp.1</i>	Gs3 (31%), Gs5 (8%)	0.80
			31% <i>Ga. europaeus</i>	Ge6 (23%), Ge2/Ge7 (4% every one)	
			15% <i>Ga. xylinus</i>	Gx1 (15%)	
			15% <i>Ga. sp. 2</i>	Gs4 (15%),	
B1 T ₂	6.3	27	89% <i>Ga. intermedius</i>	Gi8 (89%)	0.20
			11% <i>Ga. sp. 1</i>	Gs3 (11%)	
MM:					
T ₁	3	27	52% <i>Ga. xylinus</i>	Gx1 (52%)	0.61
			48% <i>Ga. sp. 1</i>	Gs3 (30%), Gs5 (18%)	
T ₂	6.3	26	78% <i>Ga. intermedius</i>	Gi8 (78%)	0.34
			22% <i>Ga. sp. 1</i>	Gs3 (22%)	
GY:					
T ₁	3.3	27	88% <i>Ga. sp. 1</i>	Gs5 (55%), Gs3 (33%)	0.58
			8% <i>Ga. europaeus</i>	Ge2/Ge6 (4% every one)	
			4% <i>Ga. sp. 2</i>	Gs4 (4%)	
T ₂	6.15	27	100% <i>Ga. sp. 1</i>	Gs3 (88%), Gs5 (12%)	0.21
MM:					
B2 T ₁	3.3	27	48% <i>Ga. sp. 1</i>	Gs3 (22%), Gs5 (19%), Gs9 (7%)	0.78
			34% <i>Ga. xylinus</i>	Gx1 (34%)	
			11% <i>Ga. europaeus</i>	Ge2 (11%)	
			7% <i>Ga. sp. 2</i>	Gs4 (7%)	
T ₂	6.15	27	84% <i>Ga. sp. 1</i>	Gs3 (84%)	0.28
			8% <i>Ga. europaeus</i>	Ge6 (8%)	
			8% <i>Ga. intermedius</i>	Gi8 (8%)	

T₀: Initial mixture; T₁: middle acetification; T₂: final acetification

In the initial mixture, only two strains, each of them from a different species, were recovered. At this point we found the species *Ga. europaeus* and *Ga. xylinus*, which were recovered in equal proportions in both media (close to 50%) (Table 1). These two starting strains were also recovered in both barrels during the acetification, although they were generally minor strains.

The strains of *Ga. sp. 1* were the predominant strains during most of the acetification processes and were recovered in very high proportions at the end, especially in B2. In this barrel a single strain of *Ga. sp. 1* (Gs3) accounted for this high proportion (over 85%). However, in B1, the main species isolated was *Ga. intermedius*, which presented a single strain (Gi8) that was predominantly recovered in both culture media (over 75%). The other strain isolated in this barrel (Gs3) was the main strain recovered at the end in B2.

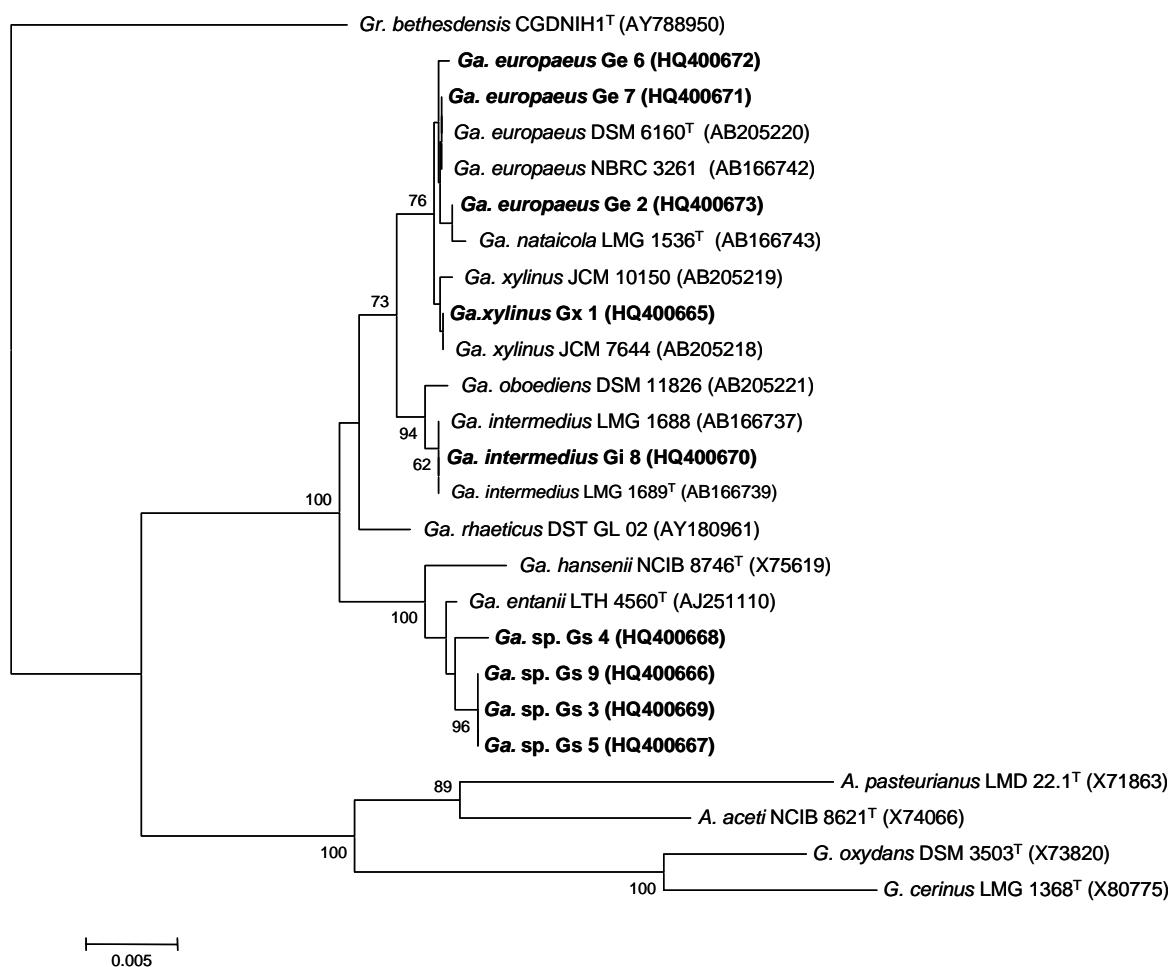


Fig. 2. Phylogenetic relationships of AAB deduced from 16S rRNA gene sequence clustering by neighbour joining. Numbers indicate the bootstrap value derived from 1000 replications. Sequences determined in this study are shown in bold. The scale bar represents 1 nucleotide substitution per 1000 nucleotides.

3.3. Culture-independent analysis

3.3.1. DGGE-PCR

In order to build up the DGGE markers, we used the reference strains of 5 isolated species (*A. pasteurianus*, *Ga. europaeus*, *Ga. xylinus*, *Ga. intermedius*, *Ga. hansenii*) together with the two different strains which belonged to *Gluconacetobacter* sp. (Gs3 and Gs4). As with the standard DGGE protocol (denaturing gradient from 30 to 60%) *Ga. intermedius*, *Ga. europaeus* and *Ga. xylinus* tend to comigrate, we tried to separate the DGGE profile of these species by modifying the denaturing gradient from 45% to 60%. With this narrower denaturing gradient we separated *Ga. intermedius* but we were unable to separate *Ga. europaeus* and *Ga. xylinus*, which showed a similar migration band (results not shown). Also *Ga. hansenii* and *Ga. sp. 1* comigrate in this gradient. Thus, we used two internal markers with relative mobility for five species and one strain of each of the unknown groups (Fig. 3). To ensure correct identification, all the bands were excised from the gel, reamplified using the same primers but without the GC clamp and identified by sequencing. As some doublets were observed in most of the bands, each band of doublets was analyzed and was confirmed to contain the same sequences.

The DGGE-PCR analysis distinguished two different species during the acetifications: *Ga. europaeus/Ga. xylinus* (band e) and *Ga. hansenii/Ga. sp. 1* (band c). The band of *Ga. europaeus/Ga. xylinus* was detected in the initial mixture and throughout the acetification in B2, although at the end of the process this band presented very low intensity, whereas *Ga. hansenii/Ga. sp. 1* was detected in all the samples from acetification, although in the first acetification point (T_1) of B2 the band was very low. The identity of the bands from the acetification samples determined by sequencing could not discriminate between *Ga. xylinus* and *Ga. europaeus* (band e) and *Ga. hansenii* and *Ga. sp. 1* (band c).

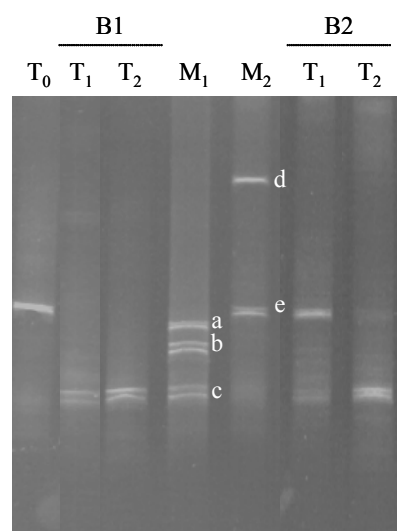


Fig. 3. DGGE-PCR analysis of acetic acid bacteria during the acetifications. M₁ and M₂ are standard patterns constructed in this study from pure cultures of different reference strains, together with Gs3 and Gs4 (*Gluconacetobacter* sp.). M₁: a) *Ga. intermedius*; b) Gs4; c) *Ga. hanseni*/Gs3. M₂: d) *A. pasteurianus*; e) *Ga. europaeus*/*Ga. xylinus*. In B1 and B2: T₀ (Initial mixture), T₁ (~ 3% (w/v) acetic acid) and T₂ (~ 6% (w/v) acetic acid).

3.3.2. RFLP-PCR 16S rRNA gene

Using the RFLP-PCR 16S rRNA gene to analyze mixed samples is difficult as some of the species present the same electrophoretic restriction patterns when they are digested with a specific restriction enzyme. Thus, a specific and sequential combination of restriction enzymes is needed to identify the different species (Table 2). The restriction enzyme sequences used in this study were as follows: 1) *TaqI* was used to distinguish *A. pasteurianus* from the *Gluconacetobacter* species group; 2) *AluI* was used to differentiate the *Ga.* sp. group from the rest of *Gluconacetobacter* species (*Ga. xylinus*/*Ga. europaeus*/*Ga. intermedius*/*Ga. hanseni*); 3) *BccI* was used to obtain three different patterns, *Ga. xylinus*, *Ga. hanseni* and the group formed by *Ga. europaeus*/*Ga. intermedius*, which were finally separated by the additional use of *XmaI*.

Ga. xylinus was the only species detected in the initial mixture, whereas the strongest pattern throughout the acetification in both barrels was for the *Ga.* sp. group, together with *Ga. xylinus* in T₁ of B2. *A. pasteurianus* was detected with low intensity but only in B1. Furthermore, in most of the acetification points, the presence of the other species (*Ga. europaeus*, *Ga. xylinus* and *Ga. intermedius*) can be also observed, although with a very low intensity (Results not shown).

Table 2. Sizes of restriction fragments obtained from the 16S rRNA gene of AAB

AAB species	Restriction patterns according to the enzyme			
	<i>TaqI</i>	<i>AluI</i>	<i>BccI</i>	<i>XmaI</i>
<i>A. pasteurianus</i>	500-375-350-210	450-320-290-200-120-50	1074-405	771-510-55
<i>Ga. sp.</i>	650-350-210-175	756-456-190-42	928-516	772-530-142
<i>Ga. xylinus</i>	650-350-210-175	790-490-120-50	948-497	1322-123
<i>Ga. europaeus</i>	650-350-210-175	790-490-120-50	948-370-128	1325-156
<i>Ga. intermedius</i>	650-350-210-175	790-490-120-50	948-370-128	772-550-159
<i>Ga. hansenii</i>	650-350-210-175	740-470-120-70-50	746-501-180	772-528-127

3.3.3. AAB enumeration by RT-PCR

The detection limit of the total AAB population (SYBR Green RT-PCR) was 10^3 cell/ml, the same as the individual species of *Ga. europaeus*, *Ga. hansenii*, *A. aceti* and *G. oxydans* with the TaqMan-MGB assay, whereas that of *A. pasteurianus* was 10^2 cell/ml. However, when some species were not detected directly by their specific probes, a pre-PCR enrichment was used to increase the sensitivity. The total AAB enumerations in all the analyzed samples were generally of the same order of magnitude as those obtained by microscope counting (10^7 cells/ml) (Table 3). However, the recovery in plate was between 2 and 3 orders of magnitude lower.

Throughout the acetification, *G. oxydans* and *A. aceti* were not detected with their species-specific TaqMan-MGB probes or after the pre-PCR enrichment. *A. pasteurianus* was only detected in B1 at T₁ and then at T₂ in both barrels (Table 3). *Ga. hansenii* was detected in all the samples studied, its population increasing with the increase in the acetic acid concentration. In contrast, the *Ga. europaeus* population was maximal in the initial mixture and then decreased throughout acetification.

Table 3. Comparison of AAB cell enumeration obtained from RT-PCR using SYBR Green and TaqMan-MGB probes, microscopy and colony counts

Samples	TaqMan-MGB Probes RT-PCR			Total TaqMan assay ^a	SYBR Green RT-PCR	Microscopy (cells/mL)	Viable counts (CFU/mL)		
	<i>A. pasteurianus</i>	<i>Ga. hansenii</i>	<i>Ga. europaeus</i>				GY	MM	
T ₀	BDL ^c	2.77E+04 ^b	1.39E+07	1.39E+07	1.42E+07	3.45E+07	1.47E+05	1.16E+05	
B1	T ₁	1.37E+05 ^b	3.60E+06	1.66E+04 ^b	3.75E+06	1.06E+07	4.40E+07	1.92E+04	1.21E+04
	T ₂	1.19E+03 ^b	4.87E+06	5.33E+04 ^b	4.92E+06	8.50E+06	1.50E+07	4.98E+04	2.11E+04
B2	T ₁	BDL ^c	5.45E+04 ^b	7.41E+03 ^b	6.19E+04	1.55E+07	3.00E+07	1.80E+04	1.45E+04
	T ₂	6.06E+03 ^b	6.84E+07	1.11E+04 ^b	6.84E+07	1.19E+07	2.30E+07	4.43E+04	9.68E+03

^a Total TaqMan-MGB assay is the sum of the three acetic acid bacteria species enumeration using each species-specific probe. ^b Quantification done using a pre-PCR before RT-PCR. ^c BDL, Below Detection Limit (<10²)

Although the TaqMan-MGB probes are highly specific, we analysed the response of the unknown strains with the different probes. All these strains gave a positive response with the *Ga. hansenii* probe. Thus, it is possible that part of the *Ga. hansenii* population detected by the TaqMan-MGB probe was in fact the group of *Ga. sp.*

Furthermore, we compared the addition of the three species-specific probes with the total AAB RT-PCR estimation, and obtained the same order of magnitude except in T₁ (for both barrels). It should be emphasized that at only one point (T₁ of B2) was this addition more than one order of magnitude lower than the microscope counting or total AAB enumeration by RT-PCR.

3.4. Culture-dependent vs. culture-independent methods

When compared, the methods tested offer similar qualitative results (Table 4). However, quantitative agreement between all the methods tested is subject to limitations. Plate recovery offers very low counts (in the range of 10⁴-10⁵ CFU/ml), whereas when the AAB population was determined using the other quantifying methods (microscope, total AAB RT-PCR and addition of specific RT-PCR), the results were at least 3 orders of magnitude higher (Table 3).

Regarding the specific results, the main species detected during the acetification (*Ga. xylinus*, *Ga. europaeus* and *Ga. sp.*) were basically identified with all the methods, with sporadic exceptions. Only specific RT-PCR was unable to detect *Ga. xylinus* because the specific probe was not available. Also, the presence of several strains that could not be ascribed to any species (*Ga. sp.*) made it difficult to compare the results. However, the fact that the strains of *Ga. sp.* hybridized with the *Ga. hansenii* probe made it easy to match those results with the fact that the other techniques observed these unknown strains throughout the acetification. The lack of detection of *Ga. intermedius* was due either to the absence of the specific probe (specific RT-PCR) or to the low intensity of this species (DGGE-PCR). Finally *A. pasteurianus* was detected by two techniques, but at very low densities, a fact which could be related to the lack of detection by DGGE-PCR or plating.

Table 4. Comparison of culture-dependent and culture-independent methods throughout the acetifications

Method	Samples					
	T ₀	B1		B2		
		T ₁	T ₂	T ₁	T ₂	
<i>Culture-dependent:</i>						
GY	<i>Ga. xylinus</i> ⁺⁺	<i>Ga. sp. 1</i> ⁺	<i>Ga. intermedius</i> ⁺⁺	<i>Ga. sp. 1</i> ⁺⁺	<i>Ga. sp. 1</i> ⁺⁺	
	<i>Ga. europaeus</i> ⁺⁺	<i>Ga. europaeus</i> ⁺	<i>Ga. sp. 1</i> ⁺	<i>Ga. europaeus</i> ⁺		
		<i>Ga. xylinus</i> ⁺		<i>Ga. sp. 2</i> ⁺		
		<i>Ga. sp. 2</i> ⁺				
MM	<i>Ga. europaeus</i> ⁺⁺	<i>Ga. xylinus</i> ⁺⁺	<i>Ga. intermedius</i> ⁺⁺	<i>Ga. sp. 1</i> ⁺⁺	<i>Ga. sp. 1</i> ⁺⁺	
	<i>Ga. xylinus</i> ⁺⁺	<i>Ga. sp. 1</i> ⁺⁺	<i>Ga. sp. 1</i> ⁺	<i>Ga. xylinus</i> ⁺	<i>Ga. europaeus</i> ⁺	
				<i>Ga. europaeus</i> ⁺	<i>Ga. intermedius</i> ⁺	
				<i>Ga. sp. 2</i> ⁺		
<i>Culture-independent:</i>						
TaqMan-MGB Probes RT-PCR	<i>Ga. europaeus</i> ⁺⁺	<i>Ga. sp./Ga. hansenii</i> ⁺⁺	<i>Ga. sp./Ga. hansenii</i> ⁺⁺	<i>Ga. sp./Ga. hansenii</i> ⁺⁺	<i>Ga. sp./Ga. hansenii</i> ⁺⁺	
	<i>Ga. sp./Ga. hansenii</i> ^t	<i>A. pasteurianus</i> ⁺	<i>Ga. europaeus</i> ⁺	<i>Ga. europaeus</i> ⁺	<i>Ga. europaeus</i> ^t	
		<i>Ga. europaeus</i> ^t	<i>A. pasteurianus</i> ^t		<i>A. pasteurianus</i> ^t	
DGGE-PCR	<i>Ga. xylinus/Ga. europaeus</i> ^{**}	<i>Ga. sp. 1/Ga. hansenii</i> ^{**}	<i>Ga. sp. 1/Ga. hansenii</i> ^{**}	<i>Ga. xylinus/Ga. europaeus</i> ^{**}	<i>Ga. sp. 1/Ga. hansenii</i> ^{**}	
				<i>Ga. sp. 1/Ga. hansenii</i> ^t	<i>Ga. xylinus/Ga. europaeus</i> ^t	
RFLP-PCR	<i>Ga. xylinus</i> ^{**}	<i>Ga. sp.</i> ^{**}	<i>Ga. sp.</i> ^{**}	<i>Ga. sp.</i> ^{**}	<i>Ga. sp.</i> ^{**}	
		<i>A. pasteurianus</i> [*]	<i>A. pasteurianus</i> [*]	<i>Ga. xylinus</i> ^{**}	<i>Ga. europaeus</i> ^t	
		<i>Ga. xylinus</i> ^t	<i>Ga. xylinus</i> ^t		<i>Ga. intermedius</i> ^t	
		<i>Ga. europaeus</i> ^t	<i>Ga. europaeus</i> ^t			
		<i>Ga. intermedius</i> ^t	<i>Ga. intermedius</i> ^t			

T₀: Initial mixture; T₁: 3% (w/v) acidity; T₂: 6% (w/v) acidity. Percentages of species identified: ++ >40%, + 1-39%, ^t Trace: <1%. Intensity of species detected: ** strong, * low, ^t very low.

Ga. sp. 1 can be considered as the main species throughout the acetification process, despite the fact that some techniques did not allow the closest species to be differentiated. Its presence can be traced to the initial mixture, in which *Ga. hansenii*, that probably included the *Ga. sp. 1*, was detected at very low density by specific RT-PCR, although other major species were also present in that mixture (especially *Ga. europaeus* and *Ga. xylinus*).

4. DISCUSSION

In this study we aimed to evaluate whether the AAB species recovered by plating are representative of those present in a traditional wine acetification. To achieve this, we compared the results obtained using a culture-dependent method with those obtained using a culture-independent method. In the culture-dependent analysis, four different culture media (GY, MM, V50 and V50 + 0.5% acetic acid (w/v)) were used for AAB recovery. The absence of AAB growth in two of the tested culture media (V50 and V50 + 0.5% acetic acid (w/v)) was unexpected, since these media were designed to mimic the composition of the AAB origin. Only a low percentage (<1%) of the total AAB population was culturable on the other two media, GY and MM. This poor recovery has already been reported by other authors (Sievers et al., 1992; Gullo et al., 2006; Torija et al., 2010; Vegas et al., 2010), and has been associated with the origin of the AAB, because vinegar is an extreme medium and a significant amount of microbiota cannot be cultivated on standard laboratory media (Sievers et al., 1992; Sokollek et al., 1998; Treck, 2005). This low culturability is the main reason why AAB are considered fastidious microorganisms (Gullo et al., 2006).

Some differences were observed in the AAB identification between both media (GY and MM), although both recovered the same main species. One of the great advantages of isolating colonies in culture media is that it enables the isolates to be identified up to strain level, as well as its further characterization. Of the 9 different strains isolated, five were identified as *Ga. europaeus*, *Ga. xylinus* and *Ga. intermedius*, which have been previously reported in wine vinegar (Treck et al., 2000; Fernández-Pérez et al., 2010; Hidalgo et al., 2010; Vegas et al., 2010). The other 4 strains were identified within the genus *Gluconacetobacter*, but they could not be associated to any known species. These strains were grouped within the *Ga. entanii*/*Ga. hansenii* cluster, although they were definitely separate from them. The closest relative was *Ga. entanii*, this species has been isolated from submerged high-acid vinegar fermentations (Schüller et al., 2000) but nowadays is not available from any culture collection due to propagation and preservation problems (Lisdiyanti et al., 2006). In contrast, the four strains isolated in this study and classified as *Gluconacetobacter sp. 1*

and 2 were easily cultured in GY and MM, which indicates the possibility of new species, although taxonomic and biochemical studies are needed to confirm this statement. Furthermore, the four strains yielded a positive response to the highly specific TaqMan-MGB probe for *Ga. hansenii* (Torija et al, 2010), which shows the similarity of the species within this cluster. However, the 4 unidentified strains were included into two different groups, as three of them shared the same 16S sequence and the same DGGE pattern. These 3 strains comigrate as *Ga. hansenii* in the DGGE-PCR. However, it should be emphasized that the DGGE amplicon is about 330 bp (De Vero and Giudici, 2008), whereas the 16S rRNA gene amplicon that we use for sequencing is 1450 bp (Ruiz et al., 2000). The other unidentified strain is 1 bp different in the DGGE amplicon, which is enough to produce a different band.

AAB diversity was greater in the middle of the acetifications (T_1 (3% acetic acid, w/v)) than at the end of the process because the acidity is lower and, therefore, the conditions are less restrictive for AAB growth and development. This fact has been already observed by other authors (Ilabaca et al., 2008; Vegas et al., 2010), that is, at the end of the acetification, few strains and species were able to survive and grow in a high percentage of acetic acid (> 6%, w/v). Furthermore, as mentioned above, all the strains isolated on plates belonged to the genus *Gluconacetobacter*, which was rather unexpected because the main species described in traditional wine vinegar was *A. pasteurianus* (Ilabaca et al., 2008; Gullo et al., 2009; Vegas et al., 2010). On the other hand, strains of *Ga. europaeus* and *Ga. intermedius* were only detected at the end of the acetification when acidity was higher (Gullo et al., 2009; Hidalgo et al., 2010; Vegas et al., 2010). The AAB plate recovery was different for both barrels, especially at the end of acetification (T_2), that is, the predominant species in B1 was *Ga. intermedius* (Gi8) whereas it was *Ga. sp. 1* in B2.

In order to evaluate whether the results obtained by plating are representative of the microbiota present in the process, different culture-independent techniques were used to detect and quantify the AAB. DGGE-PCR is probably the most commonly used technique for understanding the natural microbial populations present in environmental and food samples (Muyzer and Smalla, 1998; Cocolin et al., 2000; Randazzo et al., 2002; Ercolini, 2004). Nevertheless, it has important drawbacks such as of its inability to detect minor species (Renouf et al., 2007; Andorrà et al., 2008) and the comigration of phylogenetically related species (De Vero and Giudici, 2008). In fact, in this study, both disadvantages were corroborated, since only two bands were observed, each corresponding to two possible species. The band of *Ga. europaeus* and *Ga. xylinus* comigrated despite reducing the denaturing gradient. The main reason why we can not differentiate between

these species is because their 16S rRNA gene is very similar and their species status has been established only on the basis of DNA-DNA hybridization (De Vero and Giudici, 2008).

RFLP-PCR 16S rRNA gene analysis was also used as a culture-independent technique. The main limitation of this technique was the difficulty to detect minor species since, in mixed samples, some bands (profiles) are observed with low intensity. The same problem was reported by Ilabaca et al. (2008) when more than two AAB species were present. In any case, despite this drawback, this technique differentiated the largest number of species in this study. However, the fact that this technique requires the sequential use of different enzymes might also limit it from being routinely applied.

Finally, we used RT-PCR for the total AAB enumeration and for detecting and quantifying five AAB species. As in other studies, the enumeration of total AAB by RT-PCR was in the same order of magnitude as that obtained by microscopy counting (González et al., 2006; Andorrà et al., 2008; Torija et al., 2010).

On the other hand, only three species were detected and enumerated by the TaqMan-MGB RT-PCR (*A. pasteurianus*, *Ga. europaeus* and *Ga. hansenii*). The lack of detection of *A. aceti* and *G. oxydans* agreed with all the other methods tested. The low signal detected by the *A. pasteurianus* probe together with the low intensity obtained by RFLP-PCR 16S rRNA gene analysis could be related to the presence of a low population of this species during the process. As mentioned above, the strains of *Ga. sp.* were detected as *Ga. hansenii*. The fact that *Ga. hansenii* was not detected by other techniques suggests that the signal obtained as *Ga. hansenii* was in fact caused by *Ga. sp.*, although the presence of *Ga. hansenii* cannot be ruled out. However, these probes should still be considered as highly specific because, for example, the *Ga. europaeus* probe is able to discriminate between this species and other closely related species such as *Ga. xylinus*, *Ga. entanii*, *Ga. intermedius* and *Ga. hansenii*, which are often present in the same niches (Torija et al., 2010). Then, the differences observed between the total AAB enumeration by SYBR Green RT-PCR and microscopy and the sum of the species detected by TaqMan-MGB probes could be easily attributed to the unavailability of the specific probes for *Ga. xylinus* and *Ga. intermedius*, these species being detected by the other methods.

In general, the main species recovered by culture media can be regarded as representative of the species detected by three different culture-independent techniques. However, it should be kept in mind that culture-independent methods currently only provide information at species level.

Although the culture-independent method is more accurate and probably represents the reality of a mixed culture much better than do classical methods, it should be emphasized that the latter can be used for future studies to the isolate that would not otherwise be possible. The ability to isolate and preserve different strains for future biotechnological uses is still necessary. Furthermore, even when isolation and maintenance is possible in liquid media, the genetic drift observed in these media rules out their future use. On the other hand, just by using the culture-dependent method, new strains can be isolated that can be further be recognised as future species. In our case, we isolated two groups of strains that might be new species, although further studies are required to confirm this. However, it should be pointed out that this putative new species would have not been detected if a culture-independent method had been used alone. Nevertheless, culture-independent methods are still being developed and new approaches are needed to provide a better understanding of the complex processes of traditional vinegar production as well as other industrial processes that involve fermentations with mixed cultures.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Spanish grants RM2004-00009 from the Instituto Nacional de Investigación Agraria y Alimentaria and AGL2007-66417-C02-02/ALI from the Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología. The authors thank the Language Service of the Rovira i Virgili University for revising the manuscript.

REFERENCES

- Andorrà, I., Landi, S., Mas, A., Guillamón, J.M., Esteve-Zarzoso, B., 2008. Effect of oenological practices on microbial populations using culture-independent techniques. *Food Microbiol.* 25, 849-856.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K. (Eds.), 1992. *Short Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons Inc, London.
- Cocolin, L., Manzano, M., Cantoni, C., Comi, G., 2000. Development of a rapid method for the identification of *Lactobacillus* spp. isolated from naturally fermented Italian sausage using a polymerase chain reaction-temperature gradient gel electrophoresis. *Lett. Appl. Microbiol.* 30, 126-129.
- De Vero, L., Giudici, P., 2008. Genus-specific profile of acetic acid bacteria by 16S rDNA PCR-DGGE. *Int. J. Food Microbiol.* 125, 96-101.
- Du Toit, W.J., Pretorius, I.S., Lonvaud-Funel, A., 2005. The effect of sulphur dioxide and oxygen on the viability and culturability of a strain of *Acetobacter pasteurianus* and a strain of *Brettanomyces bruxellensis* isolated from wine. *J. Appl. Microbiol.* 98, 862-871.
- Entani, E., Ohmori, S., Masai, H., Suzuki, K., 1985. *Acetobacter polyoxogenes* sp. nov., a new species of an acetic acid bacterium useful for producing vinegar with high acidity. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 31, 475-490.
- Ercolini, D., 2004. PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food. *J. Microbiol. Methods* 56, 297-314.
- Fernández-Pérez, R., Torres, C., Sanz, S., Ruiz-Larrea, F., 2010. Strain typing of acetic acid bacteria responsible for vinegar production by the submerged elaboration method. *Food Microbiol.* 27, 973-978.
- Fleet, G.H., 1999. Microorganisms in food ecosystems. *Int. J. Food Microbiol.* 50, 101-117.
- Franke-Whittle, I.H., O'Shea, M.G., Leonard, G.J., Sly, L.I., 2005. Design, development, and use of molecular primers and probes for the detection of *Gluconacetobacter* species in the pink sugarcane mealybug. *Microb. Ecol.* 50, 128-139.
- Gammon, K.S., Livens, S., Pawlowsky, K., Rawling, S.J., Chandra, S., Middleton, A.M., 2007. Development of real-time PCR methods for the rapid detection of low concentrations of *Gluconobacter* and *Gluconacetobacter* species in an electrolyte replacement drink. *Lett. Appl. Microbiol.* 44, 262-267.
- Gevers, D., Huys, G., Swings, J., 2001. Applicability of rep-PCR fingerprinting for differentiation of *Lactobacillus* species. *FEMS Microbiol. Lett.* 205, 31-36.

- González, A., Hierro, N., Poblet, M., Mas, A., Guillamón, J.M., 2006. Enumeration and detection of acetic acid bacteria by real-time PCR and nested PCR. *FEMS Microbiol. Lett.* 254, 123-128.
- Gullo, M., Caggia, C., De Vero, L., Giudici, P., 2006. Characterization of acetic acid bacteria in “traditional balsamic vinegar”. *Int. J. Food Microbiol.* 106, 209-212.
- Gullo, M., De Vero, L., Giudici, P., 2009. Succession of selected strains of *Acetobacter pasteurianus* and other acetic acid bacteria in traditional balsamic vinegar. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 2585-2589.
- Hidalgo, C., Vegas, C., Mateo, E., Tesfaye, W., Cerezo, A.B., Callejón, R.M., Poblet, M., Guillamón, J.M., Mas, A., Torija, M.J., 2010. Effect of barrel design and the inoculation of *Acetobacter pasteurianus* in wine vinegar production. *Int. J. Food Microbiol.* 141, 56-62.
- Hierro, N., Esteve-Zarzoso, B., González, A., Mas, A., Guillamón, J.M., 2006. Real-time quantitative PCR (QPCR) and reverse transcription-QPCR for detection and enumeration of total yeasts in wine. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 7148-7155.
- Holzappel, W.H., 1997. Use of starter cultures in fermentation on a household scale. *Food Control* 8, 241-258.
- Ilabaca, C., Navarrete, P., Mardones, P., Romero, J., Mas, A., 2008. Application of culture culture-independent molecular biology based methods to evaluate acetic acid bacteria diversity during vinegar processing. *Int. J. Food Microbiol.* 126, 245-249.
- Jara, C., Mateo, E., Guillamón, J.M., Torija, M.J., Mas, A., 2008. Analysis of several methods for the extraction of high quality DNA from acetic acid bacteria in wine and vinegar for characterization by PCR-based methods. *Int. J. Food Microbiol.* 128, 336-341.
- Lisdiyanti, P., Navarro, R.R., Uchimura, T., Komagata, K., 2006. Reclassification of *Gluconacetobacter hansenii* strains and proposals of *Gluconacetobacter saccharivorans* sp. nov. and *Gluconacetobacter nataicola* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56, 2101-2111.
- López, I., Ruiz-Larrea, F., Cocolin, L., Orr, E., Phister, T., Marshall, M., VanderGheynst, J., Mills, D.A., 2003. Design and evaluation of PCR primers for analysis of bacterial populations in wine by denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 6801-6807.
- Mesa, M.M., Macías, M., Cantero, D., Barja, F., 2003. Use of the direct epifluorescence filter technique for the enumeration of viable and total acetic acid bacteria from vinegar fermentation. *J. Fluoresc.* 13, 261-265.
- Millet, V., Lonvaud-Funel, A., 2000. The viable but non-culturable state of wine microorganisms during storage. *Lett. Appl. Microbiol.* 30, 136-141.
- Moreno, C.E., 2001. Métodos para medir la biodiversidad. First edition. M and T SEA, Zaragoza – Spain.

- Muyzer, G., Smalla, K., 1998. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie Van Leeuwenhoek* 73, 127-141.
- Omar, N.B., Ampe, F., 2000. Microbial community dynamics during production of the Mexican fermented maize dough pozol. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 3664-3673.
- Ough, C.S., Amerine, M.A., 1987. *Methods for Analysis of Must and Wines*. Wiley-Interscience. Publication, California.
- Randazzo, C.L., Torriani, S., Akkermans, A.D.L., de Vos, W.M., Vaughan, E.E., 2002. Diversity, dynamics and activity of bacterial communities during production of an artisanal Sicilian cheese as evaluated by 16S rRNA analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 1882-1892.
- Renouf, V., Strehaiano, P., Lonvaud-Funel, A., 2007. Yeast and bacteria analysis of grape, wine and cellar equipments by PCR-DGGE. *J. Int. Sci. Vigne Vin* 41, 51-61.
- Ruiz, A., Poblet, M., Mas, A., Guillamón, J.M., 2000. Identification of acetic acid bacteria by RFLP of PCR-amplified 16 rDNA and 16S-23S rDNA intergenic spacer. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50, 1981-1987.
- Schüller, G., Hertel, C., Hammes, W.P., 2000. *Gluconacetobacter entanii* sp. nov., isolated from submerged high-acid industrial vinegar fermentations. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 6, 2013-2020.
- Sievers, M., Sellmer, S., Teuber, M., 1992. *Acetobacter europaeus* sp. nov., a main component of industrial vinegar fermenters in Central Europe. *Syst. Appl. Microbiol.* 15, 386-392.
- Sokollek, S.J., Hertel, C., Hammes, W.P., 1998. Description of *Acetobacter oboediens* sp. nov. and *Acetobacter pomorum* sp. nov., two new species isolated from industrial vinegar fermentation. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 48, 935-940.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S., 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24, 1596-1599.
- Torija, M.J., Mateo, E., Guillamón, J.M., Mas, A., 2010. Identification and quantification of acetic acid bacteria in wine and vinegar by TaqMan-MGB probes. *Food Microbiol.* 27, 257-265.
- Treck, J., Raspor, P., Teuber, M., 2000. Molecular identification of *Acetobacter* isolates from submerged vinegar production, sequence analysis of plasmid pJK2-1 and application in the development of a cloning vector. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 53, 289-295.
- Treck, J., 2005. Quick identification of acetic acid bacteria based on nucleotide sequences of the 16S–23S rDNA internal transcribed spacer region and of the PQQ-dependent alcohol dehydrogenase gene. *Syst. Appl. Microbiol.* 28, 735-745.
- Vegas, C., Mateo, E., González, A., Jara, C., Guillamón, J.M., Poblet, M., Torija, M.J., Mas, A., 2010. Population dynamic of acetic acid bacteria during traditional wine vinegar production. *Int. J. Food Microbiol.* 138, 130-136.

Versalovic, J., Koeuth, T., Lupski, R.J., 1991. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res.* 19, 6823-6831.

Versalovic, J., Schneider, M., De Bruijn, F.J., Lupski, J.R., 1994. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods Mol. Cell. Biol.* 5, 25-40.

DISCUSIÓN GENERAL

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
APLICACIÓN DE MÉTODOS MOLECULARES PARA EL ESTUDIO DE LAS BACTERIAS ACÉTICAS IMPLICADAS EN LA ELABORACIÓN
DE VINAGRE DE VINO TRADICIONAL
Carlos Alfredo Vegas Pérez
ISBN:/DL: T.1216-2011

En la actualidad, la mayoría de los procesos de producción de vinagres se realizan mediante métodos rápidos donde el producto es obtenido en periodos de tiempo muy cortos. Sin embargo, la principal desventaja de este método es que los vinagres son de baja calidad (Tesfaye et al., 2002). La tendencia del mercado actual hacia la demanda de productos naturales y de calidad ha planteado la necesidad de incrementar la producción de vinagres tradicionales. Sin embargo, la producción de estos vinagres resulta, en general, poco atractiva para las empresas, ya que aunque el producto obtenido es de mayor calidad, se requieren tiempos de elaboración más prolongados, lo que supone un coste mayor. Además, la consideración, hasta hace poco tiempo, del vinagre como un subproducto del vino sin valor añadido, ha relegado la producción de vinagre tradicional a un proceso artesanal con poca incidencia en el mercado.

Por tanto, se trata de un proceso al cual se ha prestado muy poca atención tanto desde un punto de vista tecnológico como microbiológico. De hecho, algunas de las prácticas utilizadas durante la elaboración del vinagre tradicional afectan negativamente tanto a la cinética del proceso de producción como a la calidad del producto final. Entre ellas cabe destacar (i) el uso de vinos picados o alterados, que afecta tanto a la calidad del vinagre como a la posible proliferación de microorganismos no deseables para el correcto desarrollo de la acetificación. El crecimiento de estos microorganismos (hongos, levaduras, bacterias lácticas, anguílulas, etc.) puede tener como consecuencia que las bacterias acéticas (BA), los microorganismos responsables de la acetificación, tarden en adaptarse e inicien la acetificación muy lentamente o incluso no se desarrollen y ocasionen paradas en la acetificación. (ii) el uso de barricas que provienen de procesos de vinificación que influye tanto en la ralentización de la acetificación como en la calidad del producto final. Las barricas de madera que se utilizan para la elaboración de vinagres suelen ser barricas viejas de roble que se reciclan de los procesos de envejecimiento y crianza del vino. Por este motivo, estas barricas permiten un paso muy limitado de oxígeno a través de la madera debido a la deposición en la parte interna de tartratos y restos sólidos del vino. Esto afecta negativamente a la producción de vinagres, ya que, a diferencia del proceso de crianza de los vinos, se trata de un proceso aeróbico, es decir, que las BA necesitan el oxígeno para la oxidación del etanol a ácido acético. De hecho, estas barricas se diseñan para permitir la mínima difusión de oxígeno y así evitar tanto una rápida oxidación del vino como el desarrollo de las BA. Además, los continuos procesos de envejecimiento de vino que se realizan en estas barricas antes de utilizarse para la elaboración de vinagres las convierten en contenedores prácticamente neutros y que por tanto, no aportan al producto final los compuestos característicos y beneficiosos de la madera. Por tanto, el uso de barricas reutilizadas provenientes de los procesos de vinificación no es adecuado para la producción de vinagres.

En esta tesis se planteó como hipótesis que el tiempo de acetificación puede reducirse mejorando la aireación durante el proceso, así las BA, aerobias estrictas, tienen más oxígeno disponible que favorece su crecimiento. Esta aireación se puede conseguir mejorando la porosidad de las barricas, favoreciendo así la entrada de oxígeno. Para ello, se analizó el efecto de utilizar barricas de diferentes grosores (15, 20 y 25 mm) y construidas con maderas más porosas que el roble, como la acacia, cerezo y castaño, en la velocidad de acetificación en dos vinagreras (Mas d'en Gil y La Guinelle). En Mas d'en Gil no se observó ninguna diferencia significativa en ninguna de las variables estudiadas, parece que el lento desarrollo de la acetificación provocado inicialmente por el alto contenido de etanol y posteriormente por la llegada del invierno con bajadas muy importantes de las temperaturas, las cuales eran incompatibles con la actividad de las BA, probablemente minimizó el efecto de estas variables. En cambio, en La Guinelle, la reducción del grosor tuvo un efecto negativo en la duración del proceso y por tanto en la velocidad de acetificación. Con estos resultados parece que la reducción del grosor no mejora el proceso. De hecho, en un estudio posterior realizado por nuestro grupo (Hidalgo et al., 2010), se observó que para conseguir una reducción importante del tiempo de acetificación se debe variar el diseño de las barricas, aumentando la apertura de carga, lo que asegura una mayor superficie de contacto aire-líquido. Así, la entrada del oxígeno a través de la barrica parece limitada, y la reducción del grosor contraproducente. Conjeturando sobre el porqué del efecto negativo de la reducción del grosor en La Guinelle, hay que destacar que en esta vinagrera las barricas se encuentran a la intemperie y por tanto, es posible que esta reducción del grosor impida mantener la temperatura constante en el interior de la barrica acentuando así las variaciones entre el día y la noche, lo que puede afectar negativamente al desarrollo de las BA. El análisis de los resultados en ambas vinagreras hace pensar que las variaciones de temperatura durante la acetificación pueden ser decisivas para el buen desarrollo del proceso y que por tanto, una temperatura constante y controlada podría mejorar el proceso. Por otra parte, el uso de maderas más porosas que el roble tuvo resultados más prometedores. En este estudio, la acacia y el cerezo fueron las maderas que redujeron significativamente la duración del proceso respecto al roble, por lo que podrían ser consideradas como una alternativa al uso del roble en los procesos de producción de vinagres tradicionales. De hecho, Ribéreau-Gayon et al. (2000) ya habían observado en procesos de maduración del vino una mayor difusión de oxígeno a través de las barricas en maderas más porosas. De todas maneras, la selección de la madera de las barricas también debe tener en cuenta el efecto de éstas sobre las características organolépticas del vinagre, intentando darle al producto un mayor valor añadido. En este sentido, Callejón et al. (2009) analizaron, en las mismas maderas utilizadas en este estudio, los compuestos volátiles minoritarios producidos durante las acetificaciones, ya que estos compuestos participan en la complejidad del aroma del vinagre. Aunque en las acetificaciones con todas las

maderas hubo un incremento similar en la cantidad total de compuestos volátiles, se detectaron diferencias en los perfiles aromáticos ya que se identificaron algunos compuestos característicos de determinadas maderas, Así, por ejemplo, compuestos como el furoato de etilo y el benzoato de etilo se encontraron únicamente en las acetificaciones con madera de cerezo dando un perfil aromático característico. Por tanto, la selección del cerezo como madera para la acetificación podría ser una buena opción, ya que reduce la duración del proceso y produce aromas particulares en el vinagre.

A nivel microbiológico, la información que teníamos de la microbiota presente durante la producción de vinagre de vino por el método tradicional era muy limitada al iniciar este trabajo. Por ello, en la hipótesis de esta tesis también se planteaba que para mejorar el proceso de acetificación es necesario conocer la microbiota implicada. Además, el conocimiento de las especies y cepas presentes durante el proceso permitirá seleccionar cultivos iniciadores que controlen el proceso, mejorando la calidad sanitaria y el perfil sensorial (Holzapfel, 1997). Así, en este trabajo se realizaron diferentes estudios ecológicos para aumentar el conocimiento disponible de las BA presentes en el vinagre tradicional de vino. El primer estudio ecológico se realizó en las mismas vinagreras del estudio anterior. Los resultados mostraron que a pesar de que las condiciones de acetificación en ambas vinagreras (clima, vino, madre del vinagre, etc.) y el tiempo de acetificación fueron muy diferentes, la misma especie, *A. pasteurianus*, se identificó como mayoritaria durante ambos procesos. Otras especies también fueron identificadas a lo largo del proceso, como *Ga. xylinus*, *G. oxydans* y *Ga. europaeus* aunque en proporciones más bajas. En cambio en los estudios posteriores, las especies mayoritarias pertenecían al género *Gluconacetobacter*. De hecho en el siguiente estudio, donde se inocularon en la Finca Experimental Mas dels Frares (URV) dos cepas de *A. pasteurianus* que habían sido de las mayoritarias en el estudio ecológico anterior, éstas no sólo no se impusieron, sino que además fueron rápidamente desplazadas por las cepas propias de la vinagrera (mayoritariamente por *Ga europaeus* y *Ga. sp.*). Finalmente en el último estudio, las principales especies identificadas fueron *Ga. xylinus*, *Ga. europaeus*, *Ga. intermedius* y *Ga. sp.* Además, en la Finca Experimental también se detectó la presencia de *Ga. saccharivorans* que nunca antes se había aislado en vinagres de vino, aunque su presencia fue muy minoritaria.

De todas estas especies, *A. pasteurianus* ya había sido identificada como la principal especie de BA involucrada en la producción de vinagres tradicional de vino en Chile (Ilabaca et al., 2008) y en otros procesos de producción de vinagres tradicionales (Nanda et al., 2001; Haruta et al., 2006). En cambio, las especies de *Gluconacetobacter* (*Ga. europaeus*, *Ga. intermedius*) se suelen asociar con la producción de vinagres por cultivo sumergido, donde la concentración del ácido acético es mucho más alta que en los vinagres tradicionales (Sievers et al., 1992; Trcek et al., 2000; Callejón

et al., 2008). La predominancia de estas especies en vinagres por cultivo sumergido se relaciona con su capacidad para tolerar elevadas concentraciones de ácido acético (Trcek et al., 2005). En procesos tradicionales, como el vinagre balsámico tradicional, *Ga. europaeus* se ha detectado al final de proceso cuando las concentraciones de ácido acético son elevadas (Gullo et al., 2006). En este tipo de vinagres Gullo et al. (2009) ha propuesto una inoculación secuencial de forma que *A. pasteurianus* inicie el proceso de acetificación y *Ga. europaeus*, debido a su resistencia al ácido acético, lo finalice. Por otra parte, *Ga. intermedius* se ha identificado recientemente en vinagres tradicionales (Hidalgo et al., 2010), siendo la especie mayoritaria al final de algunas acetificaciones. Aunque está descrito que *Ga. intermedius* no necesita la presencia de ácido acético en el medio para su crecimiento (Boesch et al., 1998), a diferencia de lo descrito para *Ga. europaeus*, parece que ambas especies se desarrollan mejor cuando hay una cantidad mínima de ácido acético. De hecho, aunque tras el primer estudio parecía que la concentración de ácido acético necesaria para el desarrollo de *Ga. europaeus* en sistemas tradicionales podía estar alrededor del 6% (p/v), los estudios posteriores mostraron el crecimiento de esta especie en presencia de porcentajes muy inferiores (a partir del 3%, p/v).

Con respecto a la tipificación de las BA se observó una sucesión de cepas mayoritarias a medida que la acidez iba aumentando. Así, en todas las acetificaciones estudiadas, excepto en las realizadas en Mas d'en Gil, se observó una alternancia entre dos cepas mayoritarias que, microbiológicamente, dividía la acetificación en dos etapas. Por tanto, tras los estudios realizados, los cultivos mixtos parecen ser la mejor opción para controlar el proceso de acetificación tradicional, utilizando una cepa que inicie la acetificación y otra cepa, resistente a concentraciones ligeramente altas de ácido acético (>3%, p/v), que la finalice, es decir algo muy similar a lo ya propuesto por Gullo et al. (2009). Así mismo, la selección de estos cultivos iniciadores parece que debería realizarse entre la microbiota autóctona de la propia vinagrera, ya que las cepas de BA son muy sensibles a las condiciones de la acetificación y se adaptan mal a los cambios ambientales. Este tipo de selección local, muy extendida en otros microorganismos, como las levaduras, ofrece una serie de ventajas, la más importante es que las cepas seleccionadas ya estarán adaptadas a las condiciones de la acetificación (temperatura, clima, tipo de vino, barricas, etc.). Además, estas cepas mantendrán la tipicidad del vinagre. De todas maneras, se han realizado muy pocos estudios con cepas de BA puras, y siempre con cepas de *A. pasteurianus* y por tanto, más estudios de selección e inoculación de cepas de BA se deberían realizar para poder sacar conclusiones.

La principal limitación de estos estudios ecológicos es que únicamente se identifica la fracción cultivable, que corresponde aproximadamente al 0.1-1% del recuento realizado con microscopio

óptico. Esta baja cultivabilidad de las BA procedentes de vinagre se asocia a que al ser el vinagre un medio estresante es difícil la posterior recuperación de BA en medios de cultivos poco o nada estresantes (Entani et al., 1985; Sievers et al., 1992; Sokollek et al., 1998; Trcek, 2005; González et al., 2006; Ilabaca et al., 2008). Por tanto, estas condiciones de estrés pueden ser la causa de que las BA puedan entrar en un estado de viable pero no cultivable (Millet y Lonvaud-Funel, 2000). Otra posible causa de las diferencias observadas en el recuento en placas respecto al contaje en microscopio es que al observarlas al microscopio, suelen encontrarse formando parejas, cadenas o agregados difíciles de separar, y por tanto, es probable que cuando estas muestras de vinagre se siembran en medios sólidos, las BA agrupadas crezcan formando una sola colonia y no una colonia por cada célula como enseña la microbiología clásica (Ilabaca et al., 2008; Torija et al., 2010). Sin embargo, probablemente la principal razón de esta baja cultivabilidad es la falta de medios sólidos adecuados que permitan recuperar el total de BA observadas en muestras de vinagres. En este sentido, varios medios de cultivos con diferentes fuentes de carbono como glucosa, manitol, etanol, etc. han sido descritos con el propósito de mejorar esta recuperación (Entani et al., 1985; Gullo et al., 2006). Sin embargo, en todos los medios ensayados, la recuperación de BA siempre ha sido más baja que lo recontado al microscopio (Sievers et al., 1992; Sokollek et al., 1998; Trcek, 2005).

Debido a estos problemas de cultivabilidad de las BA en medios sólidos, no sabemos si la información que se obtiene de los estudios ecológicos realizados es representativa de la situación real del vinagre o sólo se están recuperando aquellas BA que crecen mejor en un medio de cultivo determinado. Por ello, en esta tesis se planteó realizar el seguimiento de una acetificación con temperatura controlada en nuestra Finca Experimental, utilizando técnicas dependientes e independientes de cultivo y comparar los resultados obtenidos por ambos métodos para conocer si las identificaciones realizadas con los diferentes medios de cultivos representan la microbiota presente en los procesos de producción de vinagres tradicionales.

Para la identificación dependiente de cultivo se utilizaron cuatro medios diferentes con el propósito de recuperar la máxima diversidad de colonias de BA. Los medios GY (glucosa) y YPM (manitol) han sido ampliamente utilizados en estudios de BA aislados de vinificaciones y acetificaciones dando buenos resultados para su caracterización y mantenimiento (Drysdale y Fleet, 1988; Sokollek et al., 1998; Schüller et al., 2000; Du Toit y Lambrechts, 2002; Bartowsky et al., 2003; Gullo et al., 2006; Ilabaca et al., 2008; Gullo et al., 2009). El medio V50 (vino sintético al 50%), propuesto por Quintero et al. (2009), tenía el interés de que al tener el etanol como principal fuente de carbono, su composición se asemeja a las condiciones de inicio de acetificación. Mientras que el medio V50 + 0.5% de ácido acético es un medio que se adaptó en este trabajo para recuperar aquellas BA que

además de etanol necesiten una pequeña cantidad de ácido acético para su crecimiento, como es el caso de *Ga. europaeus* (Sievers et al., 1992; Treck et al., 2007). La ausencia de crecimiento en estos dos últimos medios sólidos (V50 y V50 + 0.5% de ácido acético) fue inesperado ya que son los que imitan mejor la composición del vinagre. En cambio, los medios de cultivo más clásicos (GY y YPM) fueron los únicos donde se recuperaron colonias de BA, siendo el GY, el medio donde la población era mayor en todos los puntos analizados. La identificación de las colonias en ambos medios mostró que, en general, se recuperaban las mismas cepas, salvo pequeñas excepciones de cepas minoritarias que se aislaron sólo en uno de los medios. A nivel de especie como ya se ha comentado, las principales especies identificadas fueron *Ga. xylinus*, *Ga. europaeus*, *Ga. intermedius* y un grupo de cuatro cepas pertenecientes al género *Gluconacetobacter*. Estas cuatro cepas que no pudieron ser identificadas a nivel de especie tras secuenciación del gen ribosomal 16S y análisis filogenético podrían ser nuevas especies. Sin embargo, estudios taxonómicos y bioquímicos deben ser realizados para confirmar esta posibilidad.

Estas identificaciones de BA cultivables fueron comparadas con los resultados obtenidos por técnicas independientes de cultivo. Las técnicas utilizadas fueron el DGGE-PCR, RT-PCR y RFLP-PCR del gen 16S rRNA utilizada también como técnica independiente de cultivo. En general, puede decirse que estas técnicas detectaron las principales especies de BA identificadas por cultivo. Sin embargo, en el análisis pormenorizado de los resultados obtenidos con cada una de ellas se han observado limitaciones propias de las técnicas que, en algunos casos, han hecho difícil interpretar y comparar los resultados. El DGGE-PCR utilizado exitosamente para la identificación de BA en vinagres por otros grupos (De Vero et al., 2006; Haruta et al., 2006; Gullo et al., 2009) mostró en nuestro estudio una serie de problemas que limitó la identificación de BA directamente del vinagre. Estas limitaciones fueron básicamente la poca diversidad observada, ya que únicamente se detectó la especie mayoritaria, y la comigración de bandas entre especies filogenéticamente cercanas. Problemas similares ya habían sido citados en otros estudios (Renouf et al., 2007; Andorrà et al., 2008; De Vero y Giudici, 2008). En cambio, la técnica de RFLP-PCR del gen de 16S rRNA fue la que nos permitió identificar el mayor número de especies. La principal limitación de esta técnica es la detección de las especies minoritarias por la baja intensidad de los perfiles obtenidos y la identificación de especies filogenéticamente cercanas ya que comparten el mismo perfil de bandas cuando son digeridas con la mayoría de las enzimas de restricción. Para la identificación de estas especies próximas es necesaria la utilización de un mayor número de enzimas, lo que la convierte en una técnica más tediosa y menos rutinaria. Problemas similares ya han sido descritos por Ilabaca et al. (2008) y Jara (2009). Por último, la técnica RT-PCR fue utilizada en primer lugar para el recuento de BA totales utilizando el marcador SYBR Green. Al igual que en otros estudios, los

recuentos obtenidos coincidían en el orden de magnitud con los recuentos al microscopio (González et al., 2006; Andorrà et al., 2008; Torija et al., 2010). Posteriormente, la RT-PCR con sondas TaqMan-MGB específicas para especie (Torija et al., 2010), permitió la identificación y cuantificación de *A. pasteurianus*, *Ga. europaeus* y *Ga. hansenii*. La detección de *Ga. hansenii* era uno de los resultados que no coincidían con lo obtenido por placa. Esta especie se detectó tanto por la DGGE-PCR como por RT-PCR con sonda específica. Aunque las sondas TaqMan-MGB son altamente específicas, las cuatro cepas de *Ga. sp.* produjeron una señal positiva con la sonda de *Ga. hansenii* y además 3 de ellas presentaban 100% de homología con *Ga. hansenii* en el fragmento de 330 pb de que se utiliza en el DGGE-PCR, por lo que la población identificada y cuantificada como *Ga. hansenii* es muy probablemente debida a este grupo de cepas no identificadas a nivel de especie, aunque esto no descarta la posible presencia de *Ga. hansenii*. De todas maneras, la principal limitación de esta técnica en este estudio ha sido la falta de sondas específicas de otras especies detectadas durante la acetificación, como *Ga. xylinus* y *Ga. intermedius*.

Por tanto, tras este estudio comparativo podemos sacar diferentes conclusiones, la primera y más importante es que las especies y cepas recuperadas en placa son representativas de la población responsable del proceso de acetificación y que por tanto, la selección de cepas a partir de estudios ecológicos por técnicas dependientes de cultivo es una opción válida. Sin embargo, estos estudios ecológicos deberían realizarse mediante la combinación de técnicas dependientes e independientes de cultivo para tener una visión más completa. Además, no es posible elegir una de las técnicas independientes de cultivo como la mejor o más idónea para estos trabajos porque todas tienen sus ventajas y limitaciones y los resultados obtenidos se complementan, y por tanto, la combinación de varias técnicas resulta lo más adecuado. Por último, se ha demostrado que se hubiera perdido información microbiológica si este proceso sólo se hubiera analizado con técnicas independientes de cultivo. Sin contar la información a nivel de cepa, únicamente disponible tras estudios dependientes de cultivo, en este trabajo, el aislamiento de “presuntas” nuevas especies de BA no hubiera sido posible si sólo se hubieran utilizado técnicas independientes de cultivo. Por tanto, a pesar de que la información que aporta las técnicas independientes de cultivo sea probablemente la que más se aproxime a la realidad del vinagre, sigue siendo necesario realizar estudios tras aislamiento en placa.

Las perspectivas futuras de este trabajo es continuar con la optimización del proceso de acetificación, incidiendo especialmente en la vertiente microbiológica. La realización de estudios de inoculación de BA utilizando cultivos mixtos podría ser una opción para mejorar el control del proceso. Otro punto importante en el que seguir trabajando es el diseño de medios de cultivo más

adecuados para la recuperación de las BA del vinagre, porque, como ya hemos comentado, el aislamiento de cepas puras requiere de cultivo en placa. En relación a la aplicación de técnicas de biología molecular, sería interesante la optimización de nuevas técnicas para la identificación y cuantificación de BA directamente del vinagre como el FISH (Blasco, 2009) o la citometría de flujo, ésta última ya está siendo aplicada con éxito en el recuento de viables en levaduras y bacterias (Mendoza et al, 2010).

REFERENCIAS

- Andorrà, I., Landi, S., Mas, A., Guillamón, J.M., Esteve-Zarzoso, B., 2008. Effect of oenological practices on microbial populations using culture-independent techniques. *Food Microbiology* 25, 849-856.
- Bartowsky, E.J., Xia, D., Gibson, R.L., Fleet, G.H., Henschke, P.A., 2003. Spoilage of bottled red wine by acetic acid bacteria. *Letters in Applied Microbiology* 36, 307-314.
- Blasco Escrivá, L., 2009. Aplicación de las técnicas FISH, PCR específica y 16S-ARDRA al estudio de la población bacteriana asociada al proceso de vinificación. Tesis Doctoral. Departament de Microbiologia i Ecologia. Facultat de Ciències Biològiques. Universitat de València.
- Boesch, C., Treck, J., Sievers, M., Teuber, M., 1998. *Acetobacter intermedius*, sp. nov. *Systematic and Applied Microbiology* 21, 220-229.
- Callejón, R.M., Tesfaye, W., Torija, M.J., Mas, A., Troncoso, A.M., Morales, M.L., 2008. HPLC determination of amino acids with AQC derivatization in vinegars along submerged and surface acetifications and its relation to the microbiota. *European Food Research and Technology* 227, 93-102.
- Callejón, R.M., Tesfaye, W., Torija, M.J., Mas, A., Troncoso, A.M., Morales, M.L., 2009. Volatile compounds in red wine vinegars obtained by submerged and surface acetification in different woods. *Food Chemistry* 113, 1252-1259.
- De Vero, L., Gala, E., Gullo, M., Solieri, L., Landi, S., Giudici, P., 2006. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) analysis to evaluate acetic acid bacteria in traditional balsamic vinegar. *Food Microbiology* 23, 809-813.
- De Vero, L., Giudici, P., 2008. Genus-specific profile of acetic acid bacteria by 16S rDNA PCR-DGGE. *International Journal of Food Microbiology* 125, 96-101.
- Drysdale, G.S., Fleet, G.H., 1988. Acetic acid bacteria in winemaking: A Review. *American Journal Enology and Viticulture* 39, 143-154.
- Du Toit, W.J., Lambrechts, M.G., 2002. The enumeration and identification of acetic acid bacteria from South African red wine fermentations. *International Journal of Food Microbiology* 74, 57-64.
- Entani, E., Ohmori, S., Masai, H., Suzuki, K. I., 1985. *Acetobacter polyoxogenes* sp. nov., a new species of an acetic acid bacterium useful for producing vinegar with high acidity. *The Journal of General and Applied Microbiology* 31, 475-490.
- González, A., Hierro, N., Poblet, M., Mas, A., Guillamón, J.M., 2006. Enumeration and detection of acetic acid bacteria by real-time and nested polymerase chain reactions. *FEMS Microbiology Letters* 254, 123-128.

- Gullo, M., Caggia, C., De Vero, L., Giudici, P., 2006. Characterisation of acetic acid bacteria in “traditional balsamic Vinegar”. *International Journal of Food Microbiology* 106, 209-212.
- Gullo, M., De Vero, L., Giudici, P., 2009. Succession of selected strains of *Acetobacter pasteurianus* and other acetic acid bacteria in traditional balsamic vinegar. *Applied and Environmental Microbiology* 75, 2585-2589.
- Haruta, S., Ueno, S., Egawa, I., Hashiguchi, K., Fujii, A., Nagano, M., Ishii, M., Igarashi, Y., 2006. Succession of bacterial and fungal communities during a traditional pot fermentation of rice vinegar assessed by PCR-mediated denaturing gradient gel electrophoresis. *International Journal of Food Microbiology* 109, 79-89.
- Hidalgo, C., Vegas, C., Mateo, E., Tesfaye, W., Cerezo, A.B., Callejón, R.M., Poblet, M., Guillamón, J.M., Mas, A., Torija, M.J., 2010. Effect of barrel design and the inoculation of *Acetobacter pasteurianus* in wine vinegar production. *International Journal of Food Microbiology* 141, 56-62.
- Holzappel, W.H., 1997. Use of starter cultures in fermentation on a household scale. *Food Control* 8, 241-258.
- Ilabaca, C., Navarrete, P., Mardones, P., Romero, J., Mas A., 2008. Application of culture culture-independent molecular methods to evaluate acetic acid bacteria diversity in vinegarmaking process. *International Journal of Food Microbiology* 126, 245-249.
- Jara Campos, C.I., 2009. Desarrollo de métodos de biología molecular para el análisis directo de bacterias acéticas del vinagre. Tesis Doctoral. Departament de Bioquímica i Biotecnologia. Facultat d'Enologia. Universitat Rovira i Virgili.
- Mendoza, L.M., Manca de Nadra, M.C., Farías, M.E., 2010. Antagonistic interaction between yeasts and lactic acid bacteria of oenological relevance. Partial characterization of inhibitory compounds produced by yeasts. *Food Research International* 43, 1990-1998.
- Millet, V., Lonvaud-Funel, A., 2000. The viable but non-culturable state of wine microorganisms during storage. *Letters in Applied Microbiology* 30, 126-141.
- Nanda, K., Taniguchi, M., Ujike, S., Ishihara, N., Mori, H., Ono, H., Murooka, Y., 2001. Characterization of acetic acid bacteria in traditional acetic acid fermentation of rice vinegar (komesu) and unpolished rice vinegar (kurosu) produced in Japan. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 986-990.
- Quintero, Y., Poblet, M., Guillamón, J.M., Mas, A., 2009. Quantification of the expression of reference and alcohol dehydrogenase genes of some acetic acid bacteria in different growth conditions. *Journal of Applied Microbiology* 106, 666-674.

- Renouf, V., Strehaiano, P., Lonvaud-Funel, A., 2007. Yeast and bacteria analysis of grape, wine and cellar equipments by PCR-DGGE. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin* 41, 51–61.
- Ribéreau-Gayon P, Dubourdiou D, Donèche B, Lonvaud A., 2000. *Handbook of Enology. The microbiology of wine and vinifications*. West Sussex, England: Wiley; Pp. 183–192.
- Schüller, G., Hertel, C., Hammes, W.P., 2000. *Gluconacetobacter entanii* sp nov. isolated from submerged high-acid industrial vinegar fermentations. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50, 2013-2020.
- Sievers, M., Sellmer, S., Teuber, M., 1992. *Acetobacter europaeus* sp-nov a main component of industrial vinegar fermenters in Central-Europe. *Systematic and Applied Microbiology* 15, 386-392.
- Sokollek, S.J., Hertel, C., Hammes, W.P., 1998. Cultivation and preservation of vinegar bacteria. *Journal of Biotechnology* 60, 195-206.
- Tesfaye, W., Morales, M.L., Garcia-Parrilla, M.C., Troncoso, A.M., 2002. Wine vinegar: technology, authenticity and quality evaluation. *Trends in Food Science and Technology* 13, 12-21.
- Torija, M.J., Mateo, E., Guillamón, J.M., Mas, A. 2010. Identification and quantification of acetic acid bacteria in wine and vinegar by TaqMan-MGB probes. *Food Microbiology* 27, 257-265.
- Trcek, J., Raspor, P., Teuber, M., 2000. Molecular identification of *Acetobacter* isolates from submerged vinegar production, sequence analysis of plasmid pJK2-1 and application in the development of a cloning vector. *Applied Microbiology and Biotechnology* 53, 289-295.
- Trcek, J., 2005. Quick identification of acetic acid bacteria based on nucleotide sequences of the 16S-23S rDNA internal transcribed spacer region and of the PQQ-dependent alcohol dehydrogenase gene. *Systematic and Applied Microbiology* 28, 735-745.
- Trcek, J., Jernejc, K., Matsushita, K., 2007. The highly tolerant acetic acid bacterium *Gluconacetobacter europaeus* adapts to the presence of acetic acid by changes in lipid composition, morphological properties and PQQ-dependent ADH expression. *Extremophiles* 11, 627-635.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
APLICACIÓN DE MÉTODOS MOLECULARES PARA EL ESTUDIO DE LAS BACTERIAS ACÉTICAS IMPLICADAS EN LA ELABORACIÓN
DE VINAGRE DE VINO TRADICIONAL
Carlos Alfredo Vegas Pérez
ISBN:/DL: T.1216-2011

CONCLUSIONES

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
APLICACIÓN DE MÉTODOS MOLECULARES PARA EL ESTUDIO DE LAS BACTERIAS ACÉTICAS IMPLICADAS EN LA ELABORACIÓN
DE VINAGRE DE VINO TRADICIONAL
Carlos Alfredo Vegas Pérez
ISBN:/DL: T.1216-2011

- La disminución del grosor de las barricas no reduce el tiempo de acetificación e incluso a veces lo aumenta, por tanto, las barricas de 25 mm son las más adecuadas para la producción de vinagre de vino por el sistema tradicional.
- La utilización de barricas de maderas más porosas que el roble, como la acacia o el cerezo, puede reducir el tiempo de acetificación hasta un tercio. Por tanto, la elección de una madera distinta del roble es un parámetro a considerar si queremos mejorar cinéticamente el proceso de producción de vinagre de vino por el sistema tradicional.
- En los procesos de producción de vinagres de vino por el sistema tradicional, la temperatura es un parámetro que se debería controlar ya que tiene una gran incidencia en el desarrollo de las BA y por tanto, de la acetificación.
- La especie de BA responsable de la producción de vinagre de vino por el sistema tradicional depende de las condiciones en las que se realice el proceso. En los estudios ecológicos realizados durante esta tesis se han identificado como especies mayoritarias tanto *Acetobacter pasteurianus* como diferentes especies de *Gluconacetobacter* (*Ga. xylinus*, *Ga. intermedius*, *Ga. europaeus*).
- Ésta es la primera vez que se describe que una acetificación por el sistema tradicional es llevada a cabo por especies de *Gluconacetobacter* desde el inicio del proceso (1% (p/v) acidez). Estas especies se han encontrado habitualmente en medios con acidez y oxigenación más elevada.
- En general, en estos estudios no se identificaron cepas que fueran mayoritarias durante todo el proceso de acetificación, sino que se observó una sucesión de cepas. Por tanto, parece que la utilización de cultivos mixtos puede ser una solución adecuada para controlar y mejorar este tipo de procesos.
- Durante este estudio, las cepas de *A. pasteurianus* inoculadas en condiciones diferentes a las de su aislamiento no se han impuesto sobre la microbiota autóctona de la vinagrería, lo que sugiere que la selección de posibles cultivos iniciadores debe realizarse en cada vinagrería, ya que las cepas propias parecen ser las mejor adaptadas a las condiciones específicas de las vinagrerías. Sin embargo, más estudios serán necesarios para corroborar esta afirmación.

- La recuperación de BA en los medios de cultivo diseñados para tener una composición similar a la del vinagre (V50 o V50 + ác. acético) fue nula mientras que en los medios glucosa y manitol, dicha recuperación fue 3 o 4 órdenes de magnitud menor al conteo realizado al microscopio. A pesar de la baja recuperación en placa, las principales especies aisladas en los medios de cultivo (glucosa y manitol) eran representativas de la microbiota responsable del proceso de producción de vinagre de vino por el sistema tradicional.
- DGGE-PCR fue la técnica que detectó menor biodiversidad de especies a lo largo de la acetificación, siendo capaz de monitorizar únicamente las especies mayoritarias. Una limitación importante de la técnica es la comigración de especies relativamente cercanas.
- RFLP-PCR del gen 16S rRNA empleada como técnica independiente de cultivo fue la que mostró una mayor diversidad de especies. Sin embargo, el empleo de una amplia variedad de enzimas de restricción es la principal desventaja que presenta para ser utilizada como técnica rutinaria.
- La utilización de sondas específicas TaqMan-MGB es interesante porque nos permite simultáneamente detectar y cuantificar las especies de BA. El principal problema es que sólo se detectan aquéllas especies de las cuales tenemos sonda lo que limita el estudio. Por tanto, es necesario el diseño de nuevas sondas (como *Ga. xylinus* o *Ga. intermedius*) para tener una visión completa de los procesos.
- Aunque el estudio de la biodiversidad por técnicas independientes de cultivo nos ofrece una visión más completa del proceso, la realización de estudios ecológicos tras siembra en placa continúa siendo esencial para la recuperación de cepas y para la detección de posibles nuevas especies de BA que no serían detectadas por otros métodos, como sucede en este estudio con los dos grupos de especies sin identificar del género *Gluconacetobacter*.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
APLICACIÓN DE MÉTODOS MOLECULARES PARA EL ESTUDIO DE LAS BACTERIAS ACÉTICAS IMPLICADAS EN LA ELABORACIÓN
DE VINAGRE DE VINO TRADICIONAL
Carlos Alfredo Vegas Pérez
ISBN:/DL: T.1216-2011

Índice

1. Vinagrerías	169
1.1. Vinagrería La Guinelle	169
1.2. Vinagrería Mas d'en Gil	169
1.3. Finca Experimental Mas dels Frares	170
2. Análisis químicos	171
2.1. Acidez total	171
2.2. Concentración de etanol y azúcares residuales	172
2.3. Contenido de oxígeno disuelto	172
2.4. Contenido de anhídrido sulfuroso libre y total	172
3. Medios de cultivo para bacterias acéticas	173
4. Metodología para la extracción DNA de bacterias acéticas	174
4.1. Preparación de la muestra	174
4.1.1. Métodos dependientes de cultivo	174
4.1.2. Métodos independientes de cultivo	174
4.2. Extracción de DNA	174
5. Técnicas moleculares	176
5.1. Cuantificación de la población total de BA	176
5.1.1. PCR a tiempo real (RT-PCR)	176
5.2. Identificación a nivel de especie	176
5.2.1. Análisis de los perfiles de restricción del amplificado del gen 16S del rRNA	176
5.2.2. DGGE-PCR (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)	178
5.2.3. RT-PCR con sondas TaqMan-MGB	179
5.3. Tipificación	181
5.3.1. ERIC-PCR	181
5.3.2. (GTG) ₅ -PCR	181

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
APLICACIÓN DE MÉTODOS MOLECULARES PARA EL ESTUDIO DE LAS BACTERIAS ACÉTICAS IMPLICADAS EN LA ELABORACIÓN
DE VINAGRE DE VINO TRADICIONAL
Carlos Alfredo Vegas Pérez
ISBN:/DL: T.1216-2011

1. VINAGRERÍAS

Las vinagreras analizadas en la tesis fueron: La Guinelle (Banyuls, Francia), Mas d'en Gil (Priorat, España) y la Finca Experimental Mas dels Frares (Tarragona, España).

1.1. Vinagrera La Guinelle

Esta vinagrera artesanal se encuentra entre las colinas de Banyuls (Pirineos Francés). Posee un clima mediterráneo. Las acetificaciones se realizan a la intemperie por tanto son más susceptible a los cambios de temperatura (Figura 1). Cuando se realizó el estudio ecológico, esta vinagrera llevaba operando cinco años. Los vinos utilizados para los procesos de acetificación son vinos de Banyuls (dulces).



Fig.1. Vinagrera La Guinelle

1.2. Vinagrera Mas d'en Gil

Viticultors Mas d'en Gil es una empresa familiar ubicada en el Priorat. Posee un microclima propio: templado y seco, con la influencia mediterránea neutralizada por vientos secos del norte. Los veranos son largos y calurosos, con temperaturas máximas de hasta 40 °C y un término medio durante todo el año de 15 °C. No obstante, la temperatura puede bajar hasta los 0 °C en el invierno (www.masdengil.com). A diferencia de la otra vinagrera, esta empresa sólo llevaba un año produciendo vinagres, sin embargo a nivel de elaboración de vinos posee una cierta tradición. Los vinos utilizados para las acetificaciones son secos. Las acetificaciones se realizan en un almacén por lo que los cambios de temperatura no son tan bruscos, a diferencia de lo que ocurre en la vinagrera anterior (Figura 2).



Fig. 2. Vinagrera Mas d'en Gil

1.3. Finca Experimental Mas dels Frares

Esta finca pertenece a la Facultat d'Enologia de la Universitat Rovira i Virgili desde el año 1990 y en ella se realiza docencia e investigación (Figura 3). Dentro de las infraestructuras de la finca se implementó una pequeña vinagrera para llevar a cabo experimentos de acetificaciones. Cuando se realizaron los estudios de esta tesis, la vinagrera llevaba 2 años operativa. Se utilizan tanto vinos dulces como secos y las acetificaciones se realizan dentro de una cámara cerrada con temperatura controlada. Dicha cámara está provista de ventiladores y extractores de aire para evitar la acumulación del ácido acético y CO_2 que se produce durante las acetificaciones.



Fig. 3. Finca Experimental Mas dels Frares

2. ANÁLISIS QUÍMICOS

Durante la tesis se han realizado las siguientes determinaciones: la acidez total, el contenido de etanol, azúcares residuales, oxígeno disuelto y anhídrido sulfuroso libre y total.

2.1. Acidez total (Ough y Amerine, 1987)

Como durante las acetificaciones, la variación de la acidez total se debe básicamente a la producción de ácido acético, se asume que se puede determinar la acidez volátil o grado acético mediante la determinación de la acidez total. Por tanto, se determina la acidez total por valoración ácido-base con la fenolftaleína como indicador y se expresa en gramos de ácido acético por 100 mL de vinagre.

Material y aparatos:

- Bureta de 50 mL graduada.
- Pipeta aforada de 10 mL con doble enrase.
- Matraces erlenmeyer de 250 mL de capacidad.

Reactivos:

- Disolución de hidróxido sódico 0.5 N.
- Solución indicadora de fenolftaleína. Para un volumen de 100 mL, se disuelve 1 g de fenolftaleína en 10 mL de agua y se enrasa con alcohol etílico (95 a 96 % en volumen) hasta los 100 mL.

Procedimiento:

Medir 1 mL de vinagre, en un erlenmeyer de 250 mL.

Diluir con 100 mL aproximadamente de agua destilada y agregar 2-3 gotas de solución indicadora de fenolftaleína.

Valorar con la solución de hidróxido sódico 0.5 N.

Cálculos:

La acidez total o grado acético del vinagre se calcula mediante la fórmula siguiente:

Acidez total o Grado acético (%) =

$$\text{mL NaOH} \times \frac{0.5 \text{ eq NaOH}}{1000 \text{ mL}} \times \frac{1 \text{ eq CH}_3\text{COOH}}{1 \text{ eq NaOH}} \times \frac{60 \text{ g CH}_3\text{COOH}}{1 \text{ eq CH}_3\text{COOH}} \times 100 =$$

$$= (\text{mL NaOH} \times 3) \text{ g de CH}_3\text{COOH por 100 mL}$$

2.2. Concentración de etanol y azúcares residuales

La determinación del etanol y los azúcares residuales se realizó mediante dos kits enzimáticos comerciales (Boehringer Mannheim, Mannheim, Alemania). El procedimiento a seguir es el que se indica en las especificaciones del fabricante.

La referencia de los kits enzimáticos son los siguientes:

- Kit del Etanol. Referencia: 10 176 290 035.
- Kit de Glucosa – Fructosa (Azúcares residuales). Referencia: 10 139 106 035.

2.3. Contenido de oxígeno disuelto

El oxígeno disuelto de los vinagres se midió por el LDO™ HQ10 Portable Dissolved Oxygen Meter (HACH Company, Loveland, CO, USA).

2.4. Contenido de anhídrido sulfuroso libre y total

La determinación del sulfuroso en las muestras de vino se realizó mediante el método GAB (García Barceló, 1990) basado en la metodología de Ripper.

Sulfuroso libre

Colocar en un Erlenmeyer: 25 mL de muestra medidos con pipeta, 2-3 mL de indicador (solución de almidón al 1%) y 5 mL de ácido sulfúrico al 33%.

Valorar con yodato potásico (N/128).

Para calcular la cantidad de sulfuroso en la muestra se multiplica el volumen gastado por 10 (1 mL equivale a 10 mg de SO₂/L).

Sulfuroso total

Colocar en un Erlenmeyer: 25 mL de muestra y 10 mL de NaOH al 4%.

Tapar, agitar y dejar en reposo durante 10 minutos.

Añadir 2-3 mL de indicador (solución de almidón al 1%).

Valorar con yodato potásico (N/128).

Para calcular la cantidad de sulfuroso en la muestra se multiplica el volumen gastado por 10.

3. MEDIOS DE CULTIVO PARA BACTERIAS ACÉTICAS

Tabla 1. Composición de los medios de cultivos utilizados durante la tesis doctoral

Componentes	GYC	YPM	V50	V50 + 0.5% ácido acético
Extracto de levadura	1%	0.50%	0.40%	0.40%
Glucosa	5%			
Manitol		2.50%		
Peptona		0.30%		
CaCO ₃ ^a	2%			
Etanol ^b			6%	6%
Glicerol ^b			0.20%	0.20%
Ácido acético				0.50%
Ácido tartárico			0.20%	0.20%
MgSO ₄ .7H ₂ O			0.05%	0.05%
MnSO ₄ .H ₂ O			0.02%	0.02%
K ₂ HPO ₄			0.05%	0.05%
CaCl ₂			0.01%	0.01%
Na acetato			0.10%	0.10%

^a Sólo se adiciona al medio GYC durante la prueba de producción de ácido.

^b Siempre se añaden después de ser autoclavados.

Contenido de agar en todos los medios sólidos: 15g/L.

Los medios de cultivos se autoclavan a 121 °C durante 15 minutos.

Después de autoclavar, se añade 100 mg/L de natamicina a todos los medios para inhibir el crecimiento de hongos y levaduras.

4. METODOLOGÍA PARA LA EXTRACCIÓN DE DNA DE BACTERIAS ACÉTICAS

4.1. Preparación de la muestra

4.1.1. Métodos dependientes de cultivo

Las muestras a analizar se diluyen y siembran en los diferentes medios de cultivos mencionados en el Anexo I.

Las placas se incuban a 28 °C durante 4-7 días.

Se seleccionan colonias de BA aleatoriamente y se resiembran en placas GY con CaCO₃ para asegurarnos que las colonias aisladas producen ácido.

La colonia se resuspende en 1 mL de agua Mili-Q estéril y se centrifuga a 10,000 rpm por 10 min.

Se elimina el sobrenadante y con el pellet ya se procede a la extracción del DNA. Este pellet también puede conservarse a -20 °C.

4.1.2. Métodos independientes de cultivo

Antes de llevar a cabo la extracción del DNA directa del vinagre, las muestras se tratan con celulasa (*Trichoderma reesei*) para degradar la celulosa producida por las BA y con EDTA-PVP al 2% para eliminar los compuestos fenólicos.

La muestra del vinagre se centrifuga a 10,000 rpm por 10 min. Se elimina el sobrenadante y se añade una solución buffer (RB buffer: 0.15 M NaCl, 0.01 M EDTA) que contiene una concentración de 5 mg/L de celulasa.

La muestra se incuba a 37 °C durante 2 horas.

Posteriormente, las muestras se centrifugan a 10,000 rpm por 10 min.

Se elimina el sobrenadante y el pellet se resuspende con EDTA-PVP al 2% (p/v) y se centrifuga a 10,000 rpm por 10 min. Este lavado con EDTA-PVP al 2% se realiza dos veces.

Se elimina el sobrenadante y el pellet se resuspende en 1 mL de agua Mili-Q estéril y se centrifuga a 10,000 rpm por 10 min.

Se elimina el sobrenadante y con este pellet se realiza la extracción del DNA.

4.2. Extracción de DNA

El método utilizado es una modificación del método CTAB descrito por Ausubel et al. (1992).

- Resuspender las células en 520 μL de TE (Tris 10 mM; EDTA 1 mM. Ajustar pH=8).
- Adicionar 30 μL de SDS 20% (SDS: Dodecil sulfato de sodio), 3 μL de Proteinasa K (20 mg/mL), homogenizar e incubar a 37 °C durante 1 hora.
- Adicionar 150 μL 5M NaCl y 140 μL CTAB (5M NaCl; 10% CTAB) y homogenizar.
- Incubar 10 min a 65 °C y luego 5 min en hielo.
- Adicionar 500 μL de cloroformo:alcohol isoamilico (24:1).
- Centrifugar en frío a 10,000 rpm por 10 min.
- Transferir la fase acuosa a un nuevo tubo de 2 mL y adicionar 380 μL de Isopropanol.
- Centrifugar en frio a 10,000 rpm por 10 min.
- Eliminar el sobrenadante y adicionar 150 μL de etanol al 70%.
- Centrifugar en frio a 10,000 rpm por 10 min.
- Eliminar el sobrenadante y secar el precipitado.
- Resuspender el precipitado en 100 μL de TE.

5. TÉCNICAS MOLECULARES

5.1. Cuantificación de la población total de BA

5.1.1. PCR a tiempo real (RT-PCR)

- Condiciones de la PCR (González et al., 2006)

Preparación de la muestra:

12.5 µL de SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems).

1.5 µL de QA1F (10µM) (Ver tabla 2).

1.5 µL de QA2R (10µM) (Ver tabla 2).

4.5 µL de agua Mili-Q estéril.

5 µL de DNA extraído.

El programa utilizado para amplificar consiste en:

2 min a 50 °C

10 min a 95 °C

40 ciclos de:

15 seg a 95 °C

1 min a 60 °C

5.2. Identificación a nivel de especie

5.2.1. Análisis de los perfiles de restricción del amplificado del gen 16S del rRNA (RFLPs-PCR 16S rRNA)

- Condiciones de la PCR (Ruiz et al., 2000)

Preparación de la muestra:

1.5 µL de cada uno de los cebadores Aceti I y Aceti IV, (10 pM cada uno) (Ver tabla 2).

5 µL de Tampón Taq 10x, sin Mg (Ecotaq).

3 µL de Cloruro de Magnesio (100 mM, Ecotaq).

1 µL de dNTPs (Boehringer Mannheim) de una mezcla que contiene 1µL de cada uno (dilución 10 mM).

0.4 µL de BSA (20 mg/mL).

5 μ L de DMSO (Dimetil sulfóxido).

29.2 μ L de agua Mili-Q estéril.

0.4 μ L de Taq polimerasa (Ecotaq).

3 μ L de DNA extraído.

El programa utilizado para amplificar consiste en 35 ciclos de:

Incubación 5 min a 94 °C

1 min a 94 °C (Desnaturalización)

45 seg a 60 °C (Hibridación)

2 min a 72 °C (Polimerización)

Al final 10 min a 72 °C para terminar de polimerizar.

- Gel para la visualización del amplificado

Preparación del gel de agarosa:

Preparar un gel al 1% (p/v) de agarosa multipurpose (Boehringer Mannheim) en TBE (Tris 0.9 M; Ácido bórico 0.9 M; EDTA 20 mM; pH=8), (concentración final: 0.4 μ g/mL).

Añadir 1 μ L de bromuro de etidio (Fluka Biochemika) por cada 25 mL de solución de TBE.

Preparación de la muestra:

5 μ L del DNA amplificado se mezcla con 1-2 μ L de azul de bromofenol (Para 10 mL: 10 mg de azul de bromofenol, 5 mL de glicerol; 1 mL de solución TBE; 4 mL de agua Mili-Q, pH: 8.3). La visualización de la banda del amplificado se realiza mediante un transiluminador de luz ultravioleta y se compara con el marcador de VC 100 pb Plus DNA ladder (Vivantis Technologies Sdn. Bhd, Selangor D.E. Malasia).

- Digestión del amplificado

Preparación de la muestra:

10 μ L del DNA amplificado.

2 μ L del Tampón correspondiente según el enzima.

1 μ L del enzima (Se utilizan 5 enzimas y sus tampones correspondientes (Boehringer Mannheim): *TaqI*, *AluI*, *BccI*, *XbaI* y *XmaI*).

7 μ L de agua Mili-Q estéril (6.8 μ L de agua Mili-Q para *BccI* y *XmaI*).

0.2 μ L de BSA (Sólo en *BccI* y *XmaI*).

Incubar según requerimiento de la enzima.

- Gel de digestión del amplificado

Preparación del gel de agarosa:

Preparar un gel al 3% (p/v) de agarosa multipurpose en TBE.

Añadir 1 μL de bromuro de etidio (Fluka Biochemika) por cada 25 mL de solución de TBE.

Preparación de la muestra:

A la muestra digerida se le añade 1-2 μL de colorante azul de bromofenol. La visualización de los fragmentos de restricción se realiza mediante un transiluminador de luz ultravioleta. Como marcador de peso molecular se utiliza: 5 μL del VC 100 pb Plus DNA Ladder.

5.2.2. DGGE-PCR (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)

- Condiciones de PCR (López et al., 2003)

Preparación de la muestra:

1 μL de cada uno de los cebadores (WBAC1^{GC} y WBAC2, 10 pM cada uno) (Ver tabla 2)

5 μL de Tampón Taq 10x, sin Mg (Ecotaq).

1.5 μL de Cloruro de Magnesio (100 mM, Ecotaq).

0.4 μL de dNTPs (Boehringer Mannheim) de una mezcla que contiene 1 μL de cada uno (dilución 10 mM).

37.85 μL de agua Mili-Q estéril.

0.25 μL de Taq polimerasa (Ecotaq).

3 μL de DNA extraído.

El programa utilizado para amplificar consiste en 30 ciclos de:

Incubación 5 min a 95 °C

1 min a 95 °C (Desnaturalización)

30 seg a 67 °C (Hibridación)

1 min a 72 °C (Polimerización)

Al final 5 min a 72 °C para terminar de polimerizar.

- Gel para la visualización de los amplificados
 1. Para realizar en forma adecuada los geles se tiene que preparar:
 - a) Solución de 100% (50 mL)
 - 21 g de Urea.
 - 20 mL de formamida.
 - 10 mL de bisacrilamida.
 - 1 mL de TAE 50% (242 g Tris base; 57,1 mL de ácido acético glacial; 100 mL de EDTA al 0.5M (pH= 8); agua destilada hasta completar 1 litro).
 - Completar con agua destilada hasta los 50 mL.
 - b) Solución al 0% (50 mL)
 - 10 mL de 40% de bisacrilamida.
 - 1 mL de TAE 50%.
 - 39 mL de agua destilada.

La mezcla de estas dos soluciones se realiza con una bomba y se prepara el gel con el gradiente de desnaturalización necesario.

2. Dejar el gel polimerizar durante unos 30-60 min. Quitar el peine del gel.
3. Situar el gel en el contenedor del baño TAE 1x calentado a 60 °C. Correr el gel a 170V por 4 horas aproximadamente.
4. Añadir el tampón de carga a las muestras (0.1 a 0.5 volúmenes de producto).
5. Enjuagar las ranuras inmediatamente antes de cargar las muestras.

- Tinción del gel:

Teñir el gel durante 20-30 min en 250 mL de TAE 1x, conteniendo 0.5 µg/mL de bromuro de etidio. Si se observa un excesivo color de fondo puede introducirse un paso de desteñido de unos 15-20 min en 250 mL de TAE 1x o agua. Examinar el gel bajo luz ultravioleta (254 nm).

5.2.3. RT-PCR con sondas TaqMan-MGB

Esta técnica se ha utilizado para la detección y cuantificación de diferentes especies de BA (*Acetobacter pasteurianus*, *Acetobacter aceti*, *Gluconobacter oxydans*, *Gluconacetobacter europaeus*, *Gluconacetobacter hansenii*).

- Condiciones de la PCR (Torija et al., 2010)

Preparación de la muestra:

- 12.5 μL de Master Mix (Applied Biosystems).
- 0.25 μL de PF (sol. Stock 10 μM) (Ver tabla 2).
- 0.25 μL de PR (sol. Stock 10 μM) (Ver tabla 2).
- 0.75 μL de sonda (sol Stock 10 μM) (Ver tabla 3).
- 6.25 μL de agua Mili-Q estéril.
- 5 μL de DNA extraído.

El programa utilizado para amplificar consiste en:

- 10 seg a 95 °C
- 40 ciclos de:
 - 15 seg a 95 °C
 - 1 min a 62 °C

PCR específica previa a la RT-PCR con sondas TaqMan-MGB

- Condiciones de PCR (Torija et al., 2010)

Preparación de la muestra:

- 5 μL de Tampón 10x sin Mg (Ecotaq).
- 3 μL de Cloruro de Magnesio (100 mM, Ecotaq).
- 1 μL de dNTPs (Boehringer Mannheim) de una mezcla que contiene 1 μL de cada uno (dilución 10 mM).
- 1.5 μL de Primer-F (cebador Forward es el mismo que en la TaqMan-MGB RT-PCR).
- 1.5 μL de Primer-R (Ver tabla 2).
- 0.4 μL de Taq polimerasa (Ecotaq).
- 32.6 μL de agua Mili-Q estéril.
- 5 μL de DNA extraído.

El programa consiste en:

- 5 min a 94 °C
- 15 ciclos de:
 - 15 min a 94 °C
 - 30 seg a 62 °C

5.3. Técnicas de tipificación de BA

5.3.1. ERIC-PCR

- Condiciones de la PCR (González et al., 2004)

Preparación de la muestra:

1 μL de cada uno de los cebadores ERICI y ERICII, (10 pM cada uno) (Ver tabla 2).

5 μL de 5XGB (1M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 1M Tris-HCl; 1M MgCl_2 ; 0.5M EDTA (pH 8.8); β -mercaptoetanol 14.4M).

0.2 μL de BSA (20 mg/mL).

1.25 μL de dNTPs (Boehringer Mannheim) de una mezcla que contiene 1 μL de cada uno (dilución 10 mM).

2.5 μL de DMSO.

10.65 μL de agua Mili-Q estéril.

0.4 μL de Taq polimerasa (Ecotaq).

3 μL de DNA extraído.

El programa utilizado para amplificar consiste en 30 ciclos de:

Incubación 5 min a 94 °C

30 seg a 94 °C (Desnaturalización)

30 seg a 57 °C (Hibridación)

4 min a 65 °C (Polimerización)

Al final 8 min a 65 °C para terminar de polimerizar.

- Gel para la visualización del amplificado

Preparar un gel al 1.5 % (p/v) de agarosa multipurpose (Boehringer Mannheim). Las otras condiciones son iguales a las antes mencionadas (apartado 5.2.1.). Los marcadores utilizados para la comparación de las bandas obtenidas son: el marcador VC 100 pb Plus DNA Ladder para las bandas pequeñas y el marcador con la mezcla del DNA del fago lambda digerido con HindIII-EcoRI y HindIII (Boehringer Mannheim) para las bandas más grandes.

5.3.2. (GTG)₅-PCR

- Condiciones de la PCR (De Vuyst et al., 2007)

Preparación de la muestra:

1 μL de cebador (GTG)₅ (10 pM) (Ver tabla 2).

5 μL de 5XGB.

0.4 μL de BSA (10 mg/mL).

1.25 μL de dNTPs (Boehringer Mannheim) de una mezcla que contiene 1 μL de cada uno (dilución 10 mM).

2.5 μL de DMSO.

13.45 μL de agua Mili-Q estéril.

0.4 μL de Taq polimerasa (Ecotaq).

1 μL de DNA extraído.

El programa utilizado para amplificar consiste en 30 ciclos de:

Incubación 5 min a 94 °C

1 min a 94 °C (Desnaturalización)

1 min a 40 °C (Hibridación)

8 min a 65 °C (Polimerización)

Al final 16 min a 65 °C para terminar de polimerizar.

- Gel para la visualización del amplificado

Preparar un gel al 0.8% (p/v) de agarosa multipurpose. Las otras condiciones son iguales a las mencionadas en el apartado 5.2.1.

Tabla 2. Cebadores utilizados en las técnicas moleculares descritas

Técnica	Cebadores	Secuencias 5'-3'	Diseñados
PCR 16S rRNA	Aceti I	5'-GCTGGCGGCATGCTTAACACAT-3'	Ruiz et al., 2000
	Aceti IV	5'-GGAGGTGATCCAGCCGCAGGT-3'	Ruiz et al., 2000
ERIC-PCR	ERIC I	5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3'	Versalovic et al., 1991
	ERIC II	5'-AAGTAAGTACTGGGGTGAGCG-3'	Versalovic et al., 1991
(GTG) ₅ -PCR	(GTG) ₅	5'-GTGGTGGTGGTGGTG-3'	De Vuyst et al., 2006
PCR-DGGE	WBAC1 ^{GC*}	5'-GTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGA-3'	López et al., 2003
	WBAC2	5'-CCCGGGAACGTATTCACCGCG-3'	López et al., 2003
RT-PCR	QA1F	5' -TCAAGTCCTCATGGCCCTTATG- 3'	González et al., 2006
	QA2R	5' -TACACACGTGCTACAATGGCG- 3'	González et al., 2006
	PF <i>Ga. europaeus</i>	5' -GGGTTAAGTCCCGCAACGA- 3'	Torija et al., 2010
	PF <i>A. aceti</i>	5' -TGGAGCATGTGGTTTAATTCTGA- 3'	Torija et al., 2010
	PF <i>A. pasteurianus</i>	5' -TCAAGTCCTCATGGCCCTTATG-3'	Torija et al., 2010
	PF <i>G. Oxydans</i>	5' -CCCAGTGTAGAGGTGAAATTCGT-3'	Torija et al., 2010
	PF <i>Ga. hansenii</i>	5' -GTCCACGTTGTAAACGATGTGT-3'	Torija et al., 2010
	PR <i>Ga. europaeus</i>	5' -ACCTTCCTCCGGCTTGTCA-3'	Torija et al., 2010
	PR <i>A. aceti</i>	5' -GCGGGAAATATCCATCTCTGAA-3'	Torija et al., 2010
	PR <i>A. pasteurianus</i>	5' -TCGAGTTGCAGAGTGCAATCC-3'	Torija et al., 2010
	PR <i>G. oxydans</i>	5' -CCAGGGTATCGCGTAACTACGA-3'	Torija et al., 2010
	PR <i>Ga. hansenii</i>	5' -TGTGCTTATCGCGTAACTACGA-3'	Torija et al., 2010
	PCR previa a RT-PCR	PR <i>A. pasteurianus</i>	5' -CCCATAGGAACCGGCAGTCT-3'
PR <i>A. aceti</i>		5' -GCCGATTGCTCAGCTCATG-3'	Torija et al., 2010
PR <i>G. oxydans</i>		5' -GTCATCCAACCTTCGTGGAGACA-3'	Torija et al., 2010
PR <i>Ga. hansenii</i>		5' -CCACGAGAAGACAGTTCCTTGGCT-3'	Torija et al., 2010
PR <i>Ga. europaeus</i>		5-CAGTCCAGTTACCCAGACCATCTC-3'	Torija et al., 2010

*GC- secuencia (5'-GCCCGCCGCGCCCCGCGCCCGGCCCGCCCGCCCCGCC-3')

Tabla 3. Sondas TaqMan-MGB utilizadas

Técnica	Sondas TaqMan	Secuencias 5'-3'	Diseñados
RT-PCR	<i>Gluconacetobacter europaeus</i>	VIC-TAGTTGCCATCACGTCTG-MGB	Torija et al., 2010
	<i>Gluconacetobacter hansenii</i>	VIC-TGGCCAAGCCATCCA-MGB	Torija et al., 2010
	<i>Gluconobacter oxydans</i>	6FAM-TGGCTCGATACTGAC-MGB	Torija et al., 2010
	<i>Acetobacter aceti</i>	VIC-CAGCCTCTCCATACAA-MGB	Torija et al., 2010
	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	6FAM-TGGTGACACCATGCT- MGB	Torija et al., 2010

REFERENCIAS

- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K., 1992. In: Short protocols in molecular biology. Jonh Willey & Sons Inc (ed.), London.
- De Vuyst, L., Vancanneyt, M., 2007. Biodiversity and identification of sourdough lactic acid bacteria. *Food Microbiology* 24, 120-127.
- García Barceló, J., 1990. In: García Barceló, J. (Ed.), Técnicas analíticas para vinos. GAB, Barcelona.
- González, A., Hierro, N., Poblet, M., Rozès, N., Mas, A., Guillamón, J.M., 2004. Application of molecular methods for the differentiation of acetic acid bacteria in a red wine fermentation. *Journal of Applied Microbiology* 96, 853-860.
- González, A., Hierro, N., Poblet, M., Mas, A., Guillamón, J.M., 2006. Enumeration and detection of acetic acid bacteria by real-time PCR and nested PCR. *FEMS Microbiology Letters* 254, 123-128.
- López, I., Ruiz-Larrea, F., Cocolin, L., Orr, E., Philster, T., Marshall, M., Vander-Gheynst, J., Mills, D., 2003. Design and evaluation of PCR primers for analysis of bacterial populations in wine by denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 6801-6807.
- Ough, C.S., Amerine, M.A., 1987. *Methods for Analysis of Must and Wines*. Wiley-Interscience. Publication, California.
- Ruiz, A., Poblet, M., Mas, A., Guillamón, J.M., 2000. Identification of acetic acid bacteria by RFLP of PCR-amplified 16 rDNA and 16S-23SrDNA intergenic spacer. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50, 1981-1987.
- Torija, M.J., Mateo, E., Guillamón, J.M., Mas, A. 2010. Identification and quantification of acetic acid bacteria in wine and vinegar by TaqMan-MGB probes. *Food Microbiology* 27, 257-265.
- Versalovic, J., Koeuth, T., Lupski, R. J. 1991. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Research* 19, 6823-6831.