



**UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI**

**Departament de Bioquímica i Biotecnologia**

**INFLUÈNCIA DE COMPONENTS DELS VINS SOBRE EL  
METABOLISME d'*Oenococcus oeni* I SOBRE LA SEVA DINÀMICA  
DE POBLACIONS A LA FERMENTACIÓ MALOLÀCTICA**

Memòria presentada per

**RAMON CARRETÉ I AIXALÀ**

per optar al grau de Doctor en Bioquímica

sota la direcció del Dr. Albert Bordons de Porrata-Doria

i de la Dra. Magda Constantí Garriga

Tarragona, 2002



*La vida, la salut, el seny són inseparables d'una bona, continuada, ampolla de vi. L'humor, la fantasia, la tolerància s'esterilitzen si no reviscolen amb aquests amables sucus de raïm. El que el vi ha fet per crear coses de qualitat, per produir espurnes d'intel·ligència, per afinar els sentits i el gust, per evitar el ridícul, per suscitar l'amor, per enriquir la comprensió, per avivar la vida de l'esperit, per fomentar la bondat, per enriquir la sensibilitat, és inenarrable per la seva mateixa desorbitada extensió. El vi constitueix un element inseparable de la vida.*

**Josep Pla**



Aquesta tesi ha estat realitzada gràcies a una beca predoctoral del “Subprograma de Formació de Profesorado Universitario” concedida pel Ministerio de Educación y Cultura. D'altra banda, s'ha comptat amb l'ajuda dels projectes finançats ALI 1995-0887-C04-01 i ALI 1997-1077-C02-02 del “Programa Nacional de Tecnología de Alimentos” (Ministerio de Educación y Cultura) i AGL 2000-0827-C02-02 del Plan Nacional de I+D (Ministerio de Ciencia y Tecnología), a més del suport de la Unitat d'Enologia del CeRTA (Centre de Referència en Tecnologia d'Aliments) de la Generalitat de Catalunya.

Els doctors Albert Bordons i Magda Constantí, com a directors de la tesi, també han fet possible que aquesta sigui una realitat. A l'Albert agraeixo la confiança que, des del primer moment, va dipositar en mi, i l'interès, suport i comprensió que m'ha anat mostrant al llarg d'aquests anys. I a la Magda, la dedicació i inquietud científica per contribuir a avançar en la fase experimental, així com les aportacions enriquidores i l'ajuda que n'he rebut.

No és pas fàcil resumir en poques línies el que han significat a nivell personal els cinc anys de tesi. Ha estat un viatge llarg, iniciat de forma una mica innocent, potser, i amb alguns moments incerts però, en conjunt, molt enriquidor. Independentment de la formació científica, les experiències viscudes i els llaços entreteixits amb altres persones que m'ha aportat aquest recorregut, constitueixen allò que més valoro.

Tampoc és fàcil anomenar tots aquells a qui voldria agrair el sol fet d'haver-me dedicat uns instants del seu temps. Per això us prego, ja d'avançada, que disculpeu qualsevol ommissió que pugui cometre, i sé que comprendreu que de cap manera no hagi estat premeditada.

Voldria agrair a tots els membres del departament de Bioquímica i Biotecnologia que m'han acollit, i especialment als que, per una proximitat física, m'han donat suport tot sovint: Antoni, Cinta, Pepa, Teresa,...

Al Santiago, sense el qual el treball de laboratori difícilment hauria estat profitós.

A la Cristina, ara en terres llunyanes, a qui li dec molt, com a amiga i com a companya, que em va obrir camí i m'ha ensenyat gran part del poc que sé d'*O. oeni*. Aquesta tesi, perquè no dir-ho, és també una mica seva.

A la Gerry, a qui, tot i no haver compartit moltes hores plegats, sempre he sentit molt propera. I a les noves “làctiques”, la Joana i la Isabel, a qui agraeixo la bona sintonia i desitjo el millor per a aquest futur proper. Tampoc vull oblidar-me de les altres persones que, en algun moment, han participat en l'equip dels “làctics”: Verònica, Marta, Eva, Marc,... De tot cor, moltes gràcies!

I penso, per descomptat, en els altres companys de tesi o de doctorat, amb qui he compartit bocins de vida ben diversos: Roser, Esther, Andreu, Gerard, Isa, M<sup>a</sup> José, Judit, Santi, Míriam, Pep, Josep, Gemma, Alfonso, Noemí, Guillem, Isabel II, Marta, Blanca, María Jesús, Maite, Sumpta, Cesc, Montse, Bernardino... Amb molts d'ells he viscut jornades memorables i hem trepitjat racons de dia... i de nit, de cims... i de “tarimes”, també.

No m'agradaria oblidar-me d'aquells qui, en el terreny enològic, han estat una referència per a mi. Agraeixo als Drs. Nicolas i Montse els seus consells i indicacions, i les bones idees que de vegades m'han aportat petites llums en la recerca, així com al Pedro, Fernando i JoaMi, a qui de tant en tant també he hagut d'amoïnar.

Tot i que només van ser uns mesos, recordo amb il·lusió i gratitud als Dr. Jean Guzzo i Dra. Fabienne Remize i la oportunitat que em van donar de treballar amb ells al laboratori de l'UMS INRA de Dijon, així com en Kamel, Hafid, Charlotte, Jérôme,..., companys enyorats d'aquella estada a la Borgonya.

I més enllà de l'àmbit acadèmic, agraeixo els ànims i la comprensió (i, de vegades, la paciència) dels amics de “la colla vella”, dels amics i amigues de Taizé, dels “Koales”, “Carpe Diem” i altres joves de la parròquia... I, perquè no, d'aquelles persones que sempre han confiat en mi i m'han parlat –en llenguatges diversos– d'esperança i de llum, de somnis i anhels personals i col·lectius pels quals paga la pena lluitar quotidianament...

I a l'Eulàlia, que des del primer moment, es va fer present gairebé de forma imperceptible.

I a la meva família, perquè han estat el puntal, el pal de paller. Els agraeixo, de tot cor, la seva comprensió i el seu recolzament, i sóc ben conscient que no puc manifestar en paraules fins a quin punt ho valoro.



A la meva família i a l'Eulàlia





## ABREVIATURES

A.E.	activitat enzimàtica específica
ATP	trifosfat d'adenosina
ATR	<i>Acidic Tolerance Response</i>
BSA	seroalbúmina bovina
C6	àcid hexanoic
C10	àcid decanoic
C12	àcid dodecanoic
CECT	Colección Española de Cultivos Tipo
CR1	soca d' <i>O. oeni</i> aïllada al Mas dels Frares
Da	Dalton (kDa=kiloDalton)
DCCD	N,N'-díciclohexilcarbodiimida
DNA	àcid desoxiribonucleic
DO	densitat òptica
dNTP	trifosfat deoxinucleòtid
$\Delta\Psi$	potencial elèctric
EDTA	àcid etilendiaminotetracètic
<i>EMBL</i>	<i>European Molecular Biology Laboratory</i>
<i>et al.</i>	<i>et altri</i>
FA	fermentació alcohòlica
FML	fermentació malolàctica
g	unitats de gravetat
H <sup>+</sup>	protó
<i>Hsp</i>	<i>Heat shock protein</i>
<i>hsp</i>	gen d' <i>Hsp</i>
kb	kilobases
LATR	<i>Lactic Acid Tolerance Response</i>
LDH	enzim lactat-deshidrogenasa
LMW	<i>Low Molecular Weight</i> (marcador de baix p.m.)
Lo18	proteïna d'estrès d' <i>O. oeni</i> de 18 kDa
MRSFM	Medi MRS enriquit amb DL-màlic i fructosa
<i>L.</i>	<i>Leuconostoc</i>

<i>Lb.</i>	<i>Lactobacillus</i>
<i>Lc.</i>	<i>Lactococcus</i>
NAD <sup>+</sup>	dinucleòtid de nicotinamida i adenina
<i>O.</i>	<i>Oenococcus</i>
<i>ORF</i>	<i>Open Reading Frame</i> (marc obert de lectura)
<i>P.</i>	<i>Pediococcus</i>
pb	parells de bases
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PFGE	<i>Pulsed Field Gel Electrophoresis</i>
pH	- log [ H <sup>+</sup> ]
pH <sub>e</sub>	pH extern
pH <sub>i</sub>	pH intern
P <sub>i</sub>	fosfat inorgànic
pK	- log K
p.m.	pes molecular
<i>pmf</i>	força protomotriu
PMSF	fluorur de fenilmetil sulfonil
p/v	pes/volum
RAPD-PCR	<i>Random Amplified Polymorphic DNA</i>
RNA	àcid ribonucleic
mRNA	RNA missatger
rRNA	RNA ribosomal
r.p.m.	revolucions per minut
RT-PCR	<i>RetroTranscriptase-Polymerase Chain Reaction</i>
<i>SD</i>	desviació estàndard
<i>SmHsp</i>	<i>Hsp</i> de baix p.m.
SDS	dodecilsulfat sòdic
TCA	àcid tricloroacètic
UFC	Unitats Formadores de Colònies
UV	ultravioleta
v/v	volum/volum
YEPDA	Medi <i>Yeast Potato Dextrose Agar</i>
YEPMA	Medi <i>Yeast Potato Mannitol Agar</i>

# ÍNDEX



---

<b>1. INTRODUCCIÓ</b>	1
<b>1.1. Els bacteris làctics i el vi</b>	3
1.1.1. La fermentació malolàctica	3
1.1.2. Control de la FML	5
1.1.3. Bacteris làctics que intervenen en la FML	9
<b>1.2. <i>Oenococcus oeni</i>, principal responsable de la FML</b>	11
1.2.1. Classificació i característiques generals	11
1.2.2. Metabolisme cel·lular bioenergètic en la FML	13
1.2.3. Condicions de creixement i factors d'estrès que afecten el desenvolupament d' <i>O. oeni</i> en el vi	15
1.2.4. Interaccions amb altres microorganismes	24
1.2.5. El metabolisme d' <i>O. oeni</i> afecta la composició sensorial del vi	25
<b>1.3. Identificació d'<i>O. oeni</i>: espècie i soca</b>	27
1.3.1. Els diferents mètodes fenotípics i morfològics	27
1.3.2. Els mètodes genotípics. Estat actual	27
<b>1.4. Respostes d'adaptació a condicions d'estrès per part dels             bacteris làctics</b>	29
1.4.1. Modificacions en la membrana plasmàtica	29
1.4.2. Resposta a les condicions àcides	30
1.4.3. Activitat ATPasa de membrana	33
1.4.4. Síntesi de proteïnes d'estrès	35
<b>1.5. Sobre les interaccions entre llevats i <i>O. oeni</i></b>	39
<b>2. OBJECTIUS</b>	43
<b>3. MATERIALS I MÈTODES</b>	47
<b>3.1. Microorganismes</b>	47
<b>3.2. Medis de cultiu</b>	47
<b>3.3. Condicions de cultiu</b>	53
<b>3.4. Condicions i seguiment de vinificació</b>	54
3.4.1. Vinificacions simulades en most	54
3.4.2. Vinificacions reals	56
3.4.3. Determinació d'alguns components del vi relacionats	

amb el metabolisme d' <i>O. oeni</i>	58
<b>3.5. Seguiment del creixement cel·lular i de la FML</b>	58
<b>3.6. Seguiment de les dinàmiques de població</b>	59
3.6.1. Aïllament de soques	59
3.6.2. Extracció del DNA	61
3.6.3. Quantificació del DNA	61
3.6.4. PCR específica d'espècie	61
3.6.5. Amplificació a l'atzar del DNA total amb 2 encebadors (RAPD-PCR múltiple)	62
3.6.6. Gels d'agarosa i anàlisi dels perfils resultants	62
<b>3.7. Metodologia emprada en l'estudi de paràmetres metabòlics (ATPasa i proteïnes d'estrès)</b>	63
3.7.1. Obtenció de cèl·lules no proliferants	63
3.7.2. Determinació de proteïnes	64
3.7.3. Aïllament de les membranes plasmàtiques	66
3.7.4. Mesura de l'activitat ATPasa	67
3.7.5. Perfils proteics en SDS-PAGE	69
3.7.6. Seqüenciació de la proteïna aïllada	72
3.7.7. Assaig de l'activitat GAPDH	73
3.7.8. Immunodetecció amb anticòs de GAPDH	74
3.7.9. RT-PCR quantitativa	76
3.7.9.1. Transcripció reversa (RT)	76
3.7.9.2. PCR quantitativa del cDNA	76
<b>3.8. Metodologia aplicada en l'estudi de l'efecte de compostos de la paret cel·lular de <i>S. cerevisiae</i> sobre <i>O. oeni</i></b>	79
3.8.1. Determinació de l'activitat lactat-deshidrogenasa	79
3.8.2. Determinació de l'activitat proteasa exocel·lular	79
3.8.3. Extracció d'RNA total bacterià	82
3.8.4. Quantificació de l'RNA	83
3.8.5. Electroforesi desnaturalitzant d'RNA	84
3.8.6. Transferència de l'RNA i fixació del gel desnaturalitzant	85
3.8.7. Obtenció de sondes marcades radioactivament	87
3.8.8. <i>Northern blot</i>	87

3.8.9. PCR per a la detecció dels gens <i>prtP</i> i <i>htrA</i>	88
<b>4. RESULTATS I DISCUSSIÓ</b>	<b>91</b>
<b>4.1. Activitat ATPasa de membrana en <i>O. oeni</i> i efecte de les diferents condicions d'estrès</b>	<b>93</b>
4.1.1. Caracterització de l'activitat H <sup>+</sup> -ATPasa en <i>O. oeni</i>	94
4.1.2. Activitat ATPasa al llarg del creixement cel·lular	96
4.1.3. Efecte de les diferents condicions d'estrès sobre l'activitat ATPasa	98
<b>4.2. Estudi dels perfils de proteïnes de membrana i de la possible expressió de proteïnes d'estrès en soques d'<i>O. oeni</i></b>	<b>106</b>
4.2.1. Electroforesis en condicions desnaturalitzants (SDS-PAGE) de les fraccions de membrana	106
4.2.2. Determinació de la seqüència N-terminal de la proteïna de 40 kDa	110
4.2.3. Caracterització parcial de la proteïna de 40 kDa	113
4.2.4. Estudi de l'expressió gènica d' <i>Hsp18</i> en la soca tipus CECT 4100	118
<b>4.3. Estudi dels efectes dels compostos de la paret cel·lular de <i>S. cerevisiae</i> sobre <i>O. oeni</i></b>	<b>134</b>
4.3.1. Relació de l'efecte inhibidor de l'etanol amb l'activitat exoproteasa d' <i>O. oeni</i>	135
4.3.2. Cerca de gens implicats en la síntesi d'exoproteases	141
4.3.3. Anàlisi dels RNAs per <i>Northern blot</i>	143
<b>4.4. Estudi de la influència d'alguns components del vi sobre la dinàmica de poblacions dels bacteris làctics durant la FA i la FML en microvinificacions simulades amb most</b>	<b>148</b>
4.4.1. Característiques de les vinificacions	148
4.4.2. Efectes sobre la FML	150
4.4.3. Efecte sobre el creixement dels bacteris làctics	152
4.4.4. Efecte sobre la dinàmica poblacional d' <i>O. oeni</i>	157
4.4.5. Relació amb alguns components del vi	161
4.4.6. Possible efecte dels bacteris làctics sobre els llevats durant la FA	164

---

<b>4.5. Estudi de la influència d'alguns components del vi sobre la dinàmica de poblacions dels bacteris làctics durant la FA i la FML en una vinificació real</b>	166
4.5.1. Característiques de les vinificacions	166
4.5.2. Seguiment de les poblacions de llevats i bacteris durant la FA	168
4.5.3. Efectes sobre la FML	169
4.5.4. Efecte sobre el creixement dels bacteris làctics	170
4.5.5. Efecte sobre la dinàmica poblacional d' <i>O. oeni</i>	172
4.5.6. Efectes sobre alguns components del vi	179
<b>5. CONCLUSIONS</b>	183
<b>6. BIBLIOGRAFIA</b>	187
<b>7. ANNEXOS</b>	209



# **1. INTRODUCCIÓ**



## 1.1. Els bacteris làctics i el vi

### 1.1.1. La fermentació malolàctica

La vinificació, un procés biotecnològic d'origen ancestral –per a alguns, com en Ribéreau-Gayon (1985), anterior a la panificació– ha passat de ser un “art” més o menys inexacte, on molts paràmetres bioquímics, físics i químics no podien ser controlats (principalment per ser desconeguts) a un procés biotecnològic industrial on, sense haver renunciat a “l’art de fer bon vi”, l’home intenta controlar al màxim tots els factors que poden influir en la qualitat del producte final.

Això s’entén encara més si considerem que en un escenari d’economia i mercats globalitzats, no es pot deixar a l’atzar l’elaboració de qualsevol producte de consum, per molt convençut que s’estigui de la qualitat de les matèries primeres o d’una tradició arrelada en el temps i en el país. La pressió de noves regions vitivinícoles emergents arreu del món, a part de les més conegudes, fa imprescindible la recerca constant en la línia de controlar tot el procés –ara ja a nivell molecular– com d’optimitzar i de satisfer les diferents i variants preferències de mercat.

La tesi que tot seguit es presenta se situa en el context de la vinificació. Més específicament, la tesi es focalitza en l’espècie bacteriana *O. oeni*, la principal responsable de la transformació d’origen microbiològic coneguda com a fermentació malolàctica (FML), posterior a la fermentació alcohòlica (FA) i que consisteix en la transformació d’una molècula d’àcid L-màlic en una d’àcid L-làctic i una altra de CO<sub>2</sub>, procés cada cop més valorat pels enòlegs (Kunkee, 1974; Wibowo *et al.*, 1985; Ribéreau-Gayon *et al.*, 1975 i 1998, entre molts altres). Efectivament, durant molts anys gran part de l’atenció se la va endur la FA, fet que ha permès disposar actualment d’uns coneixements ben consolidats que en faciliten el control en condicions reals de celler.

Tanmateix, l’existència de microorganismes en el vi diferents dels llevats no va passar desapercebuda ja en el segle XIX, i fou descoberta gairebé de forma simultània amb els llevats, tot i que Pasteur, a *Études sur le Vin* (1866, 1873) cita els bacteris làctics com a negatius per a la qualitat del vi, i cal esperar fins que Müller-Thurgau (1891, i el mateix autor i Osterwalder, 1913) entre finals del s. XIX i principis del XX, aportí dades que en demostrin beneficis sobre les qualitats organolèptiques i Koch

(1900) comprovi experimentalment que són aquests microorganismes els que desacidifiquen el vi.

Tot i així, no fou fins el anys vint i trenta, que Ferré (1922-1926) a la Borgonya i Ribéreau-Gayon (1937-1945) a Bordeus i recolzat per Peynaud, demostraren la importància enològica d'aquesta FML (Ribéreau-Gayon i Peynaud, 1961; Lafon-Lafourcade, 1983), que els bacteris làctics començaren a ésser considerats beneficiosos.

Per raons principalment climatològiques, la FML sembla més “imprescindible” en les regions del nord de França i Centreeuropa, on els nivells d'acidesa dels vins (aportats majoritàriament pels àcids tartàric i L-màlic, segons Henick-Kling, 1993) són més elevats. Això, entre d'altres motius, explicaria l'interès mostrat ja des de fa tants anys en el país veí per aquests tipus d'estudis.

En les nostres contrades, no podem dir que la FML sigui un procés “essencial” sense el qual no sigui possible obtenir un bon vi, tot i que certament és aconsellable especialment per raons d'emmagatzematge o criança i, en alguns casos, per rebaixar l'acidesa del vi un cop acabada la FA, si així es considera oportú de cara a satisfer la demanda d'un sector de consumidors (Suárez i Íñigo, 1992; Pilatte i Nielsen, 1999; Maicas, 2001). Per altra part, la FML pot ser no aconsellable en vins ja de per si poc àcids, propis sovint de regions més càlides i on no interessa que s'accentui la davallada d'acidesa perquè en perjudicaria les qualitats organolèptiques i l'estabilitat microbiològica (Rankine, 1977; Henick-Kling, 1993); en alguns vins negres lleugers i alguns blancs pot interessar, per exemple, que mantinguin remarcats aromes de raïm i una vivacitat que perdrien amb la FML (Lonvaud-Funel, 1999).

Si considerem els beneficis de la FML, podrem comprendre més fàcilment quin sentit té en el procés de vinificació:

- desacidificació del vi
- millora de les qualitats organolèptiques
- estabilització microbiològica en consumir nutrients residuals i produir agents antimicrobians (àcid làctic i bacteriocines) (Henick-Kling, 1993).

En el cas dels nostres vins, el primer aspecte no és tan transcendental com a d'altres regions més fredes, on el raïm no madura tan bé i els nivells d'acidesa són més elevats, de forma que els principals motius per a fer la FML acostumen a ser els altres dos (Kunkee, 1974; Suárez i Íñigo, 1992).

També, i a un nivell possiblement menys decisiu, es considera beneficiosa la FML perquè pot afavorir una evolució del color del vi gràcies al lleuger canvi del pH i perquè suavitza l'astringència dels vins negres en unir-se els tanins amb els polisacàrids provinents dels bacteris.

Fins i tot, quan no interessa que un vi determinat la porti a terme, continua essent primordial conèixer-la i controlar-la al màxim. Per què ens podem trobar, doncs, davant la necessitat d'aturar-la i/o d'impedir-la? A part de raons comercials, s'ha descrit una sèrie de possibles conseqüències negatives del metabolisme dels bacteris làctics en el vi:

- fermentació de sucres residuals que comporti excés d'àcids làctic i acètic, és a dir, el "picat làctic" (García *et al.*, 1992).
- degradació d'àcids orgànics, com el tartàric, el cítric o el sòrbic, que també podrà comportar "picat làctic" i altres modificacions organolèptiques (Radler, 1975; Davis *et al.*, 1986).
- degradació del glicerol (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1998).
- producció de compostos tòxics, com veurem en l'apartat **1.2.4**.
- producció d'exopolisacàrids que alteren el vi (Suárez i Íñigo, 1992).

### **1.1.2. Control de la FML**

En la vinificació tradicional, la FML és espontània, a partir dels bacteris làctics provinents del raïm i de l'equipament del celler (Lafon-Lafourcade *et al.*, 1983a). En el most, els llevats i els bacteris làctics es desenvolupen simultàniament. De fet, si no sulfitíssim, aquests podrien imposar-se sobre els llevats (Lafon-Lafourcade i Peynaud, 1974). Lonvaud-Funel (1999) ho matisa afirmant que els llevats es mostren millor adaptats per créixer en el most, principalment per l'alt contingut inicial en sucres (al voltant dels 210 g/l) i pel pH proper a 3,5. Per tot plegat, allò que succeeix en la realitat és que els bacteris làctics no es desenvolupen fins un cop els sucres no han estat consumits dràsticament pels llevats, i així s'eviten alteracions del vi degudes al ventall de productes metabòlics que es produïrien pel metabolisme de bacteris làctics i acètics.

Al llarg del seu creixement, els bacteris làctics fermenten els sucres residuals (les hexoses i pentoses no consumides per *Saccharomyces*) i transformen nombrosos components del vi (Henick-Kling, 1993; Ribéreau-Gayon *et al.*, 1998). L'àcid L-màlic

n'és el més important en termes de quantitat i influència en composició del vi, tot i que altres substrats (no tots encara prou ben precisats) són metabolitzats i probablement influeixin en el resultat organolèptic final. Les concentracions d'àcid L-màlic presents al most oscil·len des d'1-2 g/l (habituals en les nostres contrades) fins a 10 g/l en regions més fredes (Lonvaud-Funel, 1999).

Tot i que en un procés normal de vinificació la FML es pot desenvolupar perfectament, el vi és un medi de cultiu pobre i selectiu, i el nombre restringit d'espècies de bacteris làctics que s'hi poden trobar es desenvolupa sota restriccions nutricionals, físiques i químiques, per la qual cosa continua havent punts "foscos" o no del tot controlats en el procés (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1998; Lonvaud-Funel, 1999).

Històricament, la FML s'ha portat a terme en vins negres, mentre que en vins blancs, i sempre segons Lafon-Lafourcade *et al.* (1983a), fins llavors (1983), la FML tan sols s'utilitzava regularment en vinificació de blancs en algunes regions com Suïssa, Borgonya o Xampanya. Diferents raons evidencien la major dificultat dels blancs per a la FML: baix pH, deficiències nutricionals i alts nivells de SO<sub>2</sub> (Lafon-Lafourcade, 1983; Ribéreau-Gayon *et al.*, 1998). Per exemple, la clarificació, tècnica molt estesa en la vinificació en blanc, redueix considerablement la població de bacteris làctics (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1998) i si s'aplica amb excessiva intensitat, pot eliminar del medi alguns nutrients essencials per al metabolisme dels bacteris (Fornachon, 1957), mentre que en vins que han fet la FA en contacte amb la brisa (la maceració pròpia dels negres) o sotmesos a un trasbals retardat, la FML es veu afavorida perquè s'hi troben components provinents de les pells i llavors i de la lisi de llevats, que constitueixen nutrients per als bacteris làctics (Lafon-Lafourcade i Peynaud, 1961; García *et al.*, 1992), alhora que alguns es combinen amb el SO<sub>2</sub> i en redueixen els nivells lliures (Delteil, 2000a).

Les vies per estimular la FML i evitar, alhora, efectes secundaris indesitjats, es basen en la selecció i control de condicions que afavoreixin el creixement de la flora malolàctica autòctona, principalment: pH adequat, concentració de SO<sub>2</sub> total baixa, temperatura de conservació del vi apropiada (al voltant de 20°C i com a límit superior, 25°C), contacte prolongat del vi amb les mares, realització de trasbalsos retardats i grau alcohòlic no excessivament elevat (Wibowo *et al.*, 1985; García *et al.*, 1992; Costello, 1993). A més, nombrosos estudis, entre ells els de Henick-Kling *et al.* (1989) i Zúñiga

*et al.* (1991), posen de manifest que els bacteris làctics autòctons són els més eficaços per efectuar la FML en un vi determinat.

Quan aquestes condicions no són compatibles amb els interessos de l'endòleg, es recorre a la inducció de la FML per altres mitjans més directes, com ho és la inoculació de cultius iniciadors comercials. Segons Lafon-Lafourcade (1983) la inoculació massiva en ordres de  $10^7$  cèl·lules/ml pot compensar els efectes inhibidors d'altres concentracions d'etanol, deficiències nutricionals, baixes temperatures i presència de  $SO_2$ .

Durant les dècades dels setanta i vuitanta, si es volia estimular la FML, l'opció habitual era la inoculació d'un volum determinat de vi en plena FML (per tant, amb bacteris làctics actius), si bé sovint en calien grans volums que no estaven disponibles en els cellers (Castino *et al.*, 1975) i es desconeixia tant la densitat final de cèl·lules (que no hauria de ser inferior a  $10^6$  cèl·lules/ml) com el seu estat fisiològic (Lafon-Lafourcade *et al.*, 1983a).

Fou necessari força anys de recerca experimental i d'èxits parcials per aconseguir que les preparacions industrials d'inòculs fossin realment eficaces (Gindreau *et al.*, 1997). Les primeres generacions eren preparacions liofilitzades d'*O. oeni* amb unes altes densitats cel·lulars ( $10^{11}$ - $10^{12}$  UFC/g) i que calia reactivar prèviament (Joyeux i Lonvaud-Funel, 1985) amb una incubació d'1 o 2 dies en un medi nutritiu, a més de fer-les passar per successius peus de cuba de volums creixents (*scale-up*). Els criteris més habituals per a la selecció dels iniciadors són: facilitat de creixement i magatzematge dels cultius, rapidesa del desenvolupament en el vi i l'efecte neutre sobre les qualitats organolèptiques (Kunkee, 1984). El primer cultiu iniciador, o estarter, que no requeria preadaptació prèvia (*ready-to-use starter*) per a inoculació directa, Viniflora oenos™ (1993) (Chr Hansen's Laboratory Danmark A/S) fou avaluat en diverses àrees productores (Nielsen *et al.*, 1996a i b), amb resultats força positius excepte amb vins blancs molt àcids. Des de llavors, s'han anat desenvolupant nous cultius iniciadors per selecció de soques d'*O. oeni*. Gindreau *et al.* (1997) van experimentar amb 6 iniciadors malolàctics per avaluar la capacitat de desenvolupar la FML en diferents tipus de vins i establir quins s'adaptaven millor en cadascun d'ells. En la majoria dels casos van observar que s'imposava la soca inoculada sobre les autòctones, tot i que no sempre comportava beneficis organolèptics.

Els principals avantatges que implica la inoculació amb iniciadors preparats industrialment són el bon control sobre el moment d'inici de la FML, el guany de temps en el conjunt del procés de vinificació i la reducció de possibles alteracions organolèptiques en partir de soques seleccionades, normalment d'*O. oeni*, tot i que també s'han comercialitzat altres soques heterofermentatives facultatives, com *Lactobacillus plantarum* (Prahl *et al.*, 1988; Cavin *et al.*, 1989). Cada cop més estesa, té un cert cost econòmic i cal optimitzar al màxim la resta de condicions de vinificació per a fer-la rendible, assegurant-nos que s'escurça significativament el temps de FML, que la possibilitat de contaminació per part d'altres bacteris indesitjats és molt baixa i que s'imposa realment la soca inoculada (Delteil, 2001) .

Un altre avantatge de la inoculació, és que si es coneix quina soca de bacteris làctics ha portat a terme la FML, també es disposa de més informació sobre les possibles qualitats organolèptiques del producte final, ja que a cada soca seleccionada se li pot associar particularitats analítiques, aromàtiques i de tast. Si bé aquesta última afirmació sembli agosarada, s'observa una tendència per part de nombrosos productors a cercar productes preconcebuts (Pilatte i Nygaard, 1999; Delteil, 2000b). Segons Pilatte i Nielsen (1999), entre els avantatges observats per inoculació dels vins, a part d'una reducció del temps ja esmentada, hi ha l'obtenció de nivells lleugerament inferiors tant d'acidesa volàtil final com d'amines biògenes respecte les FMLs espontànies.

Convien diverses opinions sobre en quin moment s'ha d'inocular el vi. Alguns autors (Kunkee, 1967) recomanen fer-ho abans o durant la FA, ja que part del SO<sub>2</sub> es trobaria associat als àcids orgànics produïts pels llevats (Van Vuuren i Dicks, 1993), mentre que d'altres (Gallander, 1979) hi mostren reticències o bé opinen que cal fer-ho un cop acabada la FA, quan els sucres són residuals (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1975 i 1985). Gallander (1979) i Lafon-Lafourcarde *et al.* (1983b) obtingueren dades experimentals que mostraven un baix rendiment, tant en biomassa com en consum d'àcid L-màlic, quan s'inoculava al principi, motivat per una concentració massa alta de SO<sub>2</sub>, excessiva competència dels llevats sobre el consum de nutrients disponibles i absència de compostos derivats de l'autòlisi de llevats. A part d'això, existiria un major risc de picat làctic per degradació metabòlica dels sucres (Lafon-Lafourcarde *et al.*, 1983b) o d'alteracions derivades del metabolisme de degradació d'altres compostos, com àcids orgànics o glicerol. Ara bé, sembla que s'ha anat imposant majoritàriament



la inoculació un cop acabada la FA, ja que es redueix el risc de “picat làctic” i es troben en el vi nutrients procedents d'autòlisi dels llevats que afavoreixen el creixement dels bacteris làctics (Beelman *et al.*, 1982).

Malgrat tot, alguns autors qüestionen la inoculació i presenten evidències empíriques que indueixen a pensar que són els bacteris làctics autòctons els més eficaços per efectuar la FML en un vi determinat (Wibowo *et al.*, 1985; Henick-Kling *et al.*, 1989; Zúñiga *et al.*, 1990; Reguant, 2001).

### 1.1.3. Bacteris làctics que intervenen en la FML

En el most, s'han identificat fins a 10 espècies diferents de bacteris làctics, pertanyents als gèneres *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* i *Oenococcus* (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1998; Lonvaud-Funel, 1999), tal com es pot veure en la següent taula (Taula 1.1).

**Taula 1.1.** Espècies de bacteris làctics aïllats en mosts i vins.

<b>Lactobacils</b>	Heterofermentatius facultatius	<i>Lactobacillus casei</i> <i>Lactobacillus plantarum</i>
	Heterofermentatius obligatoris	<i>Lactobacillus brevis</i> <i>Lactobacillus hilgardii</i> <i>Lactobacillus fructivorans</i> <sup>(1)</sup>
<b>Cocs</b>	Homofermentatius	<i>Pediococcus damnosus</i> <i>Pediococcus pentosaceus</i> <i>Pediococcus parvulus</i> <sup>(2)</sup>
	Heterofermentatius	<b><i>Oenococcus oeni</i></b> <i>Leuconostoc mesenteroides</i> <i>subsp. mesenteroides</i>

(1) i (2) Aïllats en vins de l'estat de Washington (Edwards *et al.*, 1994) i d'Austràlia (Davis *et al.*, 1988).

Segons quines siguin les condicions climàtiques durant els darrers dies de la maduració del raïm, la població inicial en el most pot oscil·lar de 10<sup>2</sup> UFC/ml a 10<sup>4</sup>

UFC/ml (Lafon-Lafourcade, 1986). Existeix una relació directa amb el pH: com més alt, major població de bacteris làctics totals (Lonvaud-Funel, 1999).

Al llarg dels primers dies de la FA, la població augmenta fins a un màxim de  $10^4$  UFC/ml, i llavors decreix fins al voltant de  $10^2$  UFC/ml cap al final de la FA (Lonvaud-Funel, 1999). Els principals components de la microbiota làctica són *Pediococcus sp.*, *L. mesenteroides* i *O. oeni* (Lafon-Lafourcade *et al.*, 1983a), mentre que els lactobacils homofermentatius, majoritaris en el most, són desplaçats progressivament pels heterofermentatius o bé per *L. mesenteroides*, si bé cal ser prudents a l'hora d'extrapolar aquestes dades, ja que hi intervenen condicionants geogràfics i climàtics (Wibowo *et al.*, 1985).

En les regions vitivinícoles del nostre país –la majoria de les quals es poden considerar càlides– la FML s'esdevé pocs dies després d'acabada la FA, quan la població de bacteris làctics assoleix  $10^6$  UFC/ml, i en anyades caloroses gairebé és consecutiva, sense lapse de temps (fase *lag*) intermedi (Reguant, 2001).

Molt més important que el nombre total de bacteris és la diversitat interespecífica, que disminueix ostensiblement al llarg de la FA en incrementar-se els nivells d'etanol i d'altres metabòlits secundaris provinents dels llevats, de forma que en la majoria de casos és *O. oeni* qui predomina al final de la FA (Lonvaud-Funel, 1991; Masqué i Bordons, 1996; Reguant, 2001) i realitza la FML, tot i que algunes soques de *Pediococcus* i *Lactobacillus* podran haver sobreviscut i mantenir-se en nivells latents. Igualment, existeixen interaccions entre les diferents espècies de bacteris làctics, ja sigui per competició a nivell de nutrients o per síntesi de bacteriocines (Lonvaud-Funel i Joyeux, 1993; Navarro *et al.*, 2000).

A més, l'atac de fags sobre els bacteris làctics és un altre factor que pot condicionar en alguns casos la FML, i Arendt *et al.* (1991) i Poblet *et al.* (1998) demostraren l'existència de lisogènia en *O. oeni*, que no afecta per igual totes les soques presents en un mateix vi, de forma que només una part de la població total d'*O. oeni* es veu afectada, i actua com a mecanisme involucrat en la selecció natural de soques.

Un cop finalitzada la FML, el vi és estabilitzat amb  $\text{SO}_2$  per eliminar els bacteris i llevats romanents i evitar contaminacions indesitjades per pediococs i lactobacils que, com ja s'ha comentat, poden continuar presents en el vi (García *et al.*, 1992).

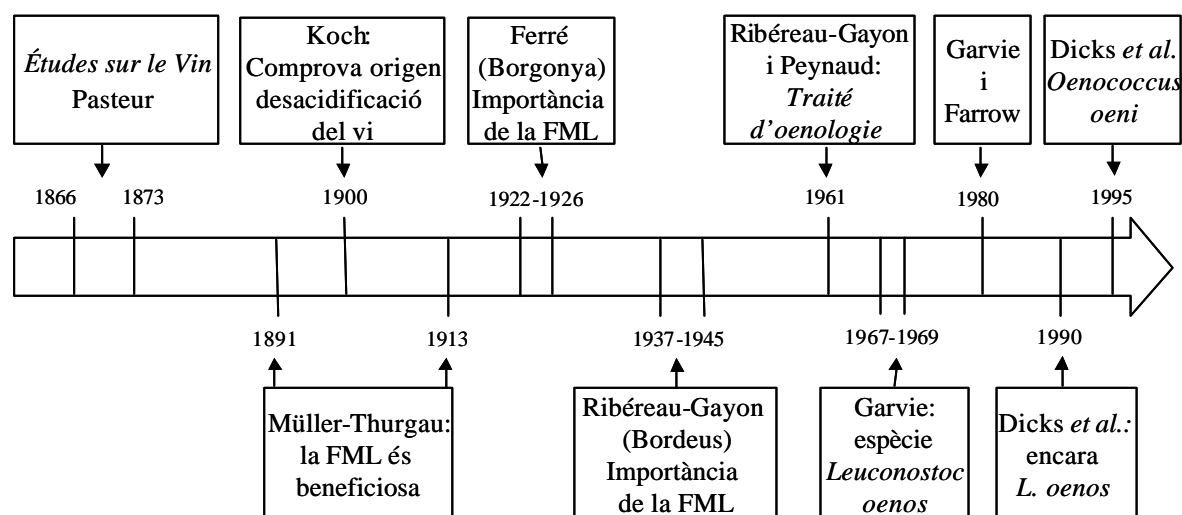
## 1.2. *Oenococcus oeni*, principal responsable de la FML

### 1.2.1. Classificació i característiques generals

- **Classificació**

La consideració d'*O. oeni* com a espècie és relativament recent. Garvie (1967) va proposar-ne la creació per classificar aquelles soques aïllades del vi que es diferenciaven d'altres leuconostocs per una major tolerància a l'acidesa i l'etanol, a més de la capacitat de degradar un factor de creixement present al suc de tomàquet, el glucopantotenat, a part d'altres característiques en la fermentació d'hidrats de carboni. Garvie (1969), Garvie i Farrow (1980) i Dicks *et al.* (1990) refermaren aquesta classificació a partir d'estudis de caire enzimàtic i proteic (veure figura 1.1).

Les tècniques de biologia molecular van permetre a Dicks *et al.* (1995b) –recollint també informació aportada per altres grups durant els primers anys 1990– suggerir la reclassificació de l'espècie *L. oenos* en un nou gènere, *Oenococcus*, on l'espècie tipus havia de ser *O. oeni*, nova classificació que ja apareixerà en la segona edició del manual Bergey's (Madigan *et al.*, 2000), encara en elaboració (veure figura 1.1 i taula 1.2).



**Figura 1.1.** Cronologia de les fites més destacables en el coneixement de la FML i de la classificació del bacteri làctic *O. oeni*.

- **Característiques d'*O. oeni***

**Taula 1.2.** Característiques de l'espècie *O. oeni* segons la descripció de Dicks *et al.* (1995b).

<b>Generals</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Grampositiu</li> <li>• No mòbil</li> <li>• No esporulat</li> <li>• Quimiorganòtrof</li> <li>• Anaerobi facultatiu</li> <li>• Catalasa negatiu</li> <li>• Sense citocroms</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• No proteolític</li> <li>• No redueix nitrats</li> <li>• No hemolític</li> <li>• No forma indol</li> <li>• Tipus de mureïna: L-Lys-L-Ala-L-Ser o L-Lys-L-Ser-L-Ser.</li> <li>• % G+C: 38-42 %.</li> <li>• Aïllat del vi i d'hàbitats relacionats.</li> </ul>
<b>Morfològiques</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Cèl·lules el·lipsoidals o esfèriques que formen parelles o cadenes.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• La morfologia cel·lular canvia en funció de la soca i del medi de creixement.</li> </ul>
<b>De creixement</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Acidòfil</li> <li>• En most i vi a pH 3,5-3,8.</li> <li>• No inhibit per etanol al 10 % (v/v).</li> <li>• Temperatura òptima: 22°C.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Requereix un medi ric suplementat amb most o suc de tomàquet, àcid pantotènic o glucopantotenat.</li> </ul>
<b>Metabòliques</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hidrolitza l'esculina.</li> <li>• Converteix L-malat en L-(+)-lactat i CO<sub>2</sub></li> <li>• Heterofermentatiu: obté etanol, acetat i D-(+)-lactat a partir d'hidrats de carboni fermentables.</li> <li>• Prefereix la fructosa.</li> <li>• Normalment fermenta la trehalosa.</li> <li>• En most o vi, les pentoses (arabinosa i xilosa) són fermentades abans que la glucosa.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Reaccions variables en fermentar l'arabinosa, cel·lobiosa, galactosa, manosa, melibiosa, salicina i xilosa.</li> <li>• No fermenta sacarosa, lactosa, maltosa, manitol i rafinosa.</li> <li>• Algunes soques hidrolitzen l'arginina, només en el vi o hàbitats relacionats.</li> <li>• Algunes soques fermenten citrat en presència d'un hidrat de carboni fermentable (tret que es perd sovint quan se subcultiven).</li> <li>• Algunes soques produeixen polisacàrids extracel·lulars en medi suplementat amb most.</li> </ul>
<b>Soca tipus</b>	CECT 4100 <sup>1</sup> (ATCC 23279 <sup>1</sup> )	

### 1.2.2. Metabolisme cel·lular bioenergètic en la FML

La via metabòlica de la FML en la cèl·lula d'*O. oeni* inclou la captació d'àcid L-màlic, la descarboxilació a L-làctic i CO<sub>2</sub> i l'excreció dels productes finals, inclòs un protó (Versari *et al.*, 1999).

La descarboxilació és catalitzada per l'enzim malolàctic (L-malat:NAD<sup>+</sup> carboxiliasa) (nº IUC 1.1.1.38) en presència de NAD<sup>+</sup> i Mn<sup>2+</sup> (Radler *et al.*, 1970; Ribéreau-Gayon *et al.*, 1975).

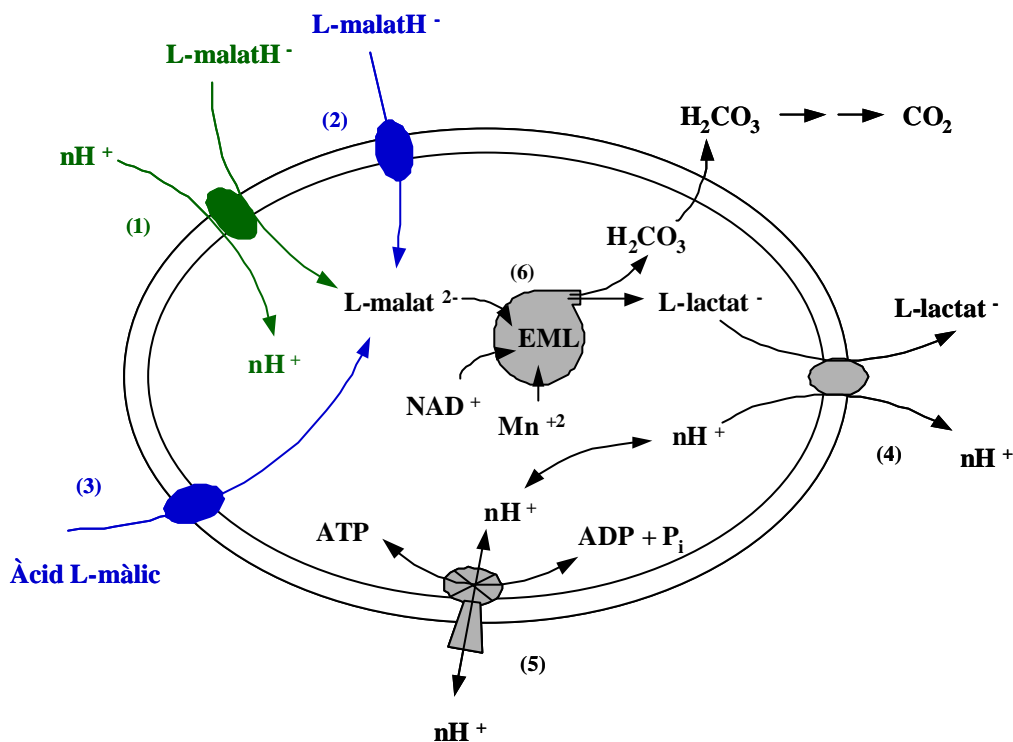
Aquesta reacció no aporta directament intermediaris amb enllaços fosfat rics en energia, tot i que la cèl·lula conserva l'energia a través d'un potencial elèctric indirecte ( $\Delta\Psi$ ): com que es consumeix un protó en la reacció de descarboxilació, el pH<sub>i</sub> augmenta, fet que afavoreix la formació d'un potencial químic de protons a través de la membrana ( $\Delta\text{pH}$ ) que, junt amb  $\Delta\Psi$ , constitueixen el mecanisme quimiosmòtic de la força protomotriu (*pmf*) a través d'aquesta membrana citoplasmàtica. Fou Henick-Kling (1986) qui començà a perfilar aquest mecanisme relativament complex i observà que *O. oeni* en treia avantatge energètic respecte altres bacteris làctics a partir d'un pH<sub>i</sub> incrementat i una *pmf* elevada. Més tard, ell mateix i Cox (1989) van presentar el primer model bioenergètic d'*O. oeni* on la *pmf* generada per eflux de l'àcid L-làctic crea un  $\Delta\text{pH}$  capaç de transportar L-malat i de generar ATP via les ATPases de membrana. Si bé *O. oeni* no pot sobreviure amb L-malat (al pH del vi, la forma majoritària és l'àcid L-màlic amb un grup carboxílic dissociat) com a única font de carboni, la FML aporta energia metabòlica addicional a la cèl·lula (ATP), especialment estimulants durant les primeres fases de creixement.

Com es pot veure, doncs, el transport d'L-malat és un altre element bàsic en aquest metabolisme, i fins ara se n'han proposat 3 mecanismes, molt similars entre ells però amb certes particularitats (veure figura 1.2):

- Loubiere *et al.* (1992): la captació d'L-malat es fa a través d'un simport L-malatH/H<sup>+</sup>, amb implicació testimonial d'un uniport de baixa afinitat, i eflux de lactat per simport electroneutre L-lactat<sup>-</sup>/H<sup>+</sup>, tot en estequiometria constant.
- Tourdot-Maréchal *et al.* (1993): existeixen 2 mecanismes simultanis de captació d'L-malat: un uniport de baixa afinitat L-malatH i una difusió

passiva d'àcid L-màlic no dissociat, el funcionament dels quals seria més o menys actiu en funció del pHe.

- Salema *et al.* (1994): existència d'un mecanisme prioritari d'uniport per L-malatH<sup>-</sup> en condicions de baixa concentració de malat i pHe 3,0-5,6, de forma que la força impulsora de la captació seria el propi consum per descarboxilació dins la cèl·lula, i un mecanisme secundari, només actiu a altes concentracions d'L-malat, per difusió o per transportador de baixa afinitat.



- |                                     |   |
|-------------------------------------|---|
| (1) simport L-malatH/H <sup>+</sup> | (2) uniport de baixa afinitat L-malatH <sup>-</sup> |
| (3) difusió passiva d'àcid L-màlic  | (4) simport electroneutre L-lactat /H <sup>+</sup>  |
| (5) H <sup>+</sup> -ATPasa          | (6) EML: enzim malolàctic                           |

**Figura 1.2.** Model dels mecanismes cel·lulars implicats en el transport de l'àcid L-màlic, dels productes resultants de la FML i de la generació de la pmf. En **blau** s'indiquen els mecanismes suggerits per Tourdot-Maréchal *et al.* (1993) i per Salema *et al.* (1994) (amb funcionaments diferents segons cada autor) mentre que en **verd**, el proposat per Loubiere *et al.* (1992). La resta de mecanismes són comuns en tots els casos.

Olsen *et al.* (1991), en *Lb. plantarum*, i Salema *et al.* (1994), en *O. oeni*, van descriure un sistema de transport electrogènic a on l'uniport d'L-malat, monoaniònic, s'acoblava al flux electroneutre d'L-lactat i creava una pmf. Es tracta d'un exemple de

mecanisme de generació de *pmf* per excreció electrogènica d'un producte final en simport amb protons. El pK aparent de l'àcid làctic és 3,9, i a pH<sub>i</sub> gairebé tot el làctic es troba en la forma aniònica (lactat). A pH elevat l'excreció genera un potencial de membrana negatiu a l'interior cel·lular, és a dir, el procés és electrogènic: es transloca més d'un protó per anió lactat. En canvi, a pHs baixos l'excreció de lactat no genera cap potencial de membrana i es pot dir que l'excreció és un procés electroneutre d'estequiometria 1:1 (Konings, Lolkema *et al.*, 1997). Salema *et al.* (1996) continuaren els seus estudis que relacionaven la generació de *pmf* amb la FML i la captació d'L-malat, confirmant el mecanisme d'uniport ja esmentat treballant sobre *resting cells* d'*O. oeni* i suggerint que la velocitat de FML es trobaria limitada per la captació d'L-malat i controlada pel  $\Delta\Psi$  generat.

### **1.2.3. Condicions de creixement i factors d'estrès que afecten el desenvolupament d'*O. oeni* en el vi**

Els bacteris làctics presents al vi han anat adquirint, al llarg de l'evolució, una sèrie de requeriments nutricionals per adaptar-se a la composició característica del seu medi (Lafon-Lafourcade, 1983; Ribéreau-Gayon *et al.*, 1998), que alhora depèn d'altres factors com la varietat, les condicions climàtiques i la tecnologia d'elaboració vínica (Suárez i Íñigo, 1992).

Els monosacàrids en són la principal font d'energia, principalment la glucosa i la fructosa, tot i que la majoria de soques també poden degradar algunes pentoses. *O. oeni* creix lentament sobre glucosa però més ràpidament sobre glucosa i malat i sobre glucosa i fructosa (Krieger *et al.*, 1992). Si bé hi ha indicis que, durant la FML i a les condicions de baix pH del vi, *O. oeni* no obté la major part d'energia del catabolisme dels sucres, sinó que ho fa de la degradació de l'àcid L-màlic (Renault *et al.*, 1988; Firme *et al.*, 1994), tradicionalment s'ha considerat que són necessàries altres fonts d'energia per a dur a terme la FML (Kunkee, 1991; Liu *et al.*, 1995).

Els aminoàcids lliures i pèptids curts constitueixen la font de nitrogen més important (Henick-Kling, 1993). En diverses soques d'*O. oeni* s'han trobat enzims proteolítics extracel·lulars (Rollán *et al.*, 1993), mecanismes que poden ser claus per a la síntesi proteica.

Pel que fa a les vitamines, totes les soques requereixen àcids fòlic i nicotínic (Lafon-Lafourcade, 1983), a part d'altres requeriments específics de cadascuna d'elles, mentre que els minerals més necessaris són el Mn, el Mg i el K (García *et al.*, 1992).

Com ja s'ha esmentat anteriorment, la FML no sempre es troba afavorida en el vi. Tot seguit es comentaran els diferents factors físicoquímics i interaccions amb altres microorganismes que hi condicionen el desenvolupament d'*O. oeni*. Cal remarcar que, de vegades, la FML no va associada a l'augment de biomassa i pot ser que es produeixi sense que hi hagi un creixement significatiu de bacteris làctics (Firme *et al.*, 1994). Alguns dels factors es poden deduir de les tècniques emprades per afavorir o bé inhibir la FML durant la vinificació (apartat 1.1.2), fet que ens indica que, sovint, és possible intervenir-hi artificialment, fent-los més o menys decisius. Quan aquests factors, ja sigui per concentració, intensitat o temps d'exposició, poden modificar el metabolisme i el creixement dels bacteris làctics d'una forma significativa, els anomenem **factors d'estrès**, i dels quals tractarem únicament els més remarcables.

- **pH**

El pH òptim de creixement dels bacteris làctics aïllats de vins es troba entre 4,2 i 4,8 (Van Vuuren i Dicks, 1993), mentre que el pH normal dels vins se situa entre 3 i 4 (García *et al.*, 1992). Curiosament també, alguns estudis *in vitro* han mostrat que l'enzim malolàctic té un pH òptim entre 5,5 i 6,0 (Schütz i Radler, 1973; Strasser de Saad *et al.*, 1984), valor concretat per Spettoli *et al.* (1984) al voltant de 5,9 per a l'enzim purificat. Henick-Kling (1986) i García (1991) van determinar en cèl·lules no proliferants que l'activitat malolàctica màxima se situava a  $pH_e$  entre 3,0 i 3,5, per la qual cosa sembla que les condicions de pH dels vins es corresponen a un òptim d'activitat malolàctica cel·lular en *O. oeni*.

El límit inferior de pH per al creixement dels bacteris làctics és 3,0 (Drici-Cachon *et al.*, 1996). García *et al.* (1992) ho justifiquen, principalment, perquè davant una concentració de protons elevada, els àcids orgànics es troben majoritàriament en la seva forma no dissociada, de manera que travessen més fàcilment la membrana plasmàtica i provoquen l'acidificació del citoplasma. En general, la FML acostuma a ser més ràpida a mesura que el pH augmenta per sobre de 3,0, tot i que algunes soques d'*O. oeni*



poden realitzar-la a pHs molt propers a 3,0, i necessiten alguns mesos per acabar-la (Lafon-Lafourcade, 1983).

El pH també pot condicionar els productes finals del metabolisme bacterià (García *et al.*, 1992), al mateix temps que exerceix una clara pressió selectiva en la dinàmica de poblacions. Per la seva major tolerància a l'acidesa, és *O. oeni* qui, generalment, predomina en els vins que no superen el pH 3,5, mentre que en els casos que sí que ho fan, predominen les espècies *Lactobacillus* i *Pediococcus* (Wibowo *et al.*, 1985; Henick-Kling, 1993).

- **Temperatura**

La temperatura òptima de creixement dels bacteris làctics, microorganismes mesòfils, se situa entre 25 i 30°C (Zambonelli, 1988), si bé en el vi es troba en un rang lleugerament inferior, entre 20 i 25°C (Lafon-Lafourcade, 1983). Durant la FML cal controlar la temperatura: precisament, entre 20 i 25°C la velocitat de transformació és màxima, i per sobre de 30°C pot veure's inhibida (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1975). Així, en el procés de vinificació hom es mou entorn dels 20°C, i se situa per sobre o per sota d'aquest valor segons interressi afavorir o inhibir, respectivament, el desenvolupament de la FML.

Cal tenir present, a més, que la temperatura també afecta el metabolisme dels sucres en *O. oeni*: el consum de glucosa és màxim a 25°C i temperatures elevades afavoreixen un increment del consum de fructosa (Serpa Pimentel *et al.*, 1994).

- **Etanol**

Junt amb el pH, se'l considera el principal inhibidor de la viabilitat dels bacteris làctics en el vi (Ribéreau-Gayon, 1985; Vaillant *et al.*, 1995).

Es tracta d'una molècula polar petita que s'incorpora en la regió hidròfila de la membrana i n'altera la permeabilitat i la composició lipídica (García *et al.*, 1992), així com les proporcions lípid-proteïna (Dombek *et al.*, 1984), per la qual cosa pot arribar a modificar l'activitat d'enzims de membrana (H<sup>+</sup>-ATPasa, per exemple) i de transport (Garbay i Lonvaud-Funel, 1994, 1996). Al llarg de la FA, l'accentuada davallada poblacional de bacteris làctics és deguda, principalment, a l'aparició d'etanol. Al

mateix temps, és un dels principals agents de pressió selectiva que fa que *O. oeni* es vagi imposant sobre altres espècies, algunes de les quals poden desaparèixer completament (*Lb. plantarum*, *Lb. hilgardii* i *Leuconostoc mesenteroides*) (García *et al.*, 1992; Lonvaud-Funel, 1999).

Per sobre del 10 % d'etanol, la reducció de l'activitat metabòlica és molt important i pot definir-se, per a cada soca, un grau màxim tolerat per al creixement (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1975). La major part de soques d'*O. oeni* creixen per sobre d'aquest llindar, però en anar augmentant, el percentatge de soques resistents disminueix (Davis *et al.*, 1988) i es veuen definitivament inhibides en la fase inicial de creixement en arribar al 12 % (Beelman *et al.*, 1977).

Si bé segons Wibowo *et al.* (1985) l'etanol podria afectar indirectament la FML actuant sobre els enzims involucrats, Capucho i San Romão (1994) van determinar que afecta més a la regulació del creixement cel·lular que no pas al desenvolupament de la FML. Si hom atén a l'augment de permeabilitat de la membrana plasmàtica i al consegüent increment de difusió passiva de protons cap al citoplasma, es poden deduir tot un seguit de conseqüències sobre el metabolisme basal de la cèl·lula, accentuades com més baix sigui el pH del vi.

En estudis experimentals s'ha observat que la tolerància a l'etanol depèn del medi de cultiu, del pH i de la temperatura d'incubació, mentre que es redueix a mesura que la temperatura augmenta i el pH disminueix (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1975; Vidal *et al.*, 2001).

- **Coure**

Present en la majoria de plaguicides emprats en el tractament de la vinya, s'ha descrit que el coure pot ser negatiu per al creixement i la FML en *O. oeni* (Suárez i Íñigo, 1992; Cabras *et al.*, 1994; Vidal *et al.*, 2001). Hsia *et al.* (1975) situen els nivells de coure en mosts entre 0,2 i 0,7 mg/l. El valor màxim de coure localitzat en most de raïm tractat amb oxiclòrid de coure és proper a 4 mg/l (Eschenbruch i Kleynhans, 1974), i altres autors en detecten fins als 7 mg/l (Puig-Deu *et al.*, 1994), tot i que Sala *et al.* (1996) indiquen que els nivells inicialment alts en most de raïm tractat amb l'oxiclòrid disminueixen dràsticament al llarg de la FA.

En estudis experimentals amb medis similars al vi (vins simulats), Vidal *et al.* (2001) van constatar que concentracions des de 5 mg/l de  $\text{Cu}^{2+}$  poden produir alteracions en el desenvolupament normal del microorganisme, sense impedir, però, l'acabament de la FML; que el coure inhibeix l'activitat dels enzims hexoquinasa, lactat-deshidrogenasa i alcohol-deshidrogenasa, especialment d'aquest últim, i que presenta un efecte sinèrgic amb l'etanol: en augmentar la concentració d'etanol, ho fa l'efecte inhibitori del coure.

D'altra banda, aparentment no afecta l'activitat de l'enzim malolàctic. Vidal *et al.* (2001) també descriuen importants diferències respecte la sensibilitat al coure per a diferents soques de bacteris làctics autòctons i de referència.

- **Àcids grassos de cadena mitjana (C10, decanoic i C12, dodecanoic)**

Se sap que els àcids grassos de cadena mitjana (C6 a C12), produïts pel metabolisme dels llevats durant la FA, inhibeixen la taxa de creixement dels bacteris làctics i la degradació d'àcid L-màlic (Lonvaud-Funel *et al.*, 1988; De Felice *et al.*, 1993). Els àcids grassos habitualment presents al vi que ja ha estat fermentat per llevats són el decanoic (C10) i el dodecanoic (C12) (Capucho i San Romão, 1994). En aquest sentit, una de les principals raons dels defensors d'inocular iniciadors de FML simultàniament als llevats (Kunkee, 1967) es trobaria en què les concentracions d'aquests àcids grassos serien força baixes encara (Guilloux-Benatier *et al.*, 1998) i, per tant, el creixement dels bacteris làctics es veuria més afavorit.

Els estudis portats a terme en llevats mostren un sinergisme entre l'acció dels àcids grassos i la de l'etanol (Sá-Correia, 1986) i un augment de l'efecte tòxic a mesura que disminueix el pH, fet que indica que la forma tòxica és la molècula no dissociada, altament soluble en els fosfolípids de membrana i que pot penetrar en el citosol per difusió passiva (Eliaz *et al.* 1976; Warth, 1988).

La presència d'àcids grassos a la membrana plasmàtica podria modificar-ne l'organització espacial, donant lloc a un increment de la permeabilitat i a una inhibició no competitiva dels enzims lligats a la membrana en dissociar-se els àcids en l'interior cel·lular ( $\text{pK}_a = 4,9$ ) (Freese *et al.*, 1973).

Quan s'inicia la FML en el vi, la concentració d'etanol es troba al voltant del 12 % i el  $\text{pH}_e$  per sota de 3,5, habitualment. A aquest  $\text{pH}_e$ , els àcids grassos es presenten en

solució com a molècules majoritàriament no dissociades, i un cop dins la cèl·lula, on el  $\text{pH}_i$  és més elevat, alliberen  $\text{H}^+$  i n'afavoreixen la dissipació del gradient transmembranal. Així, el metabolisme cel·lular pateix una sèrie d'alteracions, com ara la disminució de l'activitat de l'enzim malolàctic ( $\text{pH}$  òptim entre 5,5 i 6,0) o la resposta metabòlica de les ATPases de membrana –responsables de mantenir el gradient de  $\text{H}^+$  entre l'interior i l'exterior cel·lular– que consumirien ATP que no podria ser utilitzat per al creixement cel·lular, fet que es traduiria en la disminució de la taxa de creixement (Capucho i San Romão, 1994).

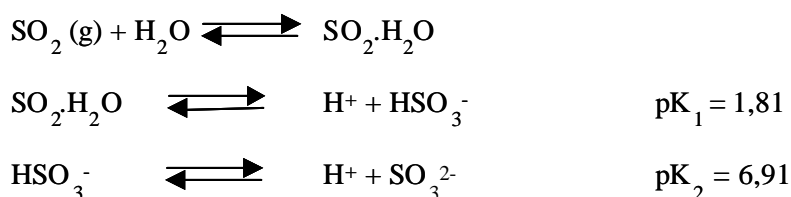
- $\text{SO}_2$

La sulfitació dels vins és una tècnica força antiga que es remunta, molt probablement, a finals del s. XVIII (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1998) i necessària en la pràctica totalitat de les vinificacions, com a antioxidant i per controlar el creixement de microorganismes autòctons (algunes espècies o soques de llevats indesitjades), així com per evitar que es produeixin els “picats” làctic i acètic (Beech i Thomas, 1985; García *et al.*, 1992; Romano i Suzzi, 1993; Constantí *et al.*, 1998).

Ribéreau-Gayon *et al.* (1998) indiquen que les dosis aconsellables es troben al voltant o per sota de 10 mg/l (sovint expressades en 1 g/hl), si bé a la pràctica poden sobrepassar, en alguns casos, els 30 mg/l. Per altra part, fins i tot quan no hi ha sulfitació, està descrita la presència de certa quantitat de  $\text{SO}_2$  provinent del propi metabolisme fermentatiu dels llevats (Henick-Kling i Park, 1994; Delteil, 2000b).

Lafon-Lafourcade i Peynaud (1974) i Davis *et al.* (1985), entre d'altres, aconsellen no superar els 40-50 mg/l de  $\text{SO}_2$  total si no es vol córrer el risc que la FML no tingui lloc o que es retardi excessivament, ja que aquestes concentracions són suficients per inhibir el creixement de bacteris làctics (Wibowo *et al.*, 1985; Ribéreau-Gayon *et al.*, 1998).

Un cop afegit el  $\text{SO}_2$  al most, s'hi estableix un conjunt de reaccions d'equilibri químic entre les diferents formes moleculars (Romano i Suzzi, 1993; Ribéreau-Gayon *et al.*, 1998):

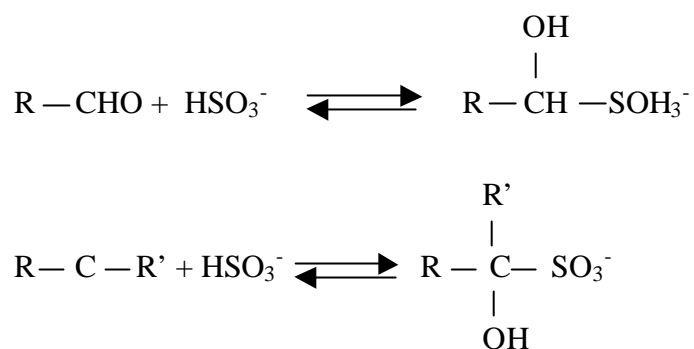


A partir dels dos valors de pK i si es té en compte el pH del vi, es dedueix que la molècula  $\text{SO}_3^{2-}$  n'és absent, mentre que és majoritària l'espècie monoionica  $\text{HSO}_3^-$ . Així doncs, a efectes pràctics, es pot prescindir de la segona reacció d'equilibri àcid-base i concloure que el  $\text{SO}_2$  total en solució es troba dissociat en  $\text{SO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  i  $\text{HSO}_3^-$ , concretament entre un 0,5-6 % el primer i un 94-99 % l'altre, considerant que el pH del vi pot oscil·lar, com a molt, entre 3,0 i 4,0 (Romano i Suzzi, 1993; Ribéreau-Gayon *et al.*, 1998):

$$\frac{[\text{H}^+][\text{HSO}_3^-]}{[\text{SO}_2]} = K$$

Aquestes consideracions són importants, ja que a  $\text{SO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  ( $\text{SO}_2$  molecular o  $\text{SO}_2$  actiu) se li atribueix essencialment la capacitat antimicrobiana (Fornachon, 1963; Lafon-Lafourcade i Peynaud, 1974). Hom no pot prescindir-ne en el moment de la sulfitació, ja que en funció de l'acidesa del vi caldrà ajustar la quantitat a addicionar. A més, el pK depèn, també, de la temperatura i del grau alcohòlic: Usseglio-Tomasset (1989) va observar com el percentatge de  $\text{SO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  augmenta lleugerament en fer-ho els altres dos paràmetres (per exemple, a pH = 3 i amb 10 % d'etanol a 19°C, hi hauria 10,95 % de forma lliure).

Un fenomen addicional condiona totalment els equilibris químics establerts. Es tracta de la combinació del  $\text{SO}_2$  lliure amb les molècules presents al vi que posseeixin un grup carbonil (C=O):

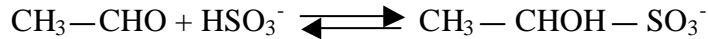


Així, els endèlegs estableixen la següent equació pràctica:

$$\text{SO}_2 \text{ total} = \text{SO}_2 \text{ lliure} + \text{SO}_2 \text{ combinat}$$

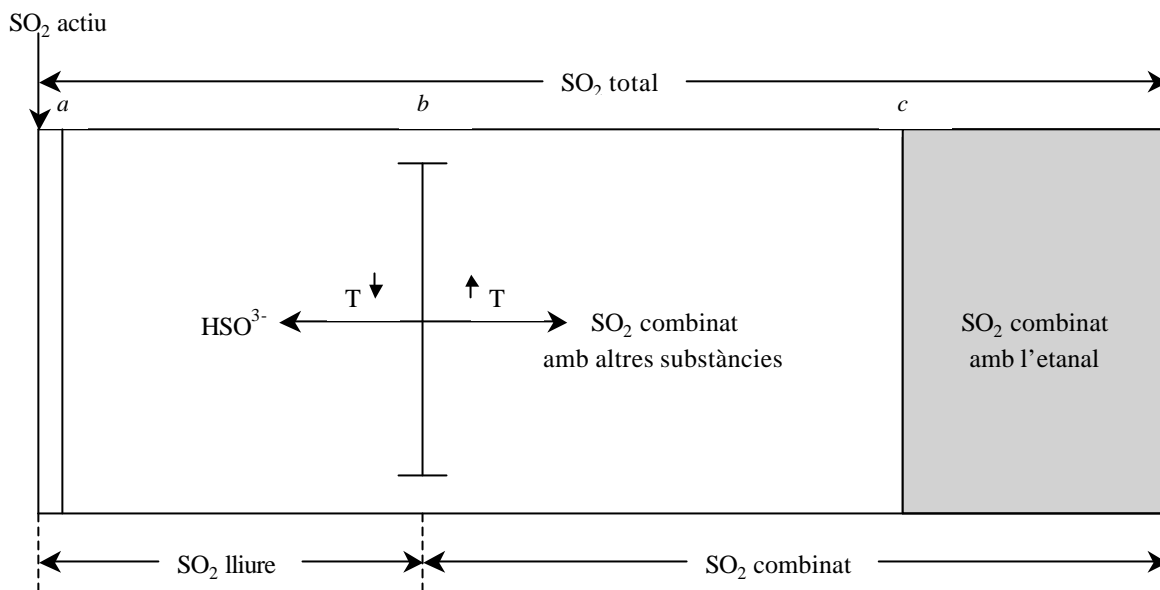
I es considera que, en relació al  $\text{SO}_2$  lliure, les propietats antisèptiques o antioxidants del  $\text{SO}_2$  combinat són gairebé nul·les (Romano i Suzzi, 1993).

Entre les molècules que es fixen al  $\text{SO}_2$ , la principal és l'etanal o acetaldehid:



També s'hi associen els àcids cetònics, pirúvic i  $\alpha$ -cetoglutàric; derivats de sucres (àcids urònics i productes d'oxidació) i altres compostos minoritaris.

En la figura 1.3 es resumeixen els diferents estats del  $\text{SO}_2$  en el vi: a l'esquerra s'hi troba el  $\text{SO}_2$  actiu, on la separació  $a$  amb  $\text{HSO}_3^-$  és variable en funció del pH. A la dreta, l'àcid aldehyd-sulfurós representa la fracció de  $\text{SO}_2$  combinada amb l'etanal, associació força estable ( $c$  és fixa i depèn de la concentració d'etanal). En canvi,  $b$  és variable: en funció de la temperatura ( $T$ ) i de la dosi de  $\text{SO}_2$  lliure,  $b$  es desplaça en una o altra direcció.



**Figura 1.3.** Representació esquemàtica dels diferents estats del  $\text{SO}_2$  en el vi (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1977).

L'acció antimicrobiana del  $\text{SO}_2$  no és compartida en mateixa proporció per les diferents formes químiques. Segons Romano i Suzzi (1993), el  $\text{SO}_2$  penetra en forma molecular dins la cèl·lula per difusió passiva. Dins del citoplasma, on el pH és més elevat, es dissocia i reacciona amb molècules biològiques essencials: proteïnes enzimàtiques a nivell de ponts disulfur, coenzims, vitamines, etc., i provoca una aturada progressiva del metabolisme que condueix a la mort cel·lular. L'acció inhibidora directa

sobre l'activitat de l'enzim malolàctic ha estat descrita per Lafon-Lafourcade (1970, 1973).

Per regla general, s'estableix que concentracions de SO<sub>2</sub> total de 100-150 mg/l o SO<sub>2</sub> combinat de 50-100 mg/l o SO<sub>2</sub> lliure de 1-10 mg/l són suficient perquè els bacteris làctics es desenvolupin amb dificultats (Wibowo *et al.*, 1985), si bé aquests valors depenen de les espècies i soques, del pH i de la quantitat de sòlids insolubles presents al vi. En medis experimentals favorables per al creixement d'*O. oeni*, Guzzo *et al.* (1998) estableixen que la inhibició del creixement és important a partir de 15 mg/l de SO<sub>2</sub> total. Sembla que *O. oeni* és menys resistent que els lactobacils (Lafon-Lafourcade i Peynaud, 1974), tot i que s'han observat diferències a nivell de soques en aquests darrers (Lonvaud-Funel i Joyeux, 1988). A la pràctica, es fa poc aconsellable superar concentracions de SO<sub>2</sub> total superiors a 40-50 mg/l si hom desitja la realització de la FML (García *et al.*, 1992).

Fornachon (1963) va observar que el SO<sub>2</sub> combinat exerceix, al seu torn, un cert efecte inhibidor sobre els bacteris làctics, i va deduir que aquests poden trencar l'enllaç aldehydic de la combinació i alliberar SO<sub>2</sub>. En estudis sobre quatre bacteris làctics de possible presència al vi, diferents d'*O. oeni*, s'ha vist que les formes combinades són entre 5 i 10 vegades menys actives que la forma lliure (Lafon-Lafourcade i Peynaud, 1974).

Comparant entre 10 soques d'*O. oeni* i 4 soques de *Lactobacillus sp.*, Delfini i Morsiani (1992) observaren que a pH 4,0, la primera espècie era més sensible que l'altra, mentre que a pH 3,5 gairebé no hi havia diferències entre totes dues. Per altra part, també comprovaren que els bacteris làctics en general poden desenvolupar elevada resistència al SO<sub>2</sub> per adaptació, qualitat que Guzzo *et al.* (1998) pogueren confirmar en *O. oeni* a través de preadaptacions.

Les dades experimentals confirmen l'existència d'una relació molt clara entre el pH i el SO<sub>2</sub> (Kunkee, 1967) de forma que a major concentració de SO<sub>2</sub> i menor pH, l'efecte inhibidor sobre *O. oeni* és més important (Britz i Tracey, 1990). Els mateixos autors en seleccionaren 5 soques, d'un total de 54, que mostraren major capacitat per sobreviure i mantenir l'activitat malolàctica en les condicions estudiades (50 mg/l SO<sub>2</sub>, pH entre 3,6 i 4,0 i 10-13 % d'etanol).

Pel que s'ha dit, es dedueix, doncs, la necessitat de controlar al màxim la dosi en la sulfitació del vi i evitar l'addició excessiva de sulfurós al most inicial, per no perjudicar

excessivament la posterior FML, allargant-la o eliminant soques d'*O. oeni* amb interès organolèptic (Britz i Tracey, 1990; Romano i Suzzi, 1993; Ribéreau-Gayon *et al.*, 1998). Els últims anys, s'han fet estudis per cercar alternatives a la sulfitació (en concentracions elevades és tòxica per al consum humà), com l'ús de lisozim (Amati *et al.*, 1992; Pitotti *et al.*, 1992; Gerbaux *et al.*, 1997).

#### 1.2.4. Interaccions amb altres microorganismes

Les interaccions amb altres microorganismes ja han estat insinuades en l'apartat 1.1.3, on s'ha parlat dels bacteris làctics que poden intervenir en la FML. A part, *O. oeni* també interacciona amb llevats, fongs, bacteris acètics i bacteriòfags (Wibowo *et al.*, 1985; Ribéreau-Gayon *et al.*, 1998). Tot seguit, ens centrarem en les interaccions amb altres bacteris làctics i deixarem, per a un apartat posterior, les establertes amb els llevats.

S'ha vist, especialment en els bacteris làctics de la llet, que aquests microorganismes són capaços de sintetitzar i alliberar al medi des de substàncies tan simples com el peròxid d'hidrogen (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) o alguns àcids orgànics, fins a bacteriocines, un tipus de molècules proteiques amb espectres d'acció molt específics (Requena i Peláez, 1995; Nes *et al.*, 1996). Fins i tot, Daeschel *et al.* (1991) proposaren la nisina, produïda per *Lactococcus lactis*, com a possible eina de control de la FML. Rammelsberg i Radler (1990) van descriure que *L. brevis* era capaç de produir una bacteriocina, la brevicina, capaç d'actuar sobre altres bacteris làctics, entre ells *O. oeni*. També observaren que una soca de *Lb. plantarum* presentava activitat antibacteriana sobre *O. oeni* i altres espècies làctiques, tot i que no arribaren a aïllar-ne la bacteriocina. Algunes soques de *P. pentosaceus* són, al seu torn, capaces de produir una altra bacteriocina en gran quantitat en el suc de raïm i estable en les condicions d'acidesa i de concentració d'etanol en el vi (Strasser de Saad, 1995). En un ampli triatge de soques de col·lecció aïllades de vins, Lonvaud-Funel i Joyeux (1993) trobaren efectes evidents d'inhibició sobre *O. oeni* i *L. mesenteroides* per part d'una soca de *P. pentosaceus* i una altra de *Lb. plantarum*, que assignaren a petits pèptids estables a la calor i degradables per proteases dels propis bacteris que en són diana, i que posseeixen un efecte tòxic transitori consistent en disminuir la velocitat de creixement i la població final.



### 1.2.5. El metabolisme d'*O. oeni* afecta la composició sensorial del vi

Simultàniament a la degradació de l'àcid L-màlic, s'esdevenen tot un conjunt de rutes fermentatives en les cèl·lules d'*O. oeni*, sovint condicionades per la presència de determinats substrats en diferents concentracions, com poden ser els sucres residuals (disacàrids com la trehalosa, pentoses com la xilosa i l'arabinosa o hexoses com la glucosa i fructosa) i l'àcid cítric (Ribéreau-Gayon et al, 1975; Delfini i Formica, 2001).

La degradació de l'àcid cítric és important, primer, perquè en desaparèixer del medi contribueix a l'estabilització microbiològica de forma natural –cap al final de la FA es troba en nivells considerables, entre 0,1 i 0,9 g/l, segons Cabanis i Cabanis, (1998)– en eliminar un substrat potencialment energètic (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1998; Versari *et al.*, 1999) i en segon lloc, pels productes resultants del metabolisme, que influeixen en la composició organolèptica final del vi. El citrat és degradat a acetat i oxalacetat, que al seu torn és descarboxilat a piruvat (Saguir i Manca de Nadra, 1996). El piruvat, el qual també provindrà dels sucres residuals, constitueix una molècula clau en el metabolisme, on s'hi creuen les diverses rutes. A partir d'ell es poden formar etanol, CO<sub>2</sub>, D-(-)-lactat, acetat (Kandler, 1983), 2,3-butanediol, acetoïna i diacetil (Salou *et al.*, 1994; Ramos *et al.*, 1995; Bartowsky i Henschke, 1995). En alguns casos, hi contribuiran junt amb els llevats (Herold *et al.*, 1995). Curiosament, s'ha determinat que la degradació de l'àcid cítric és més lenta que la d'L-màlic, de forma que si bé es consideri acabada la FML quan els nivells d'aquest són residuals, *O. oeni* pot continuar degradant cítric (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1998).

Per altra part, interessa controlar els nivells d'acidesa volàtil i una metabolització excessiva d'àcid cítric i sucres residuals pot comportar concentracions d'acetat massa elevades i donar lloc al “picat làctic”, que acostuma a esdevenir-se quan la FML és excessivament lenta o s'atura (Lonvaud-Funel, 1999) o en parades de FA, quan existeix un fort antagonisme entre soques d'*O. oeni* i de llevats (Huang *et al.*, 1996). Al mateix temps, existeix el risc derivat del fet que, quan els bacteris làctics han consumit tot l'L-màlic, llur metabolisme prossegueix sobre els altres compostos citats, i pot incrementar-se el nivell d'acidesa volàtil i aparèixer aromes làctiques no desitjades. Si aquesta fase continua sense control adequat, el vi pot esdevenir més vulnerable a la contaminació microbiològica per part de *Brettanomyces*, *Lactobacillus*, *Pediococcus*,..., espècies capaces de produir aromes desagradables i amines biògenes (Delteil, 2000a).

Les diferents soques d'*O. oeni* poden imprimir particularitats organolèptiques en funció de petites variacions en aquest metabolisme. Martineau i Henick-Kling (1995), treballant sobre diferents varietats de raïm, demostraren que en depenia considerablement la concentració final de diacetil. Altres factors que determinen la quantitat de diacetil són la concentració d'oxigen, la quantitat inicial de citrat i el nivell de SO<sub>2</sub>. L'aroma que aporta el diacetil al vi és coneguda com aroma de mantega (Martineau *et al.*, 1995; Lonvaud-Funel, 1999).

*O. oeni* també és capaç de degradar l'acetaldehid, provinent dels llevats, que si bé en concentracions baixes aporta una aroma fruitada agradable, en concentracions elevades en produeix una d'herbàcia desagradable (Henschke i Jiranek, 1993; Osborne *et al.*, 2000).

Malauradament, algunes soques d'*O. oeni* són capaces de sintetitzar precursors de carbamat d'etil (compost cancerigen) a partir d'arginina (Mira de Orduña *et al.*, 2001; Tonon *et al.*, 2001) i també amines biògenes a partir de determinats aminoàcids (Leitão *et al.*, 2000).

Es pot concloure, doncs, que els canvis organolèptics sobre el vi durant la FML, tant gustatius com aromàtics, són en gran part "específics de soca" d'*O. oeni* (Henick-Kling i Acree, 1998; Versari *et al.*, 1999).

### 1.3. Identificació d'*O. oeni*: espècie i soca

#### 1.3.1. Els diferents mètodes fenotípics i morfològics

De forma habitual, hom pot conèixer fàcilment si els bacteris aïllats del most o del vi són làctics: l'anàlisi fenotípica de les soques amb la tinció Gram permet esbrinar-ho, ja que tots són grampositius (Zambonelli, 1988), i en tenir ben fixades les cèl·lules es pot conèixer la morfologia (cocs o bacils, aïllades o en agrupacions, etc.). Tot seguit, es comprova si són o no mòbils i si són catalasa negatius (Suárez i Iñigo, 1992).

A continuació, se'n determina el caràcter hètero o homofermentatiu, i si s'escau, la naturalesa estereoquímica de l'àcid làctic format a partir de glucosa. Amb aquestes dades preliminars, doncs, hom se situa a nivell de gènere: *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* i *O. oeni* (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1998).

Se segueix fins a nivell d'espècie amb les galeries bioquímiques d'identificació API 50 CHL (Analytab Products, Plainview, USA), que permeten obtenir un perfil de fermentació d'un gran nombre de sucres. Malgrat tot, s'ha comprovat que per als bacteris làctics aïllats dels vins el poder discriminant d'aquesta tècnica no és pas suficient i que algunes soques poden aportar dubtes (Pardo *et al.*, 1988; Masqué, 1996).

En la pràctica és útil recórrer al *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Garvie, 1986, en referència a *Leuconostoc oenos*).

Altres tècniques fenotípiques emprades en la identificació dels bacteris làctics són l'anàlisi immunològica (Garvie, 1984), els perfils de sensibilitat a bacteriòfags (Tenreiro *et al.*, 1993), els perfils de proteïnes totals (Dicks *et al.*, 1995a) o l'anàlisi quantitativa dels constituents de la paret cel·lular (Van Vuuren i Dicks, 1993).

#### 1.3.2. Els mètodes genotípics. Estat actual

Possiblement, en ordre cronològic, el primer mètode genotípic en ser aplicat a la detecció de bacteris làctics en el vi, a nivell d'espècie, ha estat el d'hibridació amb sondes de DNA total, o *dot-blot* (Lonvaud-Funel *et al.*, 1989; Lonvaud-Funel *et al.*, 1991). Més endavant, Lamoureux *et al.* (1993) i Tenreiro (1995) assajaren la tècnica del ribotipatge, és a dir, l'obtenció dels perfils de restricció de l'rDNA, o el que és el mateix, RFLP (*R*estriction *F*ragment *L*ength *P*olymorphism) per a detecció a nivell de

soca, amb un èxit relatiu. En canvi, es mostrarà molt més discriminant la REA (*Restriction Enzyme Analysis*), tot i que massa laboriosa d'analitzar quan es treballa amb nombroses soques (Tenreiro, 1995). Simultàniament, els mateixos autors aplicaren la macrorestricció-PFGE (*Pulsed Field Gel Electrophoresis*), que es revelà amb elevades limitacions per discriminar a nivell de soca, contràriament als resultats obtinguts per Daniel *et al.* (1993) o Gindreau *et al.* (1997).

El predomini de tècniques basades en l'ús de la PCR es fa evident els darrers anys, en què Zapparoli *et al.* (1998b) per una banda, i Bartowsky i Henschke (1999) per l'altra, estableixen sengles mètodes d'amplificació de fragments específics de DNA per identificar *O. oeni* a nivell d'espècies d'una forma relativament ràpida i segura (PCR específica d'espècie).

Igualment, en tipificació de soques s'han fet notables progressos en aplicar especialment la tècnica del polimorfisme de DNA amplificat a l'atzar, coneguda com a RAPD-PCR (*Random Amplified Polymorphic DNA*), que es basa en el polimorfisme generat per l'amplificació aleatòria de fragments de DNA mitjançant PCR utilitzant un encebador de seqüència inespecífica (Williams *et al.*, 1990; Welsh i McClelland, 1990). Presenta, entre altres, dos grans avantatges: en primer lloc, que no cal conèixer prèviament la seqüència completa de DNA ja que s'utilitza un encebador aleatori; i en segon lloc, és una tècnica relativament ràpida: una reacció de PCR seguida d'una electroforesi en gel d'agarosa. Per raó del baix polimorfisme descrit per a *O. oeni* (Zavaleta *et al.*, 1997), cal haver establert una bona selecció de l'encebador per disposar d'una eina prou resolutiva i reproductiva a l'hora de reconèixer soques diferents d'*O. oeni* (Reguant, 2001). Precisament això és el que ha aconseguit Reguant (2001) amb la modificació i optimització de la tècnica per combinació de 2 oligonucleòtids diferents en la mateixa PCR (*multiplex* RAPD-PCR) que generen perfils de soques fàcils de tipificar i ben reproduïbles, de forma que es facilita el seguiment de les dinàmiques de poblacions al llarg de la vinificació i permet comprovar els nivells d'implantació de soques inoculades i els efectes de diferents condicions d'estrès sobre aquestes.

## 1.4. Respostes d'adaptació a condicions d'estrès per part dels bacteris làctics

Tant en la natura com en els processos biotecnològics, els bacteris troben una gran varietat de condicions físiques i químiques no sempre òptimes per al seu creixement, davant de les quals són capaços de desenvolupar mecanismes de protecció, adaptació i supervivència, específics o generals (Lengeler *et al.*, 1999; Sanders *et al.*, 1999).

En el vi s'observa molt clarament aquesta situació, ja que és un medi amb unes condicions físicoquímiques força restrictives i unes disponibilitats nutritives ben limitades. D'altra banda, la variabilitat d'aquestes encara es troba molt més accentuada per condicions ampelogràfiques, geoclimàtiques i tecnològiques (Suárez i Íñigo, 1992).

Aprofundir en la comprensió dels fenòmens de resposta a les condicions d'estrès per part dels bacteris làctics, i en concret d'*O. oeni*, a més d'aportar dades a nivell de coneixement fonamental i molecular, permet optimitzar-ne les aplicacions en vinificació, ja sigui en el control del desenvolupament de la FML com en l'elaboració i viabilitat de cultius comercials iniciadors (Guzzo *et al.*, 1994; Garbay i Lonvaud-Funel, 1996).

Fins ara, no disposem de molta informació sobre aquest aspecte en *O. oeni*, entre altres motius perquè l'atenció prioritària se l'han enduta bacteris làctics involucrats en l'elaboració de productes làctics i derivats, com ara *L. lactis*.

D'entre els fenòmens de resposta a l'estrès més estesos en procarïotes i més estudiats, parlarem de les modificacions en la membrana plasmàtica (Lonvaud-Funel *et al.*, 1988; Lanéelle i Asselineau, 1990; Tourdot-Maréchal *et al.*, 2000); de la resposta a condicions àcides que implica, entre altres mecanismes, el de la regulació del flux de protons a través de la membrana mitjançant ATPases de membrana, i de l'expressió i síntesi de proteïnes d'estrès (Morimoto *et al.*, 1990; Yura *et al.*, 1993; Garbay i Lonvaud-Funel, 1996).

### 1.4.1. Modificacions en la membrana plasmàtica

La membrana, a part de la paret cel·lular, és la receptora primària de les influències exteriors del medi sobre la cèl·lula (Lonvaud-Funel *et al.*, 1988; Tourdot-Maréchal *et al.*, 2000). El primer mecanisme descrit és el canvi en la composició lipídica (àcids

grassos i fosfolípids), de forma que qualsevol “agressió” per part del medi (addició d’etanol, canvi de temperatura, àcids grassos de cadena mitjana provinents dels llevats, etc.) susceptible de provocar una modificació de la fluïdesa, es troba compensada per un ajustament de la longitud de les cadenes moleculars i dels enllaços insaturats dels àcid grassos de membrana, que comporta modificacions en les proporcions entre àcids grassos insaturats i saturats i en la proporció de fosfolípids, tots ells paràmetres que també depenen de la fase de creixement (Lonvaud-Funel i Desens, 1990; Garbay i Lonvaud-Funel, 1994). D’aquesta forma, la membrana intenta regular constantment les seves propietats físiques per mantenir les funcions de barrera i de transport i les activitats enzimàtiques de permeases, ATPases, etc. (Garbay i Lonvaud-Funel, 1996). Per exemple, s’ha vist que la presència d’etanol augmenta de forma destacable la proporció d’àcids grassos insaturats en *O. oeni* (Garbay *et al.*, 1995) per intentar compensar l’augment de fluïdesa que aquell provoca en interaccionar amb la regió hidrofílica de la membrana (Dombek i Ingram, 1984; Konopásek *et al.*, 2000).

Un altre efecte observat és la variació de la relació fosfolípids-proteïna, que disminueix en presència dels factors d’estrès esmentats, principalment per l’augment de les proteïnes, tal i com ha estat descrit en *O. oeni* per Garbay i Lonvaud-Funel (1996), i d’entre les quals se’n sintetitzen algunes conegudes com a “proteïnes d’estrès”.

Tourdot-Maréchal *et al.* (2000) suggereixen que, de forma genèrica, la variació en la raó de lípids totals respecte proteïnes totals en membrana pot ser component essencial de la termoadaptació en *O. oeni*, corroborant la teoria de l’adaptació homeoviscosa (capacitat d’autoregulació de la fluïdesa) per part de la membrana plasmàtica dels bacteris (Sinensky, 1974 i Herman *et al.*, 1994).

#### **1.4.2. Resposta a les condicions àcides**

Els bacteris làctics es classifiquen, majoritàriament, com a neutròfils, però el seu  $pH_i$  permet una regulació molt més àmplia i alhora precisa que no pas en *E. coli* (Kashket, 1987). Els lactococs i els lactobacils, així com altres bacteris fermentatius, faciliten que el seu  $pH_i$  disminueixi quan ho fa el  $pH_e$  per la formació de productes àcids. En el cas d’*O. oeni*, aquest és capaç de créixer al voltant de 3,0, considerat el límit inferior, tot i que Drici-Cachon *et al.* (1996) van aïllar una soca mutant àcido-resistent capaç de créixer a pH 2,6.

Es coneix com a “tolerància acídica induïda” o *Acidic Tolerance Response* (ATR) la capacitat que alguns bacteris adquireixen de sobreviure a concentracions molt restrictives d'estrès àcid si, prèviament, se'ls exposa a condicions mitjanament àcides (Foster i Hall, 1990; Foster, 1993). Fins ara, la tolerància acídica ha estat especialment estudiada en bacteris entèrics –patògens responsables de nombroses malalties– i en bacteris de la placa dental. S'ha descrit en espècies com *E. coli* (Goodson i Rowbury, 1989), *Streptococcus spp.* i *Enterococcus spp.* (Belli i Marquis, 1991), *Listeria monocytogenes* (Kroll i Patchett, 1992), *Salmonella typhimurium* (Foster, 1993; Lin, 1995) però també en *L. mesenteroides* (McDonald *et al.*, 1990) i *Lb. plantarum* (McDonald *et al.*, 1990; García *et al.*, 1992).

De forma més específica, es parla de LATR (*Lactic Acid Tolerance Response*) referida a la resposta dels bacteris làctics davant l'augment d'àcid làctic com a producte final (Hartke *et al.*, 1996). Una diferència destacable entre els bacteris entèrics i els làctics és que els primers es desenvolupen en un medi àcid des de l'inici, mentre que els segons acidifiquen el medi on es desenvolupen, si bé en el cas dels bacteris làctics del vi, les condicions inicials de pH ja són baixes de partida i, en tot cas, ells mateixos les redueixen lleugerament durant la FML. Se sap que *O. oeni*, com els altres bacteris làctics, també presenta tolerància acídica, on hi jugarien un paper destacat tres mecanismes com són: a) la força protomotriu (*pmf*) generada per la fermentació d'L-màlic (Salema *et al.*, 1996); b) la síntesi de proteïnes d'estrès com a part d'una resposta típica a xoc àcid (Heyde i Portalier, 1990) i c) l'activació de l'H<sup>+</sup>-ATPasa d'extrusió de protons (Garbay i Lonvaud-Funel, 1994; Drici-Cachon *et al.*, 1996).

Els resultats d'en Hartke *et al.* (1996) mostren que *L. lactis subsp. lactis* pot adaptar-se a l'exposició de làctic per dues formes al llarg del creixement cel·lular: una fase logarítmica possiblement activada per H<sup>+</sup>, i una fase estacionària que no necessitaria l'activació per H<sup>+</sup>. Aquests resultats s'avenen amb els de Hill *et al.* (1995), que han descrit tres sistemes superposats que col·laboren en l'ATR de *S. typhimurium*: en primer lloc, la inducció d'enzims que contribuirien al restabliment del pH<sub>i</sub> (H<sup>+</sup>-ATPasa, per exemple), coordinada amb la síntesi de proteïnes d'estrès (sobreexpressades o bé expressades *de novo*) i la síntesi en fase estacionària de diverses proteïnes addicionals; en segon lloc, la síntesi, únicament en fase estacionària, d'un altre grup de noves proteïnes i, en tercer lloc, la síntesi de proteïnes d'estrès

independents del pH, com a resposta a un estrès global. O'Driscoll *et al.* (1997) van observar que les cèl·lules de *Listeria monocytogenes* LO28 que es troben en fase estacionària són més resistents a les modificacions del pH que no pas les que es troben en fase exponencial.

L'anàlisi dels extractes cel·lulars totals de *L. lactis* realitzats per Hartke *et al.* (1996) mostra la inducció d'una trentena de polipèptids respecte les condicions controls, alguns dels quals coincideixen amb *Hsps* (*Heat shock proteins*), com DnaK i GroEL, i altres de pes molecular inferior. S'han publicat resultats similars per a bacteris entèrics com *E. coli* (Heyde *et al.* 1990) o *S. typhimurium* (Foster i Hall, 1991). Això confirma que la resposta a xoc tèrmic comporta un augment de la tolerància a altres factors d'estrès.

Segons O'Sullivan i Condon (1997), l'ATR i l'habilitat de mantenir un pH<sub>i</sub> elevat desapareixen quan s'inhibeix la síntesi proteica amb cloramfenicol durant l'adaptació de les cèl·lules. Els resultats obtinguts per Heyde *et al.* (1990), Hickey i Hirschfeld (1990) i Foster i Hall (1991) ho constaten en *E. coli* i *S. typhimurium*.

En canvi, Drici-Cachon *et al.* (1996) han descrit que l'habilitat per presentar ATR en *O. oeni* implica dos sistemes separats, un dels quals sembla ser independent de la síntesi proteica. D'igual forma, Hartke *et al.* (1996) observaren que LATR en *L. lactis* no fou totalment inhibida per cloramfenicol, fet que indica que la síntesi de proteïnes *de novo* no és l'únic mecanisme per a sobreviure a l'acidificació del medi i que no és un prerrequisit per adquirir resistència àcida. Foster i Hall (1991), en contraposició a resultats anteriors, van veure que els mutants de *S. typhimurium* que no disposaven de H<sup>+</sup>-ATPasa eren molt sensibles al medi àcid i no podien donar ATR.

Més recentment, Hamilton i Svensäter (1998), a partir d'estudis realitzats sobre *Streptococcus mutans*, han proposat que els bacteris capaços de resistir condicions àcides i sotmesos a una preadaptació, induïrien un procés de resposta que probablement suplementaria qualsevol altre sistema regulador de l'homeòstasi –constituti i existent prèviament en la cèl·lula– i que en independència de la naturalesa del procés d'inducció, hauria de possibilitar una capacitat inherent de cara a protegir l'organisme. Aquest procés inclouria, a part de l'extrusió de H<sup>+</sup> via H<sup>+</sup>-ATPasa, un eflux de producte final (Carlsson i Hamilton, 1996; Dashper i Reynolds, 1996) i la formació de substàncies bàsiques (Sissons i Hancock, 1993).



D'altra banda, Jordan *et al.* (1999) també han observat que, en el cas de soques determinades d'*E. coli*, els canvis en la permeabilitat de  $H^+$  es troben correlacionats amb alteracions en la composició proteica –i en menor grau, lipídica– de la membrana plasmàtica, i que a part de la intervenció de l' $H^+$ -ATPasa, hi intervenen els sistemes d'antiport  $K^+/H^+$  i  $Na^+/H^+$ , les cadenes de transport d'electrons i nombrosos sistemes de simport solut- $H^+$ . Hamilton (1991) ja havia arribat, per a *S. mutans*, a conclusions similars.

Fins aquí, hem pogut veure el paper essencial tant de l'activitat  $H^+$ -ATPasa com de la síntesi proteica en ATR. Ara, doncs, hi aprofundirem considerant aquests dos mecanismes bioquímics en el context global de les respostes d'estrès.

### 1.4.3. Activitat ATPasa de membrana

Es considera que la major part d'activitat ATPasa detectada en la membrana plasmàtica d'*O. oeni* correspon a una ATPasa translocadora de  $H^+$  de tipus  $F_0F_1$ :  $H^+$ -ATPasa (Garbay i Lonvaud-Funel, 1994), com la que s'ha descrit per a altres bacteris làctics: en *Lb. plantarum* (Olsen *et al.*, 1991) i *L. lactis* (Poolman *et al.*, 1991).

Tourdot-Maréchal (1991) –que comprovà com el transport d'L-malat en *O. oeni* era inhibït per DCCD, l'inhibidor específic d' $F_0F_1$ -ATPasa– va establir una relació entre l'activitat malolàctica i l' $H^+$ -ATPasa: el gradient de pH generat per l' $H^+$ -ATPasa de membrana afavoreix el transport de malat. Poolman *et al.* (1991) i Olsen *et al.* (1991) també van indicar l'existència d'un transport d'L-malat dependent del flux de pH en les espècies bacterianes que van estudiar. Totes aquestes dades es mostraven coherents amb les aportacions d'en Cox i Henick-Kling (1989) i Henick-Kling *et al.* (1991), segons les quals la transformació d'L-malat a L-lactat afavoria l'increment de  $pH_i$  i, per tant, el gradient de  $H^+$  i la producció d'energia per part de l' $H^+$ -ATPasa.

L' $H^+$ -ATPasa dels bacteris facultatius és reversible (Lengeler *et al.*, 1999) i en *O. oeni*, pel que es dedueix de les aportacions experimentals, intervé tant en l'engranatge metabòlic d'obtenció d'energia durant la FML com en l'extrusió de protons –en forma de resposta primària en l'homeòstasi del  $pH_i$ – des del medi intracel·lular cap a l'exterior (Garbay i Lonvaud-Funel, 1994; Drici-Cachon *et al.*, 1996). Segons Kobayashi *et al.* (1984, 1986), que establiren per primer cop aquesta darrera funció en *Enterococcus hirae* (*Streptococcus faecalis*), l'activitat  $H^+$ -ATPasa en bacteris sempre augmenta en

resposta a la demanda de transport de protons, acoblada al catabolisme de substrats i a l'intercanvi de metabòlits per aportar la màxima energia possible a les cèl·lules. Nannen i Hutkins (1990) ho han suggerit igualment per a *L. lactis subsp. lactis* i *cremoris* i per a *Lb. casei*. En tots els casos, les condicions que porten a l'acidificació del citoplasma incrementen tant la quantitat com l'activitat ATPasa. Garbay i Lonvaud-Funel (1994) van observar la capacitat d'*O. oeni* per regular-ne ràpidament l'activitat en condicions desfavorables de creixement i Guzzo *et al.* (1997) han descrit l'activació de l'H<sup>+</sup>-ATPasa com un dels mecanismes que intervé en la tolerància d'*O. oeni* en condicions de xoc àcid.

Bender *et al.* (1986) han proposat que la tolerància a condicions de creixement àcides es pot relacionar directament amb els nivells d'H<sup>+</sup>-ATPasa per mg de proteïna en membranes de bacteris representatius de la placa dental. També s'ha vist, en membranes aïllades de bacteris molt tolerants de la placa (*Lb. casei*), una major activitat a un p*H*<sub>e</sub> òptim baix (5,0), mentre que en bacteris no tolerants de la placa (*Actinomyces viscosus*) l'activitat és molt inferior, fins i tot a un p*H*<sub>e</sub> òptim més elevat (7,0) (Belli i Marquis, 1991).

Existeixen dues hipòtesis per explicar les modificacions de l'activitat específica: canvis (increment, disminució, processos proteolítics o inhibitoris) de la proteïna de membrana, o bé alteració de la síntesi d'H<sup>+</sup>-ATPasa. Segons Kobayashi *et al.* (1984), es produeix una amplificació de la síntesi d'aquesta en *S. faecalis* i suggereixen que la seva expressió gènica es troba regulada pel p*H*<sub>i</sub>. Alhora, els mateixos autors i Nannen i Hutkins (1990) han constatat que la resposta als canvis de pH comporta algun mecanisme post-transcripcional, amb un increment de l'activitat de l'enzim. Svensäter *et al.* (2000), mitjançant estudis comparatius en electroforesis 2D-PAGE, han proposat que algunes de les bandes sobreexpressades en *S. mutans* en condicions d'estrès acídic es correspondrien amb les subunitats d'*F*<sub>0</sub>*F*<sub>1</sub>-ATPasa, tot i que no ho han demostrat.

Tourdot-Maréchal (1991), va descriure que les modificacions de la membrana lipídica afecten l'activitat H<sup>+</sup>-ATPasa. Això podria explicar com l'etanol i els àcids grassos modificarien indirectament l'activitat de l'enzim. Garbay i Lonvaud-Funel (1994) van detectar, per a *O. oeni*, una disminució d'aquesta en solució alcohòlica *in vivo*, mentre que no hi havia inhibició *in vitro*. Resultats similars s'han descrit per a *E. coli* (Dombek i Ingram, 1984) i *S. cerevisiae* (Cartwright *et al.* 1986, 1987).

El mateix equip de Tourdot-Maréchal ha suggerit darrerament l'existència de diversos sistemes ATPasa de membrana, les activitats màximes dels quals depenen del pH concret del medi (Guzzo *et al.*, 2000). Això explicaria els seus resultats, segons els quals no obtenien increments significatius de l'activitat ATPasa en cèl·lules d'*O. oeni* incubades a baix pH. Mitjançant l'ús d'inhibidors específics de diferents tipus d'ATPasa, han deduït la presència, tot i que minoritària, d'una de tipus P i probablement, segons ells, K<sup>+</sup>-ATPasa (inhibida per vanadat).

#### 1.4.4. Síntesi de proteïnes d'estrès

Tal com ja s'ha pogut entreveure en l'apartat 1.3.2, les cèl·lules bacterianes sintetitzen tot un conjunt de proteïnes com a resposta adaptativa a condicions d'estrès o poc favorables al creixement (Morimoto *et al.*, 1990; Yura *et al.*, 1993; Lengeler *et al.*, 1999). Dins d'aquest grup, han estat molt estudiades les proteïnes de resposta al xoc tèrmic, *Hsps* (*Heat shock proteins*) (Neidhardt *et al.*, 1984; Watson, 1990). Altres autors han descrit que moltes d'aquestes proteïnes també s'expressen davant altres tipus d'estrès (Heyde *et al.*, 1990; Hickey i Hirschfeld, 1990; Yura *et al.*, 1993; Hartke *et al.*, 1996).

Rallu *et al.* s'atreuen a dir, el 1996, que “the exploration of stress responses in lactic acid bacteria has just began”. Donat que les *Hsps* presenten una estructura primària altament conservada al llarg de l'evolució i sembla que desenvolupin funcions similars tant en organismes procariotes com en eucariotes (Morimoto *et al.*, 1990), sovint s'han fet extrapolacions i s'ha pressuposat que les diferents proteïnes que se sobreexpressen o se sintetitzen de novo en *O. oeni* i altres bacteris làctics comparteixen les funcions descrites en el microorganisme on han estat aïllades o estudiades per primer cop, normalment *E. coli*, o bé se n'han detectat gens per cerca d'homologies amb gens ja coneguts d'altres espècies. Aquesta tendència queda refermada perquè molts gens involucrats en la resposta a xoc tèrmic es troben altament conservats i molts han estat identificats en *L. lactis*, entre d'altres (Rallu *et al.*, 1996; Sanders *et al.*, 1999).

La inducció d'aquestes proteïnes és ràpida, transitòria i altament regulada, a través d'una sèrie de mecanismes molt estudiats en *E. coli* (Georgopoulos *et al.*, 1990; Yura *et al.*, 1993), i no tant conservats al llarg de l'evolució com ho han fet els gens i les

estructures, per la qual cosa no són del tot extrapolables als bacteris làctics (Rallu *et al.*, 1996; Sanders *et al.*, 1999).

Segons Yura *et al.* (1993), les *Hsps* també presenten funcions en condicions normals de creixement. Així, la majoria d'aquestes proteïnes actuen com a “xaperones” o “plegadors moleculars”, definides per Ellis (1987 i 1990) com a “una família de proteïnes cel·lulars que faciliten el plegament correcte d'altres polipèptids i, en alguns casos, l'engalzament en estructures oligomèriques, però que no es constitueixen en components de les estructures funcionals finals”. Els plegadors moleculars poden influir en diferents processos: replicació del DNA, transcripció a RNA, transport de proteïnes, proteòlisi, síntesi de flagels o mutagènesi per UV. En alguns casos poden, fins i tot, reactivar proteïnes desnaturalitzades, com l'RNA-polimerasa. Les seves funcions en aquests processos (Yura *et al.*, 1993; Welch i Georgopoulos, 1993) es poden resumir com:

1. Prevenir la inactivació de proteïnes cel·lulars.
2. Reactivar proteïnes desnaturalitzades.
3. Col·laborar en la degradació de proteïnes desnaturalitzades irreparables que s'acumulen tant en condicions de creixement normal com d'estrès.

A part de la temperatura, els gens *hsps* poden ser induïts per agents tals com: substàncies degradants del DNA, anàlegs d'aminoàcids, manca de fonts de carboni, infecció per fag ?, proteïnes no plegades, pH bàsic, etanol,... (Yura *et al.*, 1993).

Fins ara, les *Hsps* s'han agrupat en 5 grans famílies (*Hsp100*, *Hsp90*, *Hsp70*, *Hsp60* i *Hsps* més petites) designades d'acord amb el pes molecular (Hecker *et al.*, 1996; Narberhaus, 2002). Algunes de les *Hsps* més freqüents i més esteses, com DnaK, DnaJ, GrpE-DnaK i GroEL, han estat localitzades per immunodetecció en alguns bacteris làctics, com ara *L. lactis*, i sovint no només expressades com a resposta al xoc tèrmic, sinó induïdes per l'adaptació àcida (Hartke i Auffray, 1996; Rallu *et al.* 1996) o bé en *Streptococcus thermophilus*, per Auffray *et al.* (1995). També en 3 soques de *Lactobacillus acidophilus*, *Lb. casei* i *Lactobacillus helveticus*, Broadbent *et al.* (1997) van constatar homòlegs de Dnak, GroEL, ClpB i GrpE, mentre que DnaJ no s'expressava.

A més a més, en les respostes d'estrès, Broadbent *et al.* (1997) i González-Márquez *et al.* (1997) entre d'altres, han observat, mitjançant electroforesi bidimensional 2D-PAGE, moltes proteïnes no catalogades com a *Hsps* que col·laboren en el manteniment

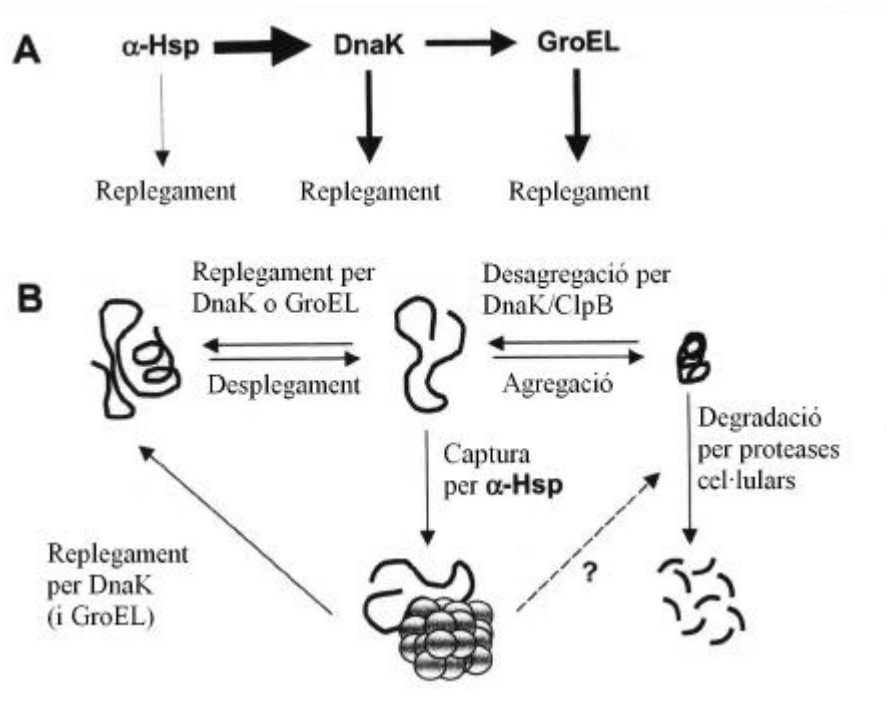
de l'activitat cel·lular en aquestes condicions més extremes com, per exemple, la superòxid dismutasa en lactococs (Sanders *et al.*, 1995).

Dins de les *Hsps* es troba la família de *smHsps* (*small heat shock proteins*), amb un p.m. d'entre 14 a 30 kDa (Merck *et al.*, 1993), presents tant en cèl·lules procariotes com eucariotes (Servant i Mazodier, 1995). Darrerament, De Jong *et al.* (1998) i Narberhaus (2002) han proposat el terme *a-Hsps* enlloc d'*smHsps*, ja que no totes les proteïnes d'estrès de baix pes molecular pertanyen a aquesta família estructural.

En alguns bacteris (*Clostridium acetobutylicum*, *Streptomyces albus*) (Sauer i Dürre, 1993; Servant i Mazodier, 1995, respectivament) es va detectar la síntesi d'una *smHsp* de 18 kDa com a resposta a condicions d'estrès. D'igual forma, es van descriure *smHsps* de 16 kDa en *Mycobacterium tuberculosis* (Yuan *et al.*, 1996) i *S. thermophilus* (González-Márquez *et al.*, 1997). Leroux *et al.* (1997) i Lee *et al.* (1997) van confirmar que aquestes *smHsps* actuaven com a plegadors moleculars que estableixen agregats proteics resultants de tractament químic o tèrmic, si bé no són capaces de protegir les proteïnes contra la inactivació tèrmica irreversible (Roy *et al.*, 1999). En conclusió, s'accepta que les *a-Hsps* contribueixen al replegament de les proteïnes desnaturalitzades en presència d'altres xaperones, junt amb les quals constitueixen un complex sistema de plegadors moleculars que actuen "en equip", com en una "xarxa multixaperona" (Veinger *et al.*, 1998; Delmas *et al.*, 2001; Narberhaus, 2002), força estès en la diversitat d'organismes (Benkirane *et al.*, 1997; Veinger *et al.*, 1998) (veure figura 1.4). En bacteris, fins ara, se n'han descrit en una cinquantena d'espècies (Narberhaus, 2002).

Dins d'aquesta cinquantena, trobem *O. oeni*, per a qui Guzzo *et al.* (1994) van descriure l'augment o la inducció de la síntesi de 6 proteïnes després de xoc tèrmic (42°C), àcid (pH 3) i en presència de concentracions elevades d'etanol (12 %), amb p.m. de 75, 66, 64, 24, 18 i 14,5 kDa. La proteïna més fortament induïda en els tres tipus de xocs és la de 18 kDa (Lo18), associada a la membrana citoplasmàtica, tot i que també es pot detectar en la fracció citoplasmàtica (Jobin *et al.*, 1997). En aquest sentit, Delmas *et al.* (2001) postulen que l'expressió podria trobar-se regulada pels nivells de la fluïdesa de membrana, i per tant seria un mecanisme d'activació ràpida en condicions d'estrès (Tourdot-Maréchal *et al.*, 2000). La seqüència N-terminal d'Lo18 mostra un percentatge elevat d'identitat amb les altres proteïnes de la mateixa família. Els autors esmentats, per la tècnica d'hibridació anticòs-proteïna, també van caracteritzar les

bandes de 66 i 64 kDa com a una de sola, concretament GroEL, mentre que no van obtenir resultats positius amb anticossos d'altres proteïnes, com ara DnaK (Guzzo *et al.*, 1997).



**Figura 1.4.** Funció d' $\alpha$ -Hsps en una xarxa multixaperona: A) Seqüència de transferència de substrats units a  $\alpha$ -Hsps per a processament posterior i B) Representació esquemàtica de la xarxa multixaperona cel·lular (Narberhaus, 2002).

## 1.5. Sobre les interaccions entre llevats i *O. oeni*

Anteriorment, ja s'ha introduït la idea que el metabolisme dels llevats afecta directament l'evolució de la població total de bacteris làctics presents inicialment en el most i el creixement posterior d'aquells que s'hi imposen, habitualment *O. oeni*.

L'etanol no és altra cosa que el resultat del metabolisme fermentatiu dels llevats. I en menor mesura es troben l'efecte dels àcids grassos de cadena mitjana o les petites concentracions de SO<sub>2</sub> que aquests poden produir.

Pot semblar, doncs, que l'acció dels llevats sobre *O. oeni* hagi de ser únicament negativa, però no és ben bé així, com han pogut observar Guilloux-Benatier *et al.* (1993) o Rollán *et al.* (1993). Els primers varen descriure l'efecte positiu dels autolisats de llevats sobre la degradació de l'àcid L-màlic en el vi per part dels bacteris làctics, mentre que els segons varen detectar activitat proteolítica extracel·lular en *O. oeni*, que el permetria beneficiar-se de les macromolècules provinents dels llevats autolisats.

Actualment, hom estableix, doncs, tres tipus d'interaccions entre *S. cerevisiae* i *O. oeni* al llarg de la vinificació:

- en primer lloc, alentiments o, fins i tot, aturades de FA lligades a la presència de bacteris en cas d'inoculació simultània amb llevats, per competició nutricional o síntesi de metabòlits inhibidors, com l'àcid acètic (King i Beelman, 1986; Suárez i Íñigo, 1992; Edwards, 2000), tot i que en els experiments de vinificació d'en Henick-Kling i Park (1994), en cap cas detectaren que l'addició simultània d'inòculs de llevat i de bacteris làctics inhibís la FA.
- en segon lloc, inhibició del creixement bacterià per part dels llevats per síntesi d'àcids grassos C8, C10 i C12, principalment els dos darrers (Lafon-Lafourcade *et al.*, 1984; Edwards i Beelman, 1987; Lonvaud-Funel *et al.*, 1988) i per SO<sub>2</sub> (King i Beelman, 1986; Henick-Kling i Park, 1994), o bé per competició amb substrats com l'arginina (Guerzoni i Gardini, 1988).
- per últim, estimulació del creixement bacterià per part dels llevats gràcies a la detoxificació del medi: les envoltres cel·lulars són capaces d'absorbir àcids grassos segons Lonvaud-Funel *et al.* (1985) i Guilloux-Benatier *et al.* (1998) i altres tòxics per als llevats, com residus de plaguicides (Henick-Kling i Park, 1994); a l'activitat proteolítica dels llevats (Charpentier i Feuillat, 1993) o a l'alliberament, per part d'aquests, de compostos estimulants del creixement,

com ara vitamines (Beelman *et al.*, 1985; King i Beelman, 1986), aminoàcids i pèptids (Feuillat *et al.*, 1977; Guilloux-Benatier *et al.*, 1985), o de molècules d'estructura més complexa, com les proteïnes de paret cel·lular glicosilades alliberades durant l'autòlisi (Guilloux-Benatier *et al.*, 1993; 1998).

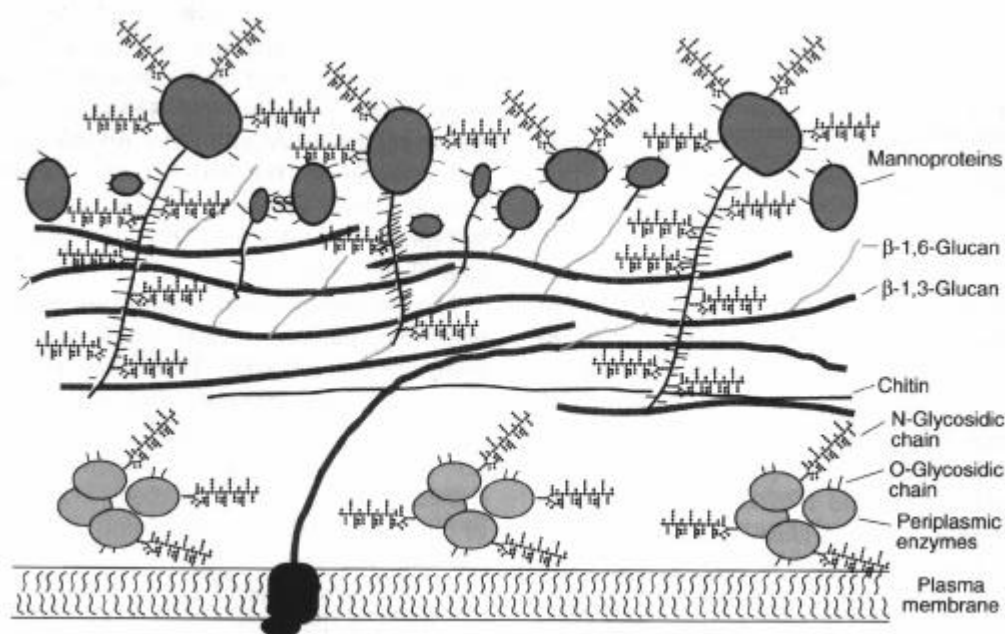
Existeixen evidències experimentals que indiquen que el creixement dels bacteris làctics en el vi i la durada de la FML es troben influenciades per la soca de llevat que porta a terme la FA (Fornachon, 1968; Lafon-Lafourcade *et al.*, 1983a; Avedovech *et al.*, 1992; Delteil i Jarry, 1992; Reguant, 2001). Lonvaud-Funel *et al.* (1988) les atribueixen, precisament, als diferents nivells de substàncies nitrogenades alliberades pels llevats durant i després de la FA.

Segons Hernawan i Fleet (1995), l'autolisat de llevats és constituït per una gran part de polisacàrids, proteïnes, aminoàcids i àcids nucleics. Han estat identificades dos tipus de molècules amb possibles efectes positius sobre el creixement d'*O. oeni*: en primer lloc, els polisacàrids i pèptidomannans secretats durant la FA, i en segon lloc, les mannopteïnes de paret cel·lular alliberades principalment durant l'autòlisi, un cop finalitzada la FA, gràcies a l'acció de  $\beta_{1-3}$  glucanases (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1998).

Les mannopteïnes alliberades, segons Guilloux-Benatier *et al.* (1993), podrien ser emprades com a única font de nitrogen per al creixement d'*O. oeni*. Representen un 40 % dels compostos de la paret cel·lular dels llevats i el pes molecular es troba comprès entre 100 i 200 kDa. Presenten l'estructura de polipèptids molt glicosilats (O i N-glicosilació, entre un 50 i 95 % de carbohidrats) i s'ancoren a les parets dels llevats, tal i com es pot observar en la figura 1.5. En conjunt, la paret cel·lular dels llevats consta d'un complex de mannopteïnes,  $\beta_{1-6}$  glucans d'uns 150 residus,  $\beta_{1-3}$  glucans d'uns 1500 residus i quitina (Lipke i Ovalle, 1995).

D'altra banda, sabem que *O. oeni* presenta nombrosos requeriments de nutrició nitrogenada en ésser auxòtrof per a la majoria d'aminoàcids (Garvie, 1967) i segons Manca de Nadra *et al.* (1999) és capaç d'hidrolitzar pèptids i proteïnes presents al most i al vi, confirmant els resultats obtinguts pocs anys abans pel mateix equip, que detectaren, per primer cop, la producció de dues proteases extracel·lulars en diverses soques d'*O. oeni* (Rollán *et al.*, 1993 i 1995). Recentment, han caracteritzat una exoproteasa en condicions de carència nutricional, homodímera, activa entre pH 4 i 5,5 i que presenta activitat proteolítica sobre suc de raïm (Farías i Manca de Nadra, 2000).





**Figura 1.5.** Composició i estructura de la paret cel·lular de *S. cerevisiae* (Schreuder *et al.*, 1996).

Malgrat tot, en *O. oeni* encara no són coneguts ni els sistemes de transport d'aminoàcids o de pèptids, ni els enzims proteolítics o pèptidolítics específicament produïts en condicions enològiques; mentre, i com succeeix en altres aspectes, els sistemes proteolítics han estat més estudiats en altres bacteris làctics, especialment en *L. lactis*, i també en alguns lactobacils, implicats en la secreció de sistemes d'hidròlisi de la caseïna al llarg de la producció de derivats làctics (Kunji *et al.*, 1996; Poquet *et al.*, 2000). A partir dels seus resultats, s'ha pogut elaborar un model de sistema proteolític implicat en la nutrició nitrogenada dels bacteris làctics, basat en la interacció de tres grups diferents de biomolècules per assegurar la via metabòlica: proteases, transportadors d'oligopèptids i peptidases, els quals participen conjuntament en les funcions de reciclatge, activació i degradació de proteïnes i en la nutrició per assimilació d'aminoàcids (Christensen *et al.*, 1999).



## **2. OBJECTIUS**



La FML presenta, sovint, problemes per al seu desenvolupament perquè el vi és un medi difícil de tolerar per als microorganismes que hi poden viure, entre ells *O. oeni*. El control d'aquest procés requereix un estudi profund dels factors que modifiquen el metabolisme dels bacteris làctics i com aquests afecten les dinàmiques de poblacions d'*O. oeni* al llarg de la vinificació.

En l'esmentat context se situen els objectius principals del treball que s'exposa en la present memòria:

1. Estudi *in vitro* de l'efecte d'alguns components del vi sobre mecanismes bioquímics d'*O. oeni*, com són l'activitat ATPasa de membrana, la possible sobreexpressió de proteïnes de membrana i aparició de proteïnes d'estrès i l'obtenció de nitrogen a partir de components de la paret cel·lular de *S. cerevisiae*.
2. Estudi dels efectes d'alguns d'aquests components del vi sobre la dinàmica d'evolució de les poblacions de diferents soques d'*O. oeni* en vins simulats i vins reals, mitjançant la identificació dels bacteris presents per tècniques moleculars.



### **3. MATERIALS I MÈTODES**





### 3. MATERIALS I MÈTODES

#### 3.1. Microorganismes

Els estudis portats a terme en aquesta tesi, concretament els assaigs de tipus metabòlic i les microvinificacions, s'han realitzat amb tres soques:

- la soca de col·lecció d'*O. oeni* CECT 4100 (abans CECT 217), que pertany a la *Colección Española de Cultivos Tipo* (CECT) de València.
- *O. oeni* CR1, soca aïllada pel nostre grup de recerca al celler experimental del Mas dels Frares, URV.
- soca comercial *Vitilactic* (de Sofralab [Martin Vialatte] S.A., Epernay, França).

Als assaigs d'interaccions entre *O. oeni* i *S. cerevisiae*, s'han utilitzat les soques:

- *O. oeni* Lo 84.13 (*Institut d'Œnologie* de Bordeus, França).
- *O. oeni* S3 (soca no comercial de Lallemand INC., Montreal, Canadà).

En les microvinificacions, també s'emprà el llevat *S. cerevisiae* Lalvin RV1 (Lallemand INC., Montreal, Canadà), aïllat al Mas dels Frares per Torija *et al.* (1999), mentre que en la campanya de vinificació de l'any 2000 s'inoculà amb el llevat *S. cerevisiae* Montrachet Davis 522 (Lalvin, Lallemand INC., Montreal, Canadà).

#### 3.2. Medis de cultiu

- **Medi de cultiu ric MRSFM**

Es tracta del medi emprat per al manteniment, sembra, inoculació i recompte de viables de les diferents soques, així com per a l'obtenció de cèl·lules per a sotmetre-les a condicions d'estrès en forma de cèl·lules no proliferants (*resting cells*). També s'ha utilitzat en forma sòlida per al cultiu en placa amb l'addició de 20 g/l d'agar bacteriològic.

MRSFM presenta la mateixa composició que el medi MRS (descriu De Man *et al.* (1960), considerat òptim per al creixement dels bacteris làctics), més fructosa i àcid L-màlic, amb la qual cosa presenta la següent composició final:

Component	Concentració (g/l)
Bactopeptona	10
Extracte de carn	10
Extracte de llevat	5
Glucosa	20
Tween 80	1
Citrat d'amoni	2
Acetat de sodi	5
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,1
MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	0,05
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2
H <sub>2</sub> O destil·lada	Enrasar a 1 litre
Se l'ha enriquit amb:	
Àcid DL-màlic	4
D-Fructosa	5

pH 5 ajustat amb KOH 10N  
Autoclavat a 121°C durant 15 minuts.

- **Medi MRSFM modificat per a l'aïllament de soques en les vinificacions**

Emprant com a medi base MRSFM sòlid, cal afegir:

- Solució de suc de tomàquet al 10 % v/v, que s'obté centrifugant 1 litre de suc sense conservants a 5000 x g, 10 minuts. El sobrenedant s'esterilitza i es conserva a 4°C, fins que s'afegeix al medi just abans de repartir en plaques.
  - Funció: aporta un derivat glicosilat de l'àcid pantotènic conegut anteriorment com a *TJF (Tomato Juice Factor)* (Garvie, 1967).
- Nistatina, 50 mg/l: es bull durant uns minuts, dissolta en aigua, la quantitat en pols proporcional al volum de medi que preparem per a facilitar-n'hi la solubilització i homogeneïtat, on l'afegirem tot just abans de repartir les plaques, al mateix temps que el suc de tomàquet.
  - Funció: antifúngic contra el creixement de llevats.
- Azida sòdica, 100 mg/l: dissolta en aigua estèril, s'afegeix simultàniament als anteriors components.
  - Funció: evita el desenvolupament de bacteris acètics.

- **Medi FT80 pH 4,5**

Aquest medi ha estat utilitzat per obtenir els precultius (inoculació i creixement) de cèl·lules d'*O. oeni* en els assaigs per estudiar l'activitat exoproteasa en el medi. El pH 4,5 també contribueix a una certa aproximació a les condicions reals de vinificació.

Aquesta és la seva composició:

Component	Concentració (g/l)
Casaminoàcids	5
Extracte de llevat	4
D-glucosa	5
D-fructosa	3,5
Àcid DL-màlic	10
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,6
KCl	0,45
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,13
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	0,003
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,13
Tween80	1 ml
H <sub>2</sub> O destil·lada	Enrasar a 1 litre

S'ajusta el pH a 4,5 i s'esterilitza 15 min a 121°C.

- **Medis FT80 modificats per a l'estudi de l'activitat exoproteasa**

A partir del medi descrit anteriorment, s'ha elaborat un altre medi ric en nucleòtids, vitamines i font de nitrogen en forma de macromolècules (diferents extractes de llevats) sense casaminoàcids. La composició del medi és la següent:

Component	Concentració (g/l)
D-fructosa	5
D-glucosa	5
Tween80	1
Àcid DL-màlic	10
Acetat de sodi	1
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1
Àcid ascòrbic	0,15
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,1
MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	0,01
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,01
Adenina <sup>(1)</sup>	5 mg/l
Guanina <sup>(1)</sup>	5 mg/l
Citosina <sup>(1)</sup>	5 mg/l
Timina <sup>(1)</sup>	5 mg/l
Piridoxal <sup>(2)</sup>	1,5 mg/l
Àcid pantotènic <sup>(2)</sup>	0,75 mg/l
Biotina <sup>(2)</sup>	0,075 mg/l

Tiamina (hidroclorur) <sup>(2)</sup>	0,075 mg/l
Àcid nicotínic <sup>(2)</sup>	0,075 mg/l
Riboflavina <sup>(2)</sup>	0,075 mg/l
Àcid fòlic <sup>(2)</sup>	0,075 mg/l
Extracte de llevat <sup>(3)</sup>	5
H <sub>2</sub> O destil·lada	Enrasar fins a 1 litre

S'ajusta pH a 4,5

S'esterilitza per pasteurització: 10 min a 100°C.

- (1) Les bases nitrogenades es preparen en forma concentrada 1000X, i es conserven a -20°C.  
 (2) Les vitamines es preparen d'igual forma que les bases nitrogenades.  
 (3) Extracte de llevat estàndard.

A partir d'aquest medi s'han fet modificacions per reduir la font i la biodisponibilitat de nitrogen, tal com s'indica en la taula 3.1.

**Taula 3.1.** Medis basats en l'FT80 modificat i amb contingut de nitrogen total 10 vegades inferior: 0,5 g/l.

Codi medi	Font de N	Quantitat
estàndard	Extracte de llevat sense sal, tipus B	0,5 g/l
50 % P	Extracte de llevat DI 54 codi 30101	0,5 g/l
peptona	Peptona de llevat codi 222	0,5 g/l

- **Medi YEPDA per al recompte de llevats (seguiment de FA)**

Component	Concentració (g/l)
D-glucosa	20
Peptona	20
Extracte de llevat	10
Agar	15

S'esterilitza 15 min a 121°C.

- **Medi per al recompte d'acètics YEPMA**

Component	Concentració (g/l)
Extracte de llevat	5
Peptona	3
Manitol	12,5
Agar	15

S'esterilitza 15 min a 121°C.

### 3.3. Condicions de cultiu i de conservació de les soques

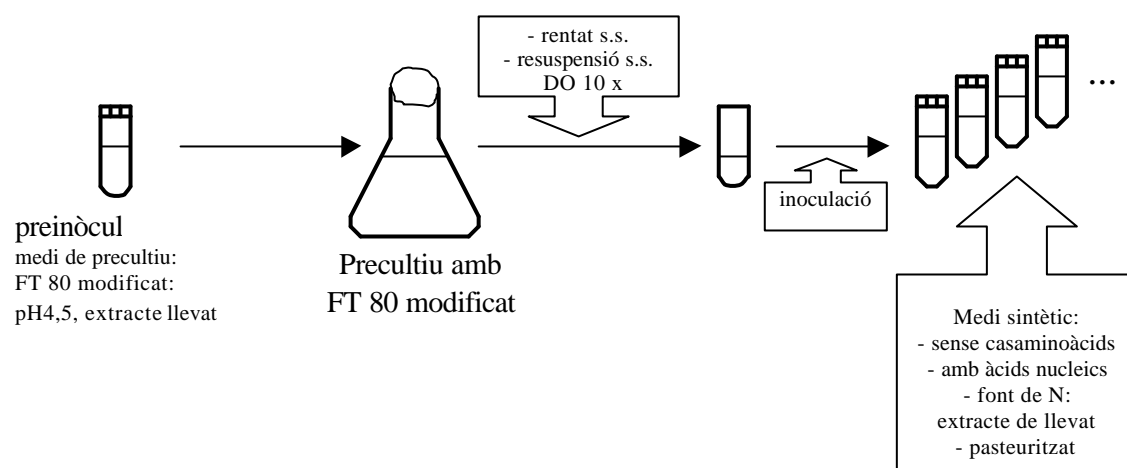
- **En medi MRSFM**

Per tal de realitzar estudis metabòlics, els medis líquids han estat inoculats (1-2 %) amb preinòculs d'*O. oeni* crescuts en 10 ml del mateix medi MRSFM fins al final de la fase exponencial i/o inici de la fase estacionària de creixement.

Els cultius s'han portat a terme en flascons de vidre amb tap de rosca, amb capacitat de 250 ml, omplerts fins a 200 ml i que es col·locaven a l'incubador de CO<sub>2</sub> (10 %) a 27°C (Sanyo, Braun-Biotech, S.A.) sense tancar-los hermèticament per facilitar l'intercanvi gasós. El temps d'incubació ha estat d'unes 48 h per a recollir les cèl·lules al final de la fase de creixement.

- **En medi FT80 pH 4,5**

S'operava de forma similar als altres casos. Les cèl·lules es recollien per centrifugació, es rentaven al final de la fase exponencial de creixement i es ressuspenien en un volum adequat de solució salina que permetia inocular el medi FT80 modificat per a estudi de l'activitat exoproteasa amb una DO inicial al voltant de 0,5.



**Figura 3.1.** Esquema de la metodologia de cultiu emprada amb el medi FT80 per a l'estudi d'interaccions entre *O. oeni* i *S. cerevisiae*. Veure explicació en l'apartat 4.3 de **Resultats i discussió**.

- **En medi MRSFM sòlid**

Veure apartat 3.5.

- **Conservació de les soques**

Segons el temps que calgui conservar-les:

- Per a períodes inferiors a una setmana, es podien mantenir en medi MRSFM líquid a 4°C sense que la viabilitat quedés considerablement afectada.
- Per a períodes d'uns 2 mesos com a màxim, en MRSFM sòlid a 4°C.
- Per a la conservació a mitjà termini (entre 3 mesos i 1 any), es congelaven a -20°C al 20 % de glicerol estèril (v/v).
- Per a llarg termini (més d'1 any) es congelaven també al 20 % de glicerol amb N<sub>2</sub> líquid en MRSFM i es conservaven a -80°C.

### 3.4. Condicions i seguiment de vinificació

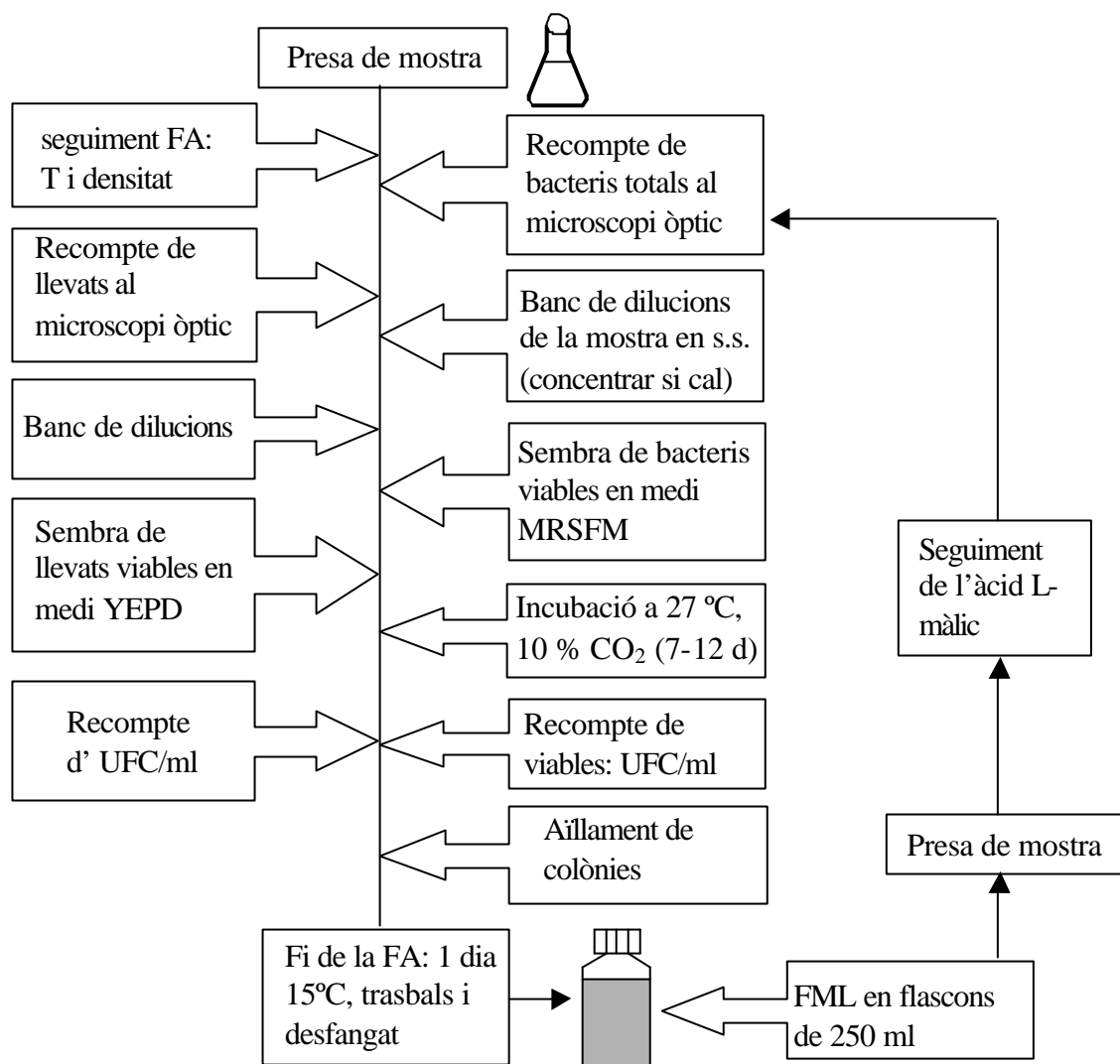
#### 3.4.1. Vinificacions simulades en most

Tal com es podrà veure en l'apartat 4.4 de **Resultats i discussió**, es realitzaren assaigs de vinificacions simulades (microvinificacions) amb most negre, procedents d'un mateix lot comercial (most Greip negre, Pepsi-Cola Company) i sense additius, el qual fou degudament corregit (concentracions de sucres i àcid L-màlic, i pH) per aproximar-lo al màxim a les condicions reals de vinificació.

La metodologia emprada es pot resumir en els següents passos:

1. Inoculació de llevat estàndard: soca de *S. cerevisiae* Lalvin RV1.
2. Inoculació inicial de mesclades de 3 soques d'*O. oeni* en números baixos, similars a aquells que es presenten en celler, entre 10<sup>2</sup> i 10<sup>4</sup> UFC/ml.
3. Introducció, de forma unifactorial, dels components estudiats en les concentracions descrites com a significativament inhibidores del creixement i de la FML: 10 mg/l de coure (Vidal, 2001), 5 mg/l d'àcid dodecanoic (C12) (Capucho i San Romão, 1994; Vidal,1997) i 40 mg/l d'SO<sub>2</sub> total (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1998; Delfini i Formica, 2001) (veure ANNEX A).
4. Tots els assaigs es realitzaren per duplicat en matrassos Erlenmeyer de 250 ml, degudament esterilitzats, tapats amb cotó de forma que permetia l'intercanvi de gasos i omplerts amb idèntic volum de most.
5. Els matrassos es mantingueren a una temperatura constant de 25°C i ,cada dia, el contingut fou homogeneïtzat durant 15 min mitjançant un agitador electromagnètic per simular les condicions de remuntatge del celler.
6. El seguiment de la FA es féu mesurant la davallada del pes del matràs i de la degradació de sucres reductors mitjançant el mètode GAB (García Barceló, 1990) així com el comptatge d'UFC/ml de llevats en alguns casos.

7. Un cop acabada la FA, quan els sucres reductors eren inferiors als 2 g/l, es procedí a un pas de sedimentació de les mares que consistia en incubar el matràs durant 24 hores a 15°C, passades les quals es trasbalsava el vi obtingut a un flascó de vidre estèril d'uns 250 ml, tapat amb un septe de silicona que permetia mantenir unes condicions anaeròbies.
8. Les preses de mostra per al monitoratge de l'activitat malolàctica (evolució del contingut d'àcid L-màlic) es feien cada 2 dies fins que l'àcid L-màlic començava a davallar. En aquest moment, si es detectava que la FML era accelerada, es preniën mostres diàriament per obtenir els punts representatius d'inici, meitat i final de FML. Com s'especifica més endavant, l'aïllament de colònies per a la identificació i tipificació només es portava a terme en punts representatius.
9. La presa de mostra (1 ml) es realitzava mitjançant una xeringa i agulla estèrils, a través del septe, i es dipositava en tubs Eppendorf.
10. La FML es considerava finalitzada quan la concentració d'L-màlic no superava els 30 mg/l i es comprovava, en mesures consecutives corresponents a dos dies diferents, que el valor no disminuïa. En aquest punt, es congelava la mostra per a determinacions analítiques posteriors.



**Figura 3.2.** Metodologia de seguiment de microvinificacions.

### 3.4.2. Vinificacions reals

D'altra banda, s'ha completat el seguiment d'una vinificació en negre (ull de llebre) corresponent a la campanya de l'any 2000 al celler experimental de la Facultat d'Enologia de la URV, situat a Constantí (Camp de Tarragona), anomenat Mas dels Freres. La variable que s'hi ha estudiat és la influència de la concentració de SO<sub>2</sub>, comparant l'evolució d'un most amb una concentració habitual, de 4 g/hl, amb la d'un altre amb 10 g/hl, per damunt de les quantitats legalment acceptades en enologia.

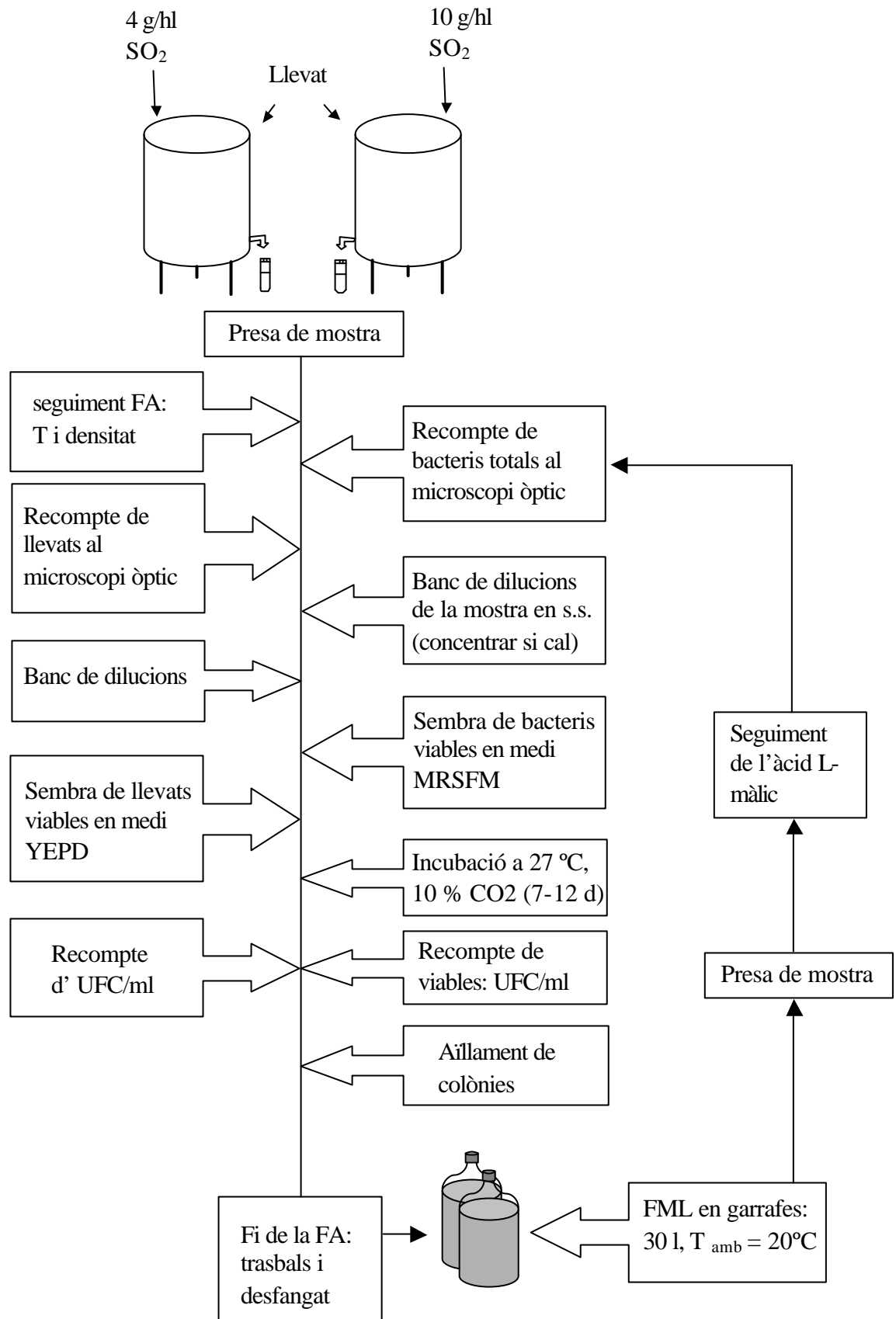
La FA va tenir lloc en tina, i un cop acabada, el vi fou transportat a garrafes de vidre de 30 litres, ubicades en el mateix celler en lloc relativament fresc (temperatura al voltant de 20°C) on es feu el seguiment de la FML iniciada espontàniament, per duplicat, i de forma similar a com s'ha indicat per a les microvinificacions. Com en el cas d'aquestes, també s'ha monitoritzat la vinificació des de l'inici de la FA:

- Presa de mostra:

El volum de mostra depenia de les anàlisis posteriors que es volien fer. Per defecte, es recollien duplicats de 10 ml en tubs estèrils, que es podien mantenir, com a màxim, 24 h a 4°C per a les anàlisis microbiològiques, i a -20°C durant mesos per a la resta de determinacions analítiques.

  - Durant la FA: cada dia. Al mateix temps es mesurava la densitat i la temperatura, sempre després del remuntatge.
  - Al llarg de la FML, se seguien criteris molt similars als de la metodologia de seguiment de les microvinificacions simulades, amb un control estricte dels nivells d'àcid L-màlic per a poder obtenir mostres d'inici, meitat i final de FML.
- Comptatge de viables:
  - Bacteris làctics:
    1. Recompte aproximat de bacteris totals al microscopi (veure apartat 3.5).
    2. Cal tenir en compte que en alguns moments la concentració de bacteris làctics podia ser molt baixa (al principi i final de FA), de l'ordre de 10<sup>1</sup>-10<sup>2</sup> UFC/ml, o fins i tot menys, i que calia centrifugar volums d'1 o 10 ml i ressuspensar el precipitat cel·lular en 100 µl de solució salina estèril.
    3. Amb la resta de mostres on la població superava els 10<sup>2</sup> UFC/ml, s'operava com s'indica també en l'apartat 3.5.
  - Llevats: recompte cada 2 dies mentre durés la FA, crescuts en medi YEPDA i a 30°C.
  - Bacteris acètics: com que es trobaven en concentracions també molt baixes, se seguia el mateix procediment descrit per als bacteris làctics en el cas semblant, i es concentraven les mostres per centrifugació. S'incubaven en medi YEPMA, a 28°C, en condicions aeròbies.





**Figura 3.3.** Metodologia de seguiment de la vinificació real en la campanya de l'any 2000.

### 3.4.3. Determinació d'alguns components del vi relacionats amb el metabolisme d'*O. oeni*

Per a la determinació de components del vi estretament lligats al metabolisme d'*O. oeni*, com són els àcids acètic, cítric i L-làctic, a part de l'L-màlic ja esmentat, així com de l'etanol, glicerol i els sucres reductors glucosa i fructosa, s'han utilitzat els assaigs enzimàtics subministrats per Roche (veure referències a l'ANNEX B).

Mentre, per a la determinació del SO<sub>2</sub> lliure, s'ha seguit el mètode de valoració volumètric GAB, mitjançant l'aparell TONING<sup>®</sup>, descrit per García Barceló (1990).

Aquestes determinacions han estat realitzades al final de la FA i al final de la FML, punts on s'han considerat representatives de l'evolució del metabolisme d'*O. oeni*.

## 3.5. Seguiment del creixement cel·lular i de la FML

### Lectura de l'absorbància a 600 nm

Mesura espectrofotomètrica de l'absorbància del cultiu a 600 nm respecte al medi de cultiu sense inocular, amb un espectrofotòmetre Hitachi U-2000.

Observació al microscopi òptic a 400X i recompte de nombre total de cèl·lules amb la cambra de Neubauer, amb les dilucions corresponents.

### Recompte de microorganismes viables o UFC/ml

Per al recompte de viables s'ha utilitzat el mètode de banc de dilucions i de sembra en superfície. Després del recompte total amb cambra de Neubauer, amb què s'obté una aproximació del nombre de cèl·lules, es realitzava un banc de dilucions amb solució salina (s.s.) estèril (solució aquosa NaCl 0.85 % p/v) i es dipositava sobre la placa de Petri, amb medi MRSFM sòlid, la dilució adequada perquè el nombre de colònies no excedís més de 2 o 3 centenars. Tot seguit s'escampava el volum de dilució (100 µl) utilitzant unes perles de vidre de 5 mm de diàmetre, esterilitzades a l'autoclau, que en moure's sobre el medi escampaven uniformement els bacteris (sembra en superfície o "gespa"). Aquesta operació es realitzava per duplicat. Les plaques s'incubaven a 27°C i

10 % CO<sub>2</sub> durant 7 dies com a mínim, fins a l'aparició de les colònies, i el recompte es realitzava amb un comptador de colònies (SBS).

#### Quantificació de la degradació de l'àcid L-màlic mitjançant assaig enzimàtic

Útil per tenir una orientació del nombre de cèl·lules actives que podien haver-hi i per al seguiment de la pròpia FML, la qual es considerava acabada quan els nivells d'L-màlic eren inferiors a 30 mg/L. S'ha utilitzat el mètode enzimàtic de l'assaig comercial de Boehringer Mannheim, ara Roche, que es fonamenta en l'oxidació de l'àcid L-màlic per la malat-deshidrogenasa i en la formació estequiomètrica de NADH, del qual es mesura l'absorbància a 340 nm.

### **3.6. Seguiment de les dinàmiques de població**

#### **3.6.1. Aïllament de soques**

De les plaques per a viables de medi MRSFM amb suc de tomàquet, nistatina i azida sòdica, amb un nombre de colònies entre 30 i 300, crescudes i ja comptades, s'aïllaven 30 a l'atzar per a cada mostra i s'incubaven en 1 ml d'MRSFM líquid. Malgrat l'ús d'inhibidors del creixement de llevats i de bacteris acètics, els cultius d'aïllament eren analitzats per descartar possibles contaminants mitjançant la prova de la catalasa (Gerhardt, 1984) i la tinció Gram (Gerhardt, 1984), de forma que les colònies catalasa negatives i grampositives eren considerades com a bacteris làctics. Un cop crescudes, eren reinoculades en 5 ml del mateix medi (2 dies de creixement) per obtenir prou biomassa cel·lular per a l'extracció del DNA total.

#### **3.6.2. Extracció del DNA**

Mètode utilitzat per Reguant (2001), basat en Persing *et al.* (1993). En la taula 3.2 s'hi indiquen els reactius emprats.

**Taula 3.2.** Reactius emprats en l'extracció de DNA.

Reactiu	Component	Concentració
TE pH 8,0	Tris-HCl	10 mM
	Na <sub>2</sub> -EDTA	1 mM
Solució concentrada RNAasa	RNAasa	0,5 mg/ml
Solució concentrada lisozim	Lisozim	100 mg/ml
GES <sup>1</sup>	Tiocianat de guanidina	5 M
	EDTA	100 mM
	N-laurilsarcosina	0,5 % (p/v)
Solució EDTA pH 8,0	Na <sub>2</sub> -EDTA	0,5 M
Acetat amònic (mantenir a 4°C)	CH <sub>3</sub> COO <sup>-</sup> NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	7,5 M
Cloroform-2-pentanol 24:1		
Isopropanol fred (conservar a -20°C fins al moment d'utilitzar-lo)		
Etanol	Etanol absolut per a Biologia Molecular	70 % (v/v)

Totes les solucions, excepte els 3 darrers reactius, s'han d'autoclavar a 121°C, 15 min.

(1) Per preparar 100 ml: 60 g de tiocianat de guanidina i 20 ml d'EDTA 0,5 M (pH 8,0) amb 20 ml d'aigua destil·lada estèril; escalfar-ho amb agitació fins dissolució total. Deixar refredar a temperatura ambient i afegir 5 ml de Sarcosina al 10 %. Finalment, ajustar el volum a 100 ml.

- Procediment:

1. Es centrifuguen 5 ml de cultiu a 3500 rpm (5000 x g) durant 10 min.
2. Es descarta el sobrenedant, es renta el precipitat amb 5 ml d'aigua estèril i es repeteix la centrifugació.
3. Es pot continuar o aturar el procés guardant el precipitat cel·lular a -20°C.
4. Es ressuspèn en 100 µl de tampó TE amb concentracions finals de 25 µg/ml d'RNAasa i 25 mg/ml de lisozim.
5. S'incuba a 37°C durant 1 h amb agitació.
6. S'afegeixen 500 µl de reactiu GES i s'agita per inversió immediatament, sense vòrtex, fins que s'observa lisi cel·lular (la solució ha de quedar ben nítida, transparent).
7. S'incuba en gel 5 min, com a mínim.
8. S'addicionen 250 µl d'acetat d'amoni fred i s'agita fins que les dues fases es mesclin. S'incuba en gel 10 min, com a mínim.
9. S'addicionen 0,5 ml de cloroform-2-pentanol i s'agita vigorosament perquè es mesclin bé totes dues fases.
10. Es centrifuga, durant 10 min, a 13000 rpm i es transfereix la fase superior a un nou tub Eppendorf, amb molta cura de no arrossegar la interfase.
11. S'introdueixen 380 µl d'isopropanol fred, s'inverteix fins que el DNA precipiti i es centrifuga 5 min a 13000 rpm.
12. Es descarta el sobrenedant i s'afegeixen 400 µl d'etanol 70 %. Es centrifuga a 13000 rpm durant 5 min, i es repeteix aquest pas 2 cops més.

13. S'evapora l'etanol de les mostres amb un dessecador de buit i es dissol el precipitat en 40 µl de TE.

### 3.6.3. Quantificació del DNA

Mesura espectrofotomètrica a 260 nm amb l'aparell GeneQuant II (Amersham Pharmacia Biotech). La relació de conversió aplicada per a conèixer la concentració de DNA és: 1 unitat DO = 50 µg /ml DNA.

### 3.6.4. PCR específica d'espècie

Per identificar les soques pertanyents a *O. oeni* aïllades durant la campanya de vinificació de l'any 2000, s'ha emprat el protocol descrit per Zapparoli *et al.* (1998b), basat en l'amplificació d'un fragment del gen de l'enzim malolàctic específic d'*O. oeni*.

En la **taula 3.3** es mostren els reactius utilitzats:

**Taula 3.3.** Reactius per a la PCR específica.

Reactiu <sup>1</sup>	Volum	Concentració en 20 ml
H <sub>2</sub> O bidestil·lada estèril	10,9 µl	
Tampó 10X	2 µl	1X
Tampó dNTPs (2 mM)	2 µl	0,2 mM
Solució MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	0,8 µl	2 mM
Encebador On 1 (5 µM)	1,6 µl	0,4 µM
Encebador On 2 (5 µM)	1,6 µl	0,4 µM
Taq polimerasa (5 U/µl)	0,1 µl	0,5 U
Mostra DNA (10 ng)	1 µl	1 µg

(1) La mescla de reacció es pot preparar afegint els reactius en el mateix ordre de col·locació que es presenta en la taula (excepte la mostra de DNA), i amb un volum suficient per al nombre de mostres a tractar. Tots els reactius es conserven a -20°C.

- Seqüència dels encebadors:

On 1 (5'-TAATGTGGTTCTTGAGGAGAAAAT-3')

On 2 (5'-ATCATCGTCAAACAAGAGGCCTT-3')

- Programa d'amplificació:

(termociclador Gene Amp PCR System, Perkin Elmer, 24 pous de capacitat):

94°C, 2 min / 30 cicles: 94°C, 45 s; 64°C, 2 min; 72°C, 2 min / 72°C, 10 min.

### 3.6.5. Amplificació a l'atzar del DNA total amb 2 encebadors (RAPD-PCR múltiple)

Per a la tipificació de soques aïllades tant en les microvinificacions com en la vinificació de celler, s'ha emprat el mètode descrit per Reguant (2001). En la taula 3.4 s'indiquen els reactius que conformen la mescla de reacció.

**Taula 3.4.** Mescla de reacció per a la RAPD-PCR múltiple.

Reactiu	Volum	Concentració en 20 ml
H <sub>2</sub> O bidestil·lada estèril	11,4 µl	
Tampó 10X	2,0 µl	1X
Tampó dNTPs (2,5 mM)	2,0 µl	0,2 mM
Solució MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	1,4 µl	3,5 mM
Encebador Coc 1 (10 µM)	1,0 µl	0,5 µM
Encebador On 2 (5 µM)	1,0 µl	0,25 µM
Taq polimerasa (5 U/µl)	0,2 µl	0,5 U
Mostra DNA (10 ng)	1 µl	0,5 µg

- Seqüència dels encebadors:

Coc (5'-AGCAGCGTGG-3')

On 2 (5'-ATCATCGTCAAACAAGAGGCCTT-3')

- Programa d'amplificació:

(termociclador Gene Amp PCR System, Perkin Elmer, 24 pous de capacitat):

94°C, 5 min / 30 cicles: 94°C, 1 min; 40°C, 1 min; 72°C, 2 min / 72°C, 10 min.

### 3.6.6. Gels d'agarosa i anàlisi dels perfils resultants

- Reactius:

Reactiu	Component	Concentració
TBE 10X <sup>1</sup>	Tris-base	890 mM
	Àcid bòric	890 mM
	EDTA	20 mM
Tampó de càrrega	Ficoll 400	20 %
	Na <sub>2</sub> EDTA	0,1 M pH 8
	Dodecilsulfat sòdic	1,0 %
	Blau de bromofenol	0,25 %

- Marcadors de pes molecular:
  - **Marker II**: 564, 2027, 2322, 4361, 6557, 9416 i 23130 pb (parells de bases).
  - **Marker VI**: 154, 234/220, 298, 394, 453, 517, 653, 1033, 1230, 1766 i 2176 pb.

Per visualitzar els productes de l'amplificació amb PCR específica, s'han separat per mitjà d'electroforesi en gel d'agarosa 1 % (p/v) en TBE 1X, on se n'han carregat 10 µl (5 µl de mostra + 5 µl de tampó de càrrega) i 2 µl de *Marker VI* com a marcador de pes molecular. Els gels s'han fet córrer en TBE 1X durant 30 min a 100 V i han estat tenyits en banys de bromur d'etidi i fotografiats.

Mentre, en el cas de les RAPD-PCR múltiples, les electroforesis s'han realitzat en gels d'agarosa 1,4 % en tampó TBE 1X, durant 2 h45 min a 100 V. S'han combinat els marcadors *Marker II* i *Marker VI* en proporció 1:2.

- Anàlisi de les imatges dels gels:

Els perfils resultants de RAPD-PCR múltiple han estat comparats per anàlisi visual i les imatges de les fotografies escanejades i tractades amb el programa *Quantity One 4.1*<sup>®</sup> (Bio-Rad) per assignar la mida als fragments de DNA i establir uns patrons de bandes propis de cada soca.

### **3.7. Metodologia emprada en l'estudi de paràmetres metabòlics (ATPasa i proteïnes d'estrès)**

#### **3.7.1. Obtenció de cèl·lules no proliferants**

Les cèl·lules es feien créixer en medi ric MRSFM fins al final de la fase exponencial (al voltant de  $5\text{-}6\cdot 10^9$  UFC/ml) en flascons de 250 ml amb 200 ml de contingut per a obtenir un nombre elevat de cèl·lules ( $5\text{-}6\cdot 10^{11}$ ).

Tot seguit es recollien per centrifugació ( $10000 \times g$ , 10 min) i es rentaven dues vegades amb s.s.

Es tornaven a resuspendre en un volum del tampó d'incubació (tampó citrat-fosfat, pH 5,0) necessari per a obtenir una suspensió d'entre  $5\cdot 10^9\text{-}1\cdot 10^{10}$  microorganismes per

ml, que es determinava per comptatge amb la cambra de Neubauer. Per a sistematitzar-ho, aquest volum era de 100 ml.

Les cèl·lules ressuspeses s'havien de mantenir en agitació. Per aquest motiu s'utilitzaven matrassos de 250 ml tapats hermèticament amb *Parafilm*<sup>TM</sup> i s'incubaven durant 1 h en agitadors orbitals, després d'haver afegit els volums o quantitats dels diferents components en estudi. Un cop passat aquest temps, es centrifugaven les mostres, es rentaven amb s.s., se separaven en dues parts alíquotes d'igual volum i es guardaven els precipitats cel·lulars congelats a -20°C. Les cèl·lules tractades amb coure, es rentaven amb una solució d'EDTA 20 mM per eliminar part del metall associat a les envoltures cel·lulars (Cooksey i Azad, 92; Fitch *et al.*, 1993; Vidal, 1997).

Cal especificar que, per a la detecció de proteïnes sobreexpressades o d'estrès, les cèl·lules es tornaven a incubar en MRSFM enlloc d'amb tampó citrat-fosfat per assegurar l'existència d'una font de nitrogen en el medi (en aquest cas, no es tractaria, doncs, de cèl·lules no proliferants en el sentit estricte).

### 3.7.2. Determinació de proteïnes

S'han utilitzat dos mètodes diferents per a determinar la concentració de proteïnes en les mostres de membrana i de la resta de fraccions subcel·lulars.

- Mètode de Bradford (1976), microassaig.

Es basa en el canvi de màxim d'absorbància, de 465 a 595 nm, d'una solució àcida del colorant Coomassie Brilliant Blue G-250 quan aquest s'uneix a proteïna. El principal avantatge d'aquest mètode és la rapidesa.

Consisteix en preparar una recta patró de 0 a 25 µg/ml de proteïna (BSA, albúmina de sèrum boví) i en diluir les mostres de forma que les lectures d'absorbància recaiguin dins la recta.

Procediment: fetes les dilucions prèvies de la mostra i dels patrons, se n'afegeixen 200 µl a 800 µl del reactiu BioRad (solució àcida del colorant) concentrat. Després d'agitar enèrgicament i passats 15 minuts, es llegeix l'absorbància a 595 nm i s'interpola a la recta patró resultant.



- Mètode de Markwell *et al.* (1978)

Un dels inconvenients del mètode de Bradford és que només permet la determinació de proteïnes solubles, i especialment per a l'anàlisi dels perfils proteics de les fraccions de membrana interessava conèixer la concentració de proteïnes totals presents a la mostra, tant les solubles com les de membrana (associades i intrínseques).

El mètode de Markwell és una modificació del mètode de Lowry per simplificar la determinació en mostres de membrana i lipoproteïnes. L'addició d'SDS (dodecilsulfat sòdic) al reactiu bàsic del Lowry permet realitzar l'assaig directament sobre les mostres sense necessitat de cap tractament previ (solubilització, etc.).

El fonament de l'assaig es resumeix en dos passos importants. Primer, la mostra de proteïna es mescla amb ions coure en medi bàsic. Després, el reactiu Folin-Ciocalteu és reduït per l'enllaç proteïna-coure. La formació de color depèn, principalment, d'aquest últim pas.

- Reactius de l'assaig:

Solucions	Components	Concentracions
A	$\left\{ \begin{array}{l} \text{Na}_2\text{CO}_3 \\ \text{NaOH} \\ \text{tartrat sòdic} \\ \text{SDS} \end{array} \right.$	2,0 % 0,4 % 0,16 % 1,0 %
B	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	4 %
C *	$\left\{ \begin{array}{l} \text{A} \\ \text{B} \end{array} \right.$	100 volums 1 volum
D *	Folin-Ciocalteu 2 N, 1:1 (v/v), amb aigua bidestil·lada	
E	BSA	0,1 mg/ml

\* Preparar en fresc, tot just abans d'utilitzar-ho.

Procediment, modificat per a mostres de poc volum (microassaig) a partir del proposat per Markwell *et al.* (1979):

- Es prepara una corba patró amb 20, 40, 60, 80 i 100 µg de BSA.
- S'afegeixen 900 µl de reactiu C a 300 µl de mostra (amb les corresponents dilucions, de forma que el contingut en proteïna es trobi entre 10-100 µg) i s'incuba a temperatura ambient durant un mínim de 10 min.
- S'afegeixen, a continuació, 90 µl de reactiu D a cada tub i s'agita enèrgicament. Es deixa incubar durant 45 min a temperatura ambient, i es llegeix l'absorbància a 660 nm amb un blanc del reactiu.

### 3.7.3. Aïllament de les membranes plasmàtiques

- Reactius:

#### Tampó I (digestió de la paret cel·lular)

Tris-HCl	50 mM	
Glucosa	50 mM	
PMSF <sup>1</sup>	1 mM	pH = 7
Pepstatina <sup>2</sup>	3 µM	
Lisozim <sup>3</sup>	80 mg	

#### Tampó II (lisi dels protoplasts i homogeneïtzació cel·lular)

Tris-HCl	20 mM	
MgSO <sub>4</sub>	10 mM	
PMSF <sup>1</sup>	1 mM	pH = 7
Pepstatina <sup>2</sup>	3 µM	
NaCl	0,5 M	

#### Tampó III (ressuspensió de la fracció de membrana)

Tris-HCl	20 mM	
MgCl <sub>2</sub>	10 mM	
PMSF <sup>1</sup>	1 mM	pH = 7
Pepstatina <sup>2</sup>	3 µM	
Na <sub>2</sub> EDTA	10 mM	

- (1) PMSF: inhibidor de proteases, concretament de serinproteases i cisteïnproteases. Es presenta sòlid (cristalls) en pols, i és altament tòxic per inhalació i pels vapors que forma en contacte amb aigua, per la qual cosa cal tenir molta cura en manipular-lo: mascareta i guants. Preparació: ressuspenem 35 mg en 1 ml d'isopropanol (es manté estable a temperatura ambient durant mesos) i s'addiciona en fresc (és a dir, just en el moment d'utilitzar el tampó).
- (2) Pepstatina A: inhibeix carboxil (aspàrtic)-proteases, no inhibeix tiolproteases o serinproteases. Es presenta en pols, estable com a mínim 3 anys a 2-8°C i es prepara amb la ressuspenió de 5 mg en 7,3 ml de metanol, guardat a -20°C en alíquotes, de les quals se n'afegeix el volum corresponent a la solució en fresc.  
L'altre inhibidor de proteases és l'EDTA: afegit al tampó III (solució de rentat i de ressuspenió de la fracció de membrana) és un inhibidor de metal·loproteases, algunes d'elles fosfolipases.
- (3) Lisozim: es presenta en pols i es guarda a 2-8°C. Es pesa la quantitat corresponent i s'afegeix al tampó I en fresc, tot just abans de ser utilitzat.

Tots tres tampons s'autoclaven sense els components que s'afegeixen en fresc, a 121°C, durant 15 min, i es guarden a 4°C.

RNAases i DNAases: 10 mg/ml en aigua bidestil·lada; parts alíquotes congelades a -20°C.

- Protocol (adaptat de Rimpiläinen *et al.*, 1986 i de Garbay i Lonvaud-Funel, 1994):

#### A. Obtenció dels protoplasts i homogeneïtzació cel·lular

1. Es ressuspenen les cèl·lules congelades a -20°C en 20 ml de tampó I.
2. S'incuba la suspensió a 37°C, durant 45 min, amb agitació suau.
3. Es centrifuga a 17000 x g, 15 min, 4°C, i es ressuspen en 15 ml de tampó II.
4. S'incuba la suspensió a 0°C durant 2 h.
5. Degradació dels àcids nucleics amb 10 µg/ml, tant d'RNAasa com de DNAasa, a 37°C durant 15 minuts. S'afegeixen 15 µl de les solucions concentrades.
6. Es centrifuga a 17000 x g, durant 10 min, 4°C, per extreure les envoltges cel·lulars i les cèl·lules no trencades.
7. En aquest punt, en el sobrenedant s'hi troba l'extracte cel·lular total i del qual se n'extreuen alíquotes sempre que calgui.

#### B. Aïllament de la membrana plasmàtica

1. Es torna a centrifugar el sobrenedant per separar les membranes: 32000 x g, 30 min, 4°C.
2. Es renta el precipitat de les membranes dues vegades amb 5 ml de tampó III. Caldrà tornar a centrifugar a la mateixa velocitat durant 30 min.
3. Es conserven les mostres en 0,5-1 ml del mateix tampó, i es guarden a 4°C tota la nit aquelles que serviran per a determinar l'activitat ATPasa específica i a -20°C les mostres per fer electroforesi de proteïnes.

### 3.7.4. Mesura de l'activitat ATPasa

Es basa en la determinació de la quantitat de fosfat inorgànic (P<sub>i</sub>) alliberat després d'incubar les mostres en presència de Mg<sup>2+</sup> i ATP. El mètode consta de dues parts:

1. Incubació (Garbay i Lonvaud-Funel, 1994)

Tampó d'assaig		
tampó acetat <sup>1</sup>	0,1 M	
MgCl <sub>2</sub>	10 mM	pH 5,6
Na <sub>2</sub> ATP	10 mM	

(1) Preparació: 90,4 % d'acetat sòdic 0,1M + 9,6 % acètic 0,1M

- Es prepara una solució de tampó fosfat 2 mg/ml de pH 7,4 i es fan dilucions per obtenir patrons des de 0 fins a 25  $\mu\text{g}$  de  $\text{P}_i$ .
- Es determina la concentració proteica de les mostres per si cal diluir-les. S'empra el mètode Bradford. És aconsellable que es trobi entre 1 i 25  $\mu\text{g}$ , si bé s'intenta treballar amb un interval d'entre 10 i 20  $\mu\text{g}$  de proteïna.
- S'incuben 50  $\mu\text{l}$  de suspensió de membrana (1-25  $\mu\text{g}$  de proteïna) en 0,250 ml del medi d'assaig, a 37°C durant 30 min. El blanc o control es prepara seguint els mateixos passos però sense mostra. Es fa també un blanc de mostra sense afegir  $\text{MgCl}_2$ , i un altre sense afegir ATP. Les mostres es determinen per triplicat.

## 2. Quantificació de fosfats (Ohnishi *et al.*, 1975)

Solució	Component	Concentració
A	Molibdat amònic	4 % p/v
	EDTA	16 mM
B	PVP 40 ( <i>polivinilpirrolidona</i> )	4 %
	Clorur d'hidroxilamina	172 mM
	$\text{H}_2\text{SO}_4$	87,5 mM
C	NaOH	6,47 mM
	$\text{Na}_2\text{CO}_3$	50 mM

- S'atura la reacció afegint 1 ml de la solució de parada formada per A:B:aigua bidestil·lada en la proporció 2:3:1.
- S'afegeixen 100  $\mu\text{l}$  del revelador de color C, 2 min després de l'aturada de la reacció.
- Es deixa 10 min i es llegeix l'absorbància a 720 nm. El color es manté 2 hores.

L'activitat ATPasa es determina interpolant els valors d'absorbància obtinguts a la recta patró de fosfats. S'expressa com a  $\mu\text{mols de P}_i \text{ alliberats} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$  de proteïna, en forma de mitjana dels triplicats i amb la desviació estàndard (*SD*).

### 3.7.5. Perfils proteics en SDS-PAGE

El procediment per obtenir els perfils es resumeix en els següents passos:

- Solubilització de les proteïnes
  - Un cop determinada la concentració de proteïnes de les mostres, es prenen alíquotes (50 – 300 µl), s'hi afegixen 4 o 5 volums d'acetona i es mantenen en gel durant 30 minuts per precipitar les proteïnes. A continuació, es centrifuga a 14000 rpm, 10 min.
  - El precipitat se solubilitza amb 50 µl de solució solubilitzadora.
  - La composició de la solució solubilitzadora és la següent: 10 mM Tris/HCl, 1mM EDTA, 2,5% SDS, β-mercaptoetanol al 5,0 % i 0,01 % de blau de bromofenol.

- Desnaturalització de les proteïnes

Immediatament després, es bull la mostra de proteïnes resuspesa durant 5 minuts en un bany a 100°C . Es deixa a temperatura ambient i es centrifuga a 10000 rpm durant 5 minuts per eliminar qualsevol impuresa soluble.

- Electroforesi en condicions desnaturalitzants (Laemmli, 1970)

En una primera fase, es va utilitzar l'aparell PhastSystem<sup>TM</sup> de Pharmacia, que inclou una unitat de separació, una unitat de tinció o revelat, els gels (PhastGel<sup>®</sup>), el tampó (PhastGel<sup>®</sup> Buffer Strips) i la major part dels reactius necessaris per a la tinció.

Per a la separació es va utilitzar el PhastGel<sup>®</sup> Homogeneous 20 (rang de separació 2-150 kD, 95 Vh) aplicant el mètode de separació proposat per a aquests gels en la fitxa tècnica de l'aparell.

Els gels consten d'una zona de concentració (*stacking*) (7,5 % T, 3 % C) de 13 mm i una altra de separació (20 % T, 2% C), de 32 mm.

El tampó del gel conté acetat 0,112 M (ió principal) i Tris 0,112 M, pH 6,5.

Les tires de tampó tenen tricina 0,2 M (ió *trailing* o d'arrossegament), Tris 0,2M, SDS 0,55 % a pH 8,1.

Per a la tinció de plata (Heukeshoven i Dernick, 1986) també s'ha aplicat el mètode proposat a la fitxa tècnica de l'aparell, amb els reactius proporcionats amb el PhastGel<sup>®</sup> Silver Staining Kit i els que s'han de preparar al moment.

Per a l'estimació de pesos moleculars de les diferents bandes, s'ha utilitzat com a patró la barreja de proteïnes del *Low Molecular Weight (LMW) Calibration Kit* de Pharmacia:

Proteïna	kDa
Fosforilasa B	94
Albúmina	67
Ovoalbúmina	43
Anhidrasa carbònica	33
Inhibidor de la tripsina	20,1
α-Lactoalbúmina	14

També s'han realitzat electroforesi tant amb el Mini-Protean® II Cell System com amb el Protean® (Bio-Rad Laboratories), aquest últim per intentar incrementar la capacitat de resolució de les bandes.

- Procediment de preparació dels gels de poliacrilamida:

1. Es netegen els vidres i els separadors amb alcohol abans d'utilitzar-los.
2. Es fixen les plaques de vidre en l'estoig de forma que la base es recolzi sobre la superfície de treball.
3. Es marca amb un retolador l'alçada a la qual ha d'arribar el gel separador: aproximadament, un centímetre per sota dels pous.
4. Es prepara el gel de separació al 12 % T i 3,3 % C, 0,375 M Tris-HCl pH 8,8 i 0,1 % SDS, segons indica la taula 3.5.

**Taula 3.5.** Composició dels gels separadors de poliacrilamida per a electroforesi SDS-PAGE.

Preparació del gel separador		Mini-Protean	Protean
Composició	Concentració	volum	volum
Aigua bidestil·lada		1,170 ml	5,85 ml
Tris-HCl pH 8,8	1 M	2,25 ml	11,25 ml
SDS	10 %	60 µl	300 µl
Acril./bisacrilamida	30 %, 29 : 1	2,4 ml	12 ml
Persulfat d'amoni	10 % (fresc)	60 µl	300 µl
TEMED		2,4 µl	12 µl

5. S'afegeix el gel suaument, amb micropipeta, fins que arribi al nivell marcat.
6. Es diposita un petit volum d'isobutanol o de solució d'SDS 0,1 % perquè cobreixi lleugerament el gel i aquest quedi perfectament anivellat posteriorment. Deixem que el gel polimeritzi a temperatura ambient (30-60 min).
7. Un cop polimeritzat, s'enretira la capa d'isobutanol o SDS diluït mitjançant una xeringa i es renta el gel amb una mica d'aigua bidestil·lada. Es prepara l'apilador (*stacking gel*) al 3 % T i 3,3 % C, 0,125 mM Tris-HCl pH 6,8 i 0,1 % SDS, immediatament abans de ser utilitzat, ja que polimeritza ràpidament (taula 3.6).

**Taula 3.6.** Composició dels gels apiladors per a electroforesi SDS-PAGE.

Preparació del gel apilador		Mini-Protean	Protean
Composició	Concentració	volum	volum
Aigua bidestil·lada		3,775 ml	7,55 ml
Tris-HCl pH 6,8	1 M	0,625 ml	1,25 ml
SDS	10 %	50 µl	100 µl
Acril./bisacrilamida	30 %, 29 : 1	0,5 ml	1 ml
Persulfat d'amoni	10 % (fresc)	50 µl	100 µl
TEMED		5 µl	10 µl

8. S'omple, gairebé fins a dalt de tot, la part per sobre de l'altre gel amb el gel apilador, i s'hi col·loca la pinta que serveix de motlle per als pouets, amb cura que no es formin bombolles.
  9. Es deixa reposar uns 30-45 min a temperatura ambient.
  10. Es treu la pinta amb molta cura i es renten els pous amb el tampó d'electroforesi 1X per extreure restes de gel no polimeritzat.
  11. Es col·loca tot el conjunt en la cubeta d'electroforesi: independentment de si es realitzen un o dos gels, s'ha de fer el muntatge de forma que es tingui un compartiment estanc en la part interior de l'estoig. Cal comprovar-ho afegint-hi el tampó de migració sense que hi hagi cap fuga.
  12. S'omplen, també, els pouets amb el tampó de migració i s'hi carreguen tot seguit les mostres ja tractades amb el tampó de solubilització (en funció de la quantitat de mostra, n'afegirem entre 5 i 30 µl) així com un volum similar de marcador LMW (habitualment, 5-10 µl de la ressuspensió d'un vial en 100 µl de solució solubilitzadora).
  13. S'acaba d'omplir la cubeta amb el tampó d'electroforesi.
  14. Es connecta a la font de voltatge: migració a 100 V al llarg del gel apilador i 200 V per a l'altre gel.
  15. Es deixa que migri fins que el blau de bromofenol arribi al límit del gel de separació i comenci a difondre's en el tampó.
  16. Se separa amb cura el gel dels vidres i es tenyeix. Es pot conservar en aigua destil·lada a 4°C si no es tenyeix d'immediat.
- Tinció del gel amb nitrat de plata (Bloom *et al.*, 1987):
    1. Fixació: s'incuba el gel en 100 ml de solució amb 50 % de metanol, 12 % d'àcid acètic i 0,5 ml de formaldehid del 37 %, durant 30-60 min. Si es vol parar la tinció, es pot fer en aquest pas i guardar-ho a 4°C, sinó, cal continuar.
    2. Deshidratació: s'incuba durant 10 min, 3 vegades, en 100 ml d'etanol 50 %.
    3. Preincubació: s'incuba durant 1 min en 100 ml de solució amb Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>·5H<sub>2</sub>O del 0,22 % (p/v) (equival a la capacitat d'una microespàtula), preparada en fresc.

4. Rentat: s'incuba en 100 ml d'aigua bidestil·lada durant 20 segons, 3 vegades.
5. Tinció: s'incuba durant 20 min en 100 ml de solució, que conté 12 ml de  $\text{AgNO}_3$  (solució mare 0,1 M, guardada a la nevera), 88 ml d'aigua i 70  $\mu\text{l}$  de formaldehid.
6. Rentat: es torna a incubar en 100 ml d'aigua bidestil·lada durant 20 segons, 3 vegades.
7. Revelatge: es prepara en fresc, és a dir, al moment, 100 ml d'una solució reductora amb  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 3 % (p/v), 50  $\mu\text{l}$  de formaldehid i un cristall de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ . Es manté amb lleugera agitació fins que apareguin les bandes.
8. S'atura el revelatge incubant el gel 30 min en 100 ml d'una solució formada per metanol 50 %, àcid acètic 12 % i 0,5 ml de formaldehid del 37 %.
9. Podem guardar el gel a 4°C en 100 ml d'una solució al 30 % de metanol i 3 % de glicerol.

### 3.7.6. Seqüenciació de la proteïna aïllada

- Transferència a membrana

És el pas previ a la seqüenciació de la proteïna que cal identificar. El mètode descrit es basa en el que va proposar Matsudaira (1987). Cal que la quantitat de la proteïna en qüestió es trobi entre 1 i 5  $\mu\text{g}$ , i com que en el nostre cas tenim una mostra complexa de proteïnes, per tal de conèixer quina quantitat s'ha de carregar en el gel, s'estableix un càlcul aproximatiu considerant que en cada banda hi hauria d'haver com a mínim 5  $\mu\text{g}$ .

a) Tractament de la membrana:

- Es talla un fragment de membrana de PVDF del tipus *Immobilon P*<sup>®</sup> (Millipore) d'igual mida que el gel i es mulla durant uns minuts amb metanol 100 %.
- Tot seguit, s'equilibra en tampó de transferència Tris-glicina (25 mM Tris, 192 mM glicina, 20 % metanol) durant 5 min, el mateix temps que hi deixarem el gel d'electroforesi, sense tenyir ni assecar, en condicions nadiues.
- Es posa el gel en contacte amb la membrana d'electroforesi, sense que es formin bombolles, entre 2 làmines de paper 3MM.

b) Electrotransferència:

- Intensitat constant: 25 mA, i temps: 30 min (aparell PowerPac 300 de Bio-Rad Laboratories).
- Un cop acabada, rentem la membrana 2 o 3 vegades amb aigua bidestil·lada a temperatura ambient per reduir possibles contaminants.



c) Tinció de la membrana:

- Es visualitzen les proteïnes transferides amb Coomassie Blue R-250 (0,1 % en 50 % metanol), durant 5 min.
- Es destenyeix amb 2-3 banys de 5 min cadascun, en una solució de 50 % metanol i 10 % d'acètic.
- Es neteja la membrana amb 2-3 rentades en aigua destil·lada.
- S'eixuga a l'aire i es guarda a -20°C.

• Seqüenciació N-terminal i identificació de la proteïna:

Ha estat realitzada pel Servei de Seqüenciació de Proteïnes de l'Institut de Biologia Fonamental de la U.A.B., mitjançant el mètode de degradació automàtica d'Edman en un seqüenciador Beckman LF3000 equipat amb un analitzador de PTH-aminoàcids (System Gold, Beckman).

La seqüència N-terminal obtinguda ha estat comparada amb seqüències ja descrites i incloses en les bases de dades mitjançant l'eina informàtica de l'EMBL, BLAST2.

**3.7.7. Assaig de l'activitat GAPDH**

## • Reactius:

Reactiu	Component	Concentració (mM)
Tampó d'assaig pH 8,6 <sup>1</sup>	trietanolamina	40
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	50
	EDTA	5
Substrat <sup>2</sup>	DL-GAP	20
Coenzim <sup>3</sup>	NAD <sup>+</sup>	20

(1) El tampó s'ha de preparar en fresc, tot i que es pot conservar a 4°C per uns dies.

(2) i (3) Aquests reactius es poden preparar en solucions concentrades conservades a -20°C en el congelador, i s'addicionen al tampó de reacció en els volums corresponents just abans de fer l'assaig.

## • Espectrofotòmetre: Hitachi U-2000

## • Condicions de reacció:

- S'estabilitza el tampó d'assaig a 30°C en un bany d'aigua.
- Les mostres on hem de determinar l'activitat enzimàtica s'han de mantenir en gel, a 4°C, fins al moment de l'assaig. Les dilucions de mostra es poden fer amb el mateix tampó, sense els components (2) i (3).

- En la mateixa microcubeta d'espectrofotòmetre es pot fer la mescla de reacció, afegint els microvolums ( $\mu\text{l}$ ), excepte la mostra, immediatament abans de fer la lectura d'absorbància, com s'indica en la taula 3.7.

**Taula 3.7.** Mescla de reacció en l'assaig d'activitat GAPDH.

	Blanc	Mostra
Tampó	800	750
DL-GAP	100	100
NAD <sup>+</sup>	100	100
Mostra	----	50
Volum final	1 ml	1 ml

- Es col·loca la cubeta en l'espectrofotòmetre i es llegeix l'absorbància inicial (temps zero), sense mostra, i tot seguit, s'hi addicionen els 50  $\mu\text{l}$ .
- Es monitoritza l'increment d'absorbància corresponent a la formació de NADH a 340 nm, durant 4 minuts i a intervals de 30 segons.
- Els diferents pendents obtinguts ens permetran calcular uns valors d'activitat enzimàtica expressats com a  $\mu\text{mols NADH}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}\text{ prot.}$

### 3.7.8. Immunodetecció amb anticòs de GAPDH

- **Taula 3.8.** Reactius per a la immunodetecció de la proteïna GAPDH.

Reactiu	Composició	Característiques
Tampó de transferència	25 mM Tris pH 8,3	Preparar en fresc. Conservar una setmana a 4°C, com a molt.
	192 mM glicina	
	20 % (v/v) metanol	
Tampó de bloqueig TBST	0,1 % Tween 20 en TBS	A partir del tampó concentrat TBS 10X
BSA	1 %	
Ac 1i	Contra GAPDH	Origen: ovella. Policlonal <sup>1</sup>
Ac 2i	Anti-Ovella/cabra IgG	Monoclonal. Conjugat a peroxidasa <sup>2</sup>
Reactiu revelador	Pastilla SIGMA FAST <sup>TM</sup> DAB	Substrat DAB (3,3'-Diaminobenzidine tetrahydrochloride) degradat per peroxidasa. Diluïm una pastilla en 15 ml.

(1) Anticòs policlonal contra GAPDH. Biogenesis Ltd. (codi: ab3792-1000).

(2) *Monoclonal anti-goat/sheep IgG peroxidase conjugate clone GT-34*. Dilució 1:10.000 en immunoblotting. Sigma (ref.: A9452).

- Procediment:

a) Electroforesi en el sistema Mini-Protean<sup>®</sup> II Cell System (Bio-Rad Laboratories):

Seguim els passos ja descrits en el subapartat 3.7.5. Com a novetat, en un dels dos pouets dels extrems, hi carreguem un marcador de pesos moleculars pretenyit (*Kaleidoscope Prestained Standards*, Bio-Rad) on cadascuna de les bandes té un color diferent i que ens permetrà valorar la qualitat de la transferència posterior i alhora situar l'alçada dels diferents pesos moleculars sobre la membrana ja transferida.

b) Electrotransferència amb sistema de transferència en tanc (Ausubel *et al.*, 1997):

Descrit per usar-lo en Mini Trans-Blot<sup>®</sup> Electrophoretic Transfer Cell System (Bio-Rad Laboratories).

Treballem amb guants per evitar contaminació amb proteïnes.

1. Un cop acabada l'electroforesi, se separa el gel apilador i es fa un petit tall en el cantó inferior esquerre. El gel s'equilibra en tampó de transferència, a temperatura ambient, durant 30 min.
2. Es tallen 2 peces de paper de filtre Whatman 3MM, de la mida del gel.
3. Es talla una làmina de membrana de nitrocel·lulosa de 0,45 µm (Schleicher & Schuell) que superi en 1-2 mm cada costat del gel. Es talla també el cantó inferior esquerre.
4. S'impregna la membrana en aigua. Tot seguit, s'equilibra en tampó de transferència durant 10-15 min.
5. Es col·loca la banda del càtode (-) de l'estoig, de color negre, sobre una safata plena de tampó de transferència.
6. A sobre, s'hi posa una peça d'*Scotch-Brite*<sup>™</sup> o similar.
7. Se situa una làmina de paper de filtre, impregnada de tampó de transferència, sobre el gel. S'elimina qualsevol bombolla d'aire amb una vareta de vidre.
8. Es capgira el conjunt de gel i paper i es col·loca sobre l'*Scotch-Brite*<sup>™</sup>.
9. S'humiteja la superfície del gel i es cobreix amb la membrana de forma que coincideixin els cantons retallats. Un cop l'hem dipositada sobre el gel, és millor no separar-la, ja que algunes proteïnes poden començar a transferir-se únicament per capil·laritat. Abans de continuar, és bo treure les bombolles.
10. Es cobreix la membrana amb una altra làmina de paper de filtre.
11. Es col·loca una altra peça d'*Scotch-Brite*<sup>™</sup> a sobre i es tanca l'estoig.
12. S'omple el tanc de transferència amb el tampó i s'hi disposa l'estoig amb la membrana de cara a l'ànode del tanc (+), de color vermell. S'hi acoblen uns petits recipients adaptats amb aigua congelada, per assegurar que la temperatura no sobrepassi els 20°C durant la transferència.
13. Es connecta a la font de potencial i es transfereix entre 30 min-1 h a 100 V.

14. Acabada la transferència, s'asseca la membrana a l'aire i es conserva a 4°C ben protegida, fins al moment de la immunodetecció.

c) Immunodetecció:

1. Bloqueig: s'incuba 30 min-1 h en tampó de bloqueig, amb agitació suau i a temperatura ambient. Una altra opció és deixar la membrana en el tampó de bloqueig tota la nit, per assegurar que no hi haurà marcatge inespecífic.
2. Incubació amb Ac 1i: 1 h a temperatura ambient, en el mateix tampó de bloqueig amb BSA 1%, on s'hi dilueix l'anticòs. El rang de dilucions, entre 1:100 i 1:1000, s'ajusta empíricament.
3. Es renta la membrana 10-15 min, 4 vegades, amb tampó de bloqueig.
4. Incubació amb Ac 2i: 30-60 min en agitació i a temperatura ambient, en tampó de bloqueig amb BSA 1% i amb l'anticòs en dilució 1:10000.
5. Rentat: com en el pas 3.
6. Revelatge: es dilueix una pastilla de SIGMA FAST™ DAB en 15 ml i s'incuba fins que apareguin les bandes marcades. S'atura la reacció amb rentats successius en aigua destil·lada.
7. S'eixuga la membrana a l'aire.

### 3.7.9. RT-PCR quantitativa

#### 3.7.9.1. Transcripció reversa (RT)

- Fonaments de la tècnica:

En concret, s'ha utilitzat la PCR semiquantitativa (o relativa) no competitiva, ja que es refereix el nivell d'expressió d'un gen determinat respecte a un altre gen que es pren com a referència, anomenat “constitutiú” o “endogen”, cadascun d'ells estudiats en tubs de reacció diferents.

Breument, la tècnica consisteix en la transcripció d'un fragment de seqüència d'RNA a DNA (cDNA) per mitjà d'una retrotranscriptasa. D'aquesta seqüència “llarga” de cDNA se n'amplifica una regió específica delimitada per les seqüències diana d'uns encebadors, de forma exponencial mitjançant PCR. A mesura que se sintetitza DNA, se'l quantifica simultàniament gràcies a l'increment de senyal fluorescent emès per les molècules de SYBR® Green I (Molecular Probes, Eugene, USA) que s'intercalen específicament al DNA de doble cadena (Morrison *et al.*, 1998).

- Encebadors:  
Dissenyats segons els criteris especificats en el subapartat **4.2.4** de **Resultats i discussió**.
- Reactius: veure taula **3.9**.

**Taula 3.9.** Composició de la mescla de reacció per a l'RT.

Component	Volum reacció (ml)	Concentració final
H <sub>2</sub> O bidestil·lada estèril <i>RF</i>	7,7 – µl RNA	
TaqMan RT Buffer 10X	2	1X
MgCl <sub>2</sub> 25 mM	4,4	5,5 mM
Mescla dNTPs	4,0	500 µM/dNTP
Hexàmers inespecífics	1,0	2,5 UM
Inhibidor d'RNAasa	0,4	0,4 U/µl
Transcriptasa <i>MultiScribe</i> <sup>TM</sup> <i>Reverse</i> (50 U/µl)	0,5	1,25 U/µl
Total (menys mostra)	12,3	

- Procediment:
  1. Es prepara el volum total (calculat a partir del nombre de mostres) de mescla de reactius d'RT combinant tots els components no enzimàtics.
  2. Es vorteja breument.
  3. S'afegeixen els enzims: Transcriptasa i inhibidor d'RNAasa.
  4. Es mescla per inversió del tub.
  5. Es reparteix idèntic volum de mescla de reacció en cadascun dels tubs d'RT.
  6. S'afegeix el volum de mostra en el tub corresponent.
  7. Pols de centrífuga dels tubs.
  8. Es transfereixen els tubs al termociclador i es fa l'RT.
- Condicions de termociclació:
  1. Incubació 25°C, 10 min
  2. Transcripció reversa: 48°C, 30 min
  3. Inactivació de la transcriptasa inversa: 95°C, 5 min.

Les mostres de cDNA resultats es poden conservar entre -15°C i -25°C.

### 3.7.9.2. PCR quantitativa del cDNA

- Aparell: Gene Amp 5700 Sequence Detection System<sup>®</sup>, Applied Biosystems.

- Reactius i mostra:

Component	Característiques
SyberGreen 2X	1:1 SyberGreen i aigua bidestil·lada <i>RF</i>
Encebador <i>F</i>	Concentració final en cada tub de mostra de 0,3 $\mu$ M (veure procediment)
Encebador <i>R</i>	
Mostra cDNA	Es completa amb volums i concentracions adequats

- PCR del cDNA:

0. Passos previs:

- Cal verificar la concentració dels encebadors un cop ressuspesos.
- Cal que la quantitat de cDNA inicial sigui la mateixa tant per a les amplificacions del cDNA problema com per a les de referència.
- Volum final de mescla de reacció en cada tub de PCR = 25  $\mu$ l.

1. Es prepara la mescla de 1xSyberGreen, suficient per analitzar els 2 gens per triplicat (x3) més les reaccions sense cDNA (NTC = *No Template Control*).
2. Es divideix en 2 tubs i s'afegeix a cadascun la quantitat necessària de cDNA i del parell d'encebadors que correspongui. Un cop en la mescla de reacció, la concentració final de cadascun d'ells ha de ser 0,3  $\mu$ M, i haurem fet les ressuspensions de tal forma que afegirem 1  $\mu$ l de *F* i 1  $\mu$ l de *R*.
3. En cada tub de PCR s'hi posen 25  $\mu$ l de mescla de reacció.

- Disseny de la placa de mostres:

Es defineix cada pou de la placa com a:

- UNKN (*Unknown*) = mostra amb cDNA a determinar.
- NTC (*No Template Control*): conté aigua enlloc de cDNA.
- STD (*Standard*): conté una quantitat coneguda de còpies de cDNA o ng d'RNA total.
- NAC (*No Amplification Control*): no conté cDNA però sí DNA genòmic (mostra sense RT).

- Condicions de termociclació:

50°C, 2 min / 95°C, 10 min / 40 cicles: 95°C, 15 s; 60°C, 1 min.

### 3.8. Metodologia aplicada en l'estudi de l'efecte de compostos de la paret cel·lular de *S. cerevisiae* sobre *O. oeni*

#### 3.8.1. Determinació de l'activitat lactat deshidrogenasa

- Reactius:

Reactiu	Component	Concentració (mM)	Volum (ml)
<b>Tampó fosfat pH 7</b>	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> - Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	300	600
<b>Substrat</b>	piruvat	10 mM	100
<b>Coenzim</b>	NADH	1 mM	200

- Condicions de reacció:

- S'estabilitza el tampó d'assaig a 25°C (temperatura ambient).
- Les mostres provenen de cultius d'*O. oeni* no congelats i s'han de mantenir en gel, a 4°C, fins al moment de l'assaig. Les dilucions de mostra es poden fer amb el tampó fosfat.
- En la mateixa microcubeta d'espectrofotòmetre es pot fer la mescla de reacció, afegint els microvolums (µl) indicats en la taula superior, més 100 µl de mostra (degudament diluïda) excepte el piruvat, immediatament abans de fer la lectura d'absorbància.
- Quan la senyal de l'espectrofotòmetre s'estabilitza, s'afegeixen els 100 µl de piruvat.
- Es monitoritza la disminució d'absorbància corresponent a la desaparició de NADH a 340 nm, durant 4 minuts i a intervals de 30 segons.
- El pendent mesurat indica l'activitat LDH i s'expressa en µmols de substrat per minut a 25°C (= 1 U). Activitat específica: mU/mg de proteïna.

#### 3.8.2. Determinació de l'activitat proteasa excel·lular

##### a) Incubació en substrat

- Principi: Substrat proteic  $\longrightarrow$  aminoàcids + proteïna residual
- Reactius:

Reactiu	Component	Concentració
<b>Tampó d'assaig pH 5</b>	Citrat de sodi	50 mM
<b>Substrat</b>	Mannoproteïnes de llevats <sup>1</sup>	12 g/ 100 ml

(1) Subministrat per M. Guilloux-Benatier (*Institut Universitaire de la Vigne et du Vin*, Univ. de Borgonya, Dijon, França).

- Mostra: sobrenedant a partir de cultiu cel·lular en diferents fases de creixement per centrifugació 10 min, 8000 x g, 4°C. Es manté una setmana a 4°C (màxim).
- Reacció:

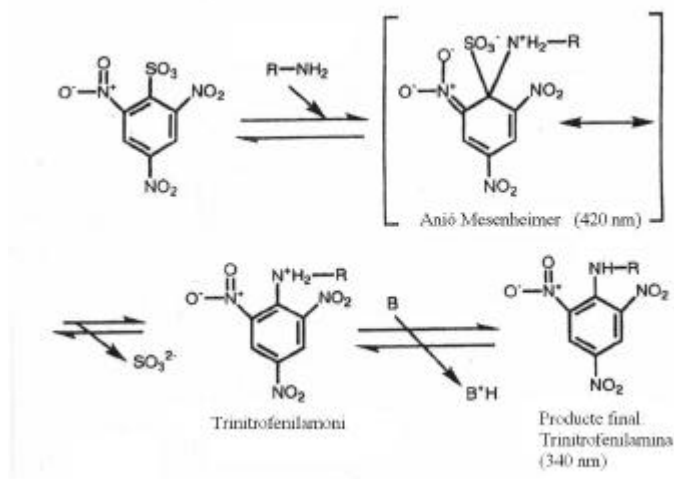
Component	Volum (ml)
Mostra	200
Tampó d'assaig	700
Substrat	100

- El substrat s'addiciona a temps 0.
- Control: la reacció s'atura a temps 0, després d'haver afegit el substrat.
- Mostres: temps d'incubació de 60 min a 30°C.
- Aturada de la reacció: per precipitació de les proteïnes amb 0,6 ml de TCA 24 % a 4°C, com a mínim, 1 h. Passat aquest temps, es centrifuga (13000 x g, 10 min) i es guarden els sobrenedants resultants a 4°C, fins al moment de la determinació dels grups amino primaris alliberats.

b) Determinació dels grups amino primaris alliberats (mètode segons Cayot i Tainturier, 1997):

- Principi:

El grup amino primari reacciona amb TNBSA (àcid 2,4,6-trinitrobenzeno-1-sulfònic) per obtenir el derivat trinitrofenílic corresponent, el qual absorbeix la llum a una longitud d'ona de 420 nm.



**Figura 3.4.** Mecanisme de reacció de la trinitrofenilació emprat per a la determinació dels grups amino lliures.



- Reactius:

Reactius	Components	Concentracions
<b>Tampó d'assaig pH 10</b>	Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub>	0,1 M. Tamponat amb NaOH
<b>Substrat</b>	TNBSA <sup>1</sup>	100X (1M). Es conserva a 18°C

(1) Coeficient d'extinció molar del derivat trinitrofenílic a 418 nm = 12500 l·mol<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>

- Determinació (veure taula 3.10):
  - Mostra: sobrenedant de cultiu cel·lular, amb una concentració en grups amino propera a 10<sup>-4</sup> M, per la qual cosa diluïm 1/20.
  - Es realitza una corba de calibratge emprant isoleucina (pm=131,2 g/mol): solució mare amb 262 mg/l equivalent a 20·10<sup>-4</sup> M.  
Punts de la corba: 0, 0,25, 0,5, 1, 2, 5, 8, 10 i 20·10<sup>-4</sup> M.

**Taula 3.10.** Mescla de reacció per a la determinació de grups amino lliures.

Components (ml)	Blanc	Control	Mostra
Medi control	0	0,1	0
Mostra	0	0	0,1
Tampó borat	0,5	0,4	0,4
TNBSA 20 mM	0,5	0,5	0,5

- S'incuba a temperatura ambient durant 15 min.
- Es llegeix l'absorbància a 420 nm. La diferència de DO respecte al blanc és proporcional a la concentració de grups amino primaris.

### 3.8.3. Extracció d'RNA total bacterià

- Reactius:

**Taula 3.11.** Reactius emprats en l'extracció d'RNA total d'*O. oeni*.

Reactiu	Component	Concentració	Observacions
Tampó I	NaCl	150 mM	pH 8,0
	Na <sub>2</sub> EDTA	10 mM	
Tampó II	Glucosa	50 mM	pH 8,0
	Na <sub>2</sub> EDTA	10 mM	
	Tris-HCl	24 mM	
Lisozim		50 mg/ml	Conservar a -20°C
Tri-Reagent	Reactiu per a extracció d'RNA		Molt tòxic per inhalació
Cloroform	Usem 0,2 ml per 1 ml de Tri-Reagent		Sense alcohol isoamílic ni altres additius
Isopropanol	0,5 ml per 1 ml de Tri-Reagent		
Etanol	Etanol i aigua	75 %	
Aigua lliure d'RNAases (H <sub>2</sub> O RF)	H <sub>2</sub> O bidestil·lada		Tractada amb DPCB <sup>1</sup>

(1) L'aigua lliure d'RNAases (RF = RNase-free) s'obté incubant aigua bidestil·lada al 10 % (v/v) de DPCB (dimetilpirocarbonat) durant tota una nit, després d'haver-la agitada vigorosament, a 37°C. Per últim, s'autoclava l'aigua per eliminar el DPCB que ja haurà degradat les RNAases.

- Procediment:
  1. Es recullen 20 ml de cultiu cel·lular d'*O. oeni* en fase exponencial (DO<sub>600 nm</sub> = 0,7 - 0,8).
  2. Es centrifuguen les cèl·lules a 6000-8000 x g, 10 min, a 4°C.
  3. Es renta el precipitat amb Tris-HCl 10 mM, pH 8 (podem aturar el procés en aquest punt i guardar les cèl·lules, sense líquid, a -80°C).
  4. Es ressuspen el precipitat en un tub Eppendorf amb 0,4 ml de tampó I i s'incuba en gel 5-10 min.
  5. S'afegeixen 0,4 ml de tampó II i 0,2 ml de lisozim 50 mg/ml, de forma que la concentració final sigui de 10 mg/ml.
  6. S'incuba 10 min a temperatura ambient.
  7. Es centrifuguen les cèl·lules amb suavitat (7000 x g, 5 min).
  8. Es ressuspen el precipitat directament en 1 ml de Tri-Reagent i es mescla pipetejant fins que la lisi sigui completa (s'ha d'observar una solució ben homogènia i gairebé transparent).
  9. Un cop ha quedat la mescla ben homogènia, es centrifuga a 12000 x g, 10 min, a 4°C, per eliminar el material insoluble (membranes, polisacàrids i DNA). El sobrenedant conté els RNA i les proteïnes.

10. Es transfereix a un tub *Eppendorf* i es deixa 5 min a temperatura ambient.
11. S'addicionen 0,2 ml de cloroform, s'homogeneïtza vigorosament durant 15 segons i s'espera de 2 a 15 min a temperatura ambient.
12. Es centrifuga a 12000 x g, 15 min a 4°C, per recuperar la fase superior (fase aquosa i acolorida) i transferir-la, amb molta cura, a un nou tub *Eppendorf*.
13. S'afegeixen 0,5 ml d'isopropanol i s'espera 5-10 min a temperatura ambient.
14. Es centrifuga a 12000 x g, 10 min, 4°C, per obtenir els RNA en forma de petit precipitat de tonalitat clara.
15. S'elimina el sobrenedant, es renta el precipitat amb 1 ml d'etanol 75 %, s'agita amb vòrtex i es recentrifuga a les mateixes condicions anteriors.
16. S'asseca l'RNA durant 5-10 min, al buit (si és possible) i a certa temperatura (al voltant de 37°C).
17. Es ressuspèn l'RNA en 30 ml d'H<sub>2</sub>O *RF* i es conserva a -80°C.

### 3.8.4. Quantificació de l'RNA

L'hem realitzada en dues fases:

a) electroforesi orientativa en gel de baixa concentració d'agarosa (0,8 %, TAE):

- A 120 V, durant 15 min.
- Mostres d'RNA obtingudes com s'indica a l'apartat anterior, **3.8.3**.
- Aporta orientació de la dilució de mostra abans de llegir les absorbàncies.

b) lectura de les absorbàncies a 260 i 280 nm:

- Normalment, les mostres es dilueixen 1/250: 2 µl mostra + 498 H<sub>2</sub>O *RF* (quan la primera fase ens indica que hi ha poc RNA, diluïm 1/200).
- Es determina l'absorbància a 260 i 280 nm amb cubetes de quars, a més d'obtenir un escombratge d'absorbàncies de 220 a 300 nm que ens pot donar informació addicional sobre l'estat de la mostra.
- Es calcula el quocient  $A_{260}/A_{280}$ , indicador de la bondat de l'extracció i dels nivells de proteïna contaminant a la mostra, que s'ha de situar entre 1,8 i 2,0.
- Les concentracions reals d'RNA s'obtenen a partir de la relació:  
1 U de DO = 40 µg/ml d'RNA.

### 3.8.5. Electroforesi desnaturalitzant d'RNA

- Reactius:

**Taula 3.12.** Reactius emprats en l'electroforesi desnaturalitzant d'RNA i composició de la mescla de mostra per carregar en el gel.

Reactiu	Component	Concentració	ml	Conc. final
Tampó 10X	Acetat de sodi	1 M, pH 7	20	0,1 M
	MOPS <sup>1</sup>	1 M	40	0,2 M
	EDTA <sup>2</sup>	0,5 M	4	10 mM
	H <sub>2</sub> O lliure RNAases	fins a 200 ml		
Gel d'agarosa <sup>4</sup>	Agarosa <sup>3</sup>	100 %	36	1,6 %
	Tampó 10X		5	1X
	Formaldehid	37 %	9	9,25 %
Mostra	Mostra amb RNA	10-15 µg RNA	2-10 µl	
	Formamida	pura	10 µl	
	Tampó 10X		2 µl	
	Formaldehid	37 %	4 µl	
	Bromur d'etidi	1 mg/ml	1 µl	
	Tampó de càrrega	Veure ap. 3.6.6	5 µl	

(1), (2) i (3) Per a biologia molecular i lliures d'RNAases.

(4) Podem treballar amb gels, cubetes i volums superiors: per exemple, 72 ml de gel: doblem els volums dels diferents components.

- Procediment:

a) Es prepara el gel d'agarosa, amb les proporcions indicades a la taula 3. 12.

- S'escalfa al microones l'agarosa en aigua bidestil·lada *RF* fins que es dissolgui completament.
- Es deixa refredar uns °C per damunt del punt de gelificació i s'afegeix el tampó i el formaldehid.
- Es dispensa en la cubeta lliure d'RNAases i es deixa que gelifiqui (1 h).

b) Tractament de la mostra:

- Coneguda la concentració d'RNA, es dilueix amb H<sub>2</sub>O *RF* de forma que prenent 2-10 µl la concentració es trobi entre 10 i 15 µg d'RNA.
- S'afegeixen els reactius indicats a la taula seguint el mateix ordre.
- S'incuba la mostra a 65°C durant 10 min per evitar la formació d'estructures secundàries en l'RNA.

c) Càrrega del gel i migració:

- Es diposita la cubeta, amb el gel ja gelificat i omplerta amb tampó 1X, parcialment dins d'un bany de gel per evitar la desnaturalització de les mostres per altes temperatures mentre avança l'electroforesi.
- Es fa córrer el gel a 60 V, 10 min per si hi ha restes d'RNAasa en els pous.
- Es diposita les mostres i es connecta l'electroforesi a 60 V unes 3 hores.

### 3.8.6. Transferència de l'RNA i fixació del gel desnaturalitzant

Un cop acabada l'electroforesi, es comprova que les mostres hagin migrat correctament observant el gel al transil·luminador. Se'n fa una fotografia i es calca els contorns, els pous i les bandes fluorescents en un paper transparent, per contrastar aquesta imatge amb les següents.

- Procediment per a la transferència per capil·laritat:
  1. Es disposa un paper d'alumini doblat i llis sobre una superfície plana i dura.
  2. Es col·loquen 2 papers de filtre Whatman 3MM de la mateixa mida que el gel i a sobre, el gel amb la part superior mirant cap a dalt.
  3. En contacte amb el gel, s'hi col·loca molt suaument i començant per un dels cantons, una membrana de niló (NYTRAN<sup>®</sup>) prèviament humitejada amb SSC 20X (veure'n la composició a **3.8.8**). Cal evitar bombolles i cobrir les vores amb el paper d'alumini.
  4. Damunt, s'hi col·loquen 3 papers Whatman com els d'abans, i a sobre d'ells, un bon feix de paper absorbent (paper de cuina, per exemple).
  5. El muntatge es completa amb un pes superior a 1 kg sobre tot el conjunt i ben repartit, de forma que quedi horitzontal, i es deixa així tota la nit.
  6. El dia següent, es desfà el muntatge i es torna a calcar la posició dels pous i de les bandes amb la membrana sobre el transil·luminador.
  7. Es fixa l'RNA transferit a la membrana incubant 2 h en un forn a 80°C. A sota, s'hi posa un paper de filtre.
  8. Acabada la fixació, es pot conservar la membrana a 4°C o a temperatura ambient, recoberta amb un paper de plàstic Saran<sup>®</sup> (Dow).

### 3.8.7. Obtenció de sondes marcades radioactivament

Utilitzem el mètode de marcatge inespecífic *random priming*.

Prèviament, cal amplificar els fragments dels gens que volem utilitzar com a sondes, mitjançant PCR. L'amplificació per a *hsp18*, *mleA* i *htrA* (programa: 92°C, 2 min / 30 cicles: 92°C, 30 s; 48°C, 30 s; 72°C, 1 min / 72°C, 2min) es basa en els encebadors indicats en la taula **3.13**. Per a l'amplificació d'*htrA*, cal veure l'apartat **3.8.9**.

**Taula 3.13.** Seqüències dels encebadors seleccionats per a l'amplificació dels gens *hsp18* (*Lo18F* i *Lo18R*), *mleA* (*MleAF* i *MleAR*) i *trxA* (*TrxAF* i *TrxAR*) en *O. oeni*.

Codi	Seqüència	pb	T <sub>m</sub> (°C)
<i>Lo18F</i>	5' ATG GAT AGA AAT GAT GGA TT 3'	20	54
<i>Lo18R</i>	5' CGT CAG ATT TTG GTA GAG TC 3'	20	58
<i>MleAF</i>	5' GGA AGA TTT TGG CCG TTC GAA TGC T 3'	25	74
<i>MleAR</i>	5' ACC AAA ATG GTC GGG TGG ACA GC 3'	24	72
<i>TrxAF</i>	5' CCG GAT TTG GTT GCT TCC TC 3'	20	62 <sup>(1)</sup>
<i>TrxAR</i>	5' AGG AGG AAT TAT ATG GCA AT 3'	20	54

(1) T<sub>m</sub> segons subministrador: T<sub>m</sub> (1M Na) 66°C, T<sub>m</sub> (50 mM Na) 45°C, % GC 45).

- Reactius de *random priming*:

La major part de reactius ens el subministra l'assaig de Life Technologies **Random Primers DNA Labeling System** (taula 3.14).

**Taula 3.14.** Components de l'assaig de marcatge inespecífic.

Component	Característiques
Tampó mescla d'encebadors inespecífics	18 unitats DO <sub>260</sub> /ml d'hexonucleòtids en tampó (0,67 HEPES, 0,17 M Tris-HCl, 17 mM MgCl <sub>2</sub> , 33 mM 2-mercaptoetanol, 1,33 mg/ml BSA)
Solució dCTP	0,5 mM dCTP en 1 mM Tris-HCl, pH 7,5
Solució dGTP	0,5 mM dGTP en 1 mM Tris-HCl, pH 7,5
Solució dTTP	0,5 mM dTTP en 1 mM Tris-HCl, pH 7,5
Fragment Klenow (fragment gran de la DNA-polimerasa I)	3 U $\mu$ l de fragment Klenow en tampó (50 mM de fosfat de potassi pH 7,0, 100 mM KCl, 1 mM DDT, 50 % (v/v) glicerol)

Altres reactius:

- dATP\*: nucleòtids d'ATP marcats radioactivament amb P<sup>32</sup>: ( $\alpha$ -<sup>32</sup>P)dATP (Easytides).
- sonda: prové de la seqüència del gen o gens en concret que hem amplificat i dels quals volem detectar-ne els nivells d'expressió. En el nostre cas, sondes d'*hsp18*, *mleA*, *htrA* i *trxA*. N'afegirem 1  $\mu$ l (corresponent a uns 10 ng de DNA).

Tots els reactius es conserven a  $-20^{\circ}\text{C}$  i es treuen del congelador en el moment d'utilitzar-los, quan els mantenim en un bany de gel.

- Procediment:
  - En un tub Eppendorf amb 16,5  $\mu\text{l}$  d'aigua, s'addiciona 1  $\mu\text{l}$  de sonda i es bull 5 min. Acabat aquest temps, es deixa uns altres 5 min en gel.
  - S'afegeix 7,5  $\mu\text{l}$  de tampó amb nucleòtids.
  - S'afegeix 1  $\mu\text{l}$  de cada nucleòtid no marcat.
  - S'addiciona 0,5  $\mu\text{l}$  de fragment Klenow i es centrifuga.
  - S'addiciona 0,5  $\mu\text{l}$  de dATP\*
  - Es deixa incubar 2 h 30 min a temperatura ambient ( $20 - 30^{\circ}\text{C}$ ).

### 3.8.8. Northern blot

- **Taula 3.15.** Reactius per a l'assaig d'hibridació *Northern blot*.

Solucions	Components	Volums o concentració
SSC 20X pH 7,0	NaCl	3 M
	Na <sub>3</sub> -citrat-H <sub>2</sub> O	0,3 M
	H <sub>2</sub> O bidestil·lada	
Solució Denhart (50X) <sup>1</sup>	Ficoll 400	1 %
	PVP	1 %
	BSA	1 %
Tampó d'hibridació	H <sub>2</sub> O	9 ml
	SSC 20X	2 ml
	Denhardt (50X)	1,2 ml
Esperma de salmó	Veure taula ANNEX B	

(1) En preparar-la, es filtra amb filtre de 0,22  $\mu$  i es conserva a  $-20^{\circ}\text{C}$  en alíquotes d'uns 20 ml.

- Prehibridació:
  - Es col·loca la membrana en un tub d'hibridació amb 10 ml de tampó, si es tracta d'una membrana petita, o en 20 ml si es tracta d'una membrana gran.
  - Es posa al forn d'hibridació a  $68^{\circ}\text{C}$ , durant 2-3 h.
- Hibridació:
  - S'elimina el tampó de prehibridació.
  - S'afegeixen 10 o 20 ml de tampó en funció de la mida de la membrana.
  - S'escalfa l'esperma de salmó 5 min a  $100^{\circ}\text{C}$ , es deixa 5 min a  $4^{\circ}\text{C}$  i tot seguit se n'addiciona uns 250  $\mu\text{l}$  per 20 ml de tampó d'hibridació.
  - Es prenen 10  $\mu\text{l}$  de sonda marcada radioactivament, s'hi afegeixen uns 500  $\mu\text{l}$  de tampó, es fa bullir 5 min i es deixa uns altres 5 min en un bany de gel.
  - S'afegeix el volum de sonda tractat anteriorment directament al tub d'hibridació, amb cura de no abocar-lo directament sobre la membrana.
  - S'incuba tota la nit a  $68^{\circ}\text{C}$ .

- Rentats de la membrana:
  - S'elimina la sonda i es fa un primer rentat amb SSC 5X/ SDS 0,1 %
  - Es realitza un segon rentat de 10 min a 68°C amb SSC 5X/ SDS 0,1 %
  - Doble rentat de 10 min a 68°C amb SSC 2X/ SDS 0,1 %
  - Doble rentat de 10 min a 68°C amb SSC 1X/ SDS 0,1 %
  - Últim rentat de 10 min a 68°C amb SSC 0.5X/ SDS 0,1 %
  - Es disposa la membrana sobre un paper Whatman 3MM, es deixa assecat durant 15 min i es recobreix amb paper Saran<sup>®</sup>, a punt per a l'autoradiografia.

### 3.8.9. PCR per a la detecció dels gens *prtP* i *htrA*

- Reactius i volums de reacció (taula 3.16):

**Taula 3.16.** Reactius emprats en la PCR amb encebadors degenerats.

Reactius	Volum
Tampó amb MgCl <sub>2</sub> (25 mM) i Taq polimerasa (5 U/ml)	10 µl
dNTPs (2 mM)	10 µl
Encebador F ( <i>forward</i> ) (4 pmol/µl)	5 µl
Encebador R ( <i>reverse</i> ) (4 pmol/µl)	5 µl
Mostra DNA (10 ng)	2 µl
H <sub>2</sub> O bidestil·lada estèril	68 µl

- Encebadors:

Es tracta d'encebadors degenerats en el cas del gen *prtP*, obtinguts per alineació de seqüències d'aminoàcids de les corresponents proteïnes altament conservades en diferents espècies bacterianes (Remize *et al.*, UMS INRA, Dijon, França):

**Taula 3.17.** Seqüències consens (*L. lactis subsp. cremoris*) dels encebadors degenerats seleccionats per a la detecció del gen *PrtP* en *O. oeni*.

Codi	Seqüència <sup>1</sup>	pb	T <sub>m</sub> (°C) <sup>2</sup>
<i>PrtP-oenos-F</i>	5' AAR GGT GAA GGY AYV GTY RT 3'	20	56-40
<i>PrtP-oenos-F2</i>	5' TCA ATG GCY TCD CCA TTT RT 3'	20	56-48
<i>PrtP-oenos-R</i>	5' CCR AAR AAG CCC ATR TAT GG 3'	20	58-50

(1) Nomenclatura de les posicions nucleotídiques degenerades: **R** = AG, **Y** = CT, **D** = AGT i **V** = ACG.

(2) T<sub>m</sub> màxima i T<sub>m</sub> mínima: defineixen un interval de T<sub>m</sub> el valor de la qual dependrà de quines bases ocupen les posicions degenerades.



Per a l'amplificació d'un fragment del gen *htrA* i posterior obtenció d'una sonda per a realitzar *Northern blot*, s'han emprat els encebadors indicats a la taula **3.18**.

**Taula 3.18.** Seqüències dels encebadors seleccionats per a la detecció del gen *htrA* en *O. oeni*.

Codi	Seqüència	pb	T <sub>m</sub> (°C)
<i>HtrA-oenos-F</i>	5' GGG CTG TTG AGT GCC ATC 3'	18	58
<i>HtrA-oenos-R</i>	5' CGC TGG CCT CGG TAG AC 3'	17	58

- Programa d'amplificació:

Per a l'amplificació de *prrP*, veure l'ANNEX D.

Per a l'amplificació d'*htrA*: 92°C, 2 min / 30 cicles: 92°C, 30 s; 52°C, 30 s; 72°C, 1 min / 72°C, 2min.



## **4. RESULTATS I DISCUSSIÓ**



#### 4.1. Activitat ATPasa de membrana en *O. oeni* i efecte de les diferents condicions d'estrès.

Part dels resultats d'aquest apartat, han estat publicats recentment (Carreté *et al.*, 2002): veure l'ANNEX F.

Com ja s'ha dit en l'apartat 1.2.3, quan *O. oeni* està realitzant la FML, obté la major part d'energia a partir de la degradació de l'àcid L-màlic (Renault *et al.*, 1988; Firme *et al.*, 1994), i ho fa de forma indirecta, gràcies a la intervenció clau de les H<sup>+</sup>-ATPases de membrana, que canalitzen la força protomotriu (*pmf*) –generada per l'augment de pH<sub>i</sub>, l'entrada d'àcid L-màlic i la sortida d'àcid L-làctic– per obtenir gran part de l'ATP necessari per al creixement cel·lular i el manteniment de l'activitat metabòlica (Cox i Henick-Kling, 1989; Poolman, 1993). Altrament, en tractar-se d' $F_0F_1$ -ATPases, poden exercir el seu mecanisme molecular de forma reversible i permetre l'eflux de H<sup>+</sup> per mantenir el pH<sub>i</sub>, sense el qual la viabilitat cel·lular es veuria greument compromesa (Garbay i Lonvaud-Funel, 1994; Lengeler *et al.*, 1999).

En base a aquestes dues funcions cel·lulars, i pel fet d'estar situada en la membrana plasmàtica –que sol ser el primer receptor de la cèl·lula enfront de les alteracions del medi– es considera que l'activitat ATPasa de membrana és un bon indicador de l'estat metabòlic cel·lular i, per consegüent, de l'activitat malolàctica.

Garbay i Lonvaud-Funel (1994) van caracteritzar l'activitat enzimàtica de l'H<sup>+</sup>-ATPasa d'*O. oeni*, amb un pH òptim de 5,6 (similar al que Bender *et al.* [1986] van descriure com a pH òptim per a l'activitat H<sup>+</sup>-ATPasa de *Lb. casei*: 5,0) i una K<sub>m</sub> per al substrat ATP d'1,1 mM, i dependent de Mg<sup>+2</sup>. Inhibida per DCCD i no per molibdat, descartaven així la possibilitat que es tractés d'una fosfatasa, alhora que demostraven que pertanyia a la família d' $F_0F_1$ -ATPases, tal com succeeix en altres bacteris làctics, estreptococs (Bender *et al.*, 1986) i diversos lactobacils i lactococs implicats en la indústria de la llet (Konings *et al.*, 1997). També van descriure que l'activitat enzimàtica H<sup>+</sup>-ATPasa depenia de la fase de creixement, del medi de cultiu i de les condicions extracel·lulars, de forma similar al que havien descrit Eraso i Gancedo (1987) per a *S. cerevisiae*, si bé en el cas dels llevats les ATPases de membrana pertanyen a una altra família (Serrano, 1991).

Malgrat la detecció, darrerament, d'una altra ATPasa de membrana, de tipus P, en *O. oeni* (Guzzo *et al.*, 2000), es pot considerar que H<sup>+</sup>-ATPasa continua sent, en gran

mesura, la responsable principal de les funcions abans esmentades, ja que l'altra es troba en proporcions molt baixes.

En el nostre estudi s'han analitzat els efectes de diferents components del vi –que poden actuar com a factors d'estrès bacterià al llarg de la FML– sobre l'activitat ATPasa de membrana en *O. oeni*, després de caracteritzar-ne les constants cinètiques.

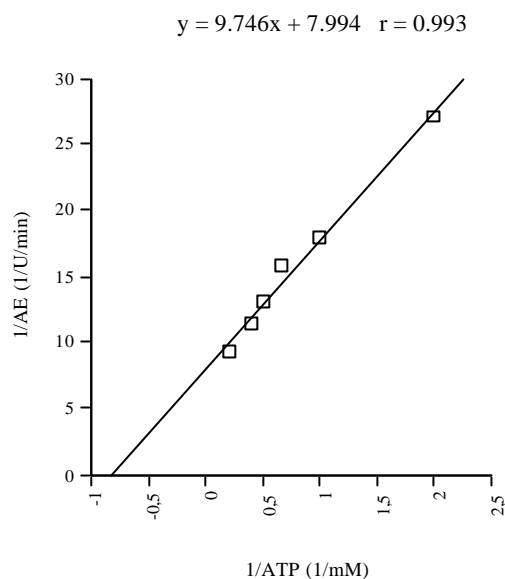
#### 4.1.1. Caracterització de l'activitat H<sup>+</sup>-ATPasa en *O. oeni*

La caracterització d'alguns paràmetres enzimàtics de l'H<sup>+</sup>-ATPasa d'*O. oeni* es va realitzar sobre la soca tipus CECT 4100. Prèviament, es comprovà la repetibilitat de l'assaig d'activitat específica H<sup>+</sup>-ATPasa sobre fraccions de membrana de cèl·lules de la mateixa soca, recollides al final de la fase de creixement i no sotmeses a cap condició d'estrès (cèl·lules control). Els valors obtinguts, expressats com a μmols de P<sub>i</sub> alliberats·min<sup>-1</sup>·mg<sup>-1</sup> de proteïna, es trobaven entre 0,12 i 0,16. La repetibilitat intraassaig presentava desviacions molt baixes, de l'ordre de mil·lèsimes, com ho mostra la taula 4.1.

**Taula 4.1.** Tres cultius diferents de la soca CECT 4100 i en el mateix medi (triplicats), amb el valor de desviació estàndard (*SD*) en l'activitat específica.

Mostres	1	2	3	A.E. mitjana	<i>SD</i>
μmols P <sub>i</sub> ·min <sup>-1</sup> ·mg <sup>-1</sup> prot	0,128	0,130	0,127	0,128	0,002

A partir dels resultats obtinguts per Garbay i Lonvaud-Funel (1994), que van caracteritzar el mateix enzim en una altra soca d'*O. oeni*, aïllada de vins espanyols (LOD004), es va creure oportú treballar amb els mateixos pH òptim de reacció (5,6) i temperatura de reacció (37°C). Es va observar que l'enzim presenta una cinètica de Michaelis-Menten aparent de primer ordre (figura 4.1), amb una concentració saturant de substrat de 10 mM, mentre que el valor de **K<sub>m</sub>** obtingut és d'**1,2 mM ± 0,1**, molt similar al descrit per Garbay i Lonvaud-Funel (1994) d'1,1 mM, o per Kobayashi *et al.* (1984) per a *S. faecalis* (1,7 mM). En l'ANNEX C es poden veure les corbes que indiquen la linealitat de l'assaig a nivell de temps i de concentració.



**Figura 4.1.** Recta de Lineweaver-Burk per a l'activitat enzimàtica de l'H<sup>+</sup>-ATPasa d'*O. oeni*. AE = Activitat específica ( $\mu\text{mols P}_i \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \text{prot}$ ).

Per tal de verificar que les nostres mesures corresponien a l'activitat de l'H<sup>+</sup>-ATPasa de membrana, es va comprovar l'efecte inhibitor d'una concentració de 200  $\mu\text{M}$  de DCCD (Bender *et al.*, 1986) sobre una fracció cel·lular de membrana plasmàtica extreta d'un cultiu en fase exponencial tardana de creixement.

Els resultats obtinguts mostren una inhibició del 80 % sobre fraccions de membrana de cèl·lules control, com es pot veure en la **taula 4.2**.

**Taula 4.2.** Inhibició de l'activitat H<sup>+</sup>-ATPasa per part de DCCD.

	A.E. ( $\mu\text{mols P}_i \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \text{prot}$ )
Cèl·lules control, fase exponencial final	0,14±0,02
Cèl·lules control amb 200 $\mu\text{M}$ DCCD	0,028±0,008

Està descrit, també, que totes les F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATPases bacterianes són dependents de Mg<sup>+2</sup> (Lengeler *et al.*, 1999). Els resultats obtinguts així ho demostren (veure **taula 4.3**), presentant un 85 % d'inhibició quan no hi ha presència de Mg<sup>+2</sup> al tampó de substrat. Així doncs, tots els assaigs es realitzaren amb Mg<sup>+2</sup> com a cosubstrat, en proporció 1:1 amb l'ATP, seguint el que es troba descrit a la bibliografia (Kobayashi *et al.*, 1984; Belli i Marquis, 1991; Garbay i Lonvaud-Funel, 1994, entre d'altres).

**Taula 4.3.**  $\mu\text{g}$  de  $\text{P}_i$  alliberats amb i sense presència de  $\text{Mg}^{+2}$  i % d'inhibició.

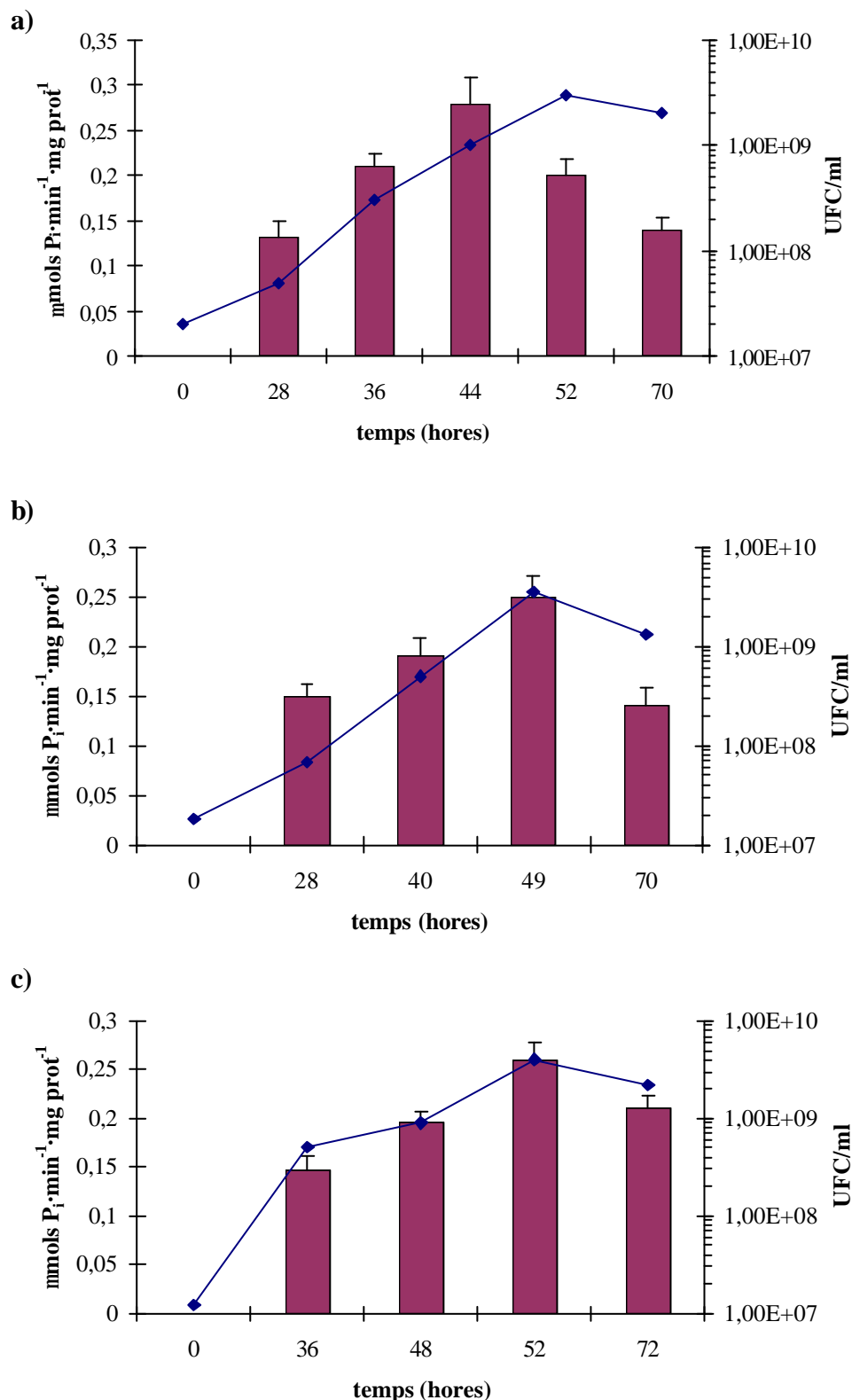
	A.E. ( $\mu\text{mols P}_i \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ prot}$ )
$\text{Mg}^{+2}$ (1:1 amb ATP)	8,14 $\pm$ 0,5
Absència de $\text{Mg}^{+2}$	1,25 $\pm$ 0,2
% d'inhibició	85 %

#### 4.1.2. Activitat ATPasa al llarg del creixement cel·lular

Es va portar a terme el seguiment de l'activitat ATPasa de membrana al llarg del creixement cel·lular, en medi ric MRSFM, sobre les 3 soques d'estudi representatives: la soca de col·lecció CECT 4100, la soca CR1 i la soca comercial Vitilactic. La finalitat, a part de comprovar com afectava la fase de creixement als nivells d'activitat enzimàtica, era establir en quin moment del creixement cel·lular aquesta era més elevada per poder estudiar-hi les modificacions produïdes pels diferents components d'estrès assajats.

Els resultats obtinguts manifestaven que en *O. oeni* l'activitat ATPasa depèn de l'etapa de creixement, ja que augmentava fins arribar als valors màxims cap al final de la fase exponencial i davallava progressivament durant la fase estacionària (veure figura 4.2). Aquests màxims són similars per a les tres soques: 0,28  $\mu\text{mols P}_i \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ prot}$  per a CECT 4100, 0,25  $\mu\text{mols P}_i \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ prot}$  per a CR1 i 0,26  $\mu\text{mols P}_i \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ prot}$  per a Vitilactic. Garbay i Lonvaud-Funel (1994) van descriure unes tendències similars per a la seva soca d'*O. oeni*, alhora que indicaven diferències significatives en els valors absoluts degudes al medi de cultiu emprat, i justificaven l'augment de l'activitat al llarg del creixement cel·lular com una resposta a l'acidificació progressiva del medi, en consonància amb les conclusions que Eraso i Gancedo (1987) havien extret per a *S. cerevisiae* en situacions similars de creixement. Tot i així, sembla més plausible que l'increment d'activitat vagi associat a la necessitat d'obtenció d'energia per a l'activació de la biosíntesi cel·lular, ja que en el medi utilitzat per a l'obtenció de la biomassa cel·lular, MRSFM (pH 5,0), es produïa una lleu desacidificació en ser transformat l'L-màlic a L-làctic.





**Figura 4.2.** Creixement (expressat en UFC/ml amb  $\blacklozenge$ ) i activitat específica ATPasa (expressada com a  $\mu\text{mols } P_i \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$  prot mitjançant barres) de les soques d'*O. oeni* CECT 4100 (a), CR1 (b) i Vitilactic (c), en les diferents fases de creixement en medi MRSFM.

En base a aquests resultats, es va decidir recollir les mostres de cultiu cel·lular al final de la fase exponencial de creixement, on apareixia la màxima activitat ATPasa, perquè les incidències de les diferents condicions d'estrès sobre les H<sup>+</sup>-ATPases de membrana hi serien més significatives i alhora la resposta molecular d'aquestes, manifestada a través de la mesura de l'activitat enzimàtica, podria ser més fàcilment detectable.

#### 4.1.3. Efecte de les diferents condicions d'estrès sobre l'activitat ATPasa

Ja han estat comentats (apartat 1.2.3), quins són els principals efectes de diferents components del vi sobre el creixement i el metabolisme d'*O. oeni*. Per al següent estudi, n'hem seleccionat alguns d'ells en base a la importància d'aquests efectes i a les implicacions que poden comportar en diferents moments de la vinificació. Les concentracions escollides corresponen a nivells la incidència dels quals sobre el creixement ja ha estat clarament descrita en treballs realitzats anteriorment: l'etanol al 12 %, concentració habitual en els nostres vins, inhibeix clarament el creixement d'*O. oeni* (Beelman *et al.*, 1977; Capucho i San Romão, 1994); d'igual forma, 10 mg/l de coure són suficients no tan sols per inhibir-ne el creixement, sinó també per endarrerir l'acabament de la FML, com van descriure Vidal *et al.* (2001). Pel que respecta als àcids grassos, tot i que Capucho i San Romão (1994) van detectar que C10 i C12, per sota de 12,5 mg/l i 2,5 mg/l, respectivament, activaven el creixement d'*O. oeni*, quan es presentaven en concentracions superiors (20 mg/l de C10 i 5 mg/l de C12) inhibien clarament la FML (Vidal *et al.*, 2001). Del SO<sub>2</sub>, s'assajaren nivells moderats, corresponents a un 2,5 %, i nivells alts, d'un 5 %, de la forma lliure (SO<sub>2</sub>.H<sub>2</sub>O) i més activa en solució (Romano i Suzzi, 1993), considerant que l'efecte del SO<sub>2</sub> és altament dependent del pH. Precisament, el pH ha estat un altre dels factors estudiats en la soca tipus CECT 4100, tenint en compte que, tot i la capacitat d'*O. oeni* de desenvolupar-se a pHs força baixos (3,0-3,5), aquests no són els òptims per al creixement (Van Vuuren i Dicks, 1993). A més, l'efecte sinèrgic del pH sobre la resta de factors d'estrès ja esmentats no és gens menyspreable (Lafon-Lafourcade i Peynaud, 1974; Capucho *et al.*, 1994; Vidal *et al.*, 2001), i per això també ha estat motiu de la nostra atenció. Per últim, com a control d'acció clara d'estrès sobre l'activitat enzimàtica de l'H<sup>+</sup>-ATPasa

de membrana, s'ha seleccionat el xoc tèrmic a 42°C, temperatura a la qual comencen a manifestar-se fenòmens de desnaturalització proteica (Lengeler *et al.*, 1999).

- Efecte del xoc tèrmic, de l'etanol i de la disminució del pH en *O. oeni* CECT 4100:

Com es pot veure en la figura 4.3, els resultats obtinguts mostren una elevada inhibició de l'activitat H<sup>+</sup>-ATPasa durant el **xoc tèrmic** –altrament esperada– causada probablement per un conjunt de factors, com ara el desencaixament de les unitats F<sub>0</sub> i F<sub>1</sub>, unides per forces moleculars làbils (Amzel i Pedersen, 1983); la desnaturalització parcial d'algunes subunitats que conformen F<sub>0</sub> i F<sub>1</sub> (Boyer, 1997) i la modificació de l'estructura i fluïdesa de la membrana, ja que F<sub>0</sub> –involucrada en la translocació de H<sup>+</sup>– s'hi troba incorporada (Amzel i Pedersen, 1983; Fillingame, 1997). En relació a aquest últim aspecte, s'ha suggerit que per a alguns organismes termòfils, quan es troben a temperatures molt elevades (superiors als 80°C), els circuits i gradients de H<sup>+</sup> no poden mantenir-se molt de temps per culpa de l'excessiva permeabilització de la membrana (Lengeler *et al.*, 1999).

Pel que respecta a l'**etanol**, s'observa una molt lleu disminució de l'activitat específica en concentracions del 12 %. Garbay i Lonvaud-Funel (1994) també van detectar una certa disminució de l'activitat en cèl·lules d'*O. oeni* incubades en concentracions similars d'etanol, mentre que en condicions *in vitro* (una suspensió de la fracció de membrana en tampó i presència d'etanol) no hi havia disminució. Possiblement, l'etanol podria actuar a través de la membrana plasmàtica, modificant-ne la fluïdesa, tal i com Dombek i Ingram (1984) van descriure per a *E. coli*, i afectant el flux de protons transmembranals. Ara bé, no es pot considerar que aquesta disminució d'activitat sigui molt significativa (no supera el 10 %), i és de suposar que *O. oeni* presenta major capacitat d'adaptar-se a les condicions del vi i regular al màxim l'entorn lipídic de l'ATPasa de membrana.

Per la seva banda, la disminució d'activitat H<sup>+</sup>-ATPasa causada pel **pH àcid (3,0)** és més considerable, del 30 %, i l'augment d'una unitat del pH (de 3,0 a 4,0) es reflecteix en un increment proporcional de l'activitat. A partir dels resultats mostrats en la figura 4.3, es pot considerar que, en ser el pH del medi de cultiu control de 5,0, la davallada d'activitat enzimàtica H<sup>+</sup>-ATPasa és proporcional a la davallada de pH.

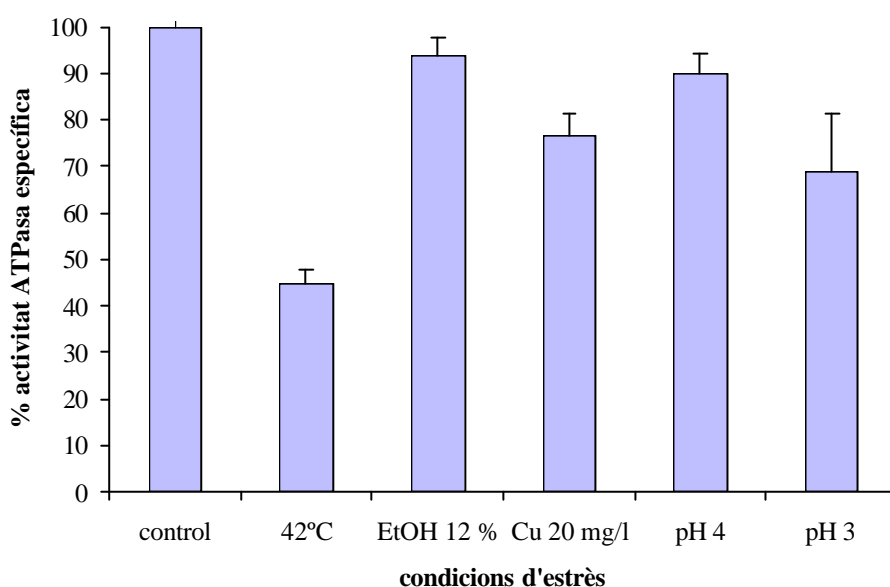
Segons Kobayashi *et al.* (1986), a partir dels seus estudis sobre *Streptococcus mutans*, l'activitat ATPasa en bacteris sempre augmenta en resposta a la demanda de transport de  $H^+$ , i segons els mateixos autors i Nannen i Hutkins (1990) (en *L. lactis*), aquest increment, lluny de correspondre a una resposta constitutiva, podria ser conseqüència de l'amplificació en la síntesi d' $H^+$ -ATPasa gràcies a la regulació de l'expressió gènica per part del  $pH_i$ . Belli i Marquis (1991), treballant sobre soques d'*S. mutans* i *Enterococcus hirae*, van comprovar que aquestes eren capaces d'adaptar-se progressivament a mesura que s'acidificava el medi, mostrant una correlació directa entre el pH al qual es desenvolupava activitat glucolítica i l'increment d'activitat ATPasa. Aquesta capacitat de preadaptació progressiva també fou descrita en *O. oeni* per Drici-Cachon *et al.* (1996).

Tanmateix, si es considera que l' $H^+$ -ATPasa de membrana d'*O. oeni* és reversible, és difícil determinar quin percentatge de l'activitat calculada correspondria a l'extrusió de  $H^+$  i quin a la producció d'ATP a partir de la *pmf*. En realitat, quan es realitza la mesura experimental a partir de la quantitat de  $P_i$  obtingut per dissociació de l'ATP sobre una mostra de fracció de membrana, s'obté un valor d'activitat específica corresponent al total de molècules de l'enzim que es troben actives, sense que sigui possible discriminar quina fracció d'aquestes molècules extreia o incorporava  $H^+$  a l'interior cel·lular, o en quina intensitat, una mateixa molècula, feia una sola o totes dues funcions. Per tot plegat, dels resultats mostrats només es pot concloure que, en les condicions d'incubació a les quals s'ha sotmès la fracció de membrana, és a dir, 1 hora en un tampó a pH 3 o pH 4, sense font de nitrogen, no s'ha observat un increment de l'activitat ATPasa total, sinó tot al contrari, que aquesta disminueix si ho fa el pH. Si la hipòtesi d'en Kobayashi *et al.* (1986) és certa, és a dir, que l'increment d'activitat ATPasa és conseqüència directa d'un augment en l'expressió i síntesi, la manca de font de nitrogen en el tampó d'incubació podria explicar, en part, aquest fenomen.

D'altra banda, Hartke *et al.* (1996) van comprovar, en *L. lactis*, que la majoria de proteïnes expressades en cèl·lules en creixement sota pH neutre són reprimides en un xoc àcid, sense que això impedeixi que *L. lactis* activi els mecanismes d'ATR. Guzzo *et al.* (1994), ja havien observat un fenomen similar en cèl·lules d'*O. oeni*. En aquesta línia, O'Sullivan i Condon (1997) demostraren que l'ATR i l'habilitat de mantenir un  $pH_i$  elevat desapareixien quan s'inhibia la síntesi proteica amb cloramfenicol durant l'adaptació de cèl·lules de *L. lactis*. Possiblement, una part dels aminoàcids lliures

resultants podria ser redirigida cap a la síntesi d' $H^+$ -ATPasa, però caldrien més estudis experimentals per comprovar aquesta hipòtesi.

Paral·lelament, i reforçant la idea que la detecció d'una disminució de l'activitat ATPasa total no implica necessàriament una davallada del bombeig de  $H^+$  cap a l'exterior de la cèl·lula, Pérez Chaia *et al.* (1994) van concloure que, en condicions que afavoreixen l'entrada de  $H^+$  a la cèl·lula, les  $H^+$ -ATPases de membrana consumirien més ATP per bombejar més protons i això es traduiria en un augment del consum de glucosa per via glucolítica, disminució de la taxa de creixement i de la biomassa final. És a dir, que encara que l'activitat estigui disminuïda respecte al control, *in vivo* pot succeir que el balanç final d'activitat  $H^+$ -ATPasa corresponent al bombeig de  $H^+$  sigui més important.



**Figura 4.3.** Activitat específica (A.E.)  $H^+$ -ATPasa de membrana en la soca CECT 4100, expressada com a  $\mu\text{mols } P_i \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ prot}$ , davant del xoc tèrmic, de la presència d'etanol (12 %) i de coure (20 mg/l) i de condicions àcides (pHs 3 i 4).

- Efecte del coure:

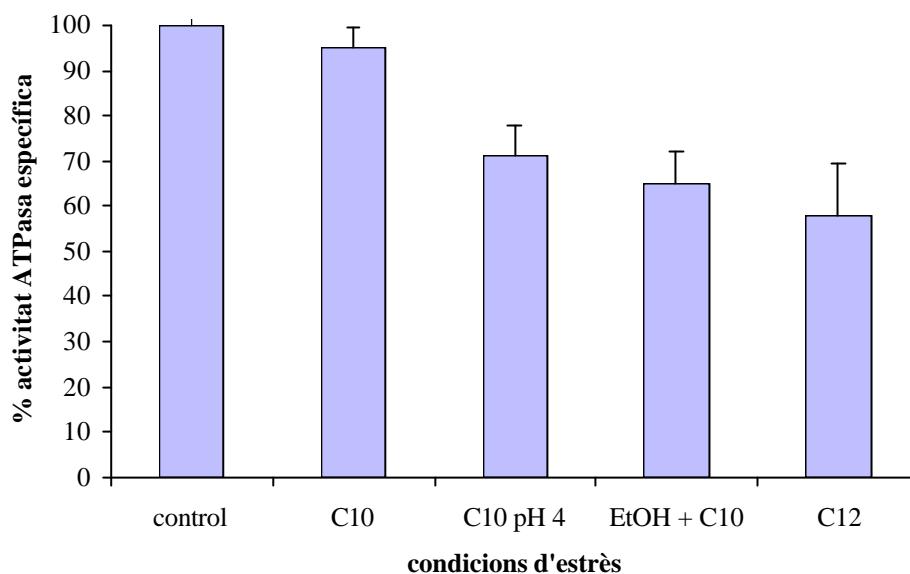
En la figura 4.3, es verifiquen nivells d'inhibició de l'activitat  $H^+$ -ATPasa per part de 20 mg/l de coure al voltant del 25 % en la soca CECT 4100. Tot i tractar-se d'una concentració de coure molt elevada perquè pugui trobar-se en condicions reals de

vinificació, Vidal *et al.* (2001) van descriure diferents nivells de resistència o de capacitat d'adaptació al coure en funció de la soca d'*O. oeni*, per la qual cosa es va considerar interessant comprovar si aquestes diferències també es reflectien a nivell d' $H^+$ -ATPasa de membrana en presència d'una concentració elevada de coure, però similar a la concentració mínima inhibidora o *MIC* (*Minimal Inhibitory Concentration*) de les soques més resistents al coure descrites pels anteriors autors. Sembla evident, doncs, que la resistència al coure s'ha d'explicar a través d'altres mecanismes i que el paper de l' $H^+$ -ATPasa hi seria, en tot cas, secundari. Vidal *et al.* (2001) suggereixen que l'efecte inhibidor d'aquest metall, especialment sobre l'enzim alcohol-deshidrogenasa (ADH) podria consistir en la capacitat de desplaçar i substituir parcialment el cofactor, en el seu cas el  $Zn^{2+}$ . Possiblement, un fenomen competitiu idèntic podria esdevenir-se en l' $H^+$ -ATPasa, on el cofactor és el  $Mg^{2+}$  (Kobayashi i Anraku, 1972; Boyer, 1997).

- Efecte dels àcids grassos C10 i C12:

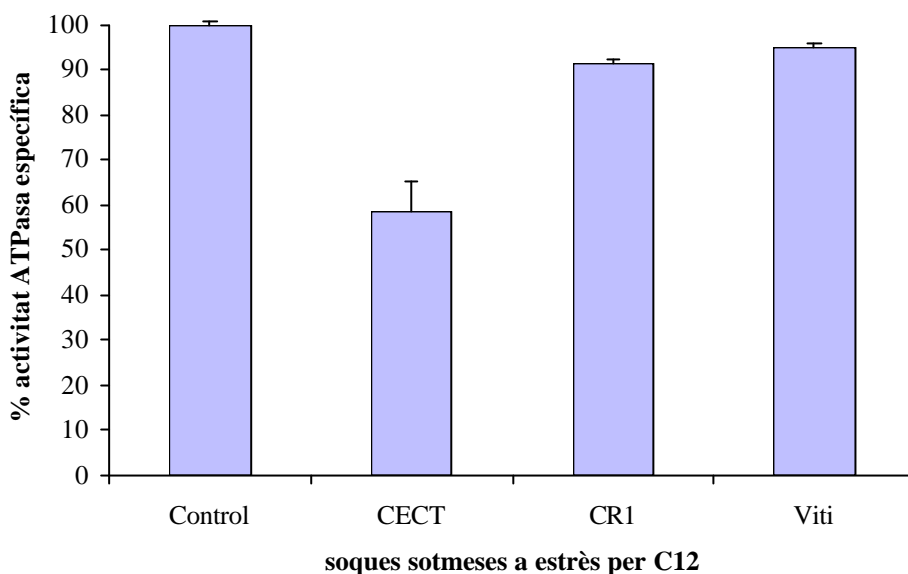
Es va continuar prenent com a referència la soca tipus CECT 4100 i s'hi va constatar un efecte inhibidor dels àcids grassos sobre l'activitat  $H^+$ -ATPasa, que s'accentua a mesura que disminueix el pH: l'efecte inhibidor del C10 a pH 5 és inferior que a pH 4, amb una disminució del 29 % de l'activitat (veure figura 4.4). Si tenim en compte que el  $pK_a$  ( $pK$  aparent) dels àcids grassos és 4,9 (Freese *et al.*, 1973), a pHs més baixos hi ha més percentatge de forma no dissociada, la qual pot penetrar al citoplasma travessant més fàcilment la membrana plasmàtica (Viegas i Sá-Correia, 1991; Capucho i San Romão, 1994). Segons Freese *et al.* (1973), la forma no dissociada és més soluble en els fosfolípids de membrana. Podríem suposar, doncs, que una part d'aquests àcids grassos protonats no arribés al citoplasma sinó que s'incorporés a la membrana, associada a la part hidrofòbica, modificant la seva composició i permeabilitat de forma similar a com ho faria l'etanol. D'aquesta forma, tot i la disminució del  $pH_i$  per la dissociació de les molècules incorporades d'àcid gras i la necessitat de compensar aquesta davallada restablint l'equilibri electroquímic de  $H^+$ , les  $H^+$ -ATPases es veurien influïdes per modificacions en les interaccions de les subunitats proteiques en contacte amb l'embolcall hidròfob de la membrana. Aquestes suposicions es veuen refermades per l'efecte sinèrgic mostrat per C10 i l'etanol (veure

figura 4.4): totes dues molècules contribuirien a modificar la fluïdesa de la membrana (Tourdot-Maréchal, 1991), comportament que també ha estat observat en els llevats (Sá-Correia, 1986).



**Figura 4.4.** Activitat específica  $H^+$ -ATPasa de membrana en la soca CECT 4100, expressada com a  $\mu\text{mols } P_i \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ prot}$ , en presència dels àcids grassos C10 i C12.

L'efecte de C12 ha estat estudiat, a més d'en la soca tipus CECT 4100, en CR1 i en Vitilactic. C12 i C10 són, d'entre els àcids grassos presents en el vi, uns dels que mostren concentracions més elevades i que inhibeixen, en major grau, tant la velocitat de creixement cel·lular com la degradació de l'àcid L-màlic (Edwards i Beelman, 1987; Guilloux-Benatier *et al.*, 1998). A més, C12 presenta una toxicitat relativa superior a C10 perquè l'augment de la cadena hidrocarbonada també n'incrementa la liposolubilitat (Sá-Correia, 1986). Com es pot veure en la gràfica de la figura 4.5, en totes tres soques s'experimenta un descens de l'activitat, més acusat en la soca tipus CECT 4100 (de l'ordre del 60 %), mentre que en CR1 i Vitilactic aquest descens, 11 % i 5 % respectivament, és més tímid, fet que reflecteix una major capacitat d'adaptació a les condicions reals de vinificació. És de suposar, a partir d'allò que s'ha observat per a C10 en CECT 4100, que l'efecte inhibitor de C12 s'accentuaria en presència d'etanol o d'un pH més baix, tal com s'observa en el creixement (Capucho i San Romão, 1994).



**Figura 4.5.** Modificacions de l'activitat específica (A.E.)  $H^+$ -ATPasa de diferents soques d'*O. oeni* sotmeses a estrès per àcid gras C12: CECT = CECT 4100, CR1 i Viti = Vitilactic.

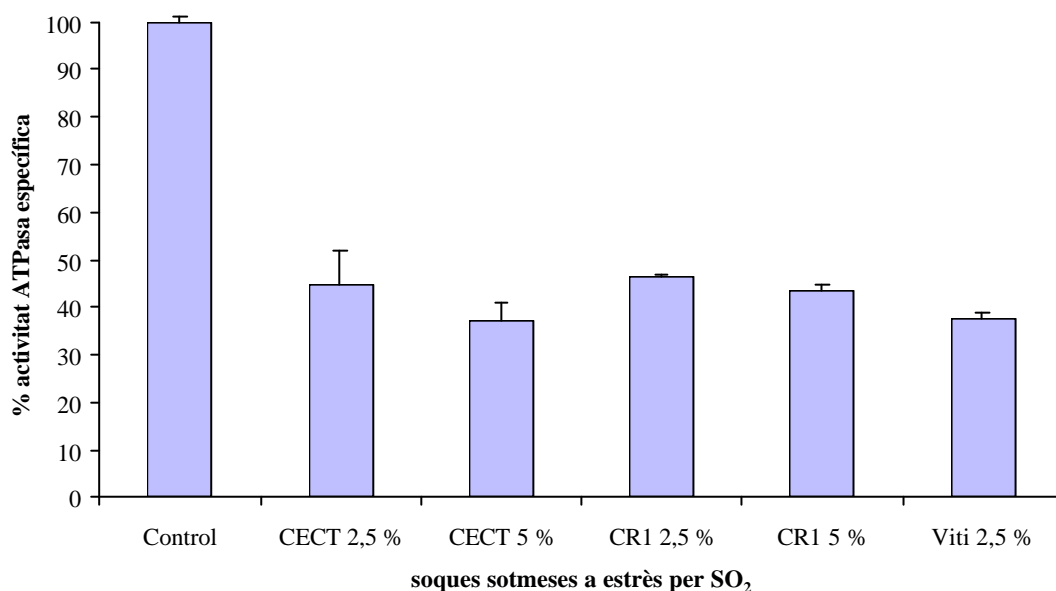
- Efecte del  $SO_2$ :

Com es pot veure en la figura 4.6, nivells moderats de  $SO_2$  molecular lliure, corresponents al 2,5 % –equiparables a 20 mg/l de total en vinificació– i nivells elevats, corresponents al 5 % –equiparables a 40 mg/l– exerceixen inhibicions similars sobre l'activitat  $H^+$ -ATPasa, i en tot cas superiors a les observades amb qualsevol dels altres factors d'estrès. Els resultats suggereixen que s'assoleix un màxim d'inhibició sobre l'enzim i que hi ha una activitat ATPasa residual del 40 %, consideració que vindria corroborada pels obtinguts per Guzzo *et al.* (2000), segons els quals hi hauria dos tipus d'ATPases en *O. oeni*: una  $F_0F_1$ -ATPasa i una P-ATPasa, una de les quals es mostraria més sensible al  $SO_2$ . Això indicaria que l'enzim és altament sensible a les concentracions de  $SO_2$  actiu presents en vinificació quan les cèl·lules s'hi incuben en repòs metabòlic durant 1 hora, i que en la resistència al  $SO_2$  la cèl·lula ha de posar en joc altres mecanismes diferents de l' $H^+$ -ATPasa de membrana, ja que si bé els nivells de  $SO_2$  afecten la viabilitat d'*O. oeni* en el vi, ho fan de forma proporcional a la concentració (Lafon-Lafourcade *et al.*, 1974; Vidal, 1997) mentre aquesta no assoleixi un llindar proper als 5 % de  $SO_2 \cdot H_2O$  (Romano i Suzzi, 1993; Guzzo *et al.*, 1998). La



forma molecular activa del  $\text{SO}_2$ ,  $\text{SO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , s'incorpora per difusió passiva a la cèl·lula i un elevat percentatge es transforma en  $\text{HSO}_3^-$  en modificar-se el pH. En el citoplasma,  $\text{HSO}_3^-$  pot reaccionar amb proteïnes, àcids nucleics i alguns cofactors (Romano i Suzzi, 1993) i inhibir l'activitat de nombrosos enzims, portant a la mort cel·lular. Com que una part de l' $\text{H}^+$ -ATPasa de membrana es troba en contacte amb el citoplasma (Fillingame, 1997), també es veuria afectada per  $\text{HSO}_3^-$ .

A nivell de soca, és CECT 4100 la que sembla més perjudicada, amb una reducció de l'activitat ATPasa de membrana del 55 % per a 2,5 % de  $\text{SO}_2$  actiu i del 63 % per al 5 % de  $\text{SO}_2$  actiu. Per a CR1 i Vitilactic la inhibició també supera el 50 %, si bé la soca comercial es mostra lleugerament més sensible a la presència de  $\text{SO}_2$ .



**Figura 4.6.** Modificacions de l'activitat específica (A.E.) ATPasa de les 3 soques d'estudi *O. oeni* sotmeses a estrès per 2,5 % i 5 % de  $\text{SO}_2$  lliure: C4100 = CECT 4100, CR1 i Viti = Vitilactic.

## 4.2. Estudi dels perfils de proteïnes de membrana i de la possible expressió de proteïnes d'estrès en soques d'*O. oeni*

### 4.2.1. Electroforesis en condicions desnaturalitzants (SDS-PAGE) de les fraccions de membrana

Per a l'estudi de les possibles modificacions en els patrons de perfils proteics de les fraccions de membrana d'*O. oeni*, s'han emprat les mateixes condicions d'estrès que s'han utilitzat en l'estudi sobre l'activitat ATPasa.

Prèviament, es comprovà que no existien diferències significatives en el perfil electroforètic de les fraccions de membrana al llarg de les diferents fases de creixement, per la qual cosa les conclusions sobre expressió proteica que es poguessin extreure enfront de diverses situacions d'estrès en mostres recollides cap al final de la fase exponencial, eren extensibles als altres estadis de creixement i es demostrava que no depenien d'aquests (veure figura 4.7).

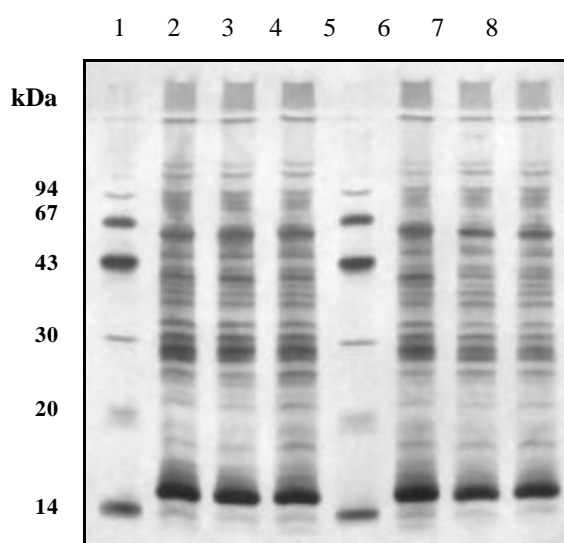
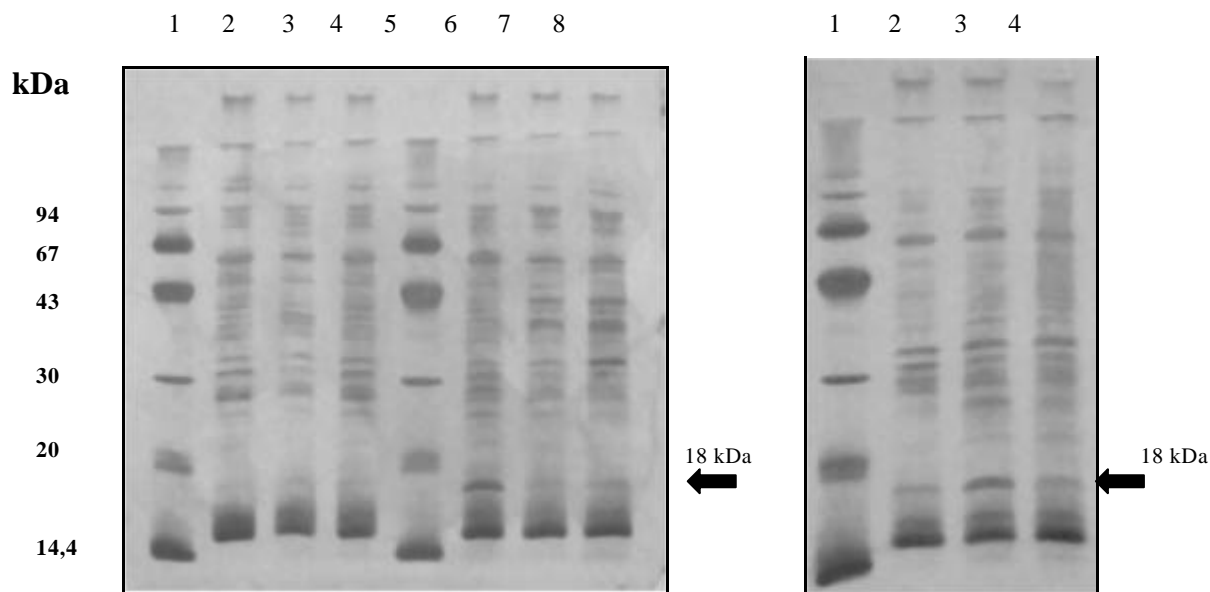


Figura 4.7. Electroforesi SDS-PAGE de fracció de membrana de la soca CECT 4100 en diferents etapes de creixement: fase exponencial: inici (7), mig (4 i 8) i final (2); fase estacionària: inici (3) i mig (6); 1 i 5): LWM (marcador de p. m.)

- Efecte del xoc tèrmic, de l'etanol i de la disminució del pH en la soca tipus CECT 4100:

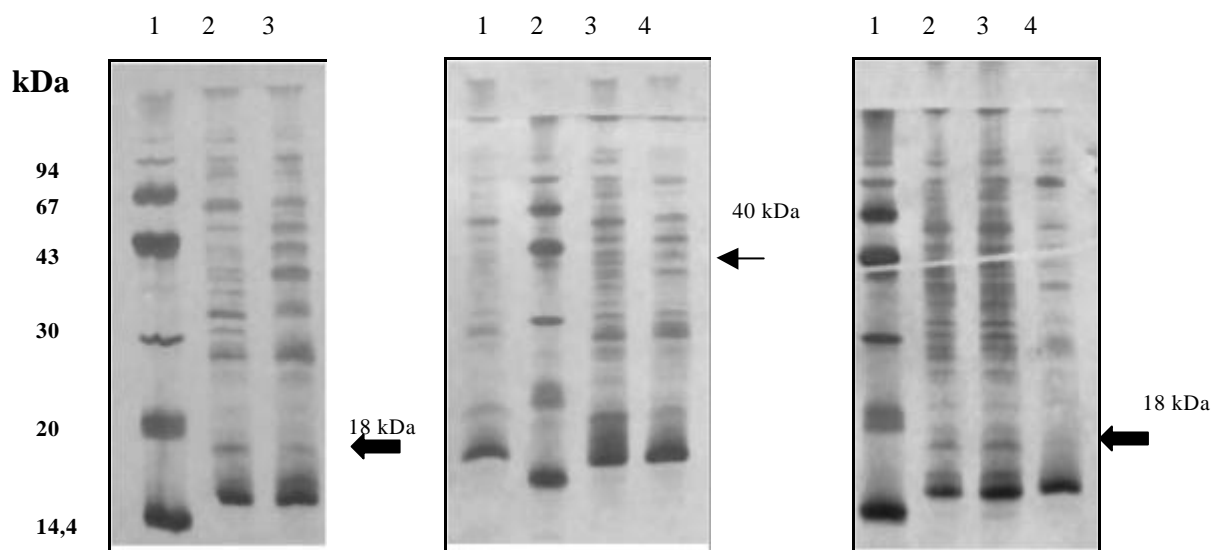
Pel que fa al xoc tèrmic, que consisteix en una incubació del cultiu cel·lular a 42°C cap al final de la fase exponencial de creixement, es mostra en la figura 4.8 el perfil corresponent a CECT 4100, on s'observa l'augment d'expressió d'una banda proteica situada al voltant dels 18 kDa i que possiblement es tracta de la proteïna Lo18 descrita per Guzzo *et al.* (1994). Es confirmaria, doncs, que aquesta banda se sobreexpressa en les diverses soques d'*O. oeni* enfront d'un xoc tèrmic, com ho corroboren els resultats

obtinguts amb CR1 (figura 4.9) i Vitilactic (resultats no mostrats), tot i que també apareix, atenuada, en les condicions control.



**Figura 4.8.** Perfil electroforètic SDS-PAGE de fracció de membrana de la soca CECT 4100 en diferents condicions d'estrès. Relació de mostres: 1) LMW, 2) Control, 3) Cu 20 mg/l, 4) C12 5 mg/l, 5) LMW, 6) xoc tèrmic 42 °C, 7) 20 mg/l SO<sub>2</sub>, 8) soca CR1 20 mg/l SO<sub>2</sub>.

**Figura 4.9.** Perfil electroforètic SDS-PAGE de fracció de membrana de la soca CR1 en diferents condicions d'estrès: 1) LMW, 2) Control, 3) xoc tèrmic 42 °C, 4) C12 5 mg/l.



**Figures 4.10, 4.11 i 4.12.** Perfils electroforètics SDS-PAGE de fracció de membrana de la soca CR1: 1) LMW, 2) 12 % etanol i 3) 20 mg/l SO<sub>2</sub> (figura 4.10); soca CECT 4100: 1) C12 5 mg/l, 2) LMW, 3) Control, 4) xoc àcid pH 3 (figura 4.11); soca CR1: 1) LMW, 2) Control, 3) xoc tèrmic 42 °C, 4) xoc àcid, pH 3 (figura 4.12).

L'etanol (12 %) mostra una certa inducció de la proteïna de p.m. de 18 kDa, si bé, en conjunt, el perfil proteic resultant de les fraccions de membrana sotmeses a una incubació en presència d'etanol durant 1 hora és molt similar als controls (veure figura

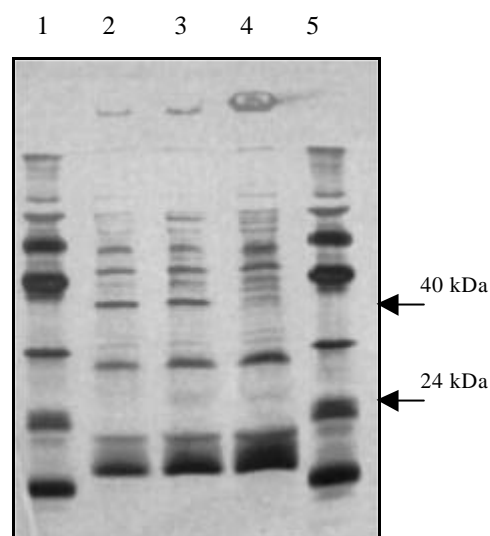
**4.10).** Respecte a l'estrès provocat per un increment de les condicions àcides, que consistia en la incubació de cèl·lules crescudes a pH 5, durant 1 hora a pH 3, es pot observar una disminució, en general, de la síntesi proteica (figura 4.11), tot i que en CECT 4100 sembla que se sobreexpressi una banda proteica d'uns 40 kDa, que apareix més atenuada en els controls. Aquesta inhibició general de l'expressió de bandes proteiques es pot fer extensible al cas de CR1, com es pot veure en la figura 4.12, i possiblement també al cas de Vitilactic, tot i que no disposem de dades per acabar-ho de confirmar.

- Efecte de l'àcid gras C12:

En la figura 4.11 (referida a CECT 4100), es constata una certa inhibició general de l'expressió proteica en el cas de C12, anàloga a la descrita en xoc àcid, que no es manifesta en CR1 (figura 4.9). Possiblement, en CECT 4100, podria explicar-se perquè C12 afavoriria l'acidificació del medi intern en dissociar-se, i les conseqüències sobre el metabolisme cel·lular i la síntesi proteica serien similars a les produïdes pel pH àcid. Les modificacions de  $\Delta\Psi$  i de *pmf* a través de la membrana plasmàtica, així com les alteracions de la composició d'aquesta, implicarien canvis i dificultats en el transport d'aminoàcids i d'oligopèptids des del medi extracel·lular fins al citoplasma (Konings *et al.*, 1994). En canvi, CR1, millor adaptada a condicions reals de vinificació, disposaria de més recursos metabòlics per contrarestar aquests efectes, com per exemple, una major capacitat de regular l'activitat  $H^+$ -ATPasa, com s'ha vist en l'apartat 4.1.3.

- Efecte del coure:

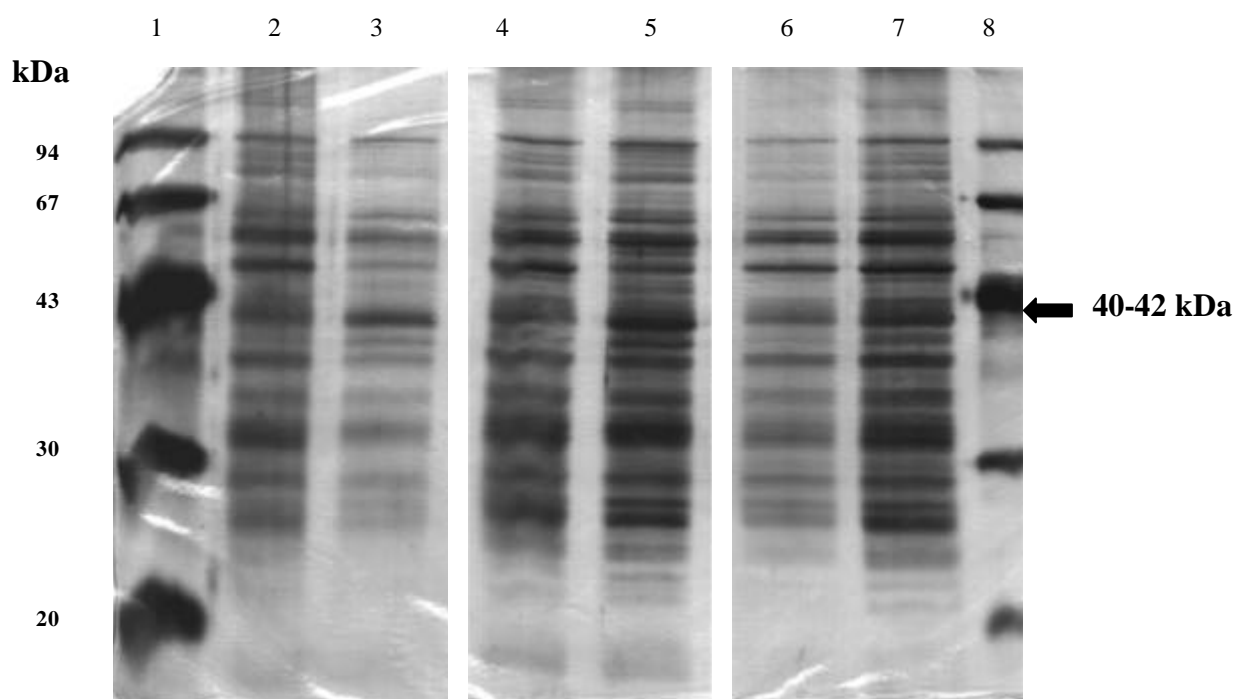
En CECT 4100 (figura 4.13), s'ha observat que en concentracions de 10 i 20 mg/l de coure se sobreexpressa una banda de 40 kDa, com també succeeix en el xoc àcid (veure figura 4.11), mentre que s'inhibeix parcialment la síntesi d'una proteïna de p.m. aparent de 24 kDa, com en el cas del xoc àcid (veure figura 4.11 i 4.13). Malauradament, no es disposa de perfils proteics corresponents a les altres dues soques, si bé els resultats obtinguts en altres condicions fan pensar que ens trobaríem davant d'unes respostes similars.



**Figura 4.13.** Perfil electroforètic SDS-PAGE de fraccions de membrana de CECT 4100: 1) LMW, 2) xoc àcidic pH 3, 3) Cu 10 mg/l, 4) Control, 5) LMW.

- Efecte del SO<sub>2</sub>:

L'observació que en CECT 4100 se sobreexpressava una proteïna de p.m. d'uns 40 kDa, que no es produïa en la resta de condicions, va fer creure convenient comprovar tal sobreexpressió en les altres dues soques utilitzades en les microvinificacions: CR1 i Vitilactic. Efectivament, en totes tres soques es podia observar la mateixa banda sobreexpressada (figura 4.14). Es va considerar convenient realitzar una sèrie de proves de cara a una caracterització d'aquesta proteïna, principalment perquè s'expressava específicament en presència de SO<sub>2</sub>, que fins ara ha estat un factor inhibidor d'*O. oeni* poc estudiat a nivell d'incidències moleculars sobre aquest bacteri i del qual no es tenia coneixença de cap proteïna específica davant d'aquella condició d'estrès. Els resultats observats en la inhibició dels nivells d'H<sup>+</sup>-ATPasa, superiors als produïts pels altres components d'estrès, i la consideració que el sulfitatge és una pràctica habitual en vinificació, refermaven aquest criteri.



**Figura 4.14.** Perfil d'electroforesi realitzada amb el sistema Mini-Protean<sup>®</sup> II Cell System (Bio-Rad Laboratories) de les fraccions de membrana de les 3 soques d'*O. oeni*, en presència de 20 mg/l de SO<sub>2</sub>: 1 i 8) LMW, 2) Control CECT 4100, 3) CECT 4100 20 mg/l SO<sub>2</sub>, 4) Control CR1, 5) CR1 20 mg/l SO<sub>2</sub>, 6) Control Vitilactic, 7) Vitilactic 20 mg/l SO<sub>2</sub>. (Tinció amb nitrat de plata).

#### 4.2.2. Determinació de la seqüència N-terminal de la proteïna de 42 kDa

Per caracteritzar la proteïna de p.m. propera a 40 kDa sobreexpressada en presència de SO<sub>2</sub> i altres condicions d'estrès calia, si més no, seqüenciar-ne el fragment N-terminal. Per aquesta raó, es va transferir la proteïna en qüestió des del gel d'electroforesi a una membrana de PVDF seguint el mètode descrit per Matsudaira (1987) (apartat **3.7.6 de Materials i mètodes**), pas previ requerit per a poder realitzar la seqüenciació per degradació automàtica d'Edman. D'aquesta forma, es va obtenir una seqüència de 17 aminoàcids que va permetre identificar la proteïna com a una gliceraldehid-3-fosfat-deshidrogenasa (GADPH), amb la qual també es corresponia el pes molecular de 40 kDa.

L'alineament amb seqüències homòlogues dels bancs de dades (*Swiss-Prot*) mitjançant l'eina informàtica BLASTP, com s'indica a la taula **4.4**, mostra uns elevats nivells d'identitat entre el fragment N-terminal en qüestió i la família de GAPDHs, entre un 62 i un 88 %. Entre les seqüències amb un nivell d'identitat més elevat, es troben les corresponents a un receptor proteic en *Streptococcus equisimilis* (Gase *et al.*, 1996) ([Q59906](#)) i en *Streptococcus pyogenes* (Lottenberg *et al.*, 1992) ([P50467](#)), i a dues proteïnes de superfície de membrana ([Q9R5J2](#)) (Pancholi i Fischetti, 1992) i ([Q9R495](#)) (Kolberg i Sletten, 1996), pertanyents igualment al gènere *Streptococcus*, relativament proper a *O. oeni* (Dicks *et al.*, 1995b).

## Taula 4.4. Cerca de seqüències N-t homològues mitjançant BLASTP.

```

BLASTP 2.0MP-WashU

Copyright (C) 1996-2001 Washington University, Saint Louis, Missouri USA.
All Rights Reserved.
Reference: Gish, W. (1996-2001) http://blast.wustl.edu

Query= (17 letters)
Database: swall
          892,628 sequences; 282,614,701 total letters.
Searching....10....20....30....40....50....60....70....80....90....100% done

```

Sequences producing High-scoring Segment Pairs:	High Score	Smallest Sum Probab. (*) P(N)	LN
SWALL: <a href="#">Q9R5J2</a> <a href="#">Q9R5J2</a> Surface dehydrogenase (Fragment).	68	0.11	1
SWALL: <a href="#">TYPH_LACCA_P19663</a> Thymidine phosphorylase (EC 2.4.2...	65	0.21	1
SWALL: <a href="#">Q9Y7H1</a> <a href="#">Q9Y7H1</a> Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogen...	63	0.31	1
SWALL: <a href="#">P90514</a> <a href="#">P90514</a> Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogena...	62	0.38	1
SWALL: <a href="#">Q9R495</a> <a href="#">Q9R495</a> 40 kDa streptococcal group A surface ...	62	0.38	1
SWALL: <a href="#">Q8WNY0</a> <a href="#">Q8WNY0</a> Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogen...	61	0.46	1
SWALL: <a href="#">BAC07472</a> <a href="#">BAC07472</a> Glyceraldehyde-3-phosphate-dehydr...	61	0.46	1
SWALL: <a href="#">BAC07473</a> <a href="#">BAC07473</a> Glyceraldehyde-3-phosphate-dehydr...	61	0.46	1
SWALL: <a href="#">Q9NJT5</a> <a href="#">Q9NJT5</a> Putative glycosomal glyceraldehyde-3-...	60	0.54	1
SWALL: <a href="#">G3P_STREQ_Q59906</a> Glyceraldehyde 3-phosphate dehydro...	68	0.55	1
SWALL: <a href="#">G3P_STRPY_P50467</a> Glyceraldehyde 3-phosphate dehydro...	68	0.55	1
SWALL: <a href="#">Q97NL1</a> <a href="#">Q97NL1</a> Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogen...	68	0.55	1
SWALL: <a href="#">Q8X221</a> <a href="#">Q8X221</a> Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogen...	62	0.55	1
SWALL: <a href="#">Q9ALW2</a> <a href="#">Q9ALW2</a> Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogen...	68	0.56	1
SWALL: <a href="#">Q8VVB9</a> <a href="#">Q8VVB9</a> Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogen...	68	0.56	1
SWALL: <a href="#">Q9CDH4</a> <a href="#">Q9CDH4</a> Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogen...	68	0.56	1
SWALL: <a href="#">BAC05494</a> <a href="#">BAC05494</a> Nephritis-associated plasmin rece...	68	0.56	1
SWALL: <a href="#">BAC05495</a> <a href="#">BAC05495</a> Nephritis-associated plasmin rece...	68	0.56	1
SWALL: <a href="#">BAC05496</a> <a href="#">BAC05496</a> Nephritis-associated plasmin rece...	68	0.56	1
SWALL: <a href="#">BAC05497</a> <a href="#">BAC05497</a> Nephritis-associated plasmin rece...	68	0.56	1
SWALL: <a href="#">AAM73770</a> <a href="#">AAM73770</a> Glyceraldehyde-3-phosphate dehydr...	68	0.56	1
SWALL: <a href="#">AAM73771</a> <a href="#">AAM73771</a> Glyceraldehyde-3-phosphate dehydr...	68	0.56	1
SWALL: <a href="#">AAM73772</a> <a href="#">AAM73772</a> Glyceraldehyde-3-phosphate dehydr...	68	0.56	1
SWALL: <a href="#">AAM73773</a> <a href="#">AAM73773</a> Glyceraldehyde-3-phosphate dehydr...	68	0.56	1
SWALL: <a href="#">AAM74950</a> <a href="#">AAM74950</a> Nephritis-associated plasmin rece...	68	0.56	1
SWALL: <a href="#">AAM78808</a> <a href="#">AAM78808</a> Glyceraldehyde-3-phosphate dehydr...	68	0.56	1
SWALL: <a href="#">G3P_LACDE_Q32755</a> Glyceraldehyde 3-phosphate dehydro...	68	0.56	1
SWALL: <a href="#">AAL00628</a> <a href="#">AAL00628</a> Glyceraldehyde 3-phosphate dehydr...	68	0.59	1
SWALL: <a href="#">Q928H9</a> <a href="#">Q928H9</a> Gap protein.	67	0.65	1
SWALL: <a href="#">Q8Y4I1</a> <a href="#">Q8Y4I1</a> Gap protein.	67	0.65	1
SWALL: <a href="#">Q8X222</a> <a href="#">Q8X222</a> Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogen...	62	0.68	1
SWALL: <a href="#">O15558</a> <a href="#">O15558</a> Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogen...	58	0.72	1
SWALL: <a href="#">O15559</a> <a href="#">O15559</a> Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogen...	58	0.72	1
SWALL: <a href="#">Q9TQZ5</a> <a href="#">Q9TQZ5</a> Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogen...	57	0.80	1
SWALL: <a href="#">G3P2_JACOR_P80447</a> Glyceraldehyde 3-phosphate dehydr...	56	0.87	1
SWALL: <a href="#">Q97652</a> <a href="#">Q97652</a> Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogen...	56	0.87	1
SWALL: <a href="#">Q97653</a> <a href="#">Q97653</a> Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogen...	56	0.87	1
SWALL: <a href="#">Q9MZ05</a> <a href="#">Q9MZ05</a> Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogen...	56	0.87	1
SWALL: <a href="#">P97617</a> <a href="#">P97617</a> Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogen...	56	0.87	1
SWALL: <a href="#">Q9L5X6</a> <a href="#">Q9L5X6</a> Extracellular glyceraldehyde-3-phosph...	63	0.93	1
...			

(\*) El valors de puntuació (*High Score*) i de probabilitat (P) són paràmetres interns de BlastP que consideren, conjuntament, els % d'identitat i d'homologies positives (aminoàcids idèntics + aminoàcids amb idèntiques propietats) i en fan una baremació

Com es pot advertir, una de les seqüències amb major identitat és catalogada com a timidina fosforilasa (P19663), descrita en *Lb. casei* (Avraham *et al.*, 1990), tot i que en presentar un p.m. de 80 kDa i no existir cap referència sobre localització no citoplasmàtica es descartà la possibilitat que la banda proteica sobreexpressada correspongués a aquest enzim.

El fet que la seqüenciació i el posterior alineament indiquessin que es tractava d'una proteïna de la família de les GAPDHs, principalment descrites com a enzims citoplasmàtics participants de la via glucolítica, féu necessària una anàlisi exhaustiva de les diferents seqüències obtingudes amb l'alineament BLASTP per comprovar si existien referències sobre membres o homòlegs d'aquesta família enzimàtica, E.C. 1.2.1.12 (Bergmeyer, 1974), en altres localitzacions cel·lulars. Efectivament, han estat descrites altres funcions diferents de la glucolítica. Com ja s'ha apuntat més amunt, en *Streptococcus* fou identificada i purificada una proteïna de superfície amb activitat deshidrogenasa i elevada capacitat d'unió amb altres proteïnes, com ara lisozim, plasmina, fibronectina i proteïnes citoesquelètiques com l'actina i la miosina (Pancholi i Fischetti, 1992), i que presentava, alhora, activitat ADP-ribosiladora (Pancholi i Fischetti, 1993) i una estructura tetraoligomèrica, amb monòmers de 36 kDa. Per altra part, ja se sap des de fa temps, segons Arnold i Pette (1968), que en cèl·lules eucariotes els enzims glucolítics es poden trobar associats a membrana o a estructures citoesquelètiques.

També en cèl·lules eucariotes, Sirover (1996, 1999) ha descrit que GAPDH es trobaria implicada en altres funcions essencials per a la viabilitat cel·lular, a part de la clàssicament acceptada de la glucòlisi: com a proteïna de membrana, intervindria en l'endocitosi, mentre que en el citoplasma, participaria en el control de la traducció en l'expressió gènica, i en el nucli, en l'exportació del tRNA nuclear i en la replicació i reparació del DNA.

Més endavant, Gase *et al.* (1996) van aportar dades sobre l'existència d'una proteïna d'unió a plasmina i plasminogen amb activitat GAPDH (Q59906) que seria transportada a la paret cel·lular d'*Streptococcus equisimilis*; Kolberg i Sletten (1996) sobre una proteïna de 40 kDa (Q9R495) reconeguda per anticossos monoclonals contra la paret cel·lular d'*Streptococcus pneumoniae* amb la mateixa activitat enzimàtica i Modun i Williams (1999), han detectat una proteïna d'unió a transferrina, de 42 kDa i



ubicada també a nivell de paret cel·lular i membrana plasmàtica en *Staphylococcus aureus* i *Staphylococcus epidermidis*, que presenta activitat GAPDH (veure taula 4.5).

**Taula 4.5.** Alineament múltiple de la seqüència problema, mitjançant CLUSTAL W 1.82 (Thompson *et al.*, 2000) amb 16 seqüències de GAPDHs d'altres organismes, amb les quals presenta valors d'homologia més elevats <sup>1</sup> o que es troben en localitzacions no citoplasmàtiques.

```

CLUSTAL W (1.82) multiple sequence alignment

Q9Y7H1      -MVIKVGINGFGRIGRLVFRSSFERDD----IEVVAVNDPFINLDYMVYLTKYDSTHGRF  55
O15558      ---VKVGINGFGRIGRVVFRAAQMRPD----IEIVGIND-LLDAEYMAYSCLKYDSTHGRF  52
Q97NL1      -MVVKVGINGFGRIGRLAFRRIQNVEG----VEVTRIND-LTDPVMLAHLKLYDTTQGRF  54
Q9L5X6      ----KVGINGFGRIGRLAFRRIQNVEG----VEVTRIND-LTDPVMLAHLKLYDTTQGRF  51
Q8VVB9      -MVVKVGINGFGRIGRLAFRRIQNVEG----VEVTRIND-LTDPVMLAHLKLYDTTQGRF  54
Q9ALW2      -MVVKVGINGFGRIGRLAFRRIQNVEG----VEVTRIND-LTDPNMLAHLKLYDTTQGRF  54
G3P_STREQ   --VVKVGINGFGRIGRLAFRRIQNVEG----VEVTRIND-LTDPNMLAHLKLYDTTQGRF  53
G3P_STRP    -YVVKVGINGFGRIGRLAFRRIQNIEG----VEVTRIND-LTDPNMLAHLKLYDTTQGRF  54
Q9R5J2      --VVKVGINGFGRIGRLAFRRIQNIEG----VEVTAIND-LTDPNM----- 39
Q9R495      --VVKVGINGFGXIGXLAFDXIQNV----- 23
Q9CDH4      -MVVKVGINGFGRIGRLAFRRIQNVEG----VEVVAIND-LTDPAMLAHLKLYDTTQGRF  54
TYPH_LACCA  --MVKIGINEFGRIGRLAFRRIYEL----- 23
G3P_LACDE   -MTVKIGINGFGRIGRLAFRRIMDLGEETKDI EVVAIND-LTTPAMLAHLKLYDSTHGT  58
40kDa      -MVKIGINGFGXIXRLAF----- 17
O15559      -MVVKVAINGFGRIGRLVFRACRKLYP--KDVQVVAIHD-LGDIKTNVYLLKYDTAHR  56
P90514      MSHIKVGINGFGRIGRLVFRAAVESGK----VDVVAINEPFMSVG-----LHG-V  45
Q8X221      -MVVKVGINGFGRIGRIVFRNAVSTMMS----RSLPCTTPSLKPNMLRICIKYDSTHGQ  55
          *:.** ** * :.*

```

(1) Com a criteri de selecció per a la presentació dels resultats, s'ha considerat que l'alineament entre la seqüència N-t problema de 17 aminoàcids i cada seqüència homòloga ha d'incloure tots els aminoàcids. És a dir, que la determinació del percentatge d'identitat realitzada per l'aplicació Clustal 1.0 es faci en base a la totalitat de la seqüència obtinguda de 17 aminoàcids.

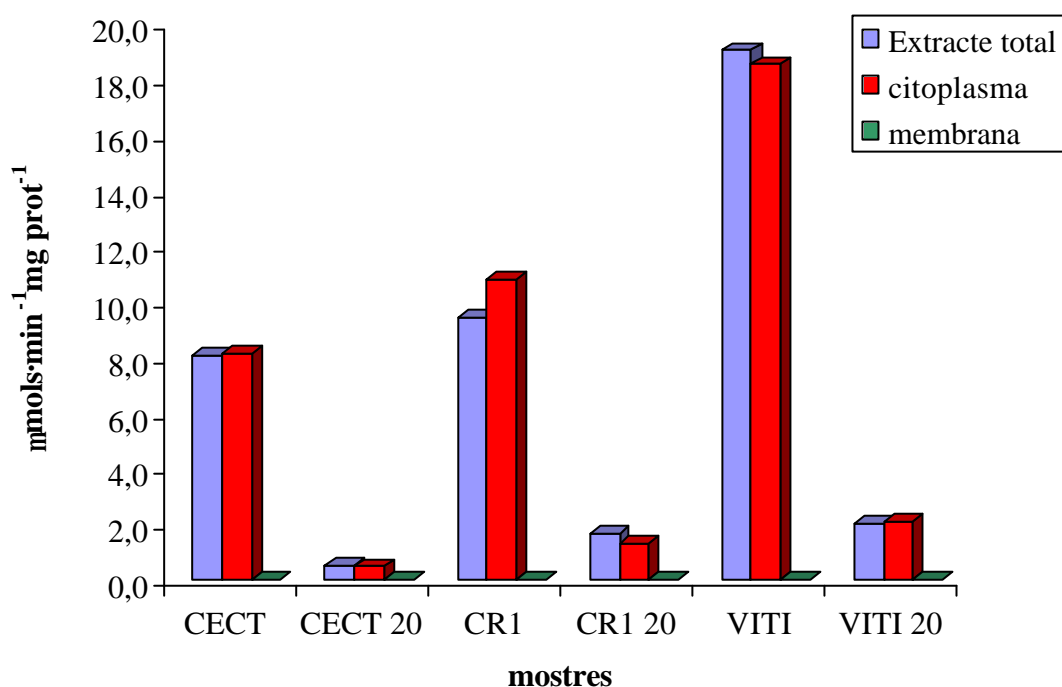
Símbols consens de ClustalW: “\*”: significa que els aminoàcids d'una columna són idèntics per a totes les seqüències alineades; “:”: es refereix a substitucions d'aminoàcids conservades segons els criteris físico-químics; “.”: es refereix a substitucions semiconservades.

### 4.2.3. Caracterització parcial de la proteïna de 40 kDa

- Assaigs d'activitat GAPDH

Per comprovar, doncs, si la proteïna sobreexpressada en *O. oeni* presentava activitat GAPDH, es realitzaren assaigs enzimàtics en l'extracte cel·lular total, la fracció citoplasmàtica i la fracció de membrana en cèl·lules de les soques CECT 4100, CR1 i Vitilactic, incubades en condicions control, per una banda, i per l'altra en presència de 2,5 % de SO<sub>2</sub> en forma molecular, SO<sub>2</sub>.H<sub>2</sub>O. Els resultats, com es pot veure en la figura 4.15, demostren que l'activitat específica només es troba localitzada

en la fracció citoplasmàtica per a totes tres soques, i els valors són molt similars als de l'extracte cel·lular total. Així, en el cas de CECT 4100, que presenta menor activitat en relació a les altres dues soques, l'extracte cel·lular total i la fracció citoplasmàtica controls presenten valors al voltant de  $8 \mu\text{mols NADH min}^{-1} \text{mg prot total}^{-1}$ , mentre que en la fracció de membrana no ha estat possible observar cap mena d'activitat, fet que es pot estendre a les altres dues soques, que mostren, en canvi, major activitat en l'extracte cel·lular total i la fracció citoplasmàtica:  $9,5$  i  $10,9 \mu\text{mols NADH}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg prot total}^{-1}$ , respectivament, en el cas de CR1, i  $19,1$  i  $18,5 \mu\text{mols NADH}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg prot total}^{-1}$ , respectivament, en el cas de Vitilactic.



**Figura 4.15.** Activitat GAPDH en les fraccions d'extracte cel·lular total, citoplasma i membrana, de les soques CECT 4100 (CECT), CR1 i Vitilactic (VITI): condicions control (CECT, CR1 i VITI) i condicions d'estrès (20 mg/l de SO<sub>2</sub> corresponents a 2,5 % de SO<sub>2</sub> lliure molecular).

Les mostres de fracció citoplasmàtica de cèl·lules incubades en presència de SO<sub>2</sub> pateixen una inhibició d'aquesta activitat força accentuada, com també es pot veure en la figura 4.15, mentre que a nivell de membrana plasmàtica tampoc apareix cap mena d'activitat. En CECT 4100, l'activitat davalla fins a valors 16 vegades inferiors als de la

condició control, i en CR1 i Vitilactic, aquesta disminució és de gairebé 10 vegades. Davant dels resultats obtinguts, en què no apareixia cap mena d'activitat GAPDH en les fraccions de membrana mentre que sí que s'observava en el citoplasma, tot semblava indicar que aquesta havia de correspondre totalment a l'enzim glucolític, d'ubicació en el citoplasma, i que ha estat caracteritzat en alguns bacteris làctics, com per exemple, *L. lactis* (Even *et al.*, 1999) i del qual, concretament de la soca *L. lactis ssp. lactis* IL1403, es disposa ja de la seqüència del genoma complet (Bolotin *et al.*, 2001). Es va comprovar, en la cerca d'homologia amb la seqüència N-terminal de la proteïna sobreexpressada a través del programa BLASTP, que hi havia un 75 % d'identitat amb la seqüència d'aminoàcids N-terminals derivada de l'*ORF* corresponent a la GAPDH citosòlica en la soca d'*L. lactis* anteriorment esmentada.

En *O. oeni*, tot i que encara no es disposa de la seqüència completa del genoma i no s'ha aïllat ni purificat l'enzim GAPDH, sí que es coneix que es tracta d'un enzim constitutiu del seu metabolisme energètic, com en la resta de bacteris làctics, ja siguin homo o heterofermentatius (Desmazeaud i Roissart, 1994). Tot plegat, fa pensar que l'activitat detectada es corresponia íntegrament, doncs, a aquest enzim.

Si fos així, es podria interpretar que, en veure's inhibida l'activitat de l'enzim glucolític gliceraldehid-3-fosfat-deshidrogenasa pel SO<sub>2</sub>, aquest afectaria directament el catabolisme dels sucres i, per tant, un dels dos mecanismes d'obtenció d'energia claus en el desenvolupament d'*O. oeni* en el vi, essent l'altre la degradació d'L-màlic (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1998). Malgrat que són diverses les evidències aportades pel que respecta a l'efecte del SO<sub>2</sub> sobre el creixement dels bacteris làctics i la FML (Romano i Suzzi, 1993; Henick-Kling i Park, 1994; Vidal *et al.*, 2001, entre molts altres), fins ara ningú n'havia estudiat la influència sobre la via heterofermentativa d'hexoses i pentoses. Darrerament, Even *et al.* (1999) han demostrat el paper clau d'aquest enzim en el control del flux de la glucòlisi i l'orientació del catabolisme de l'àcid pirúvic en *L. lactis*, exemple de bacteri làctic homofermentatiu. A més, la intensitat de l'efecte directe del SO<sub>2</sub> sobre el metabolisme seria dependent de soca, segons el que es pot extreure de la mateixa gràfica **4.15**.

Tanmateix, si bé aparentment no s'observava activitat en la fracció de membrana, no es podia concloure definitivament que la proteïna sobreexpressada no presentés, *in vivo*, aquesta activitat. No era descartable la possibilitat que, al llarg del procés de fraccionament subcel·lular, es produís una certa desnaturalització d'aquest proteïna o bé

que no fos activa en les condicions en què es trobava resuspesa la fracció de membrana. Considerant aquesta última hipòtesi, i com que el tampó de l'extracte cel·lular i de la fracció citoplasmàtica (tampó II) no era ben bé el mateix que el de l'altra fracció (tampó III) (per a conèixer la composició dels dos tampons, veure apartat **3.7.3**), es va modificar el darrer pas de purificació de la membrana plasmàtica per a ressuspendre-la en el tampó II, tot i que tampoc no s'hi va detectar cap mena d'activitat GAPDH.

- **Immunoblotting**

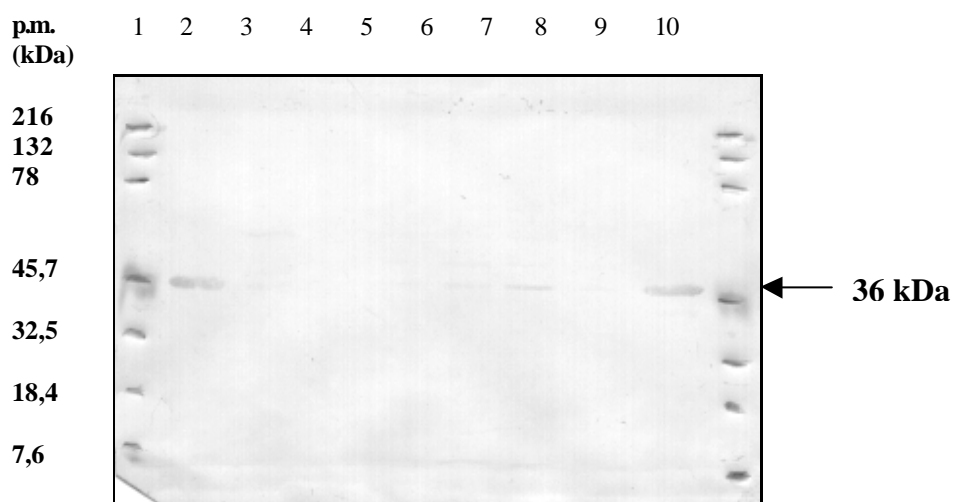
La realització d'un immunoassaig tipus *Western blot* podia aportar informació addicional sobre si la proteïna sobreexpressada es tractava d'una GAPDH encara que no presentés activitat específica en la fracció de membrana, per les possibles causes més amunt esmentades.

Per aquesta raó, es va realitzar una cerca dels diferents anticossos disponibles comercialment que tinguessin com a antigen la proteïna GAPDH i que mostressin especificitat també amb enzims GAPDH d'origen bacterià. L'anticòs seleccionat responia a aquests requisits, ja que a part de reconèixer l'enzim provinent de cèl·lules eucariotes també havia estat descrita la interacció amb *Bacillus stearothermophilus* i *E. coli* (Biogenesis Ltd. Antibody datasheet).

Com es pot veure en la figura **4.16**, no apareix hibridació significativa amb cap banda proteica de les diferents fraccions de membranes assajades. En els carrils 2 i 9 sorgeixen les bandes corresponents a una mostra purificada de GAPDH de cèl·lules de teixit muscular de conill (Sigma, G 0763), d'un p.m. de 36 kDa (es tracta d'un tetràmer amb 4 subunitats d'identíc p.m. que se separen en una electroforesi desnaturalitzant) (Bode *et al.*, 1975), emprades com a control de l'assaig. La resta de carrils, des del 3r fins al 8è, corresponen a les fraccions subcel·lulars de membrana plasmàtica de les mateixes mostres, i en idèntiques condicions que hem vist en l'assaig d'activitat enzimàtica, és a dir: CECT 4100 control, CECT 4100 2,5 % SO<sub>2</sub>, CR1 control, CR1 2,5 % SO<sub>2</sub>, Vitilactic control i Vitilactic 2,5 % SO<sub>2</sub>, respectivament. Tot i així, en el recorregut corresponent a la mostra Vitilactic control, s'intueix una banda molt lleument tenyida a la mateixa alçada que els controls, i l'explicació podria ser que es tractés no pas de la proteïna sobreexpressada —el p.m. de la qual no s'hi correspondria—

sinó de l'enzim glucolític que, de forma residual, podia haver-se associat a la fracció de membrana.

Amb tot, cal remarcar que, en consultes posteriors en les bases de dades bioinformàtiques disponibles *on-line*, es va comprovar que la seqüència immunogènica de l'epítot de GAPDH contra la qual mostrava especificitat l'anticòs emprat, per bé que representava la regió més conservada de GAPDH d'humà i ratolí, no mostrava cap percentatge d'identitat amb la seqüència completa d'*E. coli* ([www.expasy.ch/sprot/hamap/hamap\\_stat.html](http://www.expasy.ch/sprot/hamap/hamap_stat.html)). Caldria, per tant, disposar d'un anticòs primari específic d'una GAPDH d'origen bacterià per poder arrodonir l'estudi realitzat, anticòs que no estava disponible comercialment en el moment que es realitzaren aquests assaigs.



**Figura 4.16.** Immunoassaig *Western blot* de les diferents fraccions cel·lulars de les 3 soques d'estudi d'*O. oeni* en presència de l'anticòs policlonal contra GAPDH: 1) i 10) marcador de p.m., 2) i 9) control positiu (GAPDH de conill), 3) CECT 4100 control, 4) CECT 4100 2,5 % SO<sub>2</sub>, 5) CR1 control, 6) CR1 2,5 % SO<sub>2</sub>, 7) Vitilactic control i 8) Vitilactic 2,5 % SO<sub>2</sub>.

#### 4.2.4. Estudi de l'expressió gènica d'*Hsp18* en la soca tipus CECT 4100

Com s'ha vist en l'apartat 4.2.1, els perfils electroforètics de la fracció de membrana de les tres soques estudiades només mostraven sobreexpressió significativa d'una banda al voltant dels 18 kDa en el cas del xoc tèrmic, i en menor intensitat, en presència d'etanol al 12 %, estudiats en CECT 4100 com a soca tipus i en CR1.

Guzzo *et al.* (1997) indicaren que la proteïna Lo18 era induïda en presència de diferents classes d'estrès (pH àcid i concentracions elevades d'etanol, a part del xoc tèrmic) i, segons Jobin *et al.* (1997), l'expressió semblava regulada a nivell transcripcional, com succeeix en la majoria de gens descrits que codifiquen *Hsps* (Narberhaus, 2002). D'altra banda, els mateixos autors comprovaren que Lo18 es trobava associada perifèricament a la membrana citoplasmàtica i que sedimentava parcialment amb la fracció de membrana gràcies a aquesta associació. En presència d'urea o de substàncies bàsiques, se solubilitzava, fet que suggeria una interacció proteïna-proteïna amb altres proteïnes associades a membrana. A partir dels resultats obtinguts, Jobin *et al.* (1997) hipotetitzaren que Lo18 estaria involucrada en el manteniment de la integritat de membrana en condicions d'estrès. Cal afegir, a més, que en condicions normals de creixement, els nivells tant de proteïna com d'mRNA d'*hsp18* eren inexistents, per la qual cosa deduïren que *hsp18* no es tracta d'un gen d'expressió constitutiva (*gen constitutiu*), a diferència de la majoria de gens *hsps* descrits fins ara, que s'expressen també en absència d'estrès i sovint són necessaris per al creixement cel·lular (Straus *et al.*, 1987; Narberhaus, 2002). Malgrat això, com es pot veure en les figures 4.8 a 4.12, sembla que en les condicions d'incubació utilitzades en els nostres experiments, sí que apareixia un cert nivell basal d'aquesta proteïna independentment del contacte o no amb agents estressants.

Mitjançant *Northern blot*, Guzzo *et al.* (1998) van detectar certa expressió del gen *hsp18* en concentracions molt elevades de SO<sub>2</sub> (60 mg/l), ben inferior però, als nivells descrits en cèl·lules sotmeses al xoc tèrmic de 42°C. A concentracions inferiors de SO<sub>2</sub> (30 mg/l) tampoc van ser capaços de detectar cap mena d'expressió. Aquestes dades, i el fet que els mateixos autors, uns anys abans, haguessin comprovat que en concentracions moderades d'etanol (10 %) tampoc es detectava la proteïna Lo18 (Guzzo *et al.*, 1994), fan pensar que, si bé Lo18 es tracta d'una *smHsp* que s'expressa clarament en condicions de xoc tèrmic i que possiblement intervingui en les respostes

genèriques d'estrès, requereix que aquestes siguin dràstiques perquè s'expressi de forma significativa. Per comprovar, doncs, si hi havia inducció del gen d'*hsp18* en algunes de les condicions d'estrès estudiades, en el nostre treball, sobre l'efecte de l'ATPasa i la síntesi de proteïnes, i en quina magnitud es produïa aquesta inducció, es realitzaren assaigs per quantificar els nivells d'mRNA del gen en diferents condicions mitjançant RT i PCR semiquantitativa, una combinació de dues tècniques que permet quantificar nivells baixos de transcrits cel·lulars ja que és més sensible que el *Northern blot*, tècnica aquesta última respecte a la qual incrementa l'eficiència d'hibridació i redueix els riscos de degradació de l'RNA (Ambion Technical Bulletin, # 500; Grüntzig *et al.*, 2001).

- **Disseny dels encebadors per a l'amplificació del gen de referència**

Prèviament, calia designar un gen de referència respecte al qual indicar els nivells d'expressió del gen problema (normalització). Allò que ens interessava no eren els valors absoluts de quantitat de transcrit, sinó les diferències relatives en abundància d'mRNA entre les diferents mostres, que permeten obtenir resultats comparatius més útils alhora d'interpretar-los (Kellog *et al.*, 1990; Zhang i Byrne, 1999). El gen de referència, o constitutiú, havia de complir una sèrie de condicions, principalment que l'expressió fos constant i independent de factors d'estrès externs i que les eficiències de síntesi de cDNA i d'amplificació PCR d'aquest cDNA fossin, sinó idèntiques, sí molt similars a les del gen problema (en el nostre cas, *hsp18*) (Ferre, 1992).

Per determinar l'expressió gènica temporal en bacteris, fins ara ha estat força emprada la quantificació de 16S rRNA com a referència (Cheung *et al.*, 1994; Mathews *et al.*, 1999, Goerke *et al.*, 2001), ja que compleix bé la funció de control endogen i permet normalitzar les diferències en la quantificació per modificacions de l'eficiència d'RT i l'estat del cDNA. Mitjançant una cerca en les bases de dades de l'*EMBL* (*European Molecular Biology Laboratory*), es revisaren tots els fragments de seqüència de 16S rRNA publicats fins a la data (gener de 2002) per a les diverses soques d'*O. oeni* i es realitzà un alineament múltiple de seqüència mitjançant l'aplicació ClustalW (versió 1.81; Higgins *et al.*, 1996) de l'*EMBL*, amb l'objectiu de determinar quina era la regió més conservada, la qual es prendria com a motlle per dissenyar els encebadors per a la PCR quantitativa.



Figura 4.17. Alineament de fragments de seqüència 16S rRNA d'*O. oeni*.



Existeixen dos subgrups de fragments de seqüències en funció de la llargada: un d'ells, format per 8 seqüències al voltant dels 1450 pb corresponents a 8 soques d'*O. oeni* diferents (Yang i Woese, 1989; Martínez-Murcia i Collins, 1990 i Mori 1994), i l'altre, també format per 8 fragments més curts, d'uns 400 pb, corresponents a 8 soques diferents i seqüenciats per Felhmann (2000). L'alineament de la regió del segon grup mostra un alt grau d'homologia entre totes les seqüències (veure figura 4.17), per la qual cosa es va considerar que era el fragment de seqüència òptim a partir del qual dissenyar els encebadors.

Per al disseny dels encebadors, es va fer ús de l'eina informàtica PrimerExpress™ (versió 1.5, ABI PRISM™ i Applied Biosystems), que incorpora una sèrie de paràmetres i normes que han de complir els encebadors compatibles amb la PCR quantitativa en l'aparell *Gene Amp 5700 Sequence Detection System* (Applied Biosystems), quan es donen les següents condicions de termociclació:

50°C, 2 min / 95°C, 10 min / 40 cicles: 95°C, 15 s; 60°C, 1 min.

En la següent taula s'indiquen els paràmetres que han de complir els encebadors:

**Taula 4.6.** Paràmetres més importants que han de complir els encebadors per a la PCR quantitativa.

- |  |
|--|
| <ol style="list-style-type: none"> <li>1. <math>T_m</math> entre 58 i 60°C</li> <li>2. Longitud òptima: 20 pb</li> <li>3. Diferència de <math>T_m</math> dels dos encebadors inferior a 2°C.</li> <li>4. No més de 3 bases iguals juntes.</li> <li>5. No més de 2 G juntes per evitar dímers d'encebadors. Si hi ha dímers que impliquen A i T no hi ha problema, perquè es dissociaran a 60°C.</li> <li>6. Més A/T que C/G a les últimes cinc bases de l'extrem 3'</li> </ol> |
|--|

A banda, calia que els encebadors complissin altres condicions sempre que fos possible, indicades en la taula 4.7.

**Taula 4.7.** Condicions addicionals que han de complir els encebadors i l'amplicó per a la PCR quantitativa.

7.	Percentatge de G/C el més proper possible a 50 % i similar entre l'encebador 5'-3' o <i>forward</i> ( <i>F</i> ) i el 3'-5' o <i>reverse</i> ( <i>R</i> ) i amb l'amplicó.
8.	G o C a l'extrem 3' per afavorir una unió forta al lloc d'inici de la polimerització.
9.	$T_m$ molt similars dels dos encebadors per afavorir que tinguin eficiències similars.
10.	Absència de seqüències palindròmiques per evitar dímers d'encebadors o, de forma addicional, estructures secundàries.
11.	Distribució homogènia, sobretot de C/G.
I per últim, l'amplicó hauria de complir:	
1.	$T_m$ màxima de 85°C.
2.	Longitud entre 50 i 150 pb.
3.	% G/C proper al 50 %.
4.	Absència d'homopolímers per evitar estructures secundàries.

Introduïda la seqüència de treball en l'aplicació PrimerExpress™, van aparèixer 200 resultats per defecte –o menys en alguns casos– que el programa havia trobat que complien les 6 condicions de la taula 4.6, ordenats de menor a major *penalty* (índex de valoració intern del programa, que té en compte el conjunt de paràmetres esmentats).

Calia revisar un per un els parells d'encebadors proposats, perquè complissin, sempre que fos possible, les condicions suggerides en la taula 4.7. Si cap d'ells les complia completament, es modificava lleugerament l'opció més propera a l'òptim (escurçant una o dues bases, fixant només la seqüència d'un dels encebadors, etc.) i es tornava a sotmetre a l'algoritme del programa, fins que s'obtenia una configuració del parell d'encebadors per compromís de paràmetres.

En el cas del 16S rRNA, aquest és el parell d'encebadors seleccionats:

**Taula 4.8.** Encebadors seleccionats per a PCR quantitativa del gen 16S rRNA.

Codi	Seqüència	Longitud (pb)	$T_m$ (°C)	% GC
<i>F</i>	5' cgaccgaaagccttcac 3'	19	59	58
<i>R</i>	5' cgcaatgcacgaaagtgtg 3'	19	58	53

Com es pot veure en la taula 4.8, les seqüències compleixen les condicions anteriorment esmentades, si bé en el cas de l'encebador *R*, hi ha més G que A/T a les últimes cinc bases de l'extrem 3', fet que podria facilitar la formació de dímers i

comprometre el bon funcionament de la PCR quantitativa, per bé que no fou possible obtenir una combinació millor a partir de la seqüència consens de 16S rRNA emprada.

Per tal d'esvaïr els dubtes sobre la possibilitat de formació de dímers, es va recórrer a l'aplicació informàtica Amplify 1.2. (© B. Engels, 1992), la qual permet comprovar les seqüències dels productes finals teòrics d'una reacció de PCR a partir de la seqüència motlle i dels encebadors. El resultat mostrava que només havia d'aparèixer un sol producte final de reacció, de 61 pb (corresponent a l'amplicó esperat), i que el risc de formació de dímers d'encebadors no era significatiu.

Ara, únicament calia esbrinar si els encebadors de la taula 4.8 es podien hibridar amb algun altre dels fragments de seqüència d'*O. oeni* publicats a les bases de dades. Com que, malauradament, encara no es disposa de la seqüència completa del genoma d'*O. oeni*, per reduir al màxim el grau d'incertesa que això pressuposa, es va realitzar una cerca d'homologia de la seqüència dels encebadors contra tota la biblioteca de seqüències disponibles de procariotes en les bases de dades, mitjançant l'eina informàtica FASTA (Pearson, 1990; versió 3.3t09 Maig 18, 2001). Afortunadament, no es va detectar cap homologia significativa amb cap altra seqüència, de forma que podíem pensar que l'amplicó que es formaria en la PCR correspondria únicament al del gen d'estudi (tot i que no es mostren, els paràmetres de l'amplicó resultant se cenyien als establerts en la taula 4.7).

- **Disseny dels encebadors del gen problema, *hsp18***

La seqüència d'*hsp18*, de 700 pb, fou determinada per Jobin *et al.* (1997) i es troba publicada en les bases de dades de l'*EMBL* (*GenBank*).

Es va seguir la mateixa metodologia que en el cas de 16S rRNA per dissenyar el parell d'encebadors per a la PCR quantitativa d'*hsp18*. En la taula 4.9 es pot observar el resultat.

**Taula 4.9.** Encebadors seleccionats per a PCR quantitativa del gen *hsp18*.

Codi	Seqüència	Longitud (pb)	T <sub>m</sub> (°C)	% GC
F	5' tgggcaacttgatgaacaactt 3'	22	58	41
R	5' ttatgccgggcactttcc 3'	18	58	56

Tot i que no es tracta d'una opció ideal, sí que és la millor opció possible, ja que la resta de combinacions obtingudes, algunes amb penalitzacions més baixes, no complien regles essencials, com que el nombre de Gs juntes no fos superior a dos o la proporció de G/C i T/A. Els possibles inconvenients dels encebadors de la taula 4.9 serien que *F* no acaba per G o C i que el % de G/C s'allunya lleugerament del 50 %.

Pel que fa a la predicció de productes de PCR amb l'Amplify 1.2., tampoc se'n dedueix la formació de productes secundaris o dímers d'encebadors, mentre que la confrontació de la seqüència d'*F* i *R* amb les bases de dades (*GenBank*) de procariotes, a través del FASTA, no indicava hibridació amb cap seqüència coneguda.

- **Disseny experimental d'aplicació de les condicions d'estrès**

Les condicions d'estrès seleccionades per a l'estudi de l'expressió gènica en CECT 4100 foren el xoc tèrmic a 42°C (1 h), com a control positiu de l'expressió d'*hsp18*; presència de 5 mg/l de C12, coure en concentracions de 20 mg/l i SO<sub>2</sub> amb un 2,5 % de forma molecular activa, SO<sub>2</sub>.H<sub>2</sub>O. Es tracta de condicions l'efecte de les quals ja ha estat estudiat en els altres apartats d'aquest treball, sobre l'activitat ATPasa i les modificacions dels perfils proteics de la fracció de membrana, i respecte a les quals hi ha poques dades representatives de com indueixen la síntesi proteica i, en concret, la d'una proteïna d'estrès com Lo18.

Les mostres estudiades corresponen a 3 i 24 hores de creixement d'un cultiu inoculat en MRSFM en un percentatge elevat, de forma que la DO inicial es trobés al voltant de 0,5 (equivalent a unes 3·10<sup>8</sup> UFC/ml). Així doncs, la mostra corresponent a 3 h de creixement seria representativa de la resposta adaptativa del cultiu en condicions exponencials, mentre que la corresponent a 24 h ho seria de l'inici de fase estacionària. A més, en tractar-se de xocs d'estrès de caire químic (i no pas físic, com seria el cas del control a 42°C), es va considerar adient prolongar els temps d'exposició a les condicions d'estrès per damunt d'1 hora.

- **RT-PCR de l'RNA total aïllat de les diferents mostres**

Calia que el mètode de retrotranscripció seleccionat permetés realitzar una RT amb la mateixa eficiència, tant per al gen endogen com per al gen problema,

independentment de la quantitat proporcional en què es trobés cadascun d'ells en l'RNA total i del tipus de seqüència o d'estructura secundària del seu mRNA. D'entre els tres mètodes descrits fins ara, es va seleccionar el de *random hexàmers*, o hexàmers inespecífics, mentre que els altres dos (oligodTs i *gene-specific primers* [GSP]) van ser descartats, principalment perquè en el cas del mètode d'oligodTs aquest només era aplicable en cèl·lules eucariotes, on l'mRNA sí que presenta les cues de 3' poliAs, i en el cas del mètode GSP, aquest no era aconsellable perquè fàcilment podia introduir elevades diferències d'eficiència i rendiments variables entre la retrotranscripció del gen endogen i del gen problema.

Amb el mètode dels hexàmers inespecífics, s'aconsegueix que qualsevol mRNA sigui un motlle potencial per a la retrotranscriptasa, i els encebadors en la PCR quantitativa conferiran l'especificitat necessària perquè s'amplifiquin només les seqüències d'interès d'entre el conjunt de cDNA sintetitzat.

En base a les indicacions del protocol per a la Transcriptasa *MultiScribe™ Reverse* d'Applied Biosystems (veure també l'apartat **3.7.9.1 de Materials i Mètodes**) es va fixar la concentració d'RNA total en la mostra per retrotranscriure en 10 ng/μl, de forma que la quantitat total d'RNA es convertís en cDNA, en trobar-se per sota de la concentració saturant per a l'enzim retrotranscriptasa. Per això, un cop determinada la concentració d'RNA extret en cada mostra (veure mètode d'extracció en l'apartat **3.8.3**), aquesta es va diluir amb H<sub>2</sub>O bidestil·lada lliure d'RNAases, fins a 10 ng/μl.

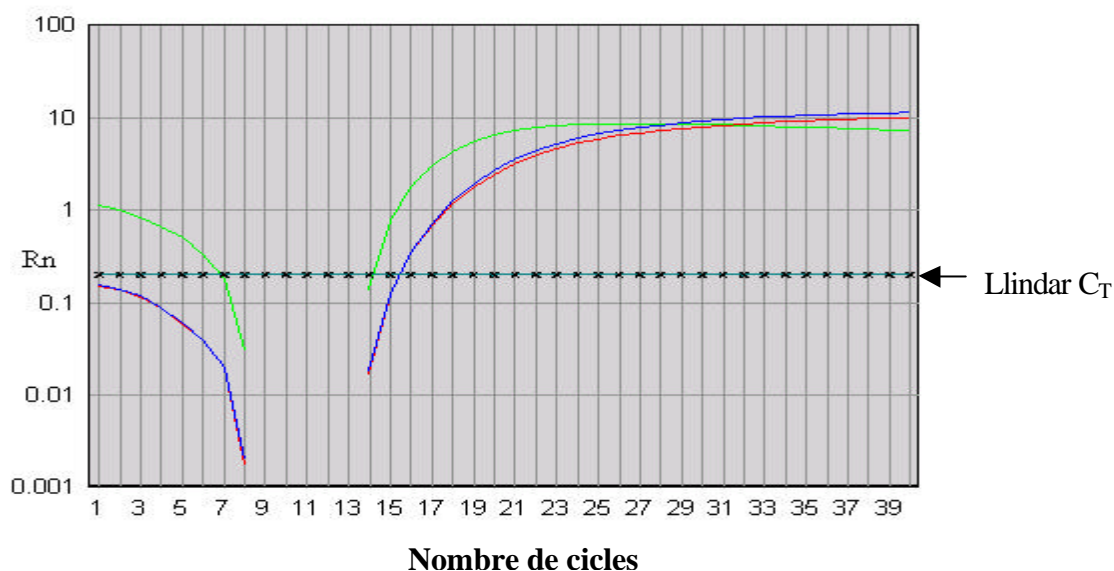
Una vegada finalitzada la reacció d'RT-PCR, el cDNA resultant de les diferents mostres podia ser sotmès a PCR quantitativa, prèvia dilució, perquè la concentració de DNA es trobés dins del rang de la recta patró dissenyada.

- **Quantificació del producte de PCR**

El programari del *Gene Amp 5700 Sequence Detection System* (Applied Biosystems) permet fer un seguiment en temps real del senyal acumulatiu de fluorescència (a 485 nm) emès per les molècules de SYBR<sup>®</sup> Green I unides al DNA que es va formant. Es tracta d'un senyal que s'expressa numèricament amb el paràmetre  $R_n$ , el qual representa la intensitat de fluorescència normalitzada respecte a una referència passiva present al tampó de reacció, i que és directament proporcional a la quantitat d'un cDNA determinat en la mostra. La referència passiva és un colorant

que no participa en la reacció d'amplificació i el senyal que emet serveix com a referència interna respecte a la qual l'emissió del complex DNA-SYBR<sup>®</sup> Green I pot ser normalitzada, esmorteint així les fluctuacions de fluorescència causades per petites modificacions en les concentracions i els volums de reacció.

Ara bé, el paràmetre que habitualment s'emptra com a mesura quantitativa del producte de PCR és  $C_T$  (*threshold cycle*), que es refereix al valor fraccionari del cicle (C) a partir del qual es detecta un increment significativament estadístic d' $\Delta R_n$  i que de forma gràfica representa el moment en què la corba  $\Delta R_n/C$  inicia una evolució exponencial, tal i com es pot veure en la figura 4.18. Segons Heid *et al.* (1996), el valor de  $C_T$  s'assigna de forma arbitrària en base a la variabilitat de la línia de base de la corba esmentada (veure la mateixa figura 4.18), per bé que el protocol d'Applied Biosystems aconsella designar com a  $C_T$  el valor més baix a partir del qual la corba  $\Delta R_n/C$  presenta el màxim pendent. L'avantatge que aporta la mesura indirecta de  $C_T$  respecte la directa d' $\Delta R_n$  és que amplia el rang de concentracions d'assaig i permet elaborar rectes patrons de 4 o 5 rangs decimals, mentre que de l'altra forma no se superarien els 3 rangs decimals (Heid *et al.*, 1996). Així, els valors de  $C_T$  obtinguts per a cada mostra poden ser comparats amb una recta patró resultant de la regressió lineal dels valors  $C_T$  corresponents a quantitats conegudes de DNA (Grüntzig *et al.*, 2001).



**Figura 4.18.** Representació de la corba  $\Delta R_n/C$  i del llindar d' $R_n$  escollit per a la determinació de  $C_T$ , per al gen 16 S (corba verda) i per al gen *hsp18* (corbes blava i vermella, que representen un duplicat).

- **Selecció de la concentració d'encebadors**

Abans de quantificar els nivells de transcrit de cada mostra, s'assajaren diferents concentracions de cadascuna de les parelles d'encebadors, per tal d'optimitzar la concentració mínima necessària per obtenir el màxim rendiment de producte de PCR que permetés una bona lectura de  $C_T$  i evitar la formació de productes secundaris que podrien emascarar o interferir en la quantificació, com ara els dímers d'encebadors o altres amplificacions inespecífiques.

Com es pot veure en la taula **4.10**, els valors més baixos de  $C_T$  s'obtenien amb 300 nM per a ambdós encebadors, per la qual cosa es va optar per treballar amb aquesta concentració per assegurar al màxim l'eficiència de PCR sense que la quantitat d'encebador present en la mescla de reacció fos un factor limitant, tot i que, com s'observa en la mateixa taula, els nivells de  $C_T$  *NAC* i  $C_T$  *NTC* són més elevats si els comparem amb els que s'obtenen per a 200, 100 i 50 nM. En el cas dels controls *NAC* (*No Amplification Control*) poden ser-hi presents restes de DNA genòmic, fet que explicaria els valors de  $C_T$  *NAC* relativament alts, mentre que els valors dels controls *NTC* (*No Template Control*) serien conseqüència, principalment, de la inespecificitat que incorpora el SYBR<sup>®</sup> Green I, ja que s'adhereix a qualsevol producte secundari de DNA, i com més elevades siguin les concentracions d'encebadors, el risc de formació d'aquests subproductes augmenta (Morrison *et al.*, 1998).

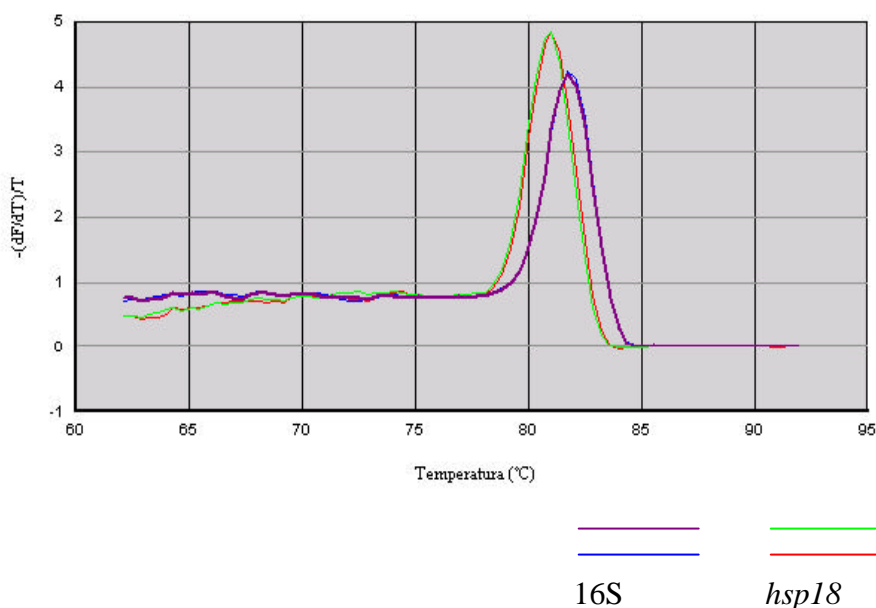
Malgrat tot, com que els càlculs es refereixen sempre a nivells d'expressió relativa respecte un gen constitutiu (16 S), d'expressió gairebé idèntica en totes les condicions, s'ha optat per introduir una correcció en els valors de concentració inicial de cDNA que consisteix en substreure al valor de concentració de cada mostra, resultant d'interpol·lar  $C_T$  en la recta patró, la concentració teòrica del control *NAC* corresponent. D'altra banda, a efectes pràctics no caldria considerar aquesta correcció, ja que les concentracions assignades als controls *NAC* són, pel cap baix, de 3 ordres decimals inferiors a les concentracions reals de cDNA de les mostres, i el percentatge d'error que implicarien seria negligible.

**Taula 4.10.** Valors de  $C_T$  obtinguts en els assaigs per determinar la concentració d'encebadors òptima per a la PCR quantitativa.

Concentració encebadors (nM)	16S			<i>hsp18</i>		
	$C_T$	$C_T$ NAC	$C_T$ NTC	$C_T$	$C_T$ NAC	$C_T$ NTC
300	14,1	21,83	23,1	22,465	26,325	31,395
200	14,425	23,62	30,41	22,68	26,32	31,51
100	15,135	24,30	32,870	23,05	27,015	33,825
50	17,255	28,98	35,09	25,155	29,25	35,67

- **Corba de dissociació dels productes de PCR**

Un aspecte addicional que calia comprovar era la corba de dissociació dels productes de PCR, també en temps real, ja que és el millor indicador per conèixer si es forma majoritàriament un únic producte d'amplificació i si aquest correspon a l'amplificat desitjat, és a dir, que els encebadors emprats s'han hibridat correctament a la seqüència diana. Aquesta corba de dissociació es defineix com la representació de la derivada negativa del senyal de fluorescència dependent de la temperatura, respecte la mateixa temperatura:  $-(dF/dT)/T$  (Morrison *et al.*, 1998; Hiratsuka *et al.*, 2001).



**Figura 4.19.** Corbes de dissociació corresponents a 16S i *hsp18*, realitzades per duplicat.



Com es pot veure en la figura 4.19, per a ambdós gens en estudi apareix, clarament, un sol producte d'amplificat majoritari, corresponent a la seva  $T_m$ : en el cas de 16S, l'amplicó tindria una  $T_m$  teòrica de 83,5°C, mentre que *hsp18*, de 82°C. El senyal de fons que es detecta en els controls *NTC* seria atribuïble als productes inespecífics que en la corba es mostren com a una línia base irregular, amb nombrosos pics de petita mida entre els 62 i 80°C.

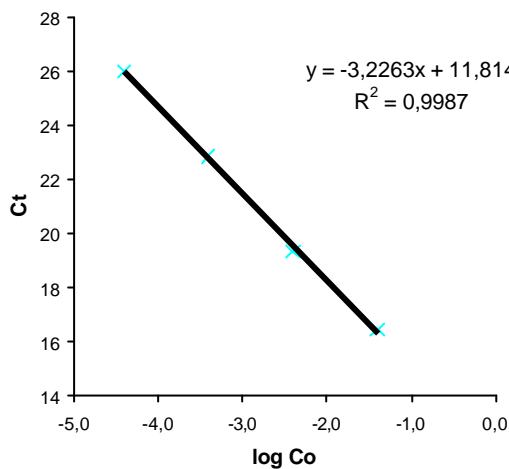
- **Disseny de la recta patró**

Ja s'ha insinuat més amunt la necessitat de generar una recta patró a partir d'una sèrie de dilucions d'una mostra de referència per poder interpolar-hi les mesures d'amplificació generades per les mostres en estudi. Com a mostra de referència es va seleccionar el DNA genòmic de CECT 4100, ja que inclou la seqüència diana dels dos gens, 16S i *hsp18*.

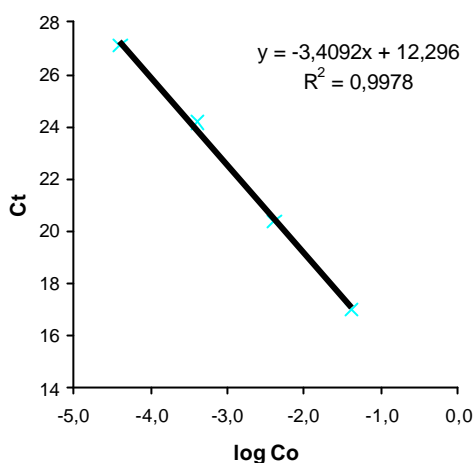
El segon objectiu que preteníem amb la recta patró era acabar de validar la bondat dels encebadors per a ser utilitzats en l'experiment; és a dir, que a part d'oferir rectes de dissociació amb un únic pic, permetessin l'obtenció d'un rang de linealitat de la recta patró que es trobés entre 4 i 5 magnituds decimals de concentració.

Com es pot veure en les figures 4.20 i 4.21, tots dos objectius s'assoleixen en obtenir corbes lineals en el rang de concentració de  $4 \cdot 10^{-2}$  a  $4 \cdot 10^{-5}$  ng/ $\mu$ l (corresponent a  $0,1-1 \cdot 10^{-4}$  ng) amb uns coeficients de correlació elevats (0,9987 per a la recta de 16S i 0,9978 per a la d'*hsp18*). Tot i que no s'indiquen, les correlacions de regressió per a 5 graus de magnitud (d'1 a  $1 \cdot 10^{-4}$  ng de cDNA) també són força elevades, de 0,9941 i 0,9926, respectivament.

Un altre aspecte que cal destacar són els pendents tan similars de totes dues rectes, que indiquen que l'eficiència d'amplificació per als dos gens és equiparable, fet que relativitza la importància de les rectes patrons en el nostre cas, ja que la proporció entre el nombre de molècules de cDNA de cadascun dels dos gens i el senyal de fluorescència que emeten es manté constant al llarg del rang de ng de la recta patró.



**Figura 4.20.** Recta patró per al gen de referència 16S, obtinguda per amplificació quantitativa a partir dels encebadors dissenyats.



**Figura 4.21.** Recta patró per al gen de referència *hsp18*, obtinguda per amplificació quantitativa a partir dels encebadors dissenyats.

- **Expressió relativa del gen *hsp18* en les condicions d'estrès estudiades**

Un cop es disposava dels encebadors adequats i es coneixia el rang de la recta patró en el qual podíem treballar, es comprovà l'increment d'expressió d'*hsp18* en front d'un xoc tèrmic descrit per Jobin *et al.* (1997) per mitjà de *Northern blot*. Tant les mostres de cultiu de 3 h i de 24 h, un cop sotmeses a xoc tèrmic durant 1 hora, mostraven uns nivells de transcrit clarament superiors als dels controls corresponents (taula 4.11), que en el cas de les cèl·lules en plena fase exponencial de creixement (3 hores), suggereixen un factor d'inducció de 50 respecte al control. Aquests resultats s'avenen amb els aportats per Narberhaus (2002), segons el qual la majoria d'*Hsps* descrites responen amb induccions de 2 a 100 vegades el nivell de mRNA, si bé el mateix autor comenta resultats molt recents en què les *smHsps* demostren una capacitat d'expressió en condicions d'estrès més elevada que les altres *Hsps*, en alguns casos fins a factors d'inducció de 300, com en *E. coli*, detectats per mitjà d'expressió en perfils de *microarrays* en el cas dels gens *ibpA* i *ibpB*, que codifiquen per a les respectives *a-Hsps* (Richmond *et al.*, 1999).

**Taula 4.11.** Nivells d'expressió relativa del gen *hsp18* en condicions de xoc tèrmic.

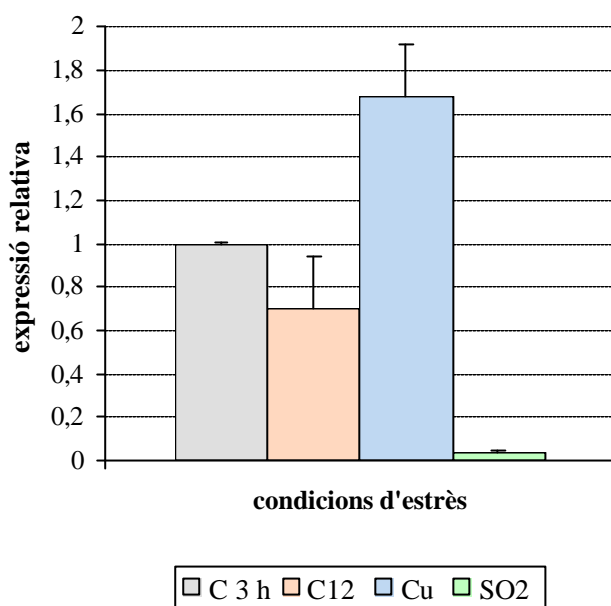
mostra	ng/ $\mu$ l (recta patró)		Normalització <i>hsp18/16S</i>	Expressió relativa (a)	Expressió relativa (b)
	16S	<i>hsp18</i>			
<b>C 3 h</b>	$1,214 \cdot 10^{-1}$	$3,79 \cdot 10^{-4}$	$3,122 \cdot 10^{-3}$	1,0	
<b>3 h, xoc tèrmic*</b>	$1,064 \cdot 10^{-1}$	$1,648 \cdot 10^{-2}$	$1,549 \cdot 10^{-1}$	49,6	
<b>C 24 h</b>	$1,135 \cdot 10^{-1}$	$2,322 \cdot 10^{-4}$	$2,046 \cdot 10^{-3}$	1,0	0,65
<b>24 h, xoc tèrmic*</b>	$1,236 \cdot 10^{-1}$	$1,145 \cdot 10^{-2}$	$9,267 \cdot 10^{-2}$	45,3	29,7

(\*) Xoc tèrmic aplicat durant 1 hora a 42°C.

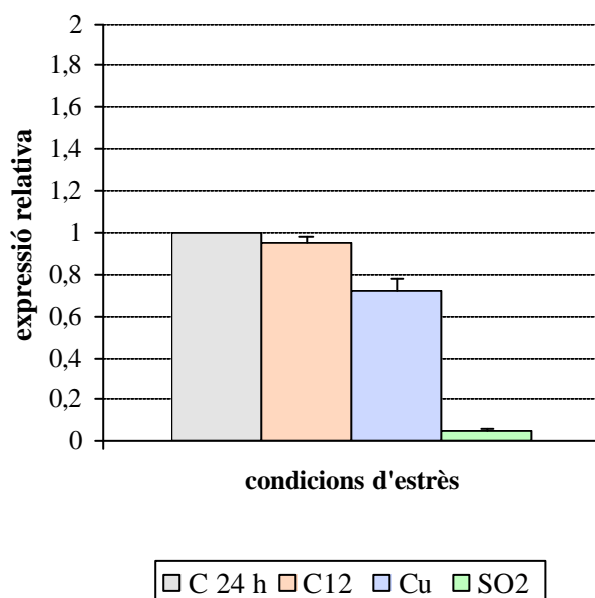
(a) Expressió relativa a la mostra control corresponent al mateix temps de creixement.

(b) Expressió, de cèl·lules cap al final de la fase exponencial, relativa a la mostra control corresponent al cultiu de 3 hores.

En les gràfiques següents, figures **4.26** i **4.27**, es pot observar que la resposta d'expressió gènica d'*O. oeni* sotmès a les condicions d'estrès esmentades, en presència de C12, coure i SO<sub>2</sub>, no és ni molt menys comparable a la que té lloc en el xoc tèrmic. Únicament, en la resposta de cèl·lules en fase exponencial de creixement en contacte durant 3 hores amb una concentració de 20 mg/l de coure (Cu 3 h) el factor d'inducció augmenta lleugerament, al voltant d'1,5. En canvi, en cèl·lules en el mateix estat de creixement, la inducció es veu molt lleument reprimida quan s'incuben en presència de 5 mg/l de C12, i clarament inhibida quan l'agent d'estrès és el SO<sub>2</sub> (2,5 % SO<sub>2</sub>.H<sub>2</sub>O). Les cèl·lules incubades durant 24 hores mostren unes tendències similars excepte en el cas del coure, amb uns nivells de transcrit relativament inferiors fins i tot als de C12, aquests últims equiparables als del control. Cal comentar, també, que l'expressió d'*hsp18* en el control de 24 h (C 24 h) representa un 0,6 de l'expressió en el control a 3 h (C 3 h) (veure taula **4.11**, última columna), per la qual cosa es podria deduir que les cèl·lules que es troben en plena fase de creixement exponencial gaudirien d'una capacitat d'expressió d'*hsp18* lleugerament superior, independentment de quines fossin les condicions d'estrès.



**Figura 4.22.** Expressió gènica relativa d'*hsp18*, en cèl·lules en fase exponencial de creixement, de la soca d'*O. oeni* CECT 4100 en les condicions control (C 3 h) i en presència de C12, coure (Cu) i SO<sub>2</sub>.



**Figura 4.23.** Expressió gènica relativa d'*hsp18*, en cèl·lules al final de la fase exponencial de creixement, de la soca CECT 4100 d'*O. oeni* en les condicions control (C 24 h) i en presència de C12, coure (Cu) i SO<sub>2</sub>.

Tanmateix, els resultats corresponents a les incubacions durant 3 i 24 h de creixement no són totalment comparables amb els obtinguts en el xoc tèrmic, ja que aquest darrer consisteix en una incubació d'unes cèl·lules en condicions normals, en el mateix estadi de creixement que les altres, durant 1 hora. La raó d'aquesta diferència en els temps d'exposició als factors d'estrès és deguda a què, mentre en un cas ens trobem davant d'una influència de tipus físic sobre les cèl·lules (la temperatura) i molt marcada (42°C), en els altres casos les influències són de tipus químic, més lentes i graduals, i cal prolongar-ne l'exposició per observar manifestacions de resposta cel·lular (Sanders *et al.*, 1999). Per aquest motiu, es va optar per una incubació de 3 hores, temps que es considerava suficient perquè el metabolisme cel·lular pogués posar en joc els diversos mecanismes de resposta, alhora que no se superava el temps de generació cel·lular (de 3-4 hores en les millors condicions, segons Garbay i Lonvaud-Funel [1996]). D'altra banda, com que ha estat descrit que la síntesi de proteïnes d'estrès també depèn de la fase de creixement (González-Márquez *et al.*, 1997), semblava interessant comprovar si les noves cèl·lules generades per divisió requerien l'activació de l'expressió d'*hsp18* per respondre a les condicions químicament adverses del medi.

A partir dels resultats obtinguts, es pot confirmar que el paper d'*Lo18* no sembla essencial ni per al metabolisme ni el creixement cel·lulars d'*O. oeni* en les tres condicions estudiades d'estrès químic moderat (5 mg/l de C12, 20 mg/l de coure i 2,5 % de SO<sub>2</sub>.H<sub>2</sub>O), en la soca tipus CECT 4100 i en un medi de creixement ric, com és MRSFM. Per conèixer a bastament, però, la importància real de l'expressió gènica d'*hsp18* davant d'aquestes condicions, caldria analitzar mostres a temps inferiors d'incubació, ja que se sap que la síntesi de la majoria de proteïnes d'estrès és induïda ràpidament (Arnau *et al.*, 1996).

### 4.3. Estudi dels efectes dels compostos de la paret cel·lular de *S. cerevisiae* sobre *O. oeni*

En la introducció s'ha esmentat que les mannoproteïnes de la paret cel·lular dels llevats que porten a terme la FA, habitualment *S. cerevisiae*, poden contribuir a la nutrició nitrogenada d'*O. oeni*. Estudis previs realitzats per Guilloux-Benatier *et al.* (1993) i Rollán *et al.* (1993) indicaven que aquestes macromolècules podrien induir la producció de peptidases, proteases i glicosidases per part del bacteri. Tanmateix, la desconeixença dels sistemes proteolítics que hi intervindrien va fer creure convenient realitzar un estudi preliminar sobre la presència d'activitat proteolítica en cultius d'*O. oeni* en contacte amb mannoproteïnes de llevats, així com l'anàlisi de les possibles proteïnes secretades, la cerca de gens homòlegs als involucrats en els sistemes proteolítics d'altres bacteris làctics i la detecció de modificacions en l'expressió d'alguns gens ja descrits en *O. oeni*.

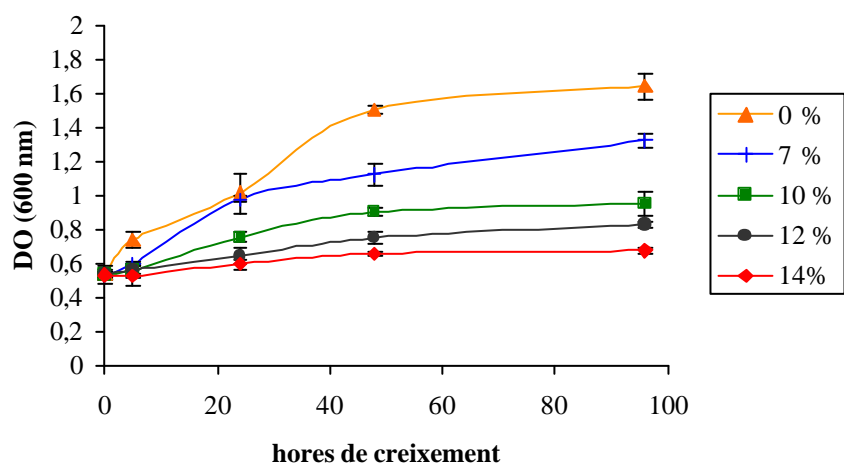
Per a realitzar aquests estudis s'empraren dues soques: *O. oeni* Lo 84.13 (*Institut d'Œnologie* de Bordeus, França) com a soca control, i *O. oeni* S3. Com s'ha assenyalat en l'apartat 3.2, les soques foren cultivades en un medi (FT 80 modificat) amb diferents concentracions d'etanol, on l'única font de nitrogen era extracte de llevat, de forma que des del moment de la inoculació ja s'afavoria l'expressió dels gens que haurien de codificar les proteïnes involucrades en el sistema proteolític, induïda per la carència de nitrogen directament assimilable en el medi de cultiu (Farías *et al.*, 1996; Baumberg, 1999).

Mostres d'aquests cultius, en diferents moments del creixement, eren centrifugades i se'n separava el sobrenedant del precipitat cel·lular. El sobrenedant, teòricament, hauria de contenir les exoproteases secretades per les cèl·lules d'*O. oeni* (Manca de Nadra *et al.*, 1999; Farías i Manca de Nadra, 2000). Prèviament als assaigs d'activitat proteasa, es determinava si existia activitat lactat-deshidrogenasa (LDH) en el sobrenedant, indicadora de l'estat cel·lular. Si les cèl·lules es trobessin malmeses (ja fos per condicions adverses durant el creixement, com nivells d'etanol elevats, o bé pel propi procés de centrifugació i separació) la presència d'aquell enzim citoplasmàtic en el sobrenedant indicaria que possiblement també s'haurien alliberat altres enzims, entre ells proteases intracel·lulars, que emascararien les determinacions d'activitat

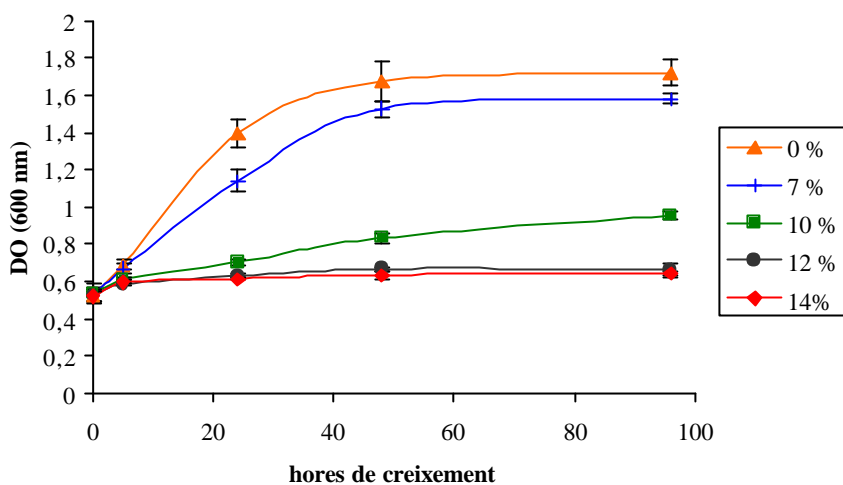
exoproteasa. Afortunadament, en cap cas es va detectar activitat LDH significativa en el sobrenedant.

#### 4.3.1. Relació de l'efecte inhibidor de l'etanol amb l'activitat exoproteasa d'*O. oeni*

Com s'observa en les figures 4.24 i 4.25 (els cultius es realitzaren per duplicat), les cèl·lules foren inoculades en concentracions elevades per disposar d'una biomassa suficient per al mostratge i extracció d'RNA posteriors i perquè, especialment en les condicions de 12 % i 14 % d'etanol, la fase inicial d'adaptació o latència no disminuís excessivament la viabilitat i el nombre total de cèl·lules, i no es prolongués exageradament el seguiment del creixement. És ben conegut l'efecte inhibidor sobre aquest creixement en *O. oeni* exercit per l'etanol (Capucho i San Romão, 1994; Vaillant *et al.*, 1995, entre molts altres) i les gràfiques ho corroboren, si bé la soca tipus Lo 84.13 es mostra més sensible per a concentracions moderades (7 i 10 %) però sense diferències significatives respecte S3 quan les concentracions d'etanol són més elevades (12 % i 14 %). Aquest factor d'estrès ha estat seleccionat perquè, segons Remize *et al.* (2001), l'activitat proteolítica es veu estimulada per la presència d'etanol. A més, és conseqüència directa del metabolisme dels llevats i, per tant, es creia convenient obtenir més informació de com es veu afectat el sistema proteolític d'*O. oeni* a diferents concentracions d'etanol.



**Figura 4.24.** Creixement de la soca d'*O. oeni* Lo 84.13 (mesurat per densitat òptica) a 600 nm en presència de diferents concentracions d'estrès i en un medi amb extracte de llevat com a única font de nitrogen.



**Figura 4.25.** Creixement de la soca S3 (mesurat per densitat òptica) a 600 nm en presència de diferents concentracions d'estrès i en un medi amb extracte de llevat com a única font de nitrogen.

Es realitzaren preses de mostra en els següents temps de creixement (coincideixen amb els punts de les corbes de les figures 4.24 i 4.25): 0 i 4 hores (inici de la fase exponencial), 24 hores (a la meitat de la fase exponencial), 43 hores (final de la fase exponencial) i 96 hores (fase estacionària).

La presència d'exoproteases en el medi de cultiu sobrenedant dels volums de mostra, un cop separades les cèl·lules per centrifugació, podia detectar-se, de forma indirecta, mitjançant el mètode descrit en l'apartat 3.8.2 de **Materials i mètodes**. Les proteases exocel·lulars del sobrenedant, en contacte amb mannopteïnes de llevat com a substrat, haurien d'actuar trencant els enllaços peptídics i alliberant aminoàcids o oligopeptids, de forma que el balanç final de grups amino lliures hauria d'augmentar respecte el sobrenedant que no es posava en contacte amb el substrat mannopteic (mostra control).

Els resultats obtinguts en la majoria de casos indiquen que l'activitat proteasa en el sobrenedant no és significativa, excepte a 24 hores de creixement i en presència de dosis elevades d'etanol (14 %), amb nivells força baixos, tant per a Lo 84.13 (**0,44 ± 0,01**) com per a S3 (**0,38 ± 0,09**), expressats com a mg NH<sub>3</sub> alliberats·μg de proteïna<sup>-1</sup>.

Tots els assaigs es realitzaren per duplicat, en cadascun dels replicats fets amb les mateixes condicions de cultiu, i s'obtingueren idèntics resultats. Les constatacions de



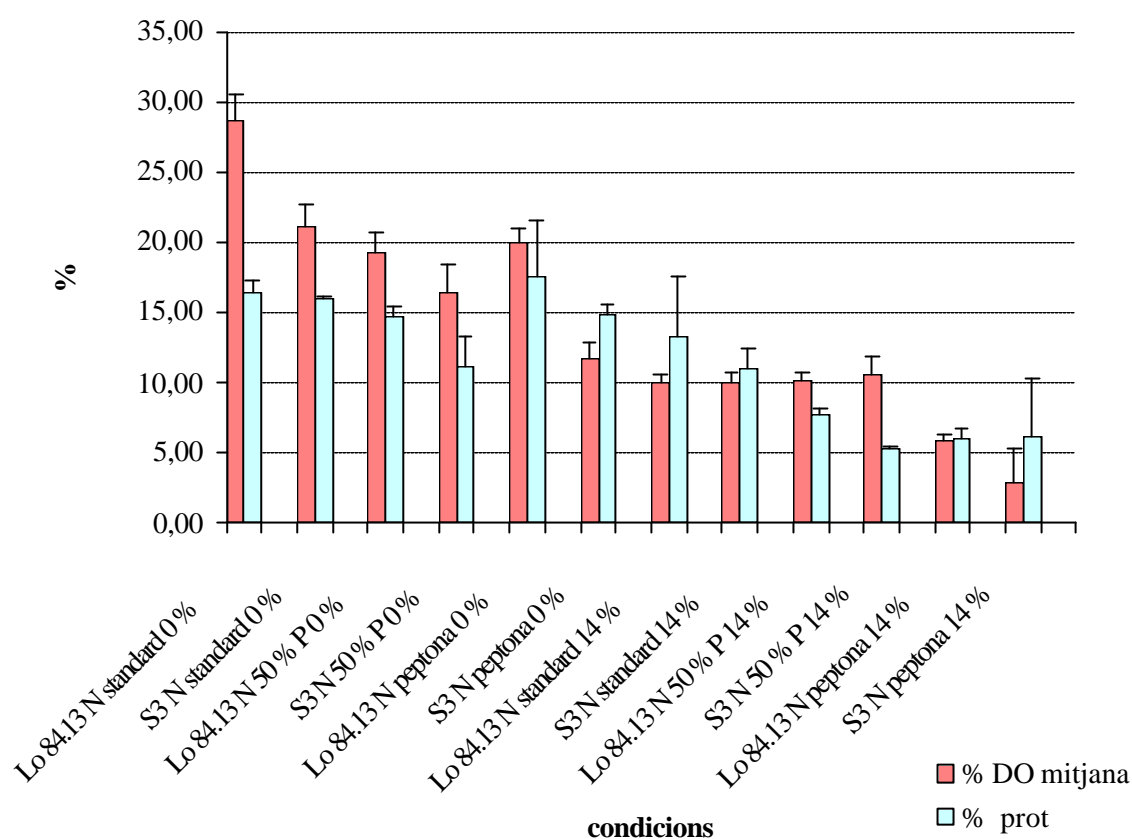
Rollán *et al.* (1993) i de Guilloux-Benatier *et al.* (1993) –els primers dels quals van detectar dues activitats proteolítiques extracel·lulars diferents en quatre soques d'*O. oeni*, mentre que els segons també detectaren un augment d'activitat peptidasa quan *O. oeni* es cultivava en presència de macromolècules de llevats– feien pensar que calia optimitzar el mètode experimental utilitzat. D'altra banda, els valors d'absorbància a 420 nm obtinguts per als controls (mostres en absència de mannoproteïnes) indicaven que el substrat contenia un elevat nombre residual de grups α-amino, provinent del preparat de mannoproteïnes, per la qual cosa es va creure convenient realitzar un pas previ de diàlisi per eliminar al màxim possible els aminoàcids lliures i oligopèptids de petita mida presents en el substrat. Tanmateix, les determinacions realitzades amb aquest substrat dialitzat tampoc mostraren cap increment d'absorbància respecte al control, tot i que sí que el valor absolut d'aquesta es veia reduïda en totes les mostres respecte als assaigs anteriors.

Atès que Laan *et al.* (1993) i Meijer *et al.* (1996) aportaven dades sobre una producció de proteases dependent de la composició del medi en lactococs, molt baixa, per exemple, en medis de cultiu rics en fonts peptídiques i aminoacídiques; i que Marugg *et al.* (1996) havien detectat, en *L. lactis*, nivells alts de producció de mRNAs específics de proteases provinents de cèl·lules que havien crescut en medis amb baixa concentració de pèptids, va semblar convenient assajar uns cultius simulant condicions reals de carència nutricional de nitrogen, per la qual cosa es reduí 10 vegades la concentració d'aquest: de 500 mg/l emprats en el medi FT80 modificat, a 50 mg/l. En la taula 4.12 es presenten els 3 components nitrogenats emprats per elaborar 3 medis diferents en funció de la relació N α-aminat/ pes sec del component.

**Taula 4.12.** Diferents components emprats per elaborar 3 medis pobres en N (50 mg/l) i amb diferents proporcions de N α-aminat.

Component nitrogenat	Codi del medi	% N α-aminat	g per 50 mg N/l
Extracte de llevat sense sal	estàndard	5,7	0,44
Extracte de llevat DI 54	50 % P	2,2	0,58
Peptona de llevat	peptona	4,5	0,41

Per tal de comprovar si, efectivament, la inducció i síntesi de proteases extracel·lulars en *O. oeni* es veia afavorida per la manca de nitrogen disponible en el medi, i com afectava l'etanol en aquest procés, es realitzaren cultius a 24 hores, partint de la mateixa quantitat d'inòcul de les 2 soques Lo 84.13 i S3 emprada en l'anterior experiment. Com era d'esperar, el creixement va ser poc considerable, passant, en els controls més afavorits, d'una DO inicial propera a 0,5 a una DO final a 24 hores de 0,75 com a màxim. En la gràfica de la figura 4.26 s'observen les relacions, expressades en percentatge, d'increment de DO i disminució de concentració proteica per a cada condició estudiada. L'efecte de l'etanol es manifesta clarament en els dos paràmetres i en tots els casos, reduint tant el creixement com el consum de font nitrogenada. Sembla que la soca que respon millor, en general, sigui la soca tipus Lo 84.13, especialment sense etanol al medi. Fins i tot, quan la font de nitrogen correspon a l'extracte de llevat estàndard, en què la variació de concentració proteica és idèntica per a ambdues soques, el rendiment, en termes de biomassa, és favorable a Lo 84.13. La millor adaptació d'aquesta soca a les condicions del medi FT80 modificat i pobre en N es fa encara més palesa quan la font de nitrogen és l'extracte 50 % P o la peptona, els % de N a-aminat dels quals són inferiors a l'extracte estàndard, que vol dir que el percentatge de nitrogen assimilable directament és inferior. En aquests casos, Lo 84.13 mostra un creixement lleugerament superior amb una major incidència en la desaparició de proteïna del medi. Es tracta de tendències que són reproduïbles quan hi ha presència d'etanol al 14 %, si bé les diferències es redueixen considerablement perquè el creixement ja és de per si molt baix. En tot cas, es pot deduir, almenys en els medis N estàndard i N 50 % P, que l'avantatge d'Lo 84.13 respecte S3 desapareix, fet que seria explicable en tractar-se aquesta última d'una soca millor adaptada a condicions de vinificació. D'altra banda, si s'estableix una relació entre el percentatge de disminució de proteïna i l'increment de DO, s'observa que, proporcionalment, la taxa de consum de font de nitrogen respecte al creixement, és superior en presència d'etanol, especialment en els medis *estàndard* i *peptona*, que presenten major fracció de N a-aminat. En el medi *estàndard*, mentre que per a Lo 84.13 la relació % proteïna/ % DO es troba al voltant de 0,6 sense etanol, aquesta augmenta fins a 1,3 en presència de 14 % d'etanol; per a S3, l'augment és menys important, de 0,7 a 1,2. En el medi *peptona*, en canvi, és S3 qui mostra un increment molt destacable, des d'1,3 a 2,2. Aquestes dades, doncs, indueixen a pensar en una possible activació de l'activitat exoproteasa en presència d'etanol.



**Figura 4.26.** Representació, en diagrama de barres, dels increments de biomassa i de la disminució de concentració proteica en les diferents condicions estudiades en medis pobres en nitrogen, per a les soques Lo 84.13 i S3.

A continuació, les mostres corresponents a les 24 hores foren centrifugades per separar-ne el sobrenedant i poder-hi determinar l'activitat proteolítica. Malauradament, però, en cap cas es va poder detectar cap mena d'activitat, per la qual cosa semblava que, aparentment, no hi hauria hagut inducció o excreció d'exoproteases al medi.

No obstant això, diversos indicis experimentals, principalment provinents dels estudis realitzats en bacteris làctics de la llet, fan pensar que, segons quines siguin les soques d'estudi i les condicions de creixement, és possible que els grups  $\alpha$ -amino lliures no augmentin considerablement per efecte de les proteases exocel·lulars (Kunji *et al.*, 1996). S'ha descrit que aquestes tenen una elevada especificitat i són capaces d'alliberar un gran nombre d'oligopèptids d'entre 4 i 8 aminoàcids, però mai aminoàcids lliures, ja que totes les peptidases es concentren intracel·lularment

(Christensen *et al.*, 1999) i actuen sobre els pèptids introduïts gràcies als sistemes de transport de membrana específics. Monnet *et al.* (1986) en *Streptococcus lactis* i més tard en *L. lactis* (1989), o Visser *et al.* (1989) en *Streptococcus cremoris*, així ho varen constatar.

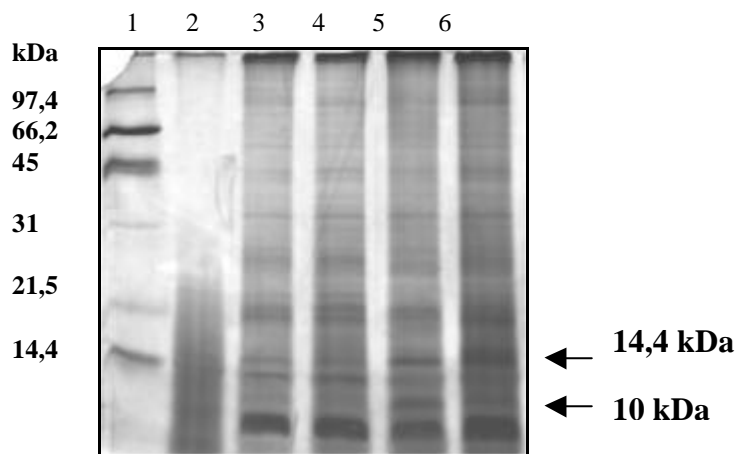
A més, la majoria de proteases descrites (en diferents espècies de lactococcs i lactobacils) es localitzen a la paret cel·lular (Kunji *et al.*, 1996). Totes elles pertanyen a la família de les serinproteases *PrpP*, el substrat de les quals és la caseïna. Diverses evidències experimentals n'han suggerit la localització exocel·lular: les proteases poden ser alliberades de la paret cel·lular per lisi mínima amb tractament de les cèl·lules amb tampó lliure de  $\text{Ca}^{2+}$  o amb lisozim (Laloi *et al.*, 1991; Coolbear *et al.*, 1992); mitjançant marcatge immunològic, Hugenholtz *et al.* (1987) en confirmaren també l'associació a paret, mentre que Kok i De Vos (1994), entre d'altres, comprovaren que els gens que codificaven proteases especificaven una seqüència de senyal N-terminal per al transport a l'exterior de la cèl·lula.

En el nostre disseny experimental, possiblement hauria calgut introduir un tractament suau amb lisozim o SDS abans de centrifugar i separar el precipitat cel·lular, ja que si –com succeeix en lactobacils i lactococs de la llet– les proteases són associades a membrana, la fracció majoritària d'aquestes seria arrossegada amb el sediment cel·lular i en el sobrenedant en restaria una fracció massa baixa per detectar activitat significativa.

D'altra banda, el fet que fos únicament en les mostres de cultiu en presència de 14 % d'etanol on s'hi trobés certa degradació proteolítica, no ens permet assegurar que aquesta fos deguda únicament a l'activitat d'exoproteases, ja que l'etanol també pot exercir un lleu efecte desnaturalitzant sobre les proteïnes (Mathews i van Holde, 1996). Igualment podria haver succeït que l'etanol col·laborés a alliberar una fracció més important de proteases de paret cel·lular al medi. No obstant això, Rollán *et al.* (1998) constataren que el  $\text{SO}_2$  i l'etanol en el vi podien incrementar l'activitat proteolítica.

Per complementar els estudis d'activitat exocel·lular, es va creure convenient realitzar una electroforesi en condicions desnaturalitzants (SDS-PAGE) dels sobrenedants corresponents als creixements en el medi inicial, més ric en nitrogen, i confirmar si el lleu increment d'activitat proteolítica en presència de 14 % d'etanol podia associar-se a l'aparició de noves bandes proteiques o a la sobreexpressió d'altres.

Efectivament, l'etanol induïa la sobreexpressió d'una banda d'uns 14 kDa, especialment en la soca S3. En el perfil d'aquesta soca també s'hi podia observar una banda d'un p.m. proper a 10 kDa que no apareixia en Lo 84.13 (veure figura 4.27).



**Figura 4.27.** Electroforesi SDS-PAGE (12 % poliacrilamida) dels sobredants de cultius d'*O. oeni*: 1) marcador de p.m., 2) Control: medi de cultiu, 3) soca Lo 84.13 amb 0 % d'etanol, 4) soca S3 amb 0 % d'etanol, 5) soca Lo 84.13 amb 14 % d'etanol i 6) soca S3 amb 14 % d'etanol.

Per tot plegat, es pot afirmar que el perfil de proteïnes secretades al medi depèn de la presència d'etanol i de la soca d'*O. oeni*.

#### 4.3.2. Cerca de gens implicats en la síntesi d'exoproteases

Com que no es disposava encara de les seqüències dels gens corresponents a *O. oeni* que codifiquen exoproteases, però sí que es trobaven publicades les seqüències del gen *PrtP* en altres espècies de bacteris làctics, es procedí a l'intent d'identificació d'aquest en les soques Lo 84.13 i S3 d'*O. oeni*, amb l'ajuda d'encebadors degenerats dissenyats per Remize *et al.* (UMS INRA Dijon), a partir de regions fortament conservades de les seqüències descrites de *PrtP* i per comparació entre les diferents espècies.

Foren seleccionades les seqüències proteïques disponibles de les espècies més properes a *O. oeni*: *L. lactis subsp. cremoris* (Kok *et al.*, 1988), on per primer cop es va seqüenciar *PrtP*; *Lb. paracasei* (Holck i Næs, 1992), *Lb. helveticus* (Pederson *et al.*, 1999) i *Lb. delbrueckii* (Germond, 1999). Mitjançant un alineament múltiple de

seqüència (Clustal W [1.81]) (veure ANNEX D) es pogueren cercar els blocs de seqüència aminoacídica més conservats que ens haurien de servir com a seqüències consens per al disseny dels encebadors degenerats, que no són altra cosa que mescles d'encebadors de PCR per intentar cobrir el màxim de possibilitats d'hibridació a seqüència diana, quan alguna de les bases nitrogenades d'aquesta no són conegudes per raó de la degeneració del codi genètic.

Els encebadors *PrtP*-oenos-*F* i *PrtP*-oenos-*R* (taula 3.17 de **Materials i mètodes**) amplificarien un fragment d'uns 1870 pb, ja que la primera base nitrogenada de *PrtP*-oenos-*F* hibrida en la posició +1824 (prenent com a motlle la seqüència de *L. lactis subsp. cremoris*) i la de *PrtP*-oenos-*R* ho fa en +3693. Tanmateix, com es pot veure en la mateixa taula, l'encebador *PrtP*-oenos-*F* presenta un grau de degeneració excessiu, que accentua la pèrdua d'especificitat, ja que en la mescla d'encebadors *F* que utilitzaríem n'hi hauria fins a 96 de diferents, dels quals únicament hibridarien correctament amb la seqüència diana alguns d'ells, però que potser es trobarien en una concentració massa baixa per oferir un producte final de PCR detectable.

Efectivament, en les condicions de PCR assajades, no fou possible detectar la formació de cap banda de producte. En l'ANNEX D s'indiquen els paràmetres de les reaccions d'amplificació.

En la primera prova s'escollí un valor de temperatura d'hibridació (*annealing*) ( $T_a$ ) establint, com a suposició de partida, que dels encebadors que componien la mescla degenerada poguessin hibridar aquells la  $T_m$  dels quals es trobés al voltant de 46°C, un valor de compromís entre *PrtP*-oenos-*F* i *PrtP*-oenos-*R* (veure, a la taula 3.17 de **Materials i mètodes**, els intervals de  $T_m$  corresponents).

Reprenent la consideració ja esmentada que *PrtP*-oenos-*F* era excessivament degenerat, es cercà un segon encebador en una altre fragment també d'elevada homologia, tot i que amb un grau de degeneració més baix, de 8, tal com s'observa en la mateixa taula 3.17 (veure també ANNEX D).

En la segona prova de PCR, se suavitzaren les condicions del cicle inicial: de 94 a 92°C i de 3 a 2 minuts i s'escollí una  $T_a$  de compromís per als encebadors *PrtP*-oenos-*F2* i *PrtP*-oenos-*R*: 52°C, condicions que s'assajaren també amb l'anterior encebador *PrtP*-oenos-*F*, sense obtenir resultats positius en cap dels casos. En el cas de *PrtP*-

oenos-F2, es reduí també el temps d'elongació per a cada cicle, de 2 a 1 minut, ja que la longitud del fragment a amplificar disminuïa respecte el primer cas.

Per restringir les condicions de PCR es portà a terme una tercera prova incrementant  $T_a$  fins a 54°C, que tampoc donà cap amplificació.

Cal destacar que, en cap dels casos, la mostra de DNA de *L. lactis*, que constituïa el control positiu –ja que se sap del cert que és portadora del gen *PrtP*– va donar positiu. Tot fa pensar que el grau de degeneració dels encebadors emprats comportava una dificultat addicional alhora de trobar les condicions de PCR òptimes i que, o bé haurien calgut més assaigs modificant alguns d'aquells paràmetres, o bé redissenyar algun dels encebadors.

En paral·lel a *PrtP*, Poquet *et al.* (2000) han identificat, més recentment, una serinproteasa exportada en *L. lactis*, pertanyent a la família *HtrA* i lligada a membrana, amb el centre catalític exposat a la superfície. Sembla que no estigui directament implicada en la síntesi nitrogenada com ho està *PrtP*, sinó que intervingui en la degradació i maduració de proteïnes exportades pel propi bacteri, com si es tractés d'un "control de qualitat". Gràcies a les dades sobre seqüències genòmiques d'*O. oeni* de què disposa el grup de l'UMS INRA de Dijon (França), dirigit per Jean Guzzo, fou possible identificar un fragment d'elevada homologia amb la regió d'*HtrA* corresponent de *L. lactis* i es dissenyaren sengles encebadors per a l'obtenció d'un producte amplificat de 231 pb (veure encebadors en la taula 3.18).

Com es pot veure en la figura 4.29, s'obtingué una banda de producte amplificat en la zona esperada. Aquest producte, doncs, seria utilitzat per elaborar una sonda per a la detecció d'expressió del gen *hrtA* mitjançant *Northern blot*.

#### 4.3.3. Anàlisi dels RNAs per *Northern blot*

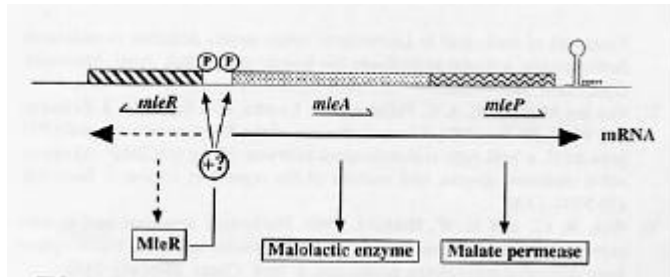
Aquesta anàlisi perseguia un doble objectiu:

- verificar l'expressió d'*HtrA* enfront d'un estrès nutricional per manca de nitrogen,
- avaluar l'activitat malolàctica i la resposta d'estrès en les condicions d'estudi, mitjançant sondes dels gens *mleA*, *hsp18* i *trxA*.

• **Obtenció de les sondes dels gens**

Prèviament, doncs, va caldre obtenir les sondes d'aquests tres darrers gens, per amplificació amb encebadors dissenyats a partir de seqüències ja conegudes en *O. oeni*.

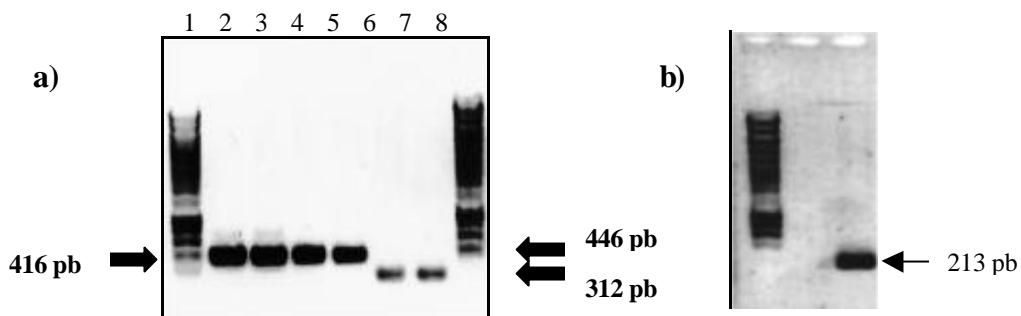
Labarre *et al.* (1996a, 1996b) havien caracteritzat el *locus mle* en *O. oeni*, que inclou el gen de l'enzim malolàctic, *mleA*, i el gen de malat permeasa, *mleP* (veure figura 4.28).



**Figura 4.28.** Caracterització del *locus mle* (enzim malolàctic) segons Labarre *et al.* (1996a, 1996b).

Així doncs, fou possible obtenir sengles encebadors a partir de la seqüència d'*mleA* (1625 pb) (*GenBank*, AC X82326) que donarien lloc a un amplificat d'uns 416 pb (veure taula 3.13 i figura 4.29).

Al seu torn, les seqüències del gen *hsp18* (*GenBank*, AC X99468) (Jobin *et al.*, 1997) i del gen *trxA* (Jobin *et al.*, 1999), que codifica per a la tioredoxina, ens permeteren elaborar els encebadors indicats en la taula 3.13 i obtenir les sondes amb 446 pb i 312 pb, respectivament (veure també la figura 4.29).



**Figura 4.29.** Imatges dels gels amb els fragments amplificats dels gens *mleA*, *hsp18* i *trxA* (a) en les soques Lo 84.13 i S3: 1 i 8) Marcador de p.m. de DNA, 2) *mleA* Lo 84.13, 3) *mleA* S3, 4) *hsp18* Lo 84.13, 5) *hsp18* S3, 6) *trxA* Lo 84.13 i 7) *trxA* S3. En b, amplificat d'*htrA*.

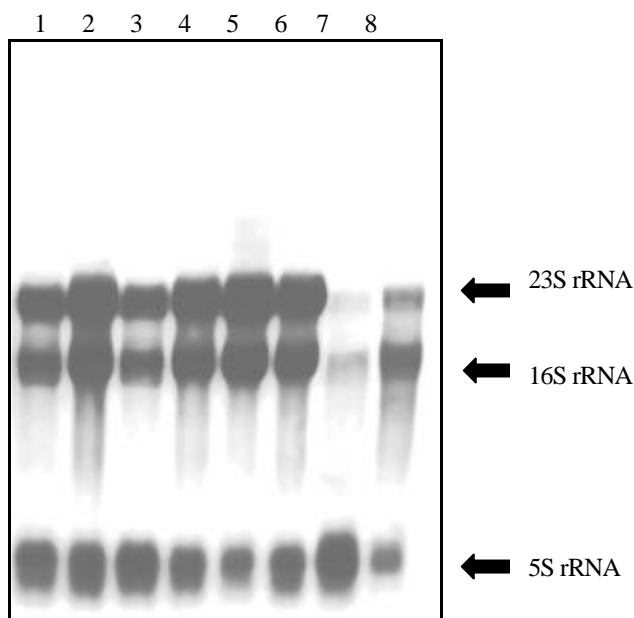


A continuació, mitjançant el mètode de marcatge inespecífic amb  $P^{32}$  descrit en l'apartat 3.8.7, se sintetitzaren les sondes per a la detecció de transcrits d'mRNA.

- **Extracció dels RNAs totals**

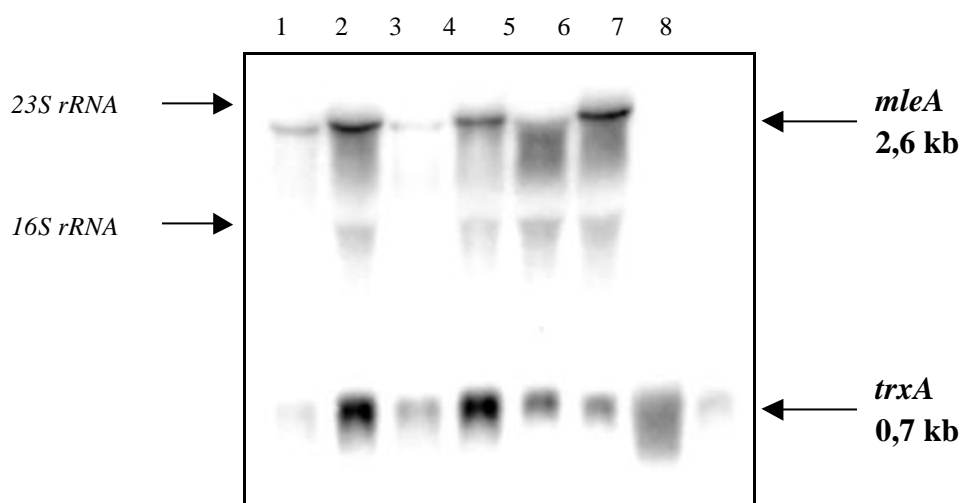
En ésser les mostres de cultius crescuts en presència de 14 % d'etanol aquelles que oferien una certa activitat proteolítica en el sobrenedant, se seleccionaren per a l'anàlisi dels seus RNAs, així com els controls corresponents (0 % d'etanol). Els temps d'incubació corresponien als 30 min i 24 hores per a totes les condicions.

L'extracció, quantificació, electroforesi en condicions desnaturalitzants i la transferència i fixació del gel resultant es realitzaren tal com s'indica, respectivament, dels apartats 3.8.3 a 3.8.6. En la figura 4.30, es mostra la tinció amb bromur d'etidi del gel de formamida-agarosa realitzat en condicions desnaturalitzants, que fou carregat amb la mateixa concentració d'RNA en totes les mostres (10  $\mu$ g). Clarament hi sobresurten les bandes majoritàries, 23S rRNA i 16S rRNA, i una petita banda inferior, corresponent a 5S rRNA. Les dues darreres posicions presenten, aparentment, una menor quantitat d'RNA total, derivades possiblement d'error experimental i degradació parcial de la mostra.



**Figura 4.30.** Electroforesi en condicions desnaturalitzants de l'RNA total de dues soques d'*O. oeni*, crescudes en les següents condicions: Lo 84.13: 1) 0 % etanol, 30 min; 2) 14 % etanol, 30 min; 5) 0 % etanol, 24 h; 6) 14 % etanol, 24 h. S3: 3) 0 % etanol, 30 min; 4) 14 % etanol, 30 min; 7) 0 % etanol, 24 h; 8) 14 % etanol, 24 h.

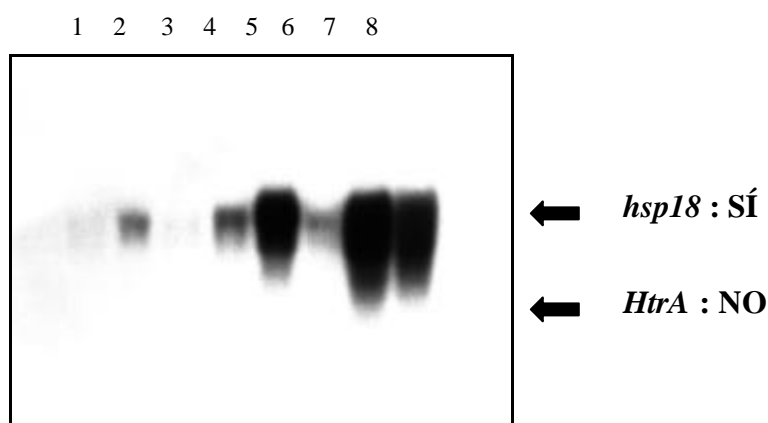
La hibridació amb la sonda per *mleA* revelava l'existència del transcrit tant en els controls com en les mostres amb etanol, per bé que en aquestes últimes el senyal era més intens, com es pot veure en la figura 4.31, mentre que en aquelles els nivells eren molt febles. De forma semblant succeïa amb el transcrit de *trxA*. El gen *trxA*, segons Jobin *et al.* (1999), s'expressa de forma similar al llarg de les diferents fases de creixement cel·lular, excepte en la fase estacionària, en què ho fa amb certa major intensitat, mentre que en presència d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (estrès oxidatiu) o de xoc tèrmic (42°C) augmenten els nivells del seu mRNA, per la qual cosa els autors descriuen la tioredoxina TrxA com una altra proteïna d'estrès. Efectivament, els resultats obtinguts mostren que, a 30 minuts d'incubació i davant d'una situació fortament estressant com ho és l'etanol al 14 %, els nivells de transcrit de *trxA* són superiors als dels controls. En canvi, a les 24 hores (final de fase exponencial i inici d'estacionària) es constata que l'expressió d'aquest gen no depèn de l'estrès per etanol, però que sí que en depèn la de l'enzim malolàctic, augmentada, almenys en la soca tipus Lo 84.13 (malauradament, no disposem d'uns resultats prou fiables per a S3, com es pot recordar d'allò que s'ha dit més amunt).



**Figura 4.31.** Autoradiograma del *Northern blot* després de la hibridació amb les sondes per a *mleA* i *trxA*. Les fletxes indiquen les posicions respectives de 23S, 16S i dels transcrits corresponents. Relació de mostres: Lo 84.13: 1) 0 % etanol, 30 min; 2) 14 % etanol, 30 min; 5) 0 % etanol, 24 h; 6) 14 % etanol, 24 h. S3: 3) 0 % etanol, 30 min; 4) 14 % etanol, 30 min; 7) 0 % etanol, 24 h; 8) 14 % etanol, 24 h.

Pel que fa a l'expressió del gen que codifica per a la proteïna d'estrès *Hsp18* (també catalogada com a Lo18), es pot comprovar en la figura 4.32 que el nivell de

transcrit és superior en les mostres corresponents al final de la fase exponencial i inici de la fase estacionària, fet que coincideix amb les aportacions d'en Guzzo *et al.* (1997, 2000). Les incubacions durant 30 minuts amb etanol mostren clarament una certa inducció, lleument superior en la soca S3, quan en els controls no n'apareix de significativa. En canvi, a les 24 hores la situació es capgira, i sembla que la presència d'etanol al medi inhibeixi lleument l'expressió. En realitat, és probable que en els cultius amb 14 % d'etanol les cèl·lules encara no hagin arribat al final de la fase exponencial de creixement, que és molt més lent, com es pot recordar de les gràfiques de les figures 4.24 i 4.25, per la qual cosa els resultats no són completament extrapolables, ja que les cèl·lules control i les exposades a etanol no es troben en la mateixa fase de creixement. Tanmateix, hom pot deduir que la soca S3 presenta una major capacitat d'expressió d'*Hsp18*, en coherència amb el fet que es tracti d'una soca major adaptada a les condicions de vinificació.



**Figura 4.32.** Autoradiograma del *Northern blot* després de la hibridació amb les sondes per a *hsp18* i *htrA*. Les fletxes indiquen les posicions respectives dels transcrits corresponents. *HtrA*, però, no es detecta. Relació de mostres: Lo 84.13: 1) 0 % etanol, 30 min; 2) 14 % etanol, 30 min; 5) 0 % etanol, 24 h; 6) 14 % etanol, 24 h. S3: 3) 0 % etanol, 30 min; 4) 14 % etanol, 30 min; 7) 0 % etanol, 24 h; 8) 14 % etanol, 24 h.

D'altra banda, no fou possible detectar cap mena d'expressió d'*htrA*, ni quan es realitzà la hibridació únicament amb aquesta sonda, per evitar possibles interferències si es feia conjuntament amb *hsp18*. Tot i que caldrien més assaigs experimentals, es pot afirmar que aquest gen no s'expressa en cap de les condicions estudiades en les soques Lo84.13 i S3.

## 4.4. Estudi de la influència d'alguns components del vi sobre la dinàmica de poblacions dels bacteris làctics durant la FA i la FML en microvinificacions simulades amb most

### 4.4.1. Característiques de les vinificacions

Per poder fer un seguiment més directe de la incidència d'alguns dels components del vi sobre la dinàmica d'evolució de les poblacions de diferents soques d'*O. oeni* al llarg de les fermentacions víniques, es va creure convenient simular una sèrie de vinificacions a escala de laboratori (microvinificacions), a partir d'un most comercial i amb la seguretat que no duia cap càrrega microbiològica prèvia. Això ens permetia controlar, ja des de l'inici, la presència de microorganismes i d'inocular-los en les concentracions desitjades, molt similars a les condicions reals de vinificació, tant els llevats com els bacteris làctics. D'aquests últims, se seleccionaren 3 soques d'estudi representatives, com són la soca de col·lecció CECT 4100, la soca CR1 aïllada pel nostre grup de recerca (Reguant, 2001) i la soca comercial Vitolactic (Sofralab [Martin Vialatte] S.A., Epernay, França).

Alhora, es disposava de l'avantatge d'utilitzar un mateix tipus de most i d'incorporar-hi, de forma unifactorial, cadascun dels components d'estrès que es volien estudiar. Per uniformitzar la composició de partida respecte a alguns paràmetres que podien afectar directament el desenvolupament dels bacteris làctics, es realitzaren una sèrie de correccions sobre la composició inicial d'aquell most:

- Concentració de sucres corregida fins a 220 g/l, amb addició de glucosa i fructosa en proporció 1:1.
- Concentració d'àcid L-màlic de 3 g/l, amb addició d'àcid DL-màlic considerant que el 50 % correspon a l'estereoisòmer L.
- pH ajustat a 3,5 amb NaOH i HCl 10 N.

En la taula **4.13** s'indiquen cadascun dels components d'estrès i la nomenclatura emprada per a les diferents microfermentacions, les quals s'han realitzat per duplicat.

**Taula 4.13.** Condicions d'estrès, codis i soques d'*O. oeni* inoculades en les diferents microvinificacions.

Component d'estrès	Nomenclatura	Soca inoculada
<b>Controls</b>	<i>C llevats</i>	Sense inocular
	<i>C CECT 4100</i>	CECT 4100
	<i>C CR1</i>	CR1
	<i>C Vitilactic</i>	Vitilactic
	<i>C mixt</i>	CECT 4100, CR1, Vitilactic
<b>5 mg/l C12</b>	<i>C12 CECT 4100</i>	CECT 4100
	<i>C12 CR1</i>	CR1
	<i>C12 Vitilactic</i>	Vitilactic
	<i>C12 mixt</i>	CECT 4100, CR1, Vitilactic
<b>10 mg/l Cu<sup>2+</sup></b>	<i>Cu CECT 4100</i>	CECT 4100
	<i>Cu CR1</i>	CR1
	<i>Cu Vitilactic</i>	Vitilactic
	<i>Cu mixt</i>	CECT 4100, CR1, Vitilactic
<b>40 mg/l SO<sub>2</sub> total <sup>1</sup></b>	<i>SO<sub>2</sub> CECT 4100</i>	CECT 4100
	<i>SO<sub>2</sub> CR1</i>	CR1
	<i>SO<sub>2</sub> Vitilactic</i>	Vitilactic
	<i>SO<sub>2</sub> mixt</i>	CECT 4100, CR1, Vitilactic

(1) Els nivells de SO<sub>2</sub> lliure presents al most de partida eren de 2 mg/l. Els nivells de SO<sub>2</sub> lliure al final de la FA oscil·laven entre 8 i 10 mg/l en les diferents microvinificacions, valors que es mantenen al llarg de la FML (mètode d'assaig GAB, García Barceló, 1990).

Tot just abans d'afegir els esmentats components i un cop corregit el most, s'hi inoculaven els llevats i els bacteris làctics en el volum total que després es repartiria en els diferents matrassos, per assegurar així que les poblacions inicials eren el més homogènies possible i el seguiment de les diferents fermentacions permetés extreure conclusions comparatives.

Com ja s'ha indicat en l'apartat **3.4.1 de Materials i mètodes**, es va utilitzar la soca de llevat comercial Lalvin RV1, de Lallemmand, aïllada a la Facultat d'Enologia de la nostra universitat (Torija *et al.*, 1999). La població inicial inoculada era de  $5 \cdot 10^6$

UFC/ml, addicionada després de reactivar el preparat liofilitzat comercial segons les indicacions del fabricant.

Pel que fa a la inoculació de les 3 soques d'*O. oeni*, es va optar per introduir un pas previ de preadaptació per reduir al màxim la mortalitat inicial que s'esdevindria en iniciadors crescuts directament en medi ric MRFSM (Wibowo *et al.*, 1988). Aquesta preadaptació es realitzava en el propi most, rebaixada la concentració de sucres per dilució amb H<sub>2</sub>O en proporció 1:1, amb 5 g/l d'extracte de llevat com a complement nutritiu i pH 3,5 (Nault *et al.*, 1995). Quan les cèl·lules del cultiu iniciador es trobaven en plena fase exponencial (48-52 hores de creixement) es preparava un banc de dilucions per poder inocular una població inicial en el most d'entre 10<sup>2</sup> i 10<sup>1</sup> UFC/ml, tant en el cas en què es tractava d'una sola soca (controls de soca) com quan s'inoculaven totes tres en idèntiques proporcions, de forma que cadascuna d'elles representés 1/3 de l'inòcul total (inòcul mixt).

Així doncs, un cop finalitzada la inoculació i repartits els volums (250 ml) en els diferents matrassos Erlenmeyer, s'inicià el procés de vinificació a petita escala en un incubador a 25 °C, del qual s'anà fent el seguiment i l'aïllament de colònies per a tipificació tal com s'indica en l'apartat **3.6 de Materials i mètodes** (veure figura 3.2).

#### 4.4.2. Efectes sobre la FML

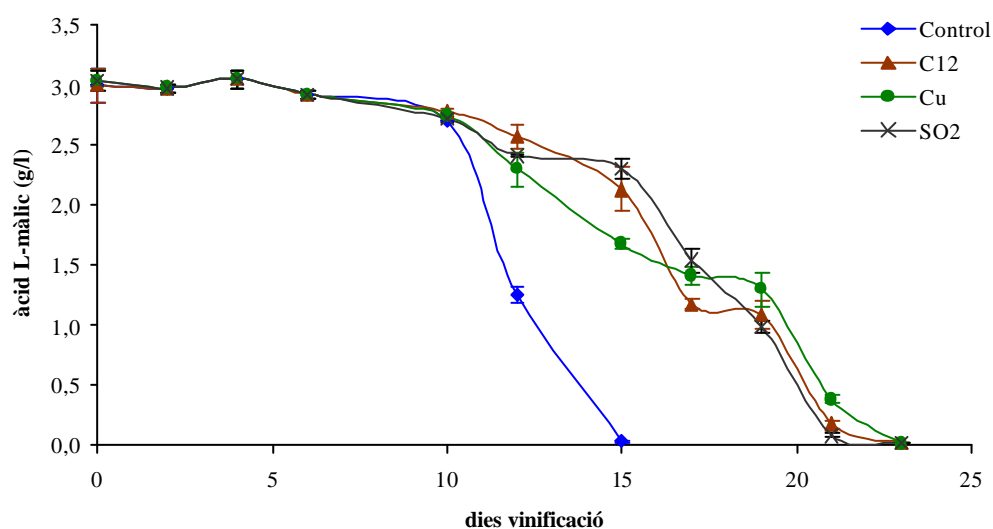
En la taula 4.14, s'indiquen els dies de finalització de la FML per a les microvinificacions control de soca i, en la figura 4.33, la degradació de l'àcid L-màlic al llarg de les FMLs corresponents als mostos inoculats amb les 3 soques i en presència dels diferents components d'estudi.

**Taula 4.14.** Temps de durada (dies) de la vinificació (FA+FML) en presència dels diferents components, per a les microvinificacions on intervé una sola soca.

	Control	C12	Cu	SO <sub>2</sub>
CECT 4100	22	31	24	29
CR1	16	24	20	22
Vitilactic	15	23	19	23

Es pot comprovar que l'efecte retardador més acusat correspon a C12, que endarrereix la finalització de la FML entre uns 7 dies (per al cas de Vitilactic) i 10 dies en el cas de CECT 4100. El  $\text{SO}_2$ , al seu torn, també endarrereix considerablement la FML, essent la soca CR1 la que presenta major capacitat per finalitzar abans el procés. En el cas de Vitilactic, l'efecte és equiparable al de C12. Els 10 mg/l de coure endarrereixen entre 2 i 4 dies la FML, i sembla que la soca que millor s'hi adapta sigui Vitilactic, com en el cas de C12. Aquesta soca ja es mostra, en el control, capaç de finalitzar la FML abans que les altres dues, mentre que CECT 4100 és, en diferència, la menys adaptada en tots els casos.

Pel que fa a les FMLs portades a terme per les 3 soques inoculades conjuntament, es pot veure en la gràfica de la figura 4.33 com les 3 condicions d'estrès estudiades alenteixen el procés més d'una setmana i que, si bé la davallada de l'àcid L-màlic es comença a fer palesa un cop acabada la FA, en el cas del control és molt més acusada, mentre que la FML sembla que es prolongui en el altres casos, ja sigui perquè els primers dies la disminució d'àcid L-màlic sigui molt més lenta (amb un pendent menys elevat que el control) o bé perquè, en el cas del *Cu mixt*, a mitja FML aparegui un petit període d'estancament que es tradueix en un punt d'inflexió i una evolució final del procés molt similar a les altres dues condicions d'estrès estudiades. Curiosament, aquest punt d'inflexió apareix en tots tres casos, en *C12 mixt* també a mitja FML, mentre que en  $\text{SO}_2$  mixt, ho fa a l'inici de la FML, al voltant dels 2,5 g/l d'L-màlic.

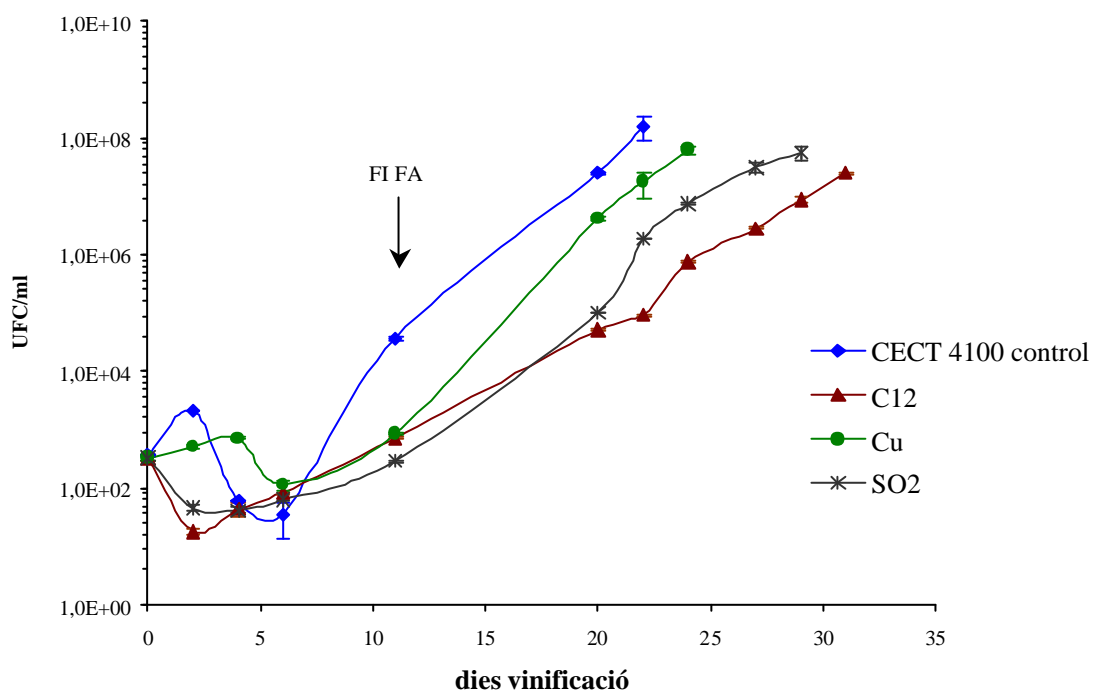


**Figura 4.33.** Degradació de l'àcid L-màlic durant les vinificacions en presència de les 3 soques: CECT 4100, CR1 i Vitilactic, en condició control i en presència de C12, coure (Cu) i  $\text{SO}_2$ .

#### 4.4.3. Efecte sobre el creixement dels bacteris làctics

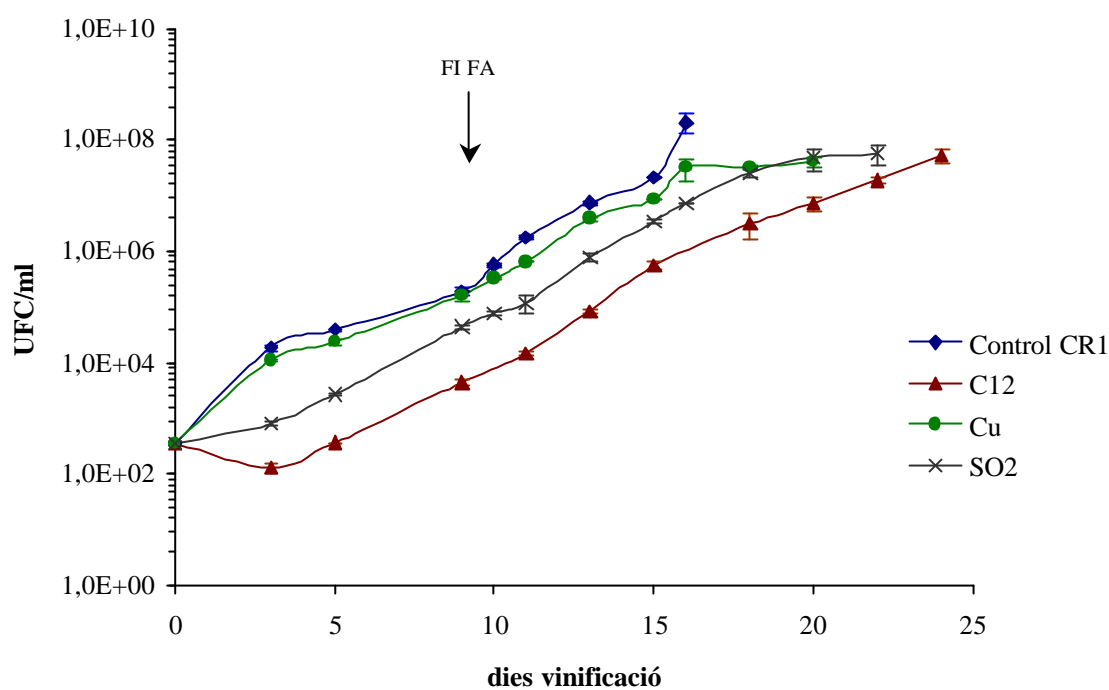
Amb l'estudi de l'evolució de biomassa es podrà contrastar encara més les dades anteriors. En les figures 4.34, 4.35 i 4.36 es representa el creixement de CECT 4100, CR1 i Vitilactic, respectivament, en cadascuna de les condicions estudiades.

En tots els casos es pot establir una relació directa entre la velocitat de creixement i la durada de la FML. Al mateix temps, a simple vista es comprova que en tots els controls, la quantitat de biomassa final és sensiblement superior, de l'ordre de  $2 \cdot 10^8$  UFC/ml, i que és C12 qui presenta un major efecte inhibitor sobre CECT 4100 i CR1, ja des de l'inici de la vinificació –en què la fase de latència és acusada i amb una davallada de la població total– fins al final de la FML, en què el nombre de viables no supera  $4 \cdot 10^7$  UFC/ml (figures 4.34 i 4.35).

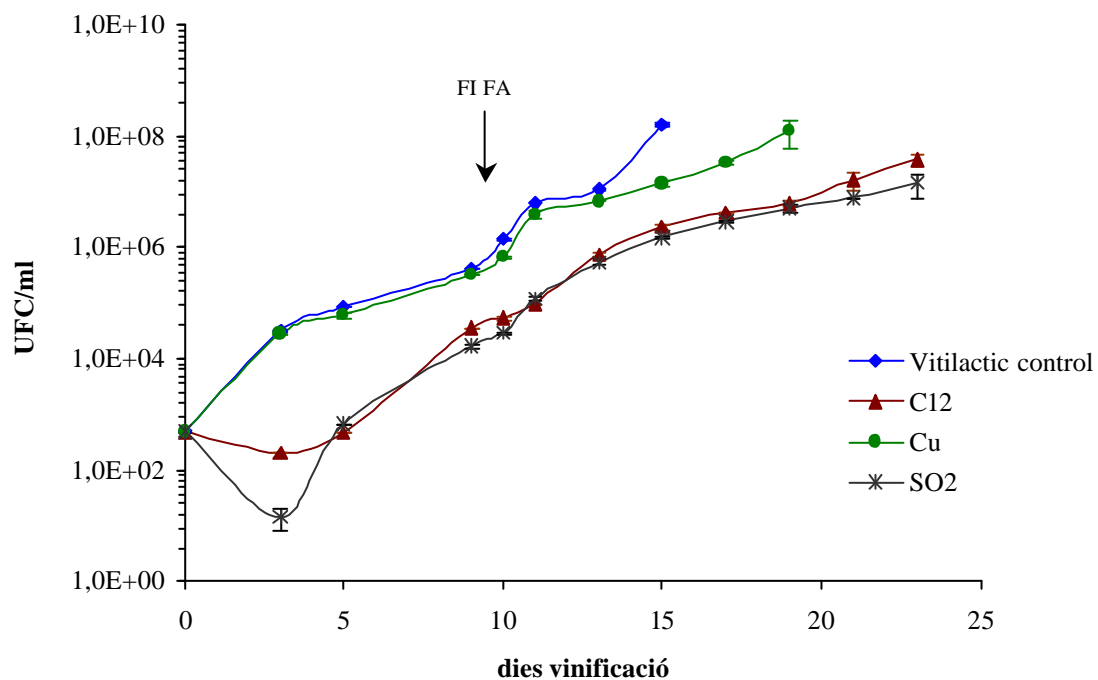


**Figura 4.34.** Evolució de la població viable de la soca CECT 4100 al llarg de les vinificacions en presència dels diferents components estudiats.





**Figura 4.35.** Evolució de la població viable de la soca CR1 al llarg de les vinificacions en presència dels diferents components estudiats.



**Figura 4.36.** Evolució de la població viable de la soca Vitilactic al llarg de les vinificacions en presència dels diferents components estudiats.

En canvi, com es pot observar en la figura 4.36, és el sulfurós qui hi mostra un efecte inhibidor més important, lleugerament superior al de l'àcid gras C12, especialment en la fase inicial de latència, on l'índex de mortalitat se situa un ordre de magnitud per sobre del provocat per C12.

Sí que és generalitzable la constatació que el sulfurós endarrereix, en tots els casos, l'inici de la FML, i especialment sobre CECT 4100, on es produeix una fase inicial de latència durant els 5 primers dies, amb una mortalitat cel·lular superior al 100 %. Com es pot veure en la figura 4.34, la població es recupera en la última fase de FA, al final de la qual presenta nivells similars als de l'inòcul (dia 0), moment a partir del qual la taxa de creixement és similar a la del control, trigant uns 8 dies més a finalitzar la FML, sense arribar al mateix nivell de biomassa final. La diferència principal del comportament de CECT 4100 i Vitolactic en presència de SO<sub>2</sub> rau, doncs, en la capacitat de recuperació cel·lular després de la davallada inicial, capacitat molt superior en Vitolactic.

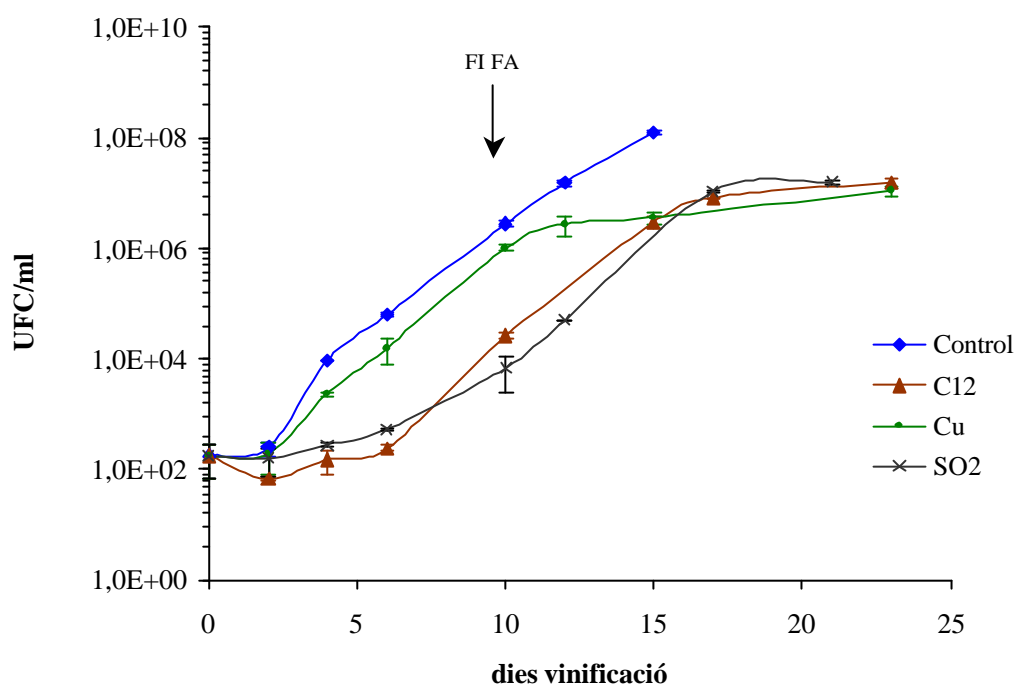
En canvi, la soca menys afectada per SO<sub>2</sub> és CR1 –fet que ja s'apuntava en la taula 4.14– i que mostra una certa fase de latència a l'inici de la vinificació, si bé sense mortalitat significativa en comparació amb les altres dues soques. A més, ja a meitat de FA la taxa de creixement s'igualava a la del control (figura 4.35).

Pel que fa a l'efecte del coure, aquest produeix una lleu disminució sobre el nombre de cèl·lules i endarrereix lleugerament la finalització de la FML (3-4 dies) per a totes 3 soques. Curiosament, la forma d'actuar d'aquest component es manifesta diferent que en els casos de C12 i SO<sub>2</sub>, ja que la corba de creixement és molt similar a la del control, sobretot en CR1 i Vitolactic, en què l'inòcul inicial no es veu significativament afectat. Tan sols es diferencia en l'estancament de l'augment de biomassa quan aquesta supera 10<sup>6</sup> UFC/ml, i que implicaria un alentiment de la degradació d'àcid L-màlic (dades no mostrades), prolongant alguns dies més la FML i portant a uns nivells de població final considerablement diferents als dels controls (al voltant de 5·10<sup>7</sup> UFC/ml).

Per últim, caldria remarcar que CR1 i sobretot Vitolactic manifesten, en els controls i en presència de coure, un creixement diàuxic (Lengeler *et al.*, 1999) ja acabada la FA (també durant aquesta es pot constatar com els primers dies després d'inocular, el creixement és més accelerat perquè catabolitzen part de glucosa i fructosa i després la competència dels llevats s'imposa). Wibowo *et al.* (1988) varen observar un fenomen similar en vins australians on hi restava entre 2 i 3 g/l de sucres residuals un cop

finalitzada la FA. Ara bé, en el nostre cas la raó de l'aparent diàuxia no es podria explicar de la mateixa forma, ja que com es podrà veure en la figures **4.43c** i **4.43d**, els nivells de sucres reductors són molt baixos acabada la FA i la seva degradació no mostra diferències significatives amb les altres condicions.

En la figura **4.37**, es pot observar l'evolució poblacional a partir d'un inòcul conformat per idèntiques proporcions de totes 3 soques.



**Figura 4.37.** Evolució de la població viable a partir d'un inòcul amb idèntiques proporcions de les 3 soques (CECT 4100, CR1 i Vitilactic), al llarg de les vinificacions en presència dels diferents components estudiats.

Es reproduïxen, de forma similar, els efectes dels diferents components d'estrès que hem vist sobre cadascuna de les soques per separat. El temps de durada (15 dies) de la FML i la dinàmica d'aquesta pel que fa al control, són similars als controls de CR1 i Vitilactic, la qual cosa ja constitueix un indicatiu de quines poden ser les soques responsables de portar a terme la FML. Més encara si observem la petita fase de latència inicial, corresponent als dos primers dies, que podria constituir la manifestació externa de la pèrdua de viabilitat originada, en gran part, sobre el percentatge de cultiu iniciador corresponent a CECT 4100.

La vinificació en *Cu mixt* presenta una gran similitud amb el control en el creixement de biomassa mentre dura la FA, tot i que no assoleixi la mateixa densitat cel·lular, i sembla que es beneficiï d'una fracció dels sucres reductors com a substrats. Després del trasbals, però, el pendent de creixement cel·lular es veu significativament disminuït i el nivell de biomassa final és d'un ordre de magnitud inferior respecte al control, i lleugerament menor al de les altres condicions estudiades. Aquest fet es correspon, d'alguna manera, amb la inflexió en el consum d'àcid L-màlic observada en la gràfica 4.33.

El comportament de les vinificacions *C12 mixt* i *SO<sub>2</sub> mixt* és similar. La fase de latència inicial és lleugerament més important en *C12 mixt*, si bé a partir del 6è dia de vinificació la població es refà i inicia un creixement amb un pendent equiparable al del control, fins que també s'alenteix abans d'arribar a 10<sup>7</sup> UFC/ml, cosa que es reflecteix igualment en el consum d'àcid L-màlic. Per la seva banda, *SO<sub>2</sub> mixt* augmenta progressivament la biomassa ja des del principi, i tot i que també s'alenteix abans d'arribar a 10<sup>7</sup> UFC/ml, finalitza un parell de dies abans que *C12 mixt* i *Cu mixt*, amb una biomassa final lleugerament superior respecte aquestes altres dues.

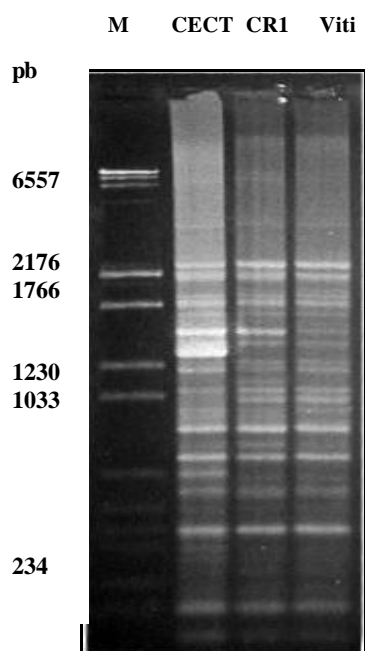
Si hom compara, doncs, les microvinificacions portades a terme amb una única soca d'*O. oeni*, amb les desenvolupades per un inòcul mixt de les 3 soques, es pot dir, en resum, que:

- en condicions *Control* i *C12* la durada és molt similar entre *C Vitilactic* i *C mixt* i *C12 Vitilactic* i *C12 mixt*, respectivament.
- la microvinificació *Cu mixt* es veu significativament desafavorida respecte *Cu CRI* i *Cu Vitilactic*.
- *SO<sub>2</sub> mixt* finalitza abans la FML que en qualsevol de les microvinificacions amb una sola soca i en presència de SO<sub>2</sub>.

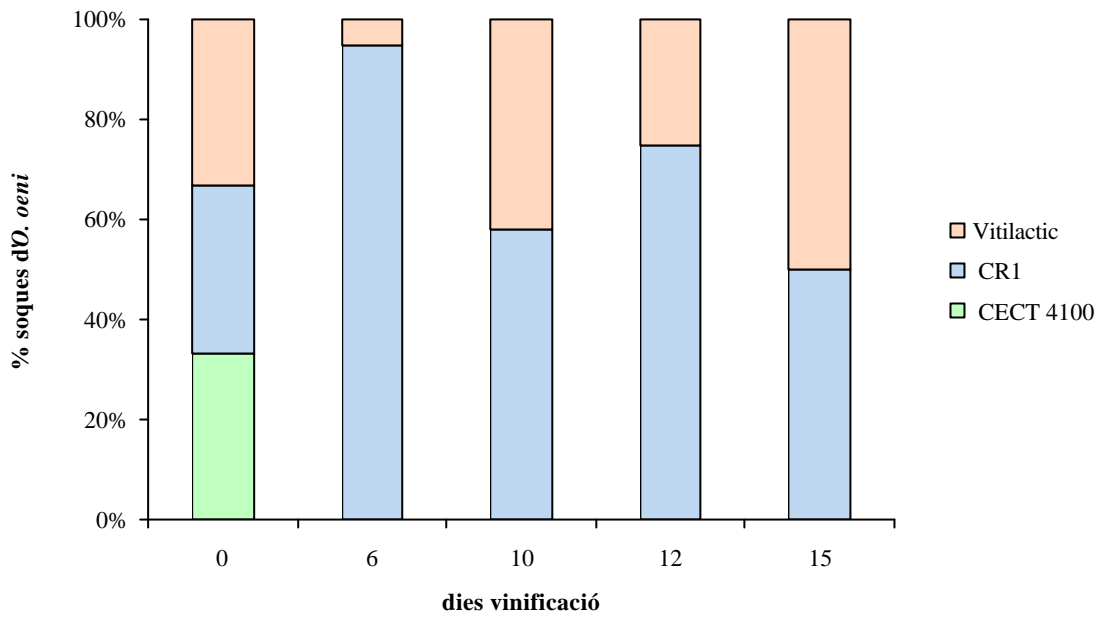
#### 4.4.4. Efecte sobre la dinàmica poblacional d'*O. oeni*

Per comprovar la participació de cadascuna de les soques en les microvinificacions portades a terme pel cultiu iniciador mixt i conèixer quina o quines s'imposaven al llarg de la FML, ha estat convenient tipificar una mostra suficientment representativa de colònies aïllades. Seguint un plantejament similar a Reguant (2001), s'han fet aïllaments de colònies a partir de les mostres de most o de vi corresponents a l'inici de la vinificació (dia 0), a la meitat de la FA (dia 6), al final de la FA (dia 10) i a l'inici, meitat i final de cada FML.

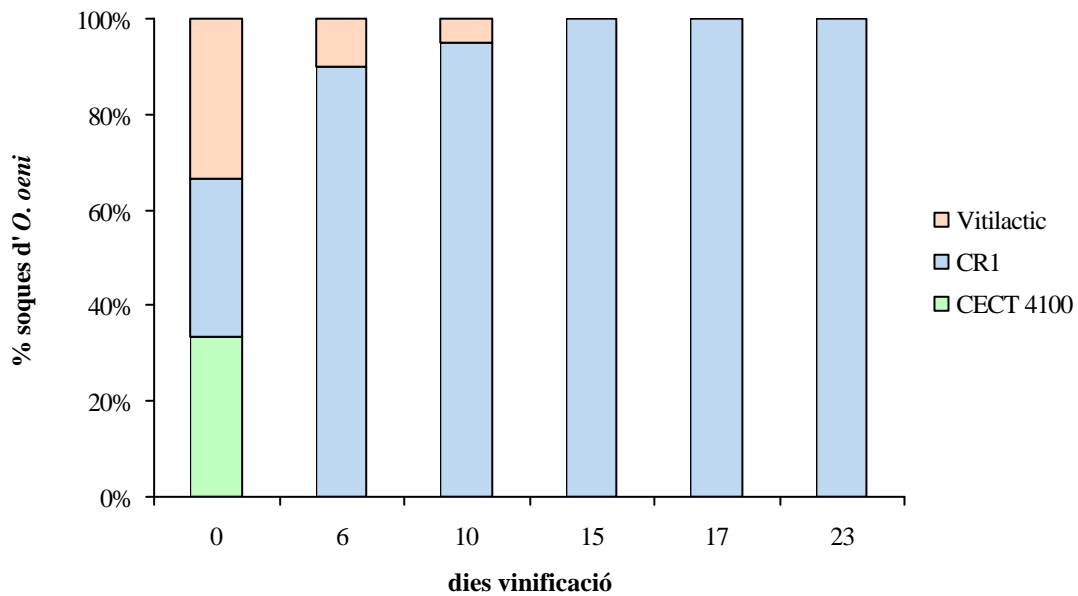
La metodologia d'aïllament és la descrita en l'apartat 3.6.1 de **Materials i mètodes**. De les 30 colònies aïllades de cada placa, 24 han estat tipificades a nivell de soca amb la PCR-RAPD múltiple, segons l'apartat 3.6.5. de **Materials i mètodes** (veure figura 4.38).



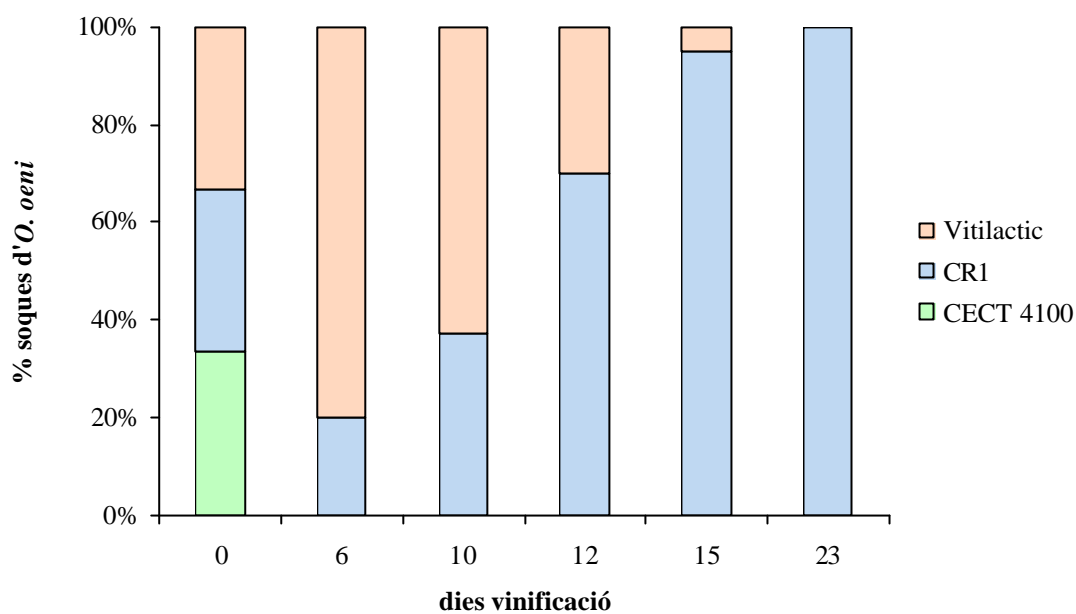
**Figura 4.38.** Perfils resultants de PCR-RAPD múltiple de les 3 soques emprades en les microvinificacions: CECT (CECT 4100), CR1 i Viti (Vitalactic). Electroforesi en gel d'agarosa: M) Marcador de p.m. (*Marker II + Marker VI*, Boehringer Mannheim), del qual només s'indiquen les mides d'algunes de les bandes, en pb (parells de bases).



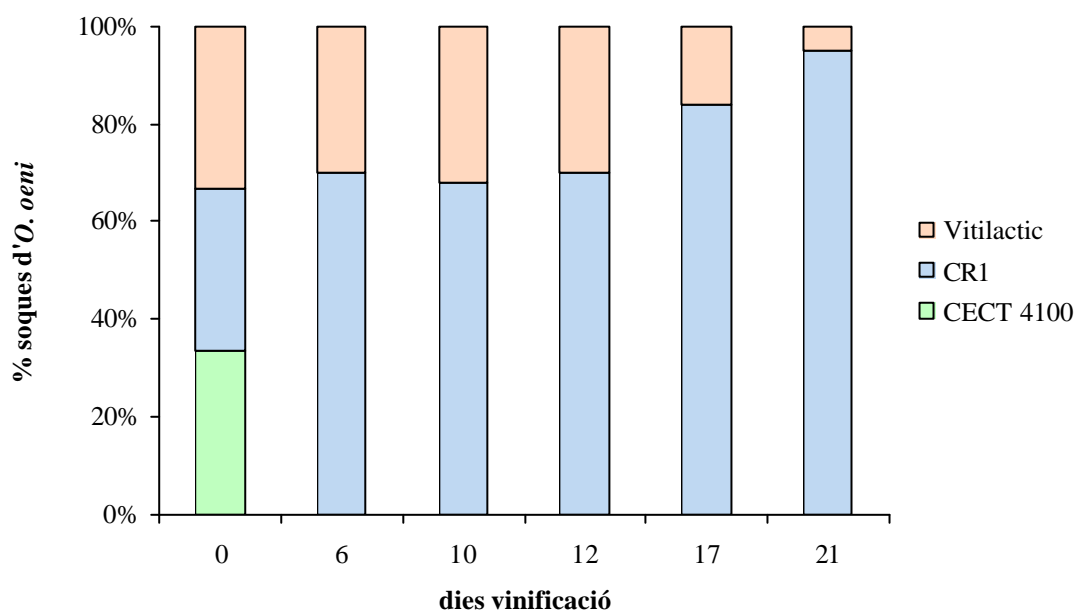
**Figura 4.39.** Evolució de les proporcions de les 3 soques (CECT 4100, CR1 i Vitolactic) al llarg de tota la microvinificació *C mixt*.



**Figura 4.40.** Evolució de les proporcions de les 3 soques (CECT 4100, CR1 i Vitolactic) al llarg de tota la microvinificació *C12 mixt*.



**Figura 4.41.** Evolució de les proporcions de les 3 soques (CECT 4100, CR1 i Vitilactic) al llarg de tota la microvinificació *Cu mixt*.



**Figura 4.42.** Evolució de les proporcions de les 3 soques (CECT 4100, CR1 i Vitilactic) al llarg de tota la microvinificació *SO<sub>2</sub> mixt*.

Allò que ressalta més clarament de les quatre gràfiques anteriors és que la soca de col·lecció CECT4100 perd tota viabilitat enfront de les altres dues i que, ja quan es troba a la meitat de la FA, no apareix (Wibowo *et al.* [1985] observaren que soques de col·lecció provinents de Califòrnia i inoculades en vins australians difícilment portaven a terme la FML). És a dir, que independentment de la composició del most, CECT 4100 es veu completament inhibida en presència de CR1 i Vitilactic, ja sigui perquè aquestes dues soques disposen de major capacitat metabòlica per captar, catabolitzar o sintetitzar certs nutrients, o també perquè alliberin al medi àcid L-làctic i altres substàncies provinents del metabolisme secundari o algunes bacteriocines (Orberg i Sandine, 1984; Rammelsberg i Radler, 1990; Piard i Desmazeaud, 1992), malgrat que Navarro *et al.* (2000) només detectaren activitat antimicrobiana en algunes soques de *Lb. plantarum* d'un total de 42 soques de bacteris làctics aïllades de vins de La Rioja, 6 de les quals eren *O. oeni*. Els resultats obtinguts confirmarien la hipòtesi que l'estancament o disminució de població de bacteris làctics viables els primers dies de la vinificació seria provocada per la inhibició de la proporció de població iniciadora corresponent a la soca tipus (figura 4.34).

CR1 i Vitilactic conviuen al llarg de la FA, per bé que la primera és majoritària en tots els casos excepte en *Cu mixt*, on la soca comercial predomina tant a la meitat com al final de la FA. En cap cas, però, Vitilactic no s'imposarà a CR1 durant la FML, i serà aquesta última la responsable de dur-la a terme en gran mesura, exceptuant el cas de *C mixt*, en què la presència de Vitilactic es mantindrà fins arribar al 50 % al final de la FML, i on és de suposar que contribuirà a la degradació de l'àcid L-màlic, especialment en l'últim tram de vinificació.

D'igual forma, es pot constatar que Vitilactic manté certa població viable al llarg de tot el procés on intervé el sulfurós (figura 4.32), mentre que desapareix ja gairebé al final de la FA en el cas de *C12 mixt*, en contrast amb els resultats de les figures 4.33 i 4.36, que indiquen que els efectes inhibidors de SO<sub>2</sub> i C12 són similars a nivell de degradació d'àcid L-màlic i d'UFC/ml.

Com a conclusió, hom pot dir que és la soca CR1, aïllada pel nostre grup de recerca (Reguant, 2001) al Celler del Mas dels Frares, qui s'imposa i porta a terme la FML en totes les microvinificacions estudiades inoculades amb un cultiu mixt.



#### 4.4.5. Relació amb alguns components del vi

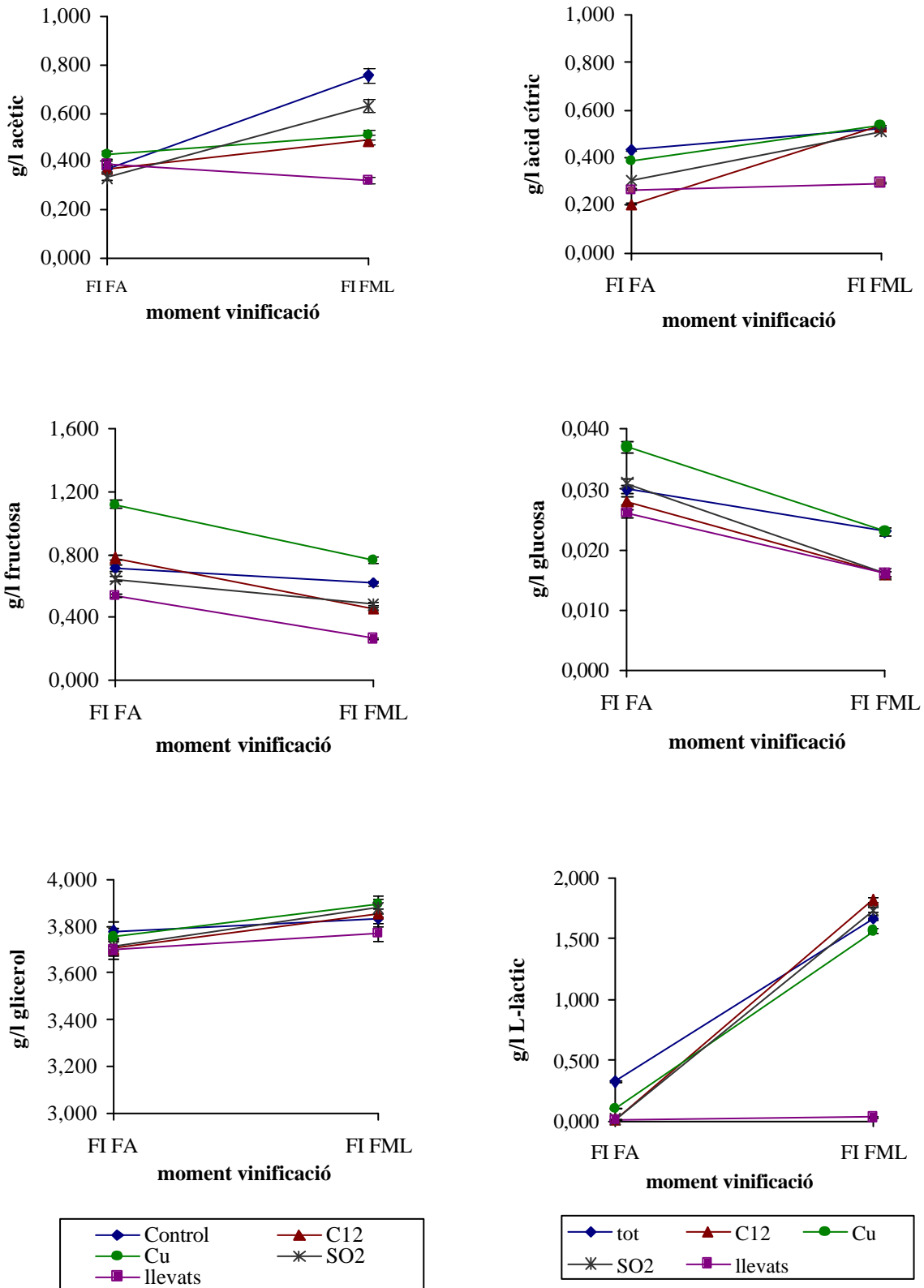
Alguns components del vi es troben directament relacionats amb el metabolisme dels bacteris làctics, per la qual cosa ha semblat interessant comprovar com van evolucionar en cadascuna de les microvinificacions, entre dos punts claus com són el final de la FA i el final de la FML, i esbrinar d'aquesta forma la incidència que podria mostrar sobre ells la FML desenvolupada en cadascuna de les condicions. Es tracta d'una informació valuosa ja que la major o menor presència d'algun d'aquests components pot condicionar completament l'estabilitat i la qualitat organolèptica del producte final.

En la figura 4.43 es mostren els resultats obtinguts, mentre que en la taula 4.15 s'indica el grau alcohòlic només al final de la FA, al voltant del 12 %, essent el valor inferior 11,9 % per a *Cu mixt* i el superior 12,9 % per a *SO<sub>2</sub> mixt*.

**Taula 4.15.** Nivells d'etanol al final de FA i de pH al final de FA i de FML, per a les microvinificacions inoculades amb un cultiu mixt d'*O. oeni*.

		<i>C llevats</i>	<i>C mixt</i>	<i>C12 mixt</i>	<i>Cu mixt</i>	<i>SO<sub>2</sub> mixt</i>
% etanol (v/v)*	final FA	12,790	12,249	12,357	11,898	12,925
	pH					
	final FA	3,39	3,45	3,41	3,41	3,39
	final FML	3,39	3,72	3,61	3,58	3,63

\* Error experimental de l'assaig de determinació d'etanol: 2%.



**Figura 4.43.** Determinacions analítiques (mitjançant assaig enzimàtic) de diversos components dels vins al final de la FA i al final de la FML: **a)** àcid acètic, **b)** àcid cítric, **c)** fructosa, **d)** glucosa, **e)** glicerol i **f)** àcid L-làctic.

En la figura **4.43a**, es pot observar com els nivells d'acètic només augmenten significativament, gairebé el doble, en *C mixt* i *SO<sub>2</sub> mixt*, mentre que en *Cu mixt* i *C12 mixt* l'augment és molt lleu. El control corresponent al vi que no ha portat a terme la FML (llevats), ens permet associar clarament l'increment dels nivells d'acètic durant la FML a l'activitat metabòlica de les soques d'*O. oeni*. Des d'un punt de vista de qualitat del vi, valors de 0,8 g/l, en el cas de *C mixt*, o de 0,6 g/l en el de *Cu mixt*, serien excessius (Delfini i Formica, 2001), si bé no superarien el límit legal establert per la CEE d'1,08 g/l en vins blancs i rosats o d'1,2 g/l en vins negres. Ara bé, no es pot considerar que aquest fet sigui un problema originat únicament per les soques d'*O. oeni* inoculades. Els nivells d'acètic al final de la FA són considerablement alts en tots els casos, al voltant de 0,35-0,4 g/l, més encara si considerem la concentració de sucres de partida, de 220 g/l. Segons Lafon-Lafourcade (1983) i Ribéreau-Gayon *et al.* (1998), en vins provinents de mosts amb contingut moderat de sucres (220 g/l), la majoria de soques de *S. cerevisiae* produeixen entre 0,1 i 0,3 g/l d'àcid acètic. Molt probablement, el fet que la FA s'hagi desenvolupat en fermentadors a 25 °C –i per tant, pugui haver assolit temperatures superiors els dies de major multiplicació dels llevats– indueix a pensar que el factor tèrmic ha contribuït a incrementar la quantitat d'acètic final.

Tanmateix, només els increments lleus d'acètic en *Cu mixt* i *C12 mixt* es poden considerar acceptables des d'un punt de vista enològic, ja que en tots dos casos són inferiors a 0,1 g/l (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1998; Reguant, 2001). S'ha descrit que en vins que pateixen FMLs lentes, les concentracions d'acètic acostumen a ser més altes (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1998), fet que no es correlaciona amb les nostres dades, excepte en el cas de *SO<sub>2</sub> mixt*.

Dels resultats obtinguts, no es pot concloure que la soca que s'imposa en la majoria de casos, CR1, produeixi acètic en excés: per una banda, perquè és la que preval en *Cu mixt* i *C12 mixt*, i per l'altra, perquè en *C mixt*, on sembla que també intervé Vitilactic (nivells propers al 50 % d'imposició), és on l'increment d'acètic durant la FML és més elevat.

Probablement, una bona part d'aquest acètic hauria de provenir de la fructosa que és degradada al llarg de la FML, especialment en *Cu mixt* i *C12 mixt*, per bé que, si ens fixem en les gràfiques **a** i **c** de la figura **4.43**, precisament en aquestes dues condicions en què es consumeix més fructosa, els augments d'àcid acètic són menors. Pel que fa a

la glucosa (figura 4.43d), també s'experimenta una davallada en tots els casos, molt lleu perquè els valors de partida, un cop finalitzada la FA, són realment molt baixos.

Els nivells d'àcid L-làctic (figura 4.43f) corresponen, principalment, als que provindrien estequiomètricament de l'àcid L-màlic present al final de la FA (al voltant de 2,7 g/l, si es considera que fins a un 30 % de la quantitat inicial ja ha estat degradada pels llevats). En el cas de *C mixt*, possiblement els bacteris làctics ja haurien començat a degradar-lo els darrers dies de la FA i això explicaria un valor més elevat que en la resta de condicions. Al final de la FML, els valors més alts de làctic corresponen a *C12 mixt*.

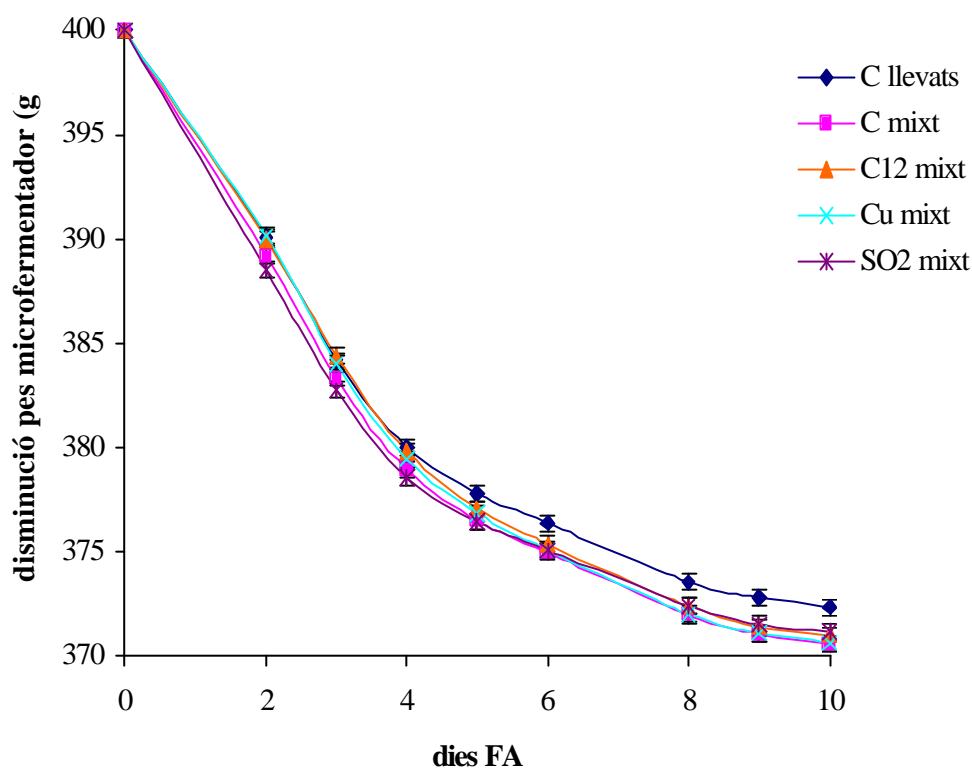
Com es pot veure a la taula 4.15, el pH va augmentar al voltant de 0,2 unitats entre el final de la FA i el final de la FML, mentre que el glicerol (figura 4.43e), considerant els intervals d'error, no pateix cap modificació significativa (cal recordar que la degradació de glicerol per part dels bacteris làctics pot malmetre la qualitat organolèptica del vi, en rebaixar-ne la concentració ideal i en originar productes secundaris del metabolisme, no desitjats). El mateix podríem dir per a l'àcid cítric (figura 4.43b), que es manté estable (l'aparent augment, lleu, observat en la gràfica, podria ser degut a raons analítiques).

#### 4.4.6. Possible efecte dels bacteris làctics sobre els llevats durant la FA

Per detectar si es manifestava un efecte de la inoculació amb *O. oeni* sobre el creixement dels llevats, es realitzaren determinacions dels pesos dels microfermentadors cada 1 o 2 dies. Ja s'ha vist prèviament que totes les microfermentacions van acabar la FA el mateix dia, i els resultats obtinguts pel que fa a l'activitat fermentativa dels llevats es podien mesurar amb el seguiment de la davallada de pes (figura 4.44), conseqüència de la conversió dels sucres reductors del most en etanol i CO<sub>2</sub>. A simple vista, i amb les dades disponibles, no es pot afirmar que la presència i el desenvolupament de bacteris làctics en el most afectés negativament el desenvolupament de la FA. En tot cas, si es té en compte la gràfica de la figura 4.44, s'adverteix que és en *C llevats*, en què no hi ha presència d'*O. oeni*, on la disminució de pes del fermentador és lleument inferior, tot i que no de forma significativa.

Caldria, però, un estudi més acurat per poder extreure conclusions remarcables sobre les interaccions d'*O. oeni* i *S. cerevisiae* durant la FA, i continuar aprofundint en els estudis encetats en l'apartat 4.3 de **Resultats i discussió**.

D'altra banda, els components d'estrès afegits en els corresponents fermentadors tampoc van afectar significativament el desenvolupament de les FAs, a partir del que es dedueix de la mateixa figura 4.44.



**Figura 4.44.** Evolució de la FA en les diferents microfermentacions expressada com a disminució del pes (g) dels matrassos Erlenmeyer al llarg del temps (dies).

## 4.5. Estudi de la influència d'alguns components del vi sobre la dinàmica de poblacions dels bacteris làctics durant la FA i la FML en una vinificació real

Continuant amb l'estudi de la influència d'alguns components del vi sobre la dinàmica de poblacions, ens va semblar interessant introduir el seguiment d'una vinificació real coincidint amb la campanya de verema de l'any 2000 al Mas dels Frares (celler experimental de la Facultat d'Enologia de la URV) en la qual el paràmetre estudiat fou la influència de la concentració de SO<sub>2</sub>, que pot condicionar la FML i fins i tot provocar-ne aturades si s'empra en excés (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1977). El seguiment de la dinàmica de poblacions s'ha centrat, primerament, en detectar quina era l'espècie que s'imposava i duia a terme la FML, mitjançant la tècnica PCR específica d'espècie (veure apartat **3.6.4 de Materials i mètodes**), i en segon lloc, en tipificar les soques d'*O. oeni* per mitjà de la RAPD-PCR múltiple (veure apartat **3.6.5**).

### 4.5.1. Característiques de les vinificacions

Com es descriu en l'apartat **3.4.2**, la varietat de raïm estudiada ha estat l'ull de llebre ("tempranillo", cast.). Es realitzaren dues FAs, la primera amb una concentració habitual de SO<sub>2</sub>: 4 g/hl, i l'altra amb una concentració molt superior a la normalment utilitzada: 10 g/hl, per poder comparar amb claredat si la variable SO<sub>2</sub> pot ser determinant per a la imposició d'una o altra soca d'*O. oeni* al llarg de la FA i de la FML, per la qual cosa es realitzà el seguiment de la població d'*O. oeni* durant tota la vinificació. D'aquesta forma, el dia 0 (zero) correspon al de l'inici del procés, quan el raïm és premsat i el most resultant introduït a les tines. A més, també s'assajà l'efecte del lisozim com a substitut parcial del SO<sub>2</sub> (Amati *et al.*, 1992), addicionant-ne un cop acabada la FA.

**Taula 4.16.** Descripció de les característiques bàsiques de les vinificacions reals, portades a terme en dues tines diferents, A i B.

	Tina A	Tina B
<b>Concentració SO<sub>2</sub></b>	4 g/hl	10 g/hl
<b>Volum most (litres)</b>	500	200
<b>Data verema</b>	12/9/00	
<b>Tipus vinificació</b>	Vi negre	
<b>Llevat inoculat</b>	<i>S. cerevisiae</i> : Montrachet Davis 522 (Lalvin)	
<b>Durada FA</b>	9 dies	9 dies
<b>T fermentació</b>	Estable 25 °C	Primers i darrers dies: 21-22 °C A la meitat de la FA: 24-25 °C
<b>Efecte SO<sub>2</sub> sobre FA</b>	No significatiu	

Un cop finalitzada la FA es descubaren les tines i el vi es va repartir en garrafes de vidre de 30 litres, seguint la distribució de la taula 4.17.

**Taula 4.17.** Distribució i codis de les diferents condicions de FML assajades.

	Control A <sup>(1)</sup>		Control B <sup>(2)</sup>		Lisozim <sup>(3)</sup>
<b>Nomenclatura</b>	CA1	CA2	CB1	CB2	Liso
<b>FA origen</b>	A		B		A
<b>FML/inoculació</b>	espontània				
<b>Variable d'estudi</b>	SO <sub>2</sub> afegit a l'inici de la FA <sup>(4)</sup>				Lisozim: 30 g/hl

(1) i (2) Els controls A i B es realitzaren per duplicat.

(3) S'addicionà al vi provinent de la tina A, on s'hi havia afegit 40 g/hl de SO<sub>2</sub> a l'inici de la FA.

(4) Els nivells de SO<sub>2</sub> lliure al final de la FA es trobaven al voltant de 5 mg/l en A i 10 mg/l en B.

Es mesurà la població viable de bacteris làctics de les mostres recollides i seguint les indicacions de l'apartat 3.6 de **Materials i mètodes**, s'identificaren i tipificaren les soques d'*O. oeni*.

D'altra banda, també s'analitzaren diversos components del vi interessants per poder obtenir més informació sobre l'evolució i el resultat final de les vinificacions.

Pel que fa a l'evolució de l'àcid L-màlic, aquesta no es va començar a mesurar fins un cop acabada la FA.

#### 4.5.2. Seguiment de les poblacions de llevats i bacteris durant la FA

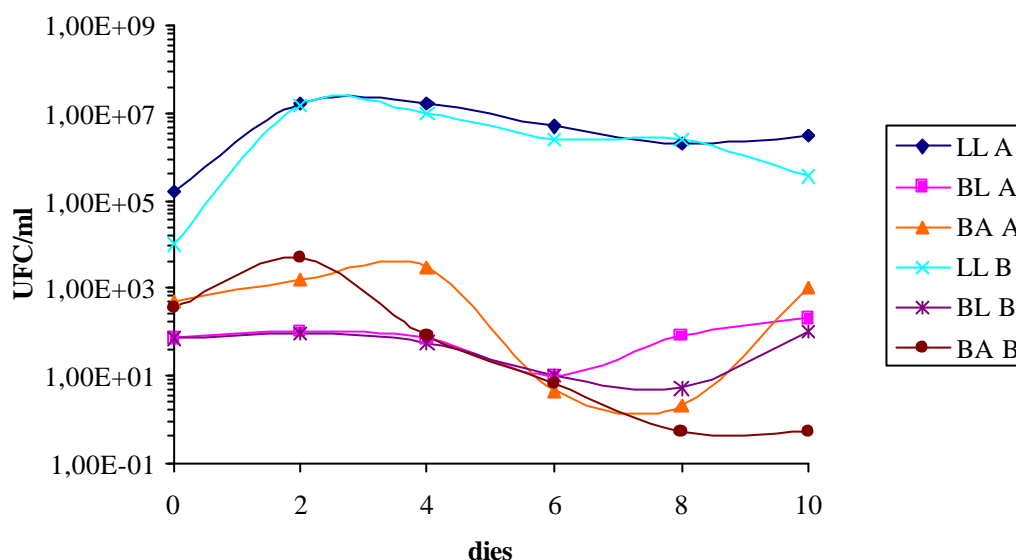


Figura 4.45. Evolució de les poblacions de llevats (LL) i de bacteris làctics (BL) i acètics (BA) al llarg de les fermentacions A i B.

En la figura 4.45, es comprova que el creixement dels llevats és similar en totes dues tines, amb unes poblacions lleugerament superiors en A, coherents amb les dades de temperatura durant la FA. Així, la incidència de l'increment de  $\text{SO}_2$  sobre els llevats no és molt important, encara que a l'inici –tot just després de la inoculació– pot haver contribuït a la davallada de població de B en un ordre de magnitud.

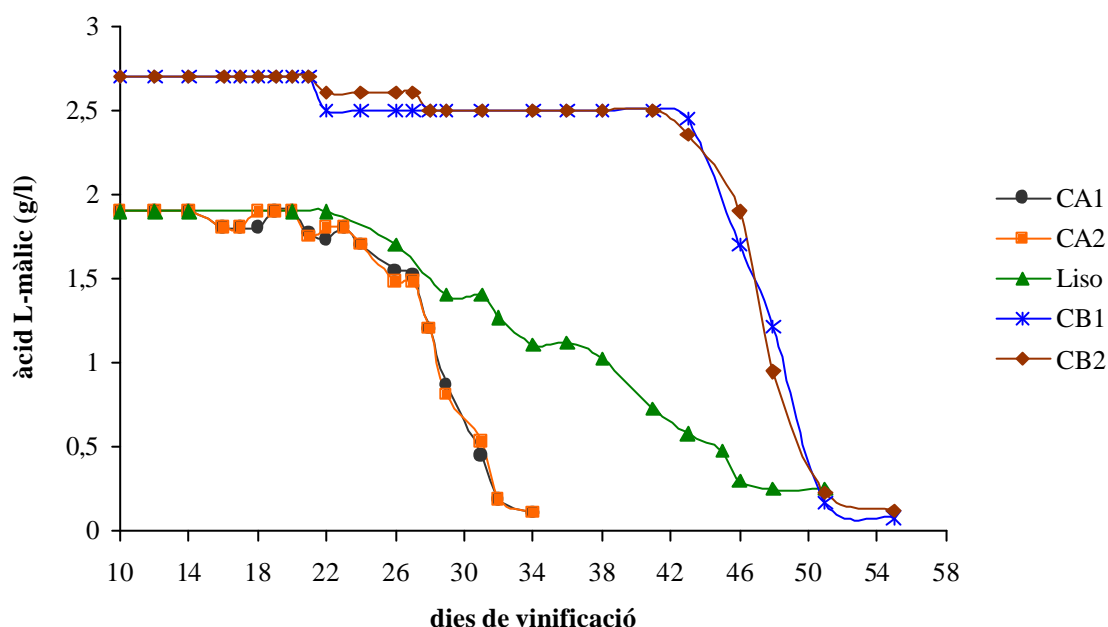
Pel que fa als bacteris làctics, segueixen una evolució idèntica fins al 6è dia de fermentació, moment en què divergeixen i en la tina B continuen davallant en població mentre en A s'acosten a  $10^2$  UFC/ml el dia 8, cap al final de la FA, en què el nivell de sucres reductors ja és proper a 2 g/l i la competència dels llevats disminueix. Possiblement l'efecte bacteriostàtic del  $\text{SO}_2$  contribueixi a endarrerir la reacció dels bacteris làctics en B (Fornachon, 1963), i es manifesti més encara sobre la població de bacteris acètics, més elevada (al voltant de  $10^3$  UFC/ml) durant els quatre primers dies de la FA, moment en què comença a davallar fins a nivells residuals que ja no



remuntaran, especialment en la tina B, mentre que en la tina A encara aconseguiran beneficiar-se de la disminució de la competència sobre nutrients per part dels llevats.

#### 4.5.3. Efectes sobre la FML

En la figura 4.46, on es representa la degradació de l'àcid L-màlic, s'observa un efecte evident de la concentració de SO<sub>2</sub> sobre l'evolució de la FML, comparable als resultats obtinguts per Reguant (2001) en vinificacions realitzades amb garnatxa durant la campanya 1999 al mateix Mas dels Frares. El dia 10 es refereix al moment en què es descuba i es redistribueix el vi en garrafes.



**Figura 4.46.** Degradació de l'àcid L-màlic al llarg de la FML en les vinificacions reals de la campanya 2000.

En primer lloc, cal destacar que totes les FMLs van ser completades i que els replicats evolucionaren idènticament, de la qual cosa es deriva que la FA ja condiciona de forma destacable l'evolució posterior de la FML i que si es mantenen els mateixos paràmetres de control durant la resta de vinificació, l'evolució de la FML és força reproducible.

Entre les raons que explicarien la diferència de concentració d'àcid L-màlic en els controls A respecte els B, es trobaria el fet que la FA s'hauria desenvolupat en tines

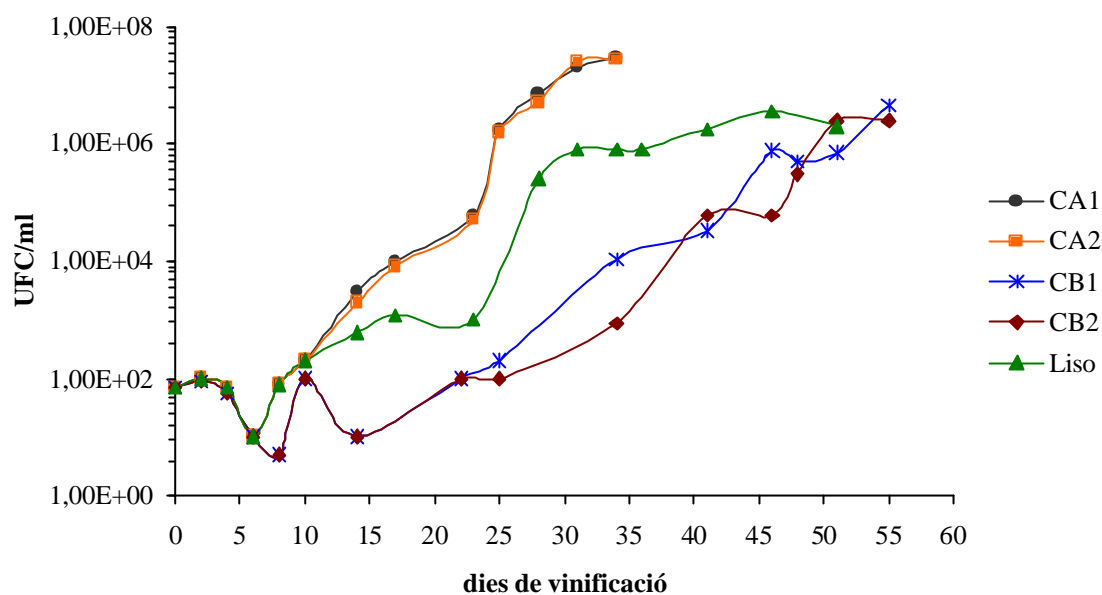
diferents, on la maceració no hauria estat la mateixa i el desenvolupament del metabolisme dels llevats hagués portat a un consum d'àcid L-màlic superior en A. Precisament, segons Henick-Kling i Park (1994) i Ribéreau-Gayon *et al.* (1998), aquesta degradació d'L-màlic per part dels llevats pot arribar a un 30 % de la quantitat inicial, valor que coincideix completament amb les nostres dades.

L'endarreriment de l'inici de la FML, provocat per la presència de SO<sub>2</sub>, és d'uns 20 dies, com es pot observar en la figura 4.46. Curiosament, aquest període d'endarreriment es manté entre el final de la FML de CA1 i CA2 i el final de la FML en CB1 i CB2 (d'uns 20-22 dies), explicable perquè un cop s'inicia la caiguda d'L-màlic en els controls B, aquesta segueix un pendent constant, similar al pendent dels controls A. Fins i tot, mentre A no assoleix els 1,5 g/l, la desaparició de l'àcid és més lenta, fenomen que no es reproduïx per a B. El retard experimentat en presència elevada de SO<sub>2</sub> és equiparable al que fou descrit per Reguant (2001) en condicions similars de vinificació per a la varietat garnatxa.

La condició *Liso* manifesta una evolució diferent a la de la resta. Per bé que comença a davallar paral·lelament a CA1 i CA2, manté un pendent molt més desaccelerat, pel qual l'L-màlic no arriba a consumir-se per complet fins gairebé els mateixos dies que ho fan els controls B. Així, des del punt de vista del resultat final sobre l'acabament de la FML, el liozim i el SO<sub>2</sub>, en les condicions assajades (30 g/hl i 10 g/hl respectivament), ofereixen uns resultats equiparables.

#### 4.5.4. Efecte sobre el creixement dels bacteris làctics

Per poder discutir més a fons les dades anteriors de degradació d'àcid L-màlic, és necessari contrastar-les amb les del desenvolupament de població viable de bacteris làctics (*O. oeni* i les altres espècies presents inicialment en el most), que es troben representades en la figura 4.47.



**Figura 4.47.** Evolució de la població viable (UFC/ml) de bacteris làctics al llarg de les vinificacions de la campanya 2000.

A simple vista, es poden establir una sèrie de correlacions evidents entre l'evolució poblacional i el consum d'àcid L-màlic, tot i que amb diverses peculiaritats. Per exemple, en els casos de CA1 i CA2 la fase més activa de la FML coincideix amb el moment en què les poblacions s'acosten a  $10^6$  UFC/ml. Guilloux-Benatier *et al.* (1985) i Reguant (2001), entre d'altres, havien constatat que l'inici de la FML s'esdevé quan la població assoleix aquest llindar. En el nostre cas, però, cal matisar que, tot i amb un pendent de consum d'L-màlic molt més suau, l'inici se situa una mica abans, quan la població total de bacteris làctics encara es troba en l'ordre de  $10^5$  UFC/ml. Aquest fenomen es repeteix en les altres condicions: CB1 i CB2 inicien la FML quan la població encara no ha assolit  $10^6$  UFC/ml, cap al 44è dia de vinificació (en la gràfica de la figura 4.47 apareixen petites oscil·lacions entre els replicats, possiblement per causes experimentals), mentre que *Liso*, sorprenentment, és capaç d'emprendre la FML amb  $10^4$  UFC/ml. Si s'analitza l'evolució de la població en *Liso* (figura 4.47), aquest comportament s'associa també a una dinàmica de creixement diferent que en CB1 i CB2, ja que durant una gran part de la FML la població no sobrepassa les  $10^6$  UFC/ml i es manté en l'ordre de  $10^5$  UFC/ml. Ara bé, altre cop es pot dir que, des del punt de vista del resultat final, els nivells de població són similars per als controls B i per a *Liso* en acabar el procés, entre  $2\cdot 10^6$  UFC/ml, un ordre inferiors als dels controls A ( $4\cdot 10^7$

UFC/ml, coincidents amb els valors indicats per Lafon-Lafourcade (1983) per a vinificacions similars).

El comportament observat, doncs, en *Liso*, podria explicar-se pels mecanismes d'actuació del lisozim sobre la població bacteriana, diferents als exercits per SO<sub>2</sub>: actua contra els mucopèptids de la paret cel·lular trencant l'enllaç 1,4 peptídic entre l'N-acetilglucosamina i l'àcid N-acetilmuràmic, de forma que modifica la solidesa i permeabilitat de la cèl·lula (Madigan, 2001). Tot i que, segons Amati *et al.* (1992) o Gerbaux *et al.* (1999), la presència de lisozim no canviaria substancialment les característiques químiques i organolèptiques dels vins, caldria realitzar més estudis per comprovar si l'evolució de la FML en presència d'aquest enzim influeix a nivell del metabolisme cel·lular i de producció de compostos secundaris en *O. oeni*.

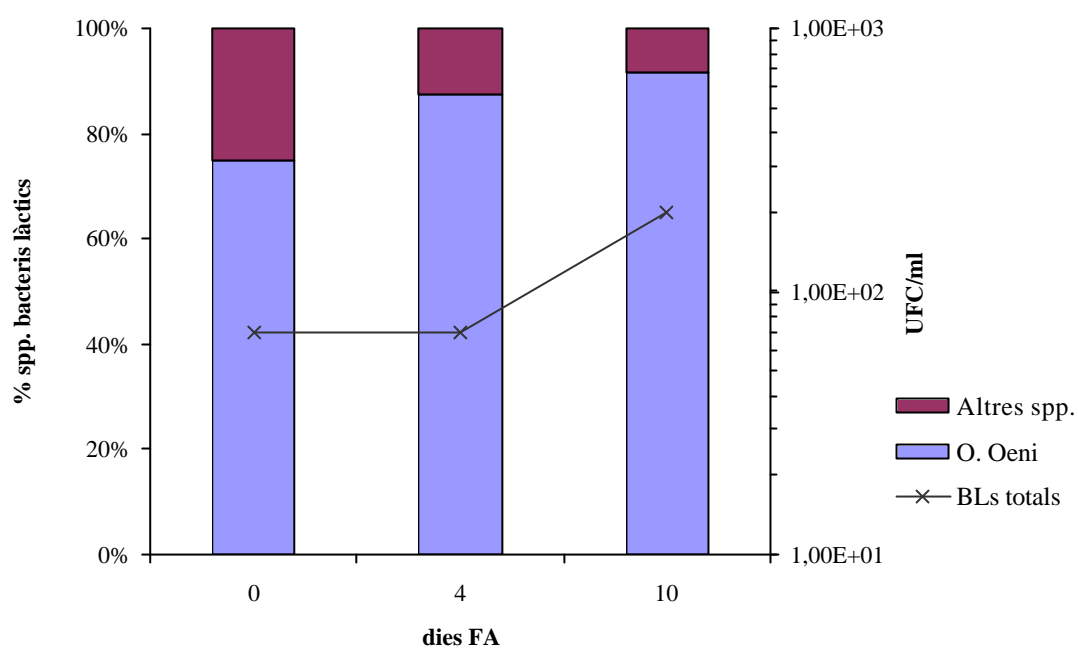
Un altre aspecte que caldria subratllar és que els primers dies després d'haver separat el vi de les mares, en els controls B s'observa una certa davallada del nombre de colònies, possiblement deguda a la manca de l'aportació de nutrients per part de les mares (Delfini, 1986).

#### **4.5.5. Efecte sobre la dinàmica poblacional d'*O. oeni***

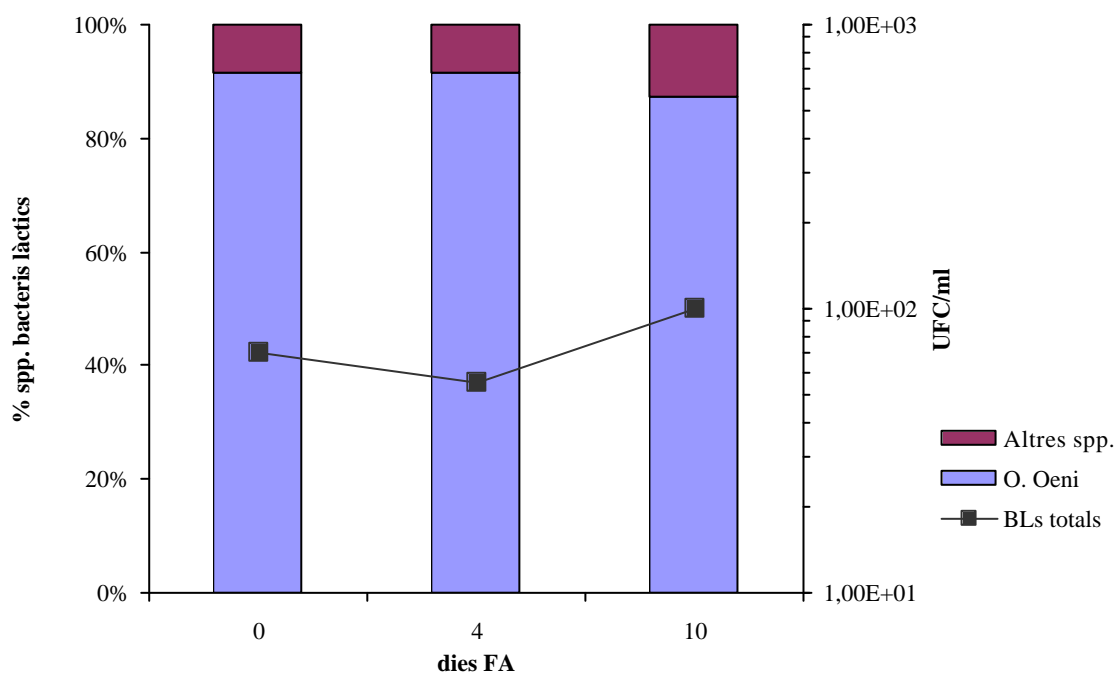
D'acord amb un plantejament similar al del seguiment de les microvinificacions, es feren aïllaments de colònies a partir de les mostres de most o de vi corresponents a l'inici de la vinificació (dia 0), a la meitat de la FA (dia 4), al final de la FA (dies 8-10) i a l'inici, meitat i final de cada FML en els diferents tipus de vins.

La metodologia d'aïllament és la descrita en l'apartat **3.6.1 de Materials i mètodes**. De les 30 colònies aïllades de cada placa, identificades com a bacteris làctics per mitjà de les proves de la catalasa i del Gram, 24 foren identificades a nivell d'espècie gràcies a la tècnica de la PCR específica descrita en **3.6.4**, i tot seguit tipificades a nivell de soca amb la PCR-RAPD múltiple (apartat **3.6.5 de Materials i mètodes**).

Els resultats de les identificacions a nivell d'espècie es presenten en les figures **4.48** i **4.49**.



**Figura 4.48.** Evolució d'*O. oeni* i de la resta de bacteris làctics durant la FA en la tina A.



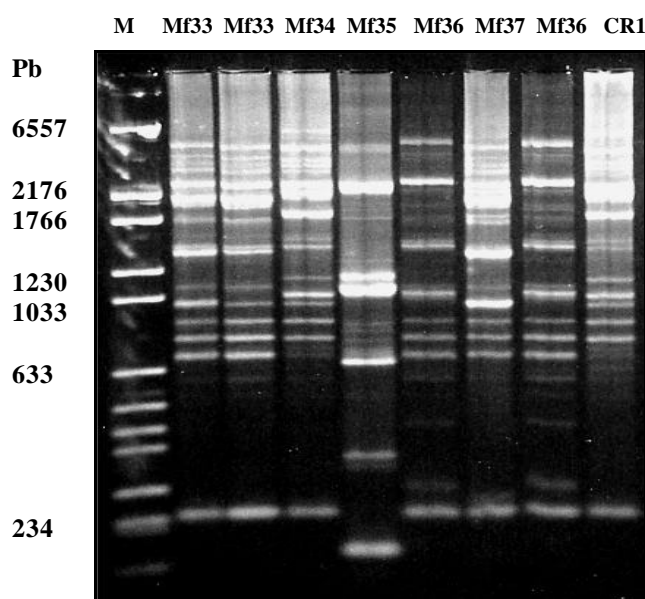
**Figura 4.49.** Evolució d'*O. oeni* i de la resta de bacteris làctics durant la FA en la tina B.

De les figures 4.48 i 4.49 se'n poden extreure diverses observacions. En primer lloc, es constata el predomini de l'espècie *O. oeni* en ambdós casos, ja des de l'inici de la FA. En la vinificació amb menor quantitat de SO<sub>2</sub> (4 g/hl), la presència d'altres espècies de bacteris làctics a l'inici de la FA (de l'ordre del 25 %) constitueix més del doble que en la vinificació amb major quantitat de SO<sub>2</sub> (10 g/hl), on es troba al voltant del 8 %. En haver partit d'un most inicial idèntic, procedent de la mateixa verema i trepig, i si considerem que l'únic element diferenciador entre una i altra tina a l'inici de la vinificació correspon als diferents nivells de SO<sub>2</sub>, molt probablement aquesta diferència de percentatge de poblacions podria ser deguda a l'efecte antibactericida del sulfurós, que actuaria ja en les primeres hores de vinificació. Això contrastaria amb els resultats obtinguts per Reguant (2001) en la campanya anterior (1999), en una altra varietat de raïm negre, garnatxa, on constatava que les proporcions trobades a l'inici i a la meitat de la FA eren similars en vins tractats amb concentracions diferents de SO<sub>2</sub>, mentre que s'apreciaven variacions en la distribució d'espècies cap al final de la FA. Aquesta darrera tendència s'intueix lleugerament en la tina B (10 g/hl), però en la tina A es produeix una lleu davallada del percentatge d'espècies diferents d'*O. oeni* a mesura que avança la FA. Entre aquestes espècies, a l'inici de la FA podrien predominar lactobacils heterofermentatius facultatius (*Lb. casei* i *Lb. plantarum*) que, en avançar la FA, deixarien pas als lactobacils heterofermentatius estrictes i a *P. damnosus*, *P. pentosaceus* i *L. mesenteroides*, en proporcions diferents segons els autors (Lafon-Lafourcade *et al.*, 1983; Lonvaud-Funel *et al.*, 1991). Possiblement, enfront les concentracions més elevades de SO<sub>2</sub>, es vegin afavorides algunes soques de lactobacils, especialment *Lb. plantarum*, amb elevada resistència a aquest antibactericida segons Carr *et al.* (1976), per bé que Manca de Nadra *et al.* (1987) detectaren que la major tolerància al SO<sub>2</sub> en vins argentins la presenta *Lb. hilgardii*. En definitiva, caldria realitzar identificacions a nivell d'espècies per a concretar-ho.

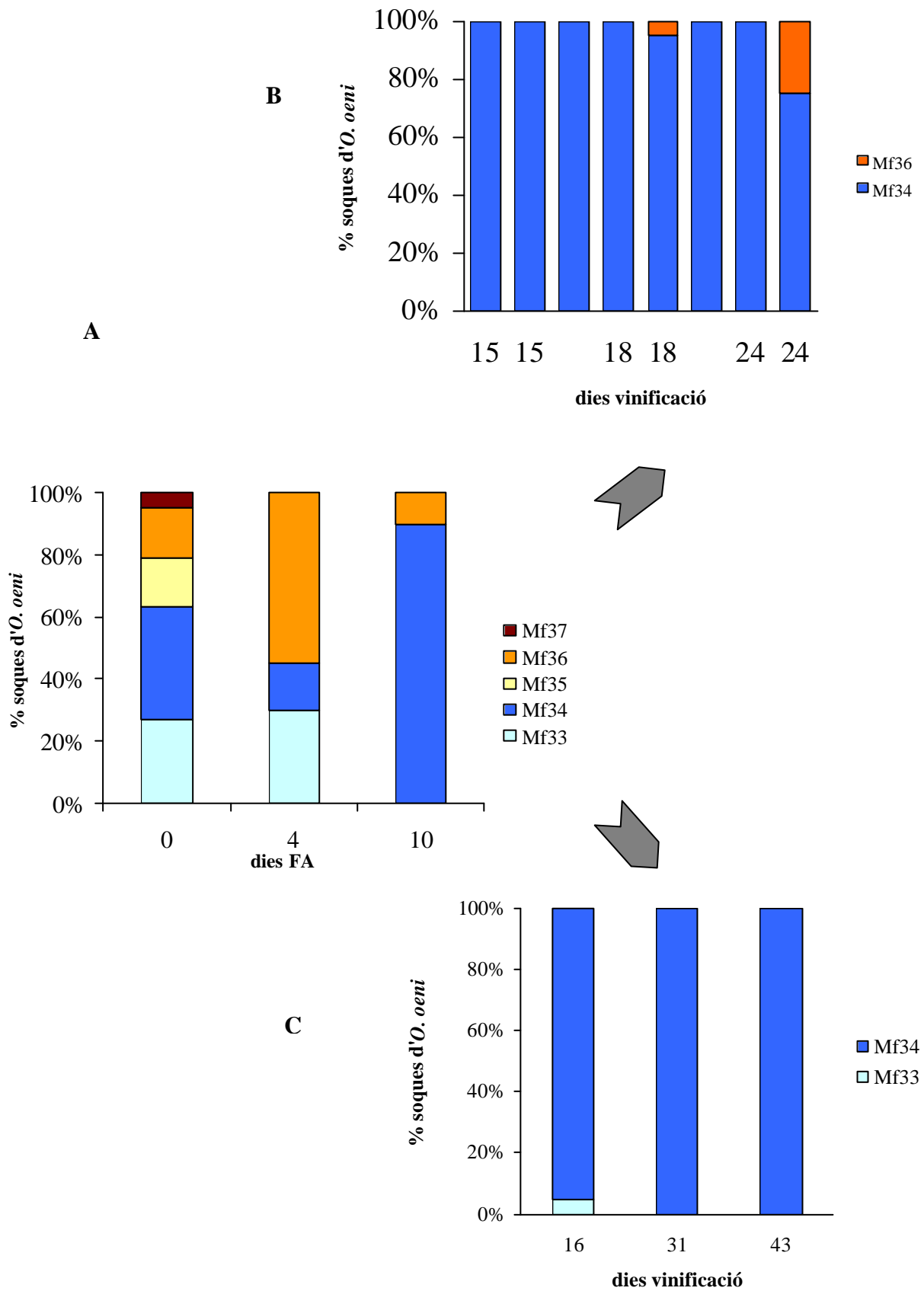
Els mateixos autors esmentats, i d'altres com ara Fleet *et al.* (1984) o Ribéreau-Gayon *et al.* (1998), confirmen que *O. oeni* apareix en nivells molt baixos o no detectables en el most i a l'inici de la FA, mentre que Davis *et al.* (1986) o Reguant (2001) van detectar nivells importants d'*O. oeni* des de l'inici, si bé en els casos estudiats per Davis *et al.* (1986) aquests es feien indetectables als pocs dies d'iniciar-se la FA. La constatació que la pressió selectiva del SO<sub>2</sub> (veure figures 4.48 i 4.49) ja incideix des de l'inici en la proporció de bacteris làctics diferents d'*O. oeni*, i que la

nostra es tracti d'una vinificació en un celler on ja els anys anteriors s'hi ha anat desenvolupant regularment la FML amb la implantació d'*O. oeni*, podria explicar-ne el predomini des del principi.

Pel que fa a la tipificació de soques d'*O. oeni* des de l'inici del procés de vinificació, en conjunt se n'han obtingut 5 perfils diferents a partir de RAPD-PCR múltiple, com es pot veure en la figura 4.50, que ens permeten etiquetar les soques des d'Mf33 fins a Mf37.

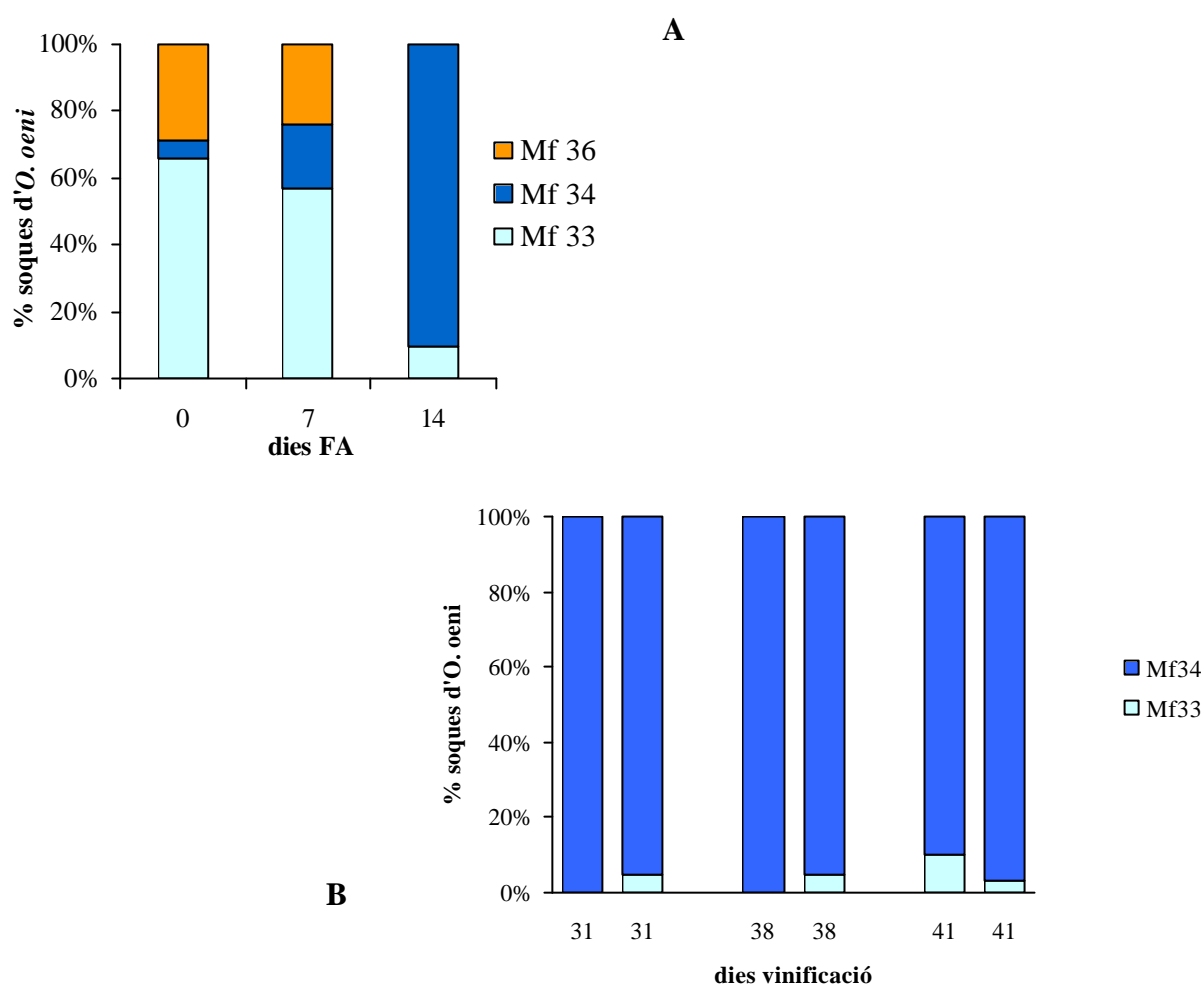


**Figura 4.50.** Perfils resultants de PCR-RAPD múltiple de les diferents soques aïllades en la campanya de vinificació del 2000: electroforesi en gel d'agarosa: M) Marcador de p.m. (*Marker II + Marker VI*, Boehringer Mannheim), del qual només s'indiquen les mides d'algunes de les bandes, en pb (parells de bases).



**Figura 4.51.** Biodiversitat de soques d'*O. oeni* en les vinificacions de la tina A, durant la FA (A), i a l'inici, meitat i final de les FMLs dels controls A: CA1 i CA2 (B), i de *Liso* (C).





**Figura 4.52.** Biodiversitat de les diferents soques d'*O. oeni* en les vinificacions de la tina B, durant la FA (A), i a l'inici, meitat i final de les FMLs dels controls B: CB1 i CB2 (B).

Una primera observació de les figures 4.51 i 4.52, és que la major diversitat de soques es presenta a l'inici de la FA, és a dir, en el most. En la tina A, on es porta a terme la vinificació amb menor presència de sulfurós, s'hi han obtingut totes les 5 soques en diferents proporcions: des d'Mf34 i Mf33, amb un 36 % i un 27 % respectivament, fins a Mf37, amb un 5 %, la de menor proporció (figura 4.51A). Mentre, en la tina B, amb una elevada concentració de sulfurós, només n'apareixen 3 d'aquestes i en proporcions ben diferents, essent Mf33 la soca predominant amb un 65 %, seguida d'Mf36 amb gairebé un 30 % i, en un percentatge molt més baix, Mf34, que curiosament era la més abundant en la tina A (figura 4.52A).

Aquesta diversitat ja es veu considerablement reduïda a la meitat de la FA: en la tina A, ja no apareixen les soques minoritàries en l'inici i és Mf36 la que predomina

lleugerament sobre Mf33 (un 55 % sobre un 30 %), en detriment d'Mf34, que era la soca que ho feia el dia 0, i que pateix una davallada superior al 100 %. Per la seva banda, en la tina B s'apunta l'inici d'una tendència per part de la soca Mf34 a augmentar gradualment la seva presència en detriment de les altres dues existents també a l'inici, sense l'aparició de cap nova soca, fins arribar al final de la FA, en què es constitueix en la soca majoritària (al voltant del 90 %), mentre que Mf36 gairebé desapareix i Mf33 es manté de forma testimonial (al voltant d'un 10 %) (figura 4.52A). Simultàniament, en la tina A, es produeix una evolució similar cap al final de la FA, essent Mf34 la soca predominant, amb la diferència que és Mf36 i no pas Mf33 la soca residual, també al voltant del 10 % (figura 4.51A).

En contrast amb els resultats obtinguts per Reguant (2001) en un vi diferent però amb concentracions similars de sulfurós, es pot constatar que en el seu cas, s'observava amb claredat que, en cadascun dels 3 moments estudiats de la FA, les soques predominants eren diferents i, a més, aquelles que eren majoritàries a l'inici arribaven a desaparèixer al final de la FA, o bé les que predominaven a la meitat o final de FA no apareixien a l'inici, mentre que, en el nostre cas, aquest fet s'observa només parcialment, ja que si bé la soca que predomina al final es troba en petita proporció a l'inici, en cap cas no s'imposa una soca que no aparegui en un % significatiu el dia 0.

Es podria suposar que les soques Mf35 i Mf37, que només apareixen al principi en el cas de la tina A, són molt sensibles a la presència de sulfurós, i que aquest seria el factor clau que en comprometria la viabilitat en el vi, més que no pas la competència per part dels llevats o l'aparició d'etanol, ja que no s'observen ni en el dia 0 a la tina B. Tot i que caldrien més dades experimentals per a confirmar aquest supòsit, diversos autors ja han constatat que l'efecte antibactericida del SO<sub>2</sub> és gairebé immediat després de la seva addició (Lafon-Lafourcade i Peynaud, 1974; Guzzo *et al.*, 1998). Cal tenir present que la presa de mostra del dia 0 es va fer unes hores després de la inoculació i que el major percentatge de sulfurós lliure –la forma més activa microbiològicament– es troba precisament a l'inici, abans que es combini amb altres components del vi (veure apartat 1.2.3 de la **Introducció**).

Si ens centrem en el desenvolupament de la FML, es pot veure com, en tots els casos (4 i 10 g/hl SO<sub>2</sub> i 30 g/hl liozím, els dos primers realitzats per duplicat i tots ells afegits inicialment) és la mateixa soca, Mf34, qui s'imposa i porta a terme la FML. En el cas de la figura 4.51 B, corresponent a CA1 i CA2, els duplicats mostren resultats

molt comparables i similars, dels quals es pot deduir que, si bé Mf34 manté el predomini ja marcat, com s'ha pogut veure (figura 4.51 A), al final de la FA, una altra soca, Mf36, roman en percentatge petit però significatiu i pot participar també en la finalització de l'activitat malolàctica, beneficiada possiblement per un cert esgotament del creixement portat a terme fins llavors per part de la població d'Mf34. La condició CB (figura 4.52 B) mostra una dinàmica molt similar, mentre que en la condició on el lisozim ha substituït el SO<sub>2</sub>, ha estat també Mf34 qui s'ha imposat totalment (figura 4.51 C).

Aquests resultats són completament equiparables als obtinguts per Reguant (2001), que en la campanya 1999 del Mas dels Frares i amb un varietat vinífera diferent (garnatxa), va constatar com, en condicions de FML espontània s'imposava un mateix perfil de soca, CR1 (la mateixa que la nostra Mf34), independentment de la major o menor presència de sulfurós en la vinificació, perfil aquest que coincidia amb el corresponent a la soca predominant en les FMLs també espontànies de la campanya anterior (1998). Així doncs, podem concloure que la mateixa soca (CR1=Mf34) s'hauria imposat durant tres anys consecutius, i que es tractaria d'una de molt ben adaptada a les condicions del celler en qüestió, sempre que no s'introduïssin altres variables, com la inoculació amb alguna soca de llevat determinada combinada amb nivells excessius de sulfurós o l'addició d'iniciadors comercials de FML que, en ser afegits en ordres de poblacions molt elevats, alterarien completament la dinàmica poblacional autòctona.

Pel que respecta a l'efecte del SO<sub>2</sub> al llarg de tota la vinificació, la constatació que Mf34 s'imposi en ambdues condicions, independentment de quin sigui el nivell d'aquest agent antibacterià –com passa en les dues campanyes anteriors, del 1998 i 1999– fa creure que no és aquest el factor determinant per explicar la preponderància d'Mf34 enfront la resta de soques. Probablement, es tracti del resultat sinèrgic d'un conjunt de factors, entre ells la composició del vi, la competència amb llevats i la capacitat de mantenir un cert avantatge metabòlic en condicions desfavorables.

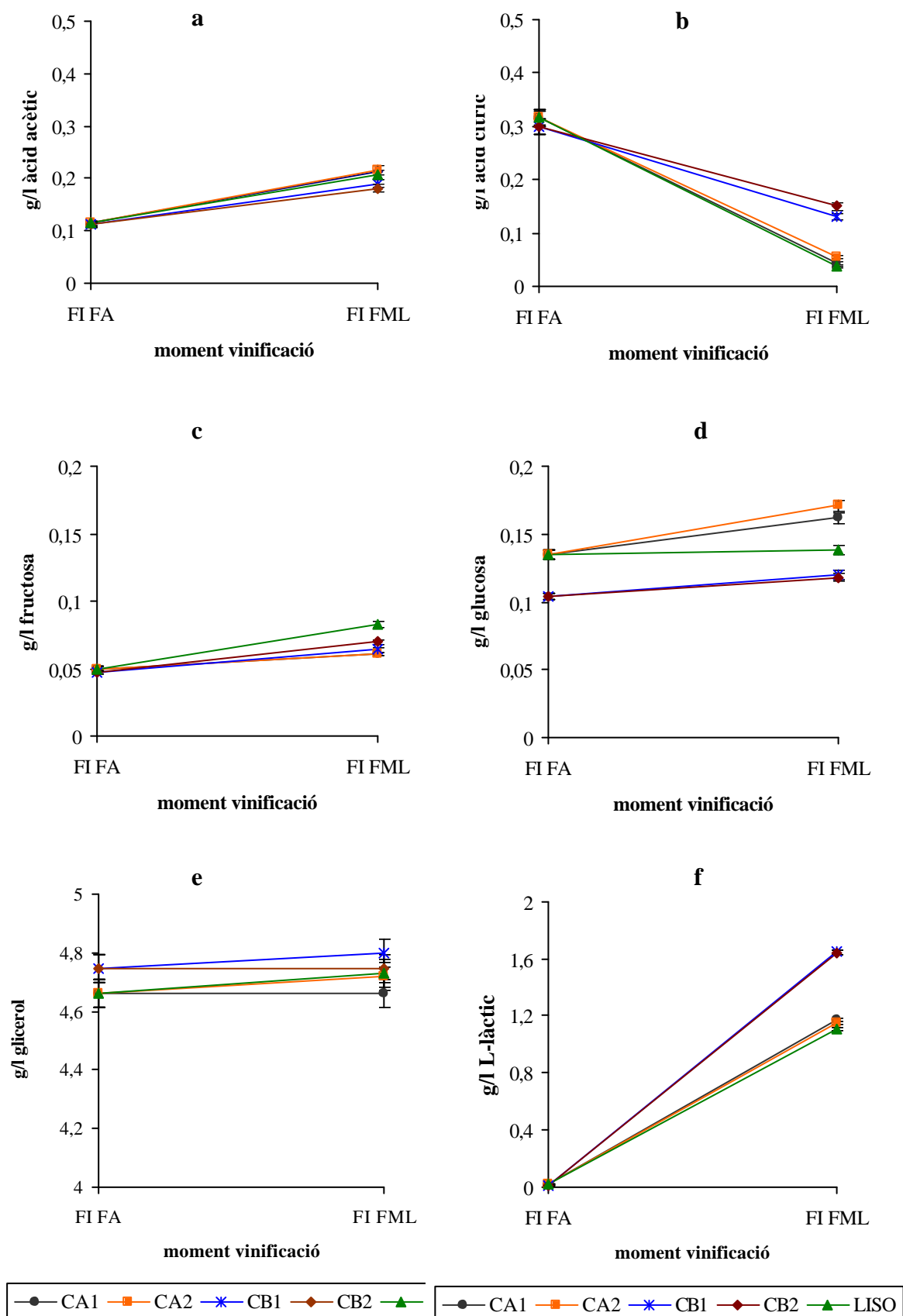
#### **4.5.6. Efectes sobre alguns components del vi**

Tal com s'ha fet en l'estudi de les microvinificacions, s'han analitzat alguns dels components dels vins directament relacionats amb el metabolisme dels bacteris làctics.

El grau alcohòlic, mesurat al final de la FA, fou similar en totes dues tines: 12,8 % (v/v) en A i 12,6 % en B.

Els nivells d'àcid acètic un cop finalitzada la FML se situen al voltant de 0,2 g/l en tots els casos, si bé CB1 i CB2 són els que presenten valors lleument inferiors, de 0,19 g/l, unes diferències poc significatives (figura 4.53a). Com ja s'ha vist en l'apartat 4.4, on es parlava de les microvinificacions, aquests són uns valors acceptables i habituals. Com que el seguiment que s'ha realitzat de bacteris acètics indica que en cap moment s'han superat llindars de població total d'acètics de  $10^2$  UFC/ml, aquest increment d'uns 0,1 g/l respecte al final de la FA possiblement sigui resultat del metabolisme heterofermentatiu dels bacteris làctics, tot i que, com es pot veure en la figura 4.53 (c i d), la glucosa i fructosa, substrats habituals de les vies heterofermentatives, ja es trobaven en nivells molt baixos i no haurien significat una aportació destacable d'energia. Tant és així, que aquests nivells o bé es mantingueren o bé s'incrementaren molt lleugerament (caldría considerar la possibilitat d'errors de mesura perquè concentracions tan baixes incrementen les oscil·lacions dels assaigs). No es pot descartar, d'altra banda, la possibilitat que un lleu increment de les concentracions finals de sucres reductors sigui deguda a la hidròlisi de polisacàrids i glicoproteïnes per part dels bacteris làctics, fenomen que Costello *et al.* (1985) varen poder detectar en alguns vins.

En canvi –i aquest fenomen sí que explicaria la formació d'acètic– l'àcid cítric davalla ostensiblement, en especial en les FMLs provinents de la tina A (controls A i *Liso*), on es consumeixen més de dues terceres parts de l'àcid present al final de la FA (veure figura 4.53 a i b) ; mentre que els controls B en metabolitzen únicament la meitat, tot i partir a l'inici de la FML d'una concentració similar. Tot plegat, es correlaciona perfectament amb els nivells finals d'acètic, lleument inferiors en CB1 i CB2, com ja s'ha esmentat. Pel que fa al glicerol (4.53 e) es pot comprovar que en cap cas és metabolitzat i manté els nivells al llarg de la FML, mentre que en la formació d'àcid L-làctic (4.53 f), es manifesta clarament que el consum d'àcid L-màlic s'ha canalitzat a través de l'enzim malolàctic dels bacteris làctics i es pot justificar que els controls B en tinguin major concentració perquè també partien de nivells superiors d'L-màlic.



**Figura 4.53.** Determinacions analítiques (mitjançant assaig enzimàtic) de diversos components dels vins al final de la FA i al final de la FML: **a)** àcid acètic, **b)** àcid cítric, **c)** fructosa, **d)** glucosa, **e)** glicerol i **f)** àcid L-làctic.



## **6. CONCLUSIONS**





1. L'activitat ATPasa de membrana, principalment deguda a H<sup>+</sup>-ATPasa (tipus F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATPasa), es mostra com un bon indicador de l'estat metabòlic de les cèl·lules d'*O. oeni* davant les diferents condicions d'estrès estudiades i es veu afectada per concentracions inhibidores de la viabilitat cel·lular d'etanol, SO<sub>2</sub>, coure i àcids grassos, per la qual cosa es pot establir una relació directa entre la inhibició del creixement d'*O. oeni* en condicions reals de vinificació i la inhibició de l'activitat ATPasa.
2. En la soca tipus d' *O. oeni*, CECT 4100, i segons les condicions d'assaig emprades, l'etanol no produeix un perfil de proteïnes de membrana excessivament diferent respecte al control, mentre que el xoc en condicions àcides o en presència de l'àcid gras C12 inhibeix, en general, l'expressió proteica.
3. La incubació de cèl·lules d'*O. oeni* de la soca tipus CECT 4100 en concentracions de coure inhibidores del creixement cel·lular o davant un xoc àcid, afavoreix la sobreexpressió d'una proteïna de membrana, de 40 kDa. La incubació de cèl·lules de diferents soques d'*O. oeni* en presència de concentracions de SO<sub>2</sub> inhibidores del creixement també afavoreix la sobreexpressió d'una proteïna de membrana de 40 kDa, la seqüència N-terminal de la qual correspon a la família de gliceraldehid-3-fosfatdeshidrogenases (GAPDH).
4. El SO<sub>2</sub>, en concentracions elevades, inhibeix l'activitat GAPDH citoplasmàtica, i per tant, el mecanisme glucolític d'obtenció d'energia per part d'*O. oeni*.
5. Mitjançant RT-PCR, s'ha comprovat que els nivells d'expressió gènica d'*hsp18* en resposta al xoc tèrmic són fins a cinquanta vegades superiors que en les condicions controls, en la soca tipus CECT 4100, mentre que en presència de concentracions de C12, coure o SO<sub>2</sub> inhibidores del creixement, únicament s'observa una certa inducció en resposta al coure i en condicions de fase exponencial de creixement. En la resta de condicions, l'expressió d'*hsp18* es troba lleugerament reprimida.
6. L'activitat proteasa associada a dues soques d'*O. oeni* estudiades (Lo 84.13 i S3) no és significativa en les condicions experimentals emprades, excepte al final de la fase exponencial de creixement i en presència de dosis elevades d'etanol (14 %).
7. En condicions de carència nutricional nitrogenada, s'ha observat una relació directa entre la biodisponibilitat de nitrogen α-aminat i la taxa de creixement d'*O. oeni*.
8. En les soques d'*O. oeni* Lo 84.13 i S3 es produeix un lleuger increment de l'expressió del gen de l'enzim malolàctic en concentracions elevades d'etanol, així

com del gen de la proteïna d'estrès *Hsp18* durant la fase estacionària, mentre que no s'observa expressió del gen d'una exoproteasa coneguda com a *HtrA*.

9. En les condicions de microvinificació estudiades, la soca tipus CECT 4100 és la que ha mostrat menor capacitat d'adaptació en tots els casos, mentre que la soca comercial Vitolactic és la primera en finalitzar la FML en condicions control i en presència de C12 o de coure. Per la seva banda, en presència de SO<sub>2</sub> és la soca aïllada CR1 la que es veu lleugerament més afavorida en la realització de la FML.
10. En les mateixes condicions de microvinificació i en presència d'un inòcul mixt de les tres soques d'*O. oeni* esmentades, la soca tipus CECT 4100 perd tota viabilitat enfront de les altres dues soques i desapareix al llarg dels primers dies de fermentació alcohòlica, independentment de quin sigui el component d'estrès introduït en el most. Per la seva banda, les altres dues soques, CR1 i Vitolactic, conviuen al llarg de la fermentació alcohòlica i col·laboren en la finalització de la fermentació malolàctica en proporcions similars únicament en la condició control, ja que en presència de C12, coure o SO<sub>2</sub>, és CR1 qui s'imposa al llarg de la FML.
11. En totes les vinificacions portades a terme (4 i 10 g/hl de SO<sub>2</sub> total i 30 g/hl de liozím) s'observa un predomini de la soca *O. oeni* ja des de l'inici de la FA, i que l'augment de concentració del SO<sub>2</sub> accentua tal predomini.
12. En la mateixa campanya de vinificació, es va poder comprovar com el liozím, en una concentració de 30 g/hl, endarrereix de forma similar l'acabament de la FML a com ho fan 10 g/hl de SO<sub>2</sub>, si bé l'evolució de la concentració d'L-màlic i de la població total de bacteris làctics sigui diferent en cada cas.
13. En tots els casos, és una mateixa soca d'*O. oeni* (Mf34) la que s'imposa al llarg de la FML, i que es presenta com a majoritària ja des dels primers dies de la FA, i per tant, del procés de vinificació. Aquesta soca, coincideix amb la que es va imposar en les campanyes anteriors, 1998 i 1999, seguides per Reguant (2001) en la varietat garnatxa, i aïllada i catalogada pel nostre grup com a CR1.

## **5. BIBLIOGRAFIA**



- Amati, A., G.Arfeffi, M. Simoni, A. Gandini, V. Gerbi, C. Tortia i R. Zironi (1992). Inibizione della fermentazione malolattica mediante il lisozima: aspetti microbiologici e tecnologici. *Biologia Oggi*, VI (1-2): 95-102.
- Amzel, L.M., i P.L. Pedersen, (1983). Proton ATPases: structure and mechanism. *Annual Reviews in Biochemistry*, 52: 801-824.
- Arendt, E.K.; Lonvaud-Funel, A. i Hammes, W.P. (1991). Lysogeny in *Leuconostoc oenos*. *Journal of General Microbiology*, 137: 2135-2139.
- Arnau, J., K.I. Sørensen, F.A. Karen, F.K. Vogensen i K.Hammer (1996). Analysis of heat shock gene expression in *Lactococcus lactis* MG1363. *Microbiology*, 142: 1685-1691.
- Arnold, H., i D. Pette (1968). Bundling of glycolytic enzymes to structure proteins of the muscle. *European Journal of Biochemistry*, 6: 163.
- Auffray, Y., E. Lecesne, A. Hartke, P. Boutibonnes (1995). Basic Features of the *Streptococcus thermophilus* Heat Shock Response. *Current Microbiology*, 30: 87-91.
- Ausubel, F.M, R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith, K. Struhl. Massachusetts General Hospital and Harvard Medical School. 1987-1997. *Current Protocols in Molecular Biology*, vol. 1, 2 and 3. John Wiley & Sons, Inc, UEA.
- Avedovech, R. M. JR., M. R. McDaniel, B. T. Watson i W. E. Sandine (1992). An evaluation of combinations of wine yeast and *Leuconostoc oenos* strains in malolactic fermentation of Chardonnay wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 43 (3): 253-260.
- Avraham, Y., N. Grossowicz i J. Yashphe (1990). Purification and characterization of uridine and thymidine phosphorylase from *Lactobacillus casei*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1040: 287-293.
- Bartowsky, E. J. i P. A. Henschke (1995). Malolactic fermentation and wine flavour. *The Australian Grapegrower & Winemaker*, 378a: 83-94.
- Bartowsky, E. J. i P. A. Henschke (1999). Use of a polymerase chain reaction for specific detection of the malolactic fermentation bacterium *Oenococcus oeni* (formerly *Leuconostoc oenos*) in grape juice and wine samples. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 5: 39-44.
- Baumberg, S. (1999) *Prokaryotic Gene Expression*. Oxford University Press.
- Beech, F. W. i S. Thomas (1985). Action antimicrobienne de l'anhydride sulfureux. *Bulletin de l'O.I.V.*, 58: 564-581.
- Beelman, R. B., A. Gavin i R. M. Keen (1977). A new strain of *Leuconostoc oenos* for induced malolactic fermentation in Eastern wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 28: 159-165.
- Beelman, R.B. i J.F. Gallander (1979). Wine deacidification. *Advances in Food Research*, 25, 1-53.
- Beelman, R. B., R. M. Keen, M. J. Banner i S. W. King (1982). Interactions between wine yeast and malolactic bacteria under wine conditions. *Developments in Industrial Microbiology*, 23: 53-61.
- Beelman, R.B., R.M. Keen, M.J. Banner i S.W. King (1985). Interactions between wine yeast and malolactic bacteria under wine conditions. *Develop. Ind. Microbiol.*, 23: 107-112.
- Belli, W. A. i R. E. Marquis (1991). Adaptation of *Streptococcus mutans* and *Enterococcus hirae* to Acid Stress in Continous Culture. *Applied And Environmental Microbiology*, 57(4): 1134-1138.
- Bender, G.R., S.V.W. Sutton i R.E. Marquis (1986). Acid Tolerance, Proton Permeabilities, and Membrane ATPases of Oral Streptococci. *Infection and Immunity*, 53 (2): 331-338.

- Benkirane, R., M.G. Gottschalk, J.D. Dubreuil (1997). Identification of a *Streptococcus suis* 60-kDa heat-shock protein using Western blotting. *FEMS Microbiology Letters*, 153: 379-385.
- Bergmeyer, H.U. (1974). *Methods of enzymatic Analysis*, II, 3<sup>rd</sup> ed (pp. 211-213).
- Bloom, H., H. Beier i H.S. Gross (1987). Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis*, 8: 93-99.
- Bode, J., M. Blumenstein, M.A. Raftery (1975). *Biochemistry*, 14: 1146
- Bolotin, A., P. Wincker, S. Mauger, O. Jaillon, K. Malarme, J. Weissenbach, S. Dusko Ehrlich i A. Sorokin (2001). The Complete Genome Sequence of the Lactic Acid Bacterium *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IL1403. *Genome Research*, 11 (5): 731-753.
- Boyer, P.D. (1997). The ATP synthase – a splendid molecular machine. *Annual Reviews in Biochemistry*: 66, 717-749.
- Britz, T.J. i R. P. Tracey (1990). The combination effect of pH, SO<sub>2</sub>, ethanol and temperature on the growth of *Leuconostoc oenos*. *Journal of Applied Bacteriology*, 68: 23-31.
- Broadbent, J.R., C.J. Oberg, H. Wang i L. Wei (1997). Attributes of the Heat Shock Response in Three Species of Dairy *Lactobacillus*. *Systematic and Applied Microbiology*, 20, 12-19.
- Cabanis, J.C. i M.T. Cabanis (1998). *Acides Organiques En Oenologie: Fondements Scientifiques Et Technologiques*, p. 319. Paris: Technique et Documentation.
- Cabras, P., M. Meloni, M. Melis, A. Farris, M. Budroni i T. Satta (1994). Interactions between lactic acid bacteria and fungicides during lactic fermentation. *Journal of Wine Research*, 5: 53-59.
- Capucho, I. i M. V. San Romão (1994). Effect of ethanol and fatty acids on malolactic activity of *Leuconostoc oenos*. *Applied and Environmental Biotechnology*, 42: 391-395.
- Carlsson, J. i I.R. Hamilton (1996). Differential toxic effects of lactate and acetate on the metabolism of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguis*. *Oral Microbiology and Immunology*, 11: 412-419.
- Carr, J. G., P. A. Davies i A. H. Sparks (1976). The toxicity of sulphur dioxide towards certain lactic acid bacteria from fermented apple juice. *Journal of Applied Bacteriology*, 40: 201-212.
- Carreté, R., M.T. Vidal, A. Bordons i M. Constantí (2002). Inhibitory effect of sulfur dioxide and other stress compounds in wine on the ATPase activity of *Oenococcus oeni*. *FEMS Microbiology Letters*, 211: 155-159.
- Cartwright C. P., F.J. Veazy, A.H. Rose (1987). Effect of the ethanol on activity of the plasma membrane ATPase in, and accumulation of glycine by, *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of General Microbiology*, 133: 857-865.
- Cartwright C.P., J.R. Juroszek, J.R. Beavan, F.M.S. Ruby, S.M.F. De Morais, A.H. Rose (1986). Ethanol dissipates the proton motive force across the plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of General Microbiology*, 132: 369-377.
- Castino, M., L. Usseglio-Tomasset i A. Gandini (1975). Factors which affect the spontaneous initiation of the malo-lactic fermentation in wines. The possibility on transmission by inoculation and its effect on organoleptic qualities. In: J. G. Carr, C. V. Cutting i G. C. Whiting (Eds.). *Lactic acid bacteria in beverages and food* (pp. 139-148). London: Academic Press.
- Cavin, J.F., V. Gerbaux, M. Guilloux, M.J. Leroy (1989) Pour une bonne fermentation malolactique, ensementer. *Viti* (138) Desembre: 61-62.

- Cayot, P. i G. Tainturier (1997). The Quantification of Protein Amino Groups by the Trinitrobenzenesulfonic Acid Method: A Reexamination. *Analytical Biochemistry*, 249: 184-200.
- Charpentier, C. i M. Feuillat (1993). Yeast Autolysis, chapter 7, *Wine Microbiology and Biotechnology*, (Ed. G.H. Fleet) Harwood Academic Publishers, Amsterdam.
- Cheung, A.L., K.J. Eberhardt i V. A. Fischetti (1994). A method to isolate RNA from gram-positive bacteria and mycobacteria. *Analytical Biochemistry*, 222: 511-514.
- Christensen, J.E., E.G. Dudley, J.A. Pederson i J.L. Steele (1999). Peptidases and amino acid catabolism in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 76: 217-246.
- Constantí, M., C. Reguant, M. Poblet, F. Zamora, A. Mas i J. M. Guillamón (1998). Molecular analysis of yeast population dynamics: effect of sulphur dioxide and inoculum on must fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 41: 169-175.
- Cooksey, D.A. i H.R. Azad (1992). Accumulation of copper and other metals by copper-resistant plant-pathogenic and saprophytic pseudomonads. *Applied and Environmental Microbiology*, 58: 274-278.
- Coolbear, T., J.R. Reid i G.G. Pritchard (1992). Stability and specificity of the cell wall-associated proteinase from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* H2 released by treatment with lysozyme in the presence of calcium ions. *Applied and Environmental Microbiology*, 58: 3263-3270.
- Costello, P. J. (1993). Induction procedures for malolactic fermentation. *Australian and New Zealand Wine Industry Journal*, 8: 51-56.
- Cox, D. J. i T. Henick-Kling (1989). Chemiosmotic energy from malolactic fermentation. *Journal of Bacteriology*, 171(10): 5750-5752.
- Daeschel, M.A., D.S. Jung i B.T. Watson (1991). Controlling Wine Malolactic Fermentation with Nisin and Nisin-Resistant Strains of *Leuconostoc oenos*. *Applied and Environmental Microbiology*, 57 (2): 601-603.
- Daniel, P., E. de Waele i J.N. Hallet (1993). Optimisation of transverse alternating field electrophoresis for strain identification of *Leuconostoc oenos*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 38: 638-641.
- Dashper, S.G. i E.C. Reynolds (1996). Lactic acid excretion by *Streptococcus mutans*. *Microbiology*, 142: 33-39.
- Davis, C. R., D. Wibowo, R. Eschenbruch, T. H. Lee i G. H. Fleet (1985). Practical implications of malolactic fermentation: a Reviews. *American Journal of Enology and Viticulture*, 36 (4): 290-301.
- Davis, C. R., D. Wibowo, T. H. Lee i G. H. Fleet (1986). Growth and metabolism of lactic acid bacteria during fermentation and conservation of some Australian wines. *Food Technology in Australia*, 38 (1): 35-40.
- Davis, C. R., D. Wibowo, T. H. Lee i G. H. Fleet (1988). Properties of wine lactic acid bacteria: their potential enological significance. *American Journal of Enology and Viticulture*, 39: 137-142.
- De Felice, M., L. Cinquanta i A. De Leonardis (1993). Gli acidi grassi liberi inibitori della fermentazione malolattica dei vini. *Industria delle bevande*, 22: 126-130.
- De Jong, W.W., G.J. Caspers i J.A.M. Leunissen (1998). Genealogy of the  $\alpha$ -crystallin-small heat-shock protein superfamily. *International Journal of Biological Macromolecules*, 22: 151-162.
- De Man, J.C., M. Rogosa i M.E. Sharpe (1960). A medium for the cultivation of Lactobacilli. *Journal of Applied Bacteriology*, 23: 130-135.
- Delfini, C. (1986). Studio sull'attività biologica della schizoflora lattica nei mosti e nei vini. *Rivista di viticoltura e di enologia di Conegliano*. 2: 61-82.

- Delfini, C. i M.G. Morsiani (1992). Resistance to Sulfur Dioxide of Malolactic Strains of *Leuconostoc Oenos* and *Lactobacillus Sp.* Isolated from Wines. *Sciences Des Aliments*, 12 (3): 493-511.
- Delfini, C. i J.V. Formica (2001). *Wine Microbiology, Science and Technology*. Marcel Dekker, Inc. 2001.
- Delmas, F., F. Pierre, F. Coucheney, C. Divies i J. Guzzo (2001). Biochemical and Physiological Studies of the Small Heat Shock Protein Lo18 from the Lactic Acid Bacterium *Oenococcus oeni*. *Journal of Molecular and Microbiological Biotechnology*, 3 (4):
- Delteil, D. i J.M. Jarry (1992). La dégradation biologique de l'acide malique. Elements de choix et technique de mise en oeuvre des *Schizosaccharomyces* en vinification en blanc. *Biologia Oggi VI* (1-2): 60-65.
- Delteil, D. (2000a) Practical Management of Malolactic Fermentation for Mediterranean Red Wines. Mondavi seminar at Vinatech 2000, Nov. 2000, Bordeaux.
- Delteil, D. (2000b) La gestion pratique de la fermentation malolactique des vins rouges méditerranéens. *Revue des Œnologues*, 95: 23-26.
- Delteil, D. (2001) Effets de différents moments d'inoculation en bactéries lactiques sur les profils des vins rouges méditerranéens. Extrait de *Congress Proceedings, 26<sup>th</sup> OIV World Congress*, Adelaide (Australia).
- Desens, C. i Lonvaud-Funel, A. (1988). Étude de la constitution lipidique des membranes de bactéries utilisés en vinification. *Connaissance de la Vigne et du Vin*, 22: 25-32.
- Desmazeaud i H. De Roissart (1994). Méthodes d'identification des bactéries lactiques. *In: Bactéries lactiques*, Vol. 1. Uriage: Ed. Loriga.
- Dicks, L. M. T., F. Dellaglio i M. D. Collins (1995b). Proposal to reclassify *Leuconostoc oenos* as *Oenococcus oeni* [corrige.] gen. nov., comb. nov.. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 45 (2): 395-397.
- Dicks, L. M. T., H. J. J. Van Vuuren i F. Dellaglio (1990). Taxonomy of *Leuconostoc* species, particularly *Leuconostoc oenos*, as revealed by numerical analysis of total soluble cell protein patterns, DNA base compositions, and DNA-DNA hybridizations. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 40 (1): 83-91.
- Dicks, L. M. T., P. A. Loubser i O. P. H. Augustyn (1995a). Identification of *Leuconostoc oenos* from South African fortified wines by numerical analysis of total soluble cell protein patterns and DNA-DNA hybridizations. *Journal of Applied Bacteriology*, 79: 43-48.
- Dombek K.M., L.O. Ingram (1984). Effects of ethanol on the *E. coli* plasma membrane. *Journal of Bacteriology*, 157: 233-239.
- Drici-Cachon, Z., J. Guzzo, J.-F. Cavin i C. Diviès (1996). Acid tolerance in *Leuconostoc oenos*. Isolation and characterization of an acid-resistant mutant. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 44: 785-789.
- Edwards, C.G. (2000) Competition between yeast and bacteria in wines: the problem of *Lactobacillus* (pp. 53-58). *Inoculation rate and nutritional aspects, keys points for good alcoholic fermentation management, Les entretiens scientifiques de Lallemand*. Austria-May 2-4, 2000.
- Edwards, C.G. i R.B. Beelman (1987). Inhibition of the malolactic bacterium, *Leuconostoc oenos* PSU-1, by decanoic acid and subsequent removal of the inhibition by yeast ghosts. *American Journal of Enology and Viticulture*, 38 (3): 239-242.
- Edwards, C.G., J.C. Peterson, T.D. Boylston i T.D. Vasile (1994). Interactions



- between *Leuconostoc oenos* and *Pediococcus spp.* during vinification of red wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 45 (1): 49-55.
- Eliaz, A.W., D. Chapman, D.F. Ewing (1976) Phospholipid phase transition. Effects on n-alcohols, n-monocarboxylic acids, phenyl-alkylalcohols and quaternarium ammonium compounds. *Biochimica et Biophysica Acta*, 448: 220-230.
- Ellis, J. (1987) Proteins as molecular chaperones. *Nature*, 328: 378-379.
- Ellis, R.J. (1990) The molecular chaperone concept. *Semin. Cell Biology*, 1: 1-9.
- Eraso, P., i C. Gancedo (1987). Activation of yeast plasma membrane ATPase by acid pH during growth. *FEBS letters*, 224: 193-197.
- Eschenbruch, R. i P.H. Kleynhans (1974). The influence of cooper-containing fungicides on the copper content of grape juice and on hydrogen sulphide formation. *Vitis*, 12: 320-324.
- Even, S. i C. Garrigues, P. Loubiere, N.D. Lindley i M. Coccagn-Bousquet (1999). Pyruvate Metabolism in *Lactococcus lactis* is Dependent upon Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase Activity. *Metabolic Engineering*: 1, 198-205.
- Fariás, M.E., G.C. Rollán i M.C. Manca de Nadra (1996). Influence of nutritional factors on the protease production by *Leuconostoc oenos* from wine. *Journal of Applied Bacteriology*, 81: 398-402.
- Fariás, M.E. i M.C. Manca de Nadra (2000). Purification and partial characterization of *Oenococcus oeni* exoprotease. *FEMS Microbiology Letters*, 185: 263-266.
- Fehlmann, M. (seqüència introduïda al *GenBank* el 10 d'octubre de 2000). Molecular Biology, University of Applied Science Waedenswil, Switzerland.
- Ferre, F. (1992) Quantitative or Semi-Quantitative PCR: Reality Versus Myth. *PCR Methods and Applications*, 2: 1-9.
- Ferré, L. (1922). Influence de la retrogradation de l'acide malique sur la composition des vins blancs. *Annales de la Science Agronomique*, 39: 277-283.
- Feuillat, M., P. Bidan, Y. Rosier (1977). Croissance des bactéries lactiques à partir des principaux constituants azotes des vins. *Ann. Technol. Agric.* 26: 435-447.
- Fillingame, R.H. (1997) Coupling H<sup>+</sup> transport and ATP synthesis in F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP synthases: glimpses of interacting parts in a dynamic molecular machine. *The Journal of Experimental Biology*: 200, 217-224.
- Firme, M. P., M. C. Leitao i M. V. San Romão (1994). The metabolism of sugar and malic acid by *Leuconostoc oenos*: effect of malic acid, pH and aeration conditions. *Journal of Applied Bacteriology*, 76: 173-181.
- Fitch, M.W., D.W. Graham, R.G. Arnold, S.K. Agarwal, P. Phelps, G.E. Speitel i G. Georgiou (1993). Phenotypic characterization of copper-resistant mutants of *Methylosinus trichosporium* OB3b. *Applied and Environmental Microbiology*, 59: 2771-2776.
- Fleet, G.H., S. Lafon-Lafourcade i P. Ribéreau-Gayon (1984). Evolution of Yeasts and Lactic Acid Bacteria During Fermentation and Storage of Bordeaux Wines. *Applied and Environmental Microbiology*, 48 (5): 1034-1038.
- Fornachon, J.C.M. (1957) The occurrence of malo-lactic fermentation in Australian wines. *Australian Journal of Applied Sciences*, 8: 120-129.

- Fornachon, J.C.M. (1963). Inhibition of certain lactic acid bacteria by free and bound sulphur dioxide. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 14: 857-862.
- Foster, J.W. i H.K. Hall (1990) Adaptative acidification tolerance response of *Salmonella typhimurium*. *Journal of Bacteriology*, 172: 771-778.
- Foster J.W., H.K. Hall (1991). Inducible pH homeostasis and the acid tolerance response of *Salmonella typhimurium*. *Journal of Bacteriology*, 173: 5129-5135.
- Foster, J.W. (1993) The Acid Tolerance Response of *Salmonella typhimurium* Involves Transient Synthesis of Key Acid Shock Proteins. *Journal of Bacteriology*, 175 (7): 1981-1987.
- Freese, E., C. Sheu, E. Galliers (1973). Function of lipophilic acids as antimicrobial food additives. *Nature* 241: 321-325.
- Gallander, J.F. (1979). Effect of time of bacterial inoculation on the stimulation of malo-lactic fermentation. *American Journal of Enology and Viticulture*, 30: 157-159.
- Garbay, S. i A. Lonvaud-Funel (1994). Characterization of membrane-bound ATPase activity of *Leuconostoc oenos*: growth conditions. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 41: 597-602.
- Garbay, S. i A. Lonvaud-Funel (1996). Response of *Leuconostoc oenos* to environmental changes. *Journal of Applied Bacteriology*, 81: 619-625.
- Garbay, S., N. Rozès i A. Lonvaud-Funel (1995). *Food Microbiology*, 12: 387-395.
- García Barceló, J. (1990) Técnicas analíticas para vinos. (Ed. J. García Barceló). GAB: Barcelona.
- García, M.J. (1991) *Caracterización fisiológica de bacterias lácticas. Fermentación maloláctica en Lactobacillus plantarum CECT 220*. Tesis doctoral. Universidad de Valencia. España.
- García, M.J., M. Zúñiga. F. Uruburu (1992). Revisión: El metabolismo y el control de las bacterias lácticas en el vino. *Revista Española de Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 32 (3): 233-268.
- García, M.J., M. Zúñiga i H. Kobayashi (1992). Energy production from L-malic acid degradation and protection against acidic external pH in *Lactobacillus plantarum* CECT 220. *Journal of General Microbiology*, 138: 2519-2524.
- Garvie, E. I. (1967). *Leuconostoc oenos* sp. nov.. *Journal of General Microbiology*, 48: 431-438.
- Garvie, E.I. (1967). The growth factor and amino acid requirements of species of the genus *Leuconostoc*, including *Leuconostoc paramesenteroides* (sp. nov.) and *Leuconostoc oenos*. *Journal of General Microbiology*, 48: 439-447.
- Garvie, E. I. (1969). Lactic dehydrogenases of strains of the genus *Leuconostoc*. *Journal of General Microbiology*, 58: 85-94.
- Garvie, E. I. (1984). Separation of species of the genus *Leuconostoc* and differentiation of the *Leuconostocs* from other lactic acid bacteria. *Methods in Microbiology*, 16: 147-178.
- Garvie, E. I. (1986). Genus *Leuconostoc* van Tieghem 1878, 198<sup>AL</sup> emend must. char. Hucker and Pederson 1930, 66<sup>AL</sup>. In: P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe i J. G. Holt (Eds.). *Bergey's manual of systematic bacteriology*, Vol. 2 (pp. 1071-1075). Baltimore: The Williams and Wilkins Co.
- Garvie, E. I. i J. A. E. Farrow (1980). The differentiation of *Leuconostoc oenos* from non-acidophilic species of *Leuconostoc*, and the identification of five strains from the american type culture collection. *American Journal of Enology and Viticulture*, 31 (2): 154-157.

- Gase, K., A. Gase, H. Schirmer i H. Malke (1996). Cloning, sequencing and functional overexpression of the *Streptococcus equisimilis* H46A gapC gene encoding a glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase that also functions as a plasmin(ogen)-binding protein. Purification and biochemical characterization of the protein. *European Journal of Biochemistry*, 239 (1): 42-51.
- Georgopoulos, C., D. Ang, A. Maddock, S. Raina, B. Lipinska i M. Zylicz (1990). Properties of the *Escherichia coli* heat shock proteins and their role in bacteriophage  $\phi$  growth (pp. 191-221). En *Stress Proteins in Biology and Medicine* (eds. Morimoto, R., A. Tissières i C. Georgopoulos), Cold Spring Harbor Lab.
- Gerbaux, V., A. Villa, C. Monamy i A. Bertrand (1997). Use of lysozyme to inhibit malolactic fermentation and to stabilize wine after malolactic fermentation. *American Journal of Enology and Viticulture*, 48 (1): 49-54.
- Gerbaux, V., E. Meistermann, Ph. Cottreau, Ch. Barrière, C. Cuinier, J.L. Berger i A. Villa (1999). Use of lysozyme in enology. *Bulletin O.I.V.*, 72 (819-820): 348-373.
- Gerhardt, P. (1984). *Manual of methods for general bacteriology*. Washington: American Society for Microbiology.
- Gindreau, E., A. Joyeux, G. De Revel, O. Claisse i A. Lonvaud-Funel (1997). Évaluation de l'établissement des levains malolactiques au sein de la microflore bactérienne indigène. *J. Int. Sci. Vigne Vin*, 31 (4): 197-202.
- Goerke, C., M.G. Bayer i C. Wolz (2001). Quantification of Bacterial Transcripts during Infection Using Competitive Reverse Transcription-PCR (RT-PCR) and LightCycler RT-PCR. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 8 (2): 279-282.
- González-Márquez, H., C. Perrin, P. Bracquart, C. Guimont, G. Linden (1997). A 16 kDa protein family overexpressed by *Streptococcus thermophilus* PB18 in acid environments. *Microbiology*, 143, 1587-1594.
- Goodson, M. i R.J. Rowbury (1989). Habituation to normal lethal acidity by prior growth of *Escherichia coli* at a sublethal acid pH value. *Letters in Applied Microbiology*, 8: 77-79.
- Grüntzig, V., S.C. Nold, J. Zhou i J.M. Tiedje (2001). *Pseudomonas stutzeri* Nitrite Reductase Gene Abundance in Environmental Samples Measured by Real-Time PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 67 (2): 760-768.
- Guerzoni, M.E. i F. Gardini (1988). Interazione tra lieviti e batteri lattici nella conversione dell'acido malico nei vini. *Industria delle Bevande*, 17: 239-245.
- Guilloux-Benatier, M., H.S. Son, S. Bouhier i M. Feuillat (1993). Activités enzymatiques: glycosidases et peptidase chez *Leuconostoc oenos* au cours de la croissance bactérienne. Influence des macromolécules de levures. *Vitis*, 32: 51-57.
- Guilloux-Benatier, M., M. Feuillat i B. Ciolfi (1985). Contribution à l'étude de la dégradation de l'acide L-malique par les bactéries lactiques isolées du vin: Effet stimulant des autolysats de levures. *Vitis*, 24: 59-74.
- Guilloux-Benatier, M., Y. Le Fur i M. Feuillat (1998). Influence of fatty acids on the growth of wine microorganisms *Saccharomyces cerevisiae* and *Oenococcus oeni*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 20: 144-149.
- Guilloux-Benatier, M., Y. Le Fur i M. Feuillat (1998). Influence of fatty acids on the growth of wine microorganisms *Saccharomyces cerevisiae* and *Oenococcus oeni*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 20: 144-149.

- Guzzo, J., F. Delmas, F. Pierre, B. Samyn, J. Van Beeumen, J.-F. Cavin i C. Diviès (1997). A small heat shock protein from *Leuconostoc oenos* induced by multiple stresses and during stationary growth phase. *Letters in Applied Microbiology*, 24: 393-396.
- Guzzo, J., J. F. Cavin i C. Diviès (1994). Induction of stress proteins in *Leuconostoc oenos* to perform direct inoculation of wine. *Biotechnology Letters*, 16: 1189-1194.
- Guzzo, J., M.-P. Jobin i C. Diviès (1998). Increase of sulfite tolerance in *Oenococcus oeni* by means of acidic adaptation. *FEMS Microbiology Letters*, 160: 43-47.
- Guzzo, J., M.P. Jobin, F. Delmas, L-C Fortier, D. Garmyn, R. Tourdot-Maréchal, B. Lee i C. Diviès (2000). Regulation of stress response in *Oenococcus oeni* as a function of environmental changes and growth phase. *International Journal of Food Microbiology*, 55: 27-31.
- Hamilton, I.R. (1991) Adaptation by *Streptococcus mutans* to acid tolerance. *Oral Microbiology and Immunology*, 6: 65-71.
- Hamilton, I.R., G. Svensäter (1998). Acid-regulated proteins induced by *Streptococcus mutans* and other oral bacteria during acid shock. *Oral Microbiology and Immunology*, 13: 292-300.
- Hartke, A., S. Bouché, J.C. Giard, A. Benachour, P. Boutibonnes, Y. Auffray (1996). The lactic acid stress response of *Lactococcus lactis subsp. lactis*. *Current Microbiology*, 33: 194-199.
- Heid, C.A., J. Stevens, K.J. Livak i P.M. Williams (1996). Real Time Quantitative PCR. *Genome Methods*, 6: 986-994.
- Henick-Kling, T. (1986). *Growth and metabolism of Leuconostoc oenos and Lactobacillus plantarum in wine*. Tesi doctoral. University of Adelaide.
- Henick-Kling, T. (1986). *Growth and metabolism of Leuconostoc oenos and Lactobacillus plantarum in wine*. Tesi doctoral. University of Adelaide.
- Henick-Kling, T. (1993). Malolactic fermentation. G. H. Fleet (Ed.). *Wine microbiology and biotechnology* (pp. 289-326). Amsterdam: Harwood Academic.
- Henick-Kling, T. i Y. H. Park (1994). Considerations for the use of yeast and bacterial starter cultures: SO<sub>2</sub> and timing of inoculation. *American Journal of Enology and Viticulture*, 45: 464-469.
- Henick-Kling, T. i T.E. Acree (1998). Modification of wine flavour by malolactic fermentation. *The Management of Malolactic Fermentation of Wine. A Symposium* (Lallemand Italia, ed), pp 17-22, Paragraphic, Toulouse, France.
- Henschke, P. A. i V. Jiranek (1993). Yeasts-metabolism of nitrogen compounds. In: G. H. Fleet (Ed.). *Wine microbiology and biotechnology*. Amsterdam: Harwood Academic.
- Herman, P., I. Konopasek, J. Plasek i J. Svobodova (1994). Time-resolved polarized fluorescence studies of the temperature adaptation in *Bacillus subtilis* using DPH and TMA-DPH fluorescent probes. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1190, 1-8.
- Hernawan, T. i G. Fleet (1995) Chemical and cytological changes during the autolysis of yeasts. *Journal of Industrial Microbiology*, 14: 440-450.
- Herold, B., P. Pfeiffer i F. Radler (1995). Determination of the three isomers of 2,3-butanediol formed by yeasts or lactic acid bacteria during fermentation. *American Journal of Enology and Viticulture*, 46: 134-137.
- Heukeshoven, J. i R. Dernick (1988). Improved silver staining procedure for fast staining in Phast System Development Unit I. Staining of sodium dodecyl sulfate gels. *Electrophoresis*, 9: 28-33.

- Heyde M. i R. Portalier (1990). Acid shock proteins of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letters*, 69: 19-26.
- Hickey, E.W. i IN. Hirschfeld (1990). Low-pH-induced effects on pattern of proteins synthesis and on internal pH in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Applied and Environmental Microbiology*, 56: 1038-1045.
- Higgins, D.G., J.D. Thompson i T.J. Gibson (1996). Using CLUSTAL for multiple sequence alignments. *Methods in Enzymology*, 266: 383-402.
- Hill, C., B. O'Driscoll, I.R. Booth (1995). Acid adaptation and food poisoning microorganisms. *International Journal of Food and Microbiology*, 28: 245-254.
- Hiratsuka, M., Y. Kishikawa, K. Narahara, T. Inoue, S.I. Hamdy, Y. Agatsuma, Y. Tomioka i M. Mizugaki (2001). Detection of Angiotensin-Converting Enzyme Insertion/Deletion Polymorphisms Using Real-Time Polymerase Chain Reaction and Melting Curve Analysis with SYBR Green I on a GeneAmp 5700. *Analytical Biochemistry*, 289: 300-303.
- Holck, A. i H. Næs (1992). Cloning, sequencing and expression of the gene encoding the cell-envelope-associated proteinase from *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* NCDO151. *Journal Of Genetic Microbiology*, 138: 1353-1364.
- Hsia, C.L., R.W. Planck, C.W. Nagel (1975). Influence of must processing on iron and cooper contents of experimental wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 26 (2): 57-61.
- Huang, Y. C., C. G. Edwards, J. C. Peterson i K. M. Haag (1996). Relationship between sluggish fermentations and the antagonism of yeast by lactic acid bacteria. *American Journal of Enology and Viticulture*, 47 (1): 1-10.
- Hughenoltz, H., D. van Sinderen, J. Kok i W.N. Konings (1987) Cell wall-associated proteases of *Streptococcus cremoris* Wg2. *Applied and Environmental Microbiology*, 53: 853-859.
- Jobin, M.-P., F. Delmas, D. Garmyn, C. Diviès i J. Guzzo (1997). Molecular characterization of the gene encoding an 18-kDa small heat shock protein associated with the membrane of *Leuconostoc oenos*. *Applied and Environmental Microbiology*, 63 (2): 609-614.
- Jobin, M-P., F. Delmas, D. Garmyn, C. Diviès i J. Guzzo (1997). Molecular Characterization of the Gene Encoding an 18- Kilodalton Small Heat Shock Protein Associated with the Membrane of *Leuconostoc oenos*. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(2): 609-614.
- Jobin, M-P., D. Garmyn, C. Diviès i J. Guzzo (1999). Expression of the *Oenococcus oeni trxA* gene is induced by hydrogen peroxide and heat shock. *Microbiology*, 145: 1245-1251.
- Jordan, K.N., L. Oxford i C.P. O'Byrne (1999). Survival of Low-pH Stress by *Escherichia coli* O157:H7: Correlation between Alterations in the Cell Envelope and Increased Acid Tolerance. *Applied and Environmental Microbiology*, 65 (7): 3048-3055.
- Kandler, O. (1983) Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 49: 209-224.
- Kashket, E.R. (1987). Bioenergetics of lactic acid bacteria: cytoplasmatic pH and osmotolerance. *FEMS Microbiology Reviews*, 46: 233-244.
- Kellog, D.E., J.J. Sninsky i S. Kowk (1990). Quantitation of HIV-1 proviral DNA relative to cellular DNA by the polymerase chain reaction. *Analytical Biochemistry*, 189: 202-208.

- King, S. W. i R. B. Beelman (1986). Metabolic interactions between *Saccharomyces cerevisiae* and *Leuconostoc oenos* in a model grape juice/wine system. *American Journal of Enology and Viticulture*, 37: 53-60.
- Kobayashi, H.; Y. Amraku (1972). Membrane-bound Adenosine Triphosphatase of *Escherichia coli*. *Journal of Biochemistry*, 71: 387-399.
- Kobayashi, H.; T. Suzuki, N. Kinoshita, T. Unemoto (1984). Amplification of the *Streptococcus faecalis* proton-translocating ATPase by a decrease in cytoplasmatic pH. *Journal of Bacteriology*, 158 (3): 1157-1160.
- Kobayashi, H., T. Suzuki i T. Unemoto (1986). Streptococcal cytoplasmic pH is regulated by changes in amount and activity of a proton-translocating ATPase. *The Journal of Biological Chemistry*, 261: 627.
- Koch, A.(1900). *Weinbau Weinhandel*, 18: 395-419.
- Kolberg, J. i K. Sletten (1996). Monoclonal Antibodies That Recognize a Common Pneumococcal Protein with Similarities to Streptococcal Group A Surface Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase. *Infection and Immunity*, 64 (9): 3544-3547.
- Konopásek, I., K. Strzalka i J. Svobodová (2000). Cold shock in *Bacillus subtilis*: different effects of benzyl alcohol and ethanol on the membrane organisation and cell adaptation. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1464: 18-26.
- Konings, W.N., B. Poolman i H.W. Van Veen (1994) Solute transport and energy transduction in bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 65: 369-380.
- Konings, W.N., J.S. Lolkema, H. Bolhuis, H.W. van Veen, B. Poolman, A.J.M. Driessen (1997). The role of transport processes in survival of lactic acid bacteria. Energy transduction and multidrug resistance. *Antonie van Leeuwenhoek*, 71: 117-128.
- Kok, J., K.J. Leenhouts, A.J. Haandrikman, A.M. Ledebøer i G. Venema (1988). Nucleotide sequence of the cell wall-associated proteinase gene of *Streptococcus cremoris* Wg2. *Applied and Environmental Microbiology*, 54: 231-238.
- Kok, J. i De Vos, W.M. (1994). The proteolytic System of lactic acid bacteria. En: Gasson, M. i W. De Vos (Eds.) *Genetics and Biotechnology of Lactic Acid Bacteria*, pp. 169-210. Blackie and Professional, London, England.
- Krieger, S.A., W.P. Hammes, T. Henick-Kling (1992). Effect of Medium Composition on Growth Rate, Growth Yield and Malolactic Activity of *Leuconostoc oenos* LoZH<sub>1-t7-1</sub>. *Food Microbiology*, 9 (1):1-11.
- Kroll, R.G., R.A. Patchett (1992) Induced acid tolerance in *Listeria monocytogenes*. *Letters in Applied Microbiology*, 14: 224-227.
- Kunji, E.R.S., I. Mierau, A. Hagting, B. Poolman i W.N. Konings (1996). The proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 70: 187-221.
- Kunkee, R. E. (1967). Malo-lactic fermentation. *Advances in Applied Microbiology*, 9: 235-279.
- Kunkee, R.E. (1974). *Chemistry of winemaking* (pp. 151-170). A. D. Webb (Ed.). American Chemical Society.
- Kunkee, R.E. (1991). Some Roles of Malic Acid in the Malolactic Fermentation in Wine Making; *FEMS Microbiology Reviews*, 88 (1): 55-72.

- Laan, H., H. Bolhuis, B. Poolman, T. Abee i W.N. Konings (1993). Regulation of proteinases synthesis in *Lactococcus lactis*. *Acta Biotechnol.* 13: 95-101.
- Labarre, C., J. Guzzo, J-F. Cavin i C. Diviès (1996a). Cloning and Characterization of the Genes Encoding the Malolactic Enzyme and the Malate Permease of *Leuconostoc oenos*. *Applied and Environmental Microbiology*, 62 (4): 1274-1282.
- Labarre, C., C. Diviès i J. Guzzo (1996b). Genetic Organization of the *mle* Locus and Identification of a *mleR*-Like Gene from *Leuconostoc oenos*. *Applied and Environmental Microbiology*, 62 (12): 4493-4498.
- Lafon-Lafourcade, S. i E. Peynaud (1961). Composition azotée des vins en fonction des conditions de vinification. *Annales de Technologie Agricole*, 10 : 143-160.
- Lafon-Lafourcade, S. i A. Joyeux (1970). Etude de la degradation de l'acide L-malique par les bactéries lactiques non proliférantes isolées des vins. *Annales de Technologie Agricole*, 19 (2): 141-154.
- Lafon-Lafourcade, S. i E. Peynaud (1974). Sur l'action antibacterienne de l'anhydride sulfureux sous forme libre et sous forme combinée. *Connaissance de la Vigne et du Vin* (1):187-203.
- Lafon-Lafourcade, S. (1983). H.J. Rehm i G. Reeds (Eds). *Wine and brandy. Biotechnology*, Vol. 5 (pp. 81-163). Weinheim : Verlag Chemie.
- Lafon-Lafourcade, S., E. Carre i P. Ribéreau-Gayon (1983a). Occurrence of lactic acid bacteria during the different stages of vinification and conservation of wines. *Applied and Environmental Microbiology*, 46 (4): 874-880.
- Lafon-Lafourcade, S., E. Carre, A. Lonvaud-Funel i P. Ribéreau-Gayon (1983b). Induction de la fermentation malolactique des vins par inoculation d'une biomasse industrielle congelée de *L. oenos* après réactivation. *Connaissance de la Vigne et du Vin*, 17: 55-71.
- Lafon-Lafourcade, S., C. Geneix i P. Ribéreau-Gayon (1984). Inhibition of alcoholic fermentation of grape must by fatty acids produced by yeasts and their elimination by yeast ghosts. *Applied and Environmental Microbiology*, 47: 1246-1249.
- Laloi, P., D. Atlan, B. Blanc, C. Gilbert i R. Portalier (1991). Cell-wall-associated proteinase of *Lactobacillus delbrückii* subsp. *bulgaricus* CNRZ397: differential extraction, purification and properties of the enzyme. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 36: 196-204.
- Lamoureux, M., H. Prévost, J. F. Cavin i C. Diviès (1993). Recognition of *Leuconostoc oenos* strains by the use of DNA restriction profiles. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 39: 547-552.
- Lanéelle, G., J. Asselineau (1990). Structures, biosynthèses et fonctions des constituants des enveloppes. *Biochimies bactérienne*, Herman Ed.
- Lee, G.J., A.M. Roseman, H.R. Saibil i E. Vierling (1997). A small heat shock protein stably binds heat denatured model substrates and can maintain a substrate in a folding competent state. *EMBO Journal*, 16: 659-671.
- Leitão, M. C., H. C. Teixeira, M. T. Barreto Crespo i M. V. San Romão (2000). Biogenic amines occurrence in wine. Amino acid decarboxylase and proteolytic activities expression by *Oenococcus oeni*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48: 2780-2784.
- Lengeler, J.W., H.G. Schlegel, G. Drews (1999). *Biology of the prokaryotes*. Georg Thieme Verlag, Rüdigerstrasse, 14, Stuttgart, Germany.

- Leroux, M.R., R. Melki, B. Gordon, G. Batelier i E.P.M. Candido (1997). Structure-function studies on small heat shock protein oligomeric assembly and interaction with unfolded polypeptides. *The Journal of Biological Chemistry*, 272: 24646-24656.
- Lipke, P-N., i R. Ovalle (1998) Cell wall architecture in yeast: New structure and new challenges. *Journal of Bacteriology*, 15: 3735-3740.
- Liu, S.Q., C.R. Davis i J.D. Brooks (1995). Growth and metabolism of selected lactic acid bacteria in synthetic wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 46 (2): 166-174.
- Liu, S.Q., C.R. Davis i J.D. Brooks (1995). Growth and metabolism of selected lactic acid bacteria in synthetic wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 46: 166-174.
- Lonvaud-Funel, A., C. Desens. A. Joyeux (1985). Stimulation de la fermentation malolactique par l'addition au vin d'enveloppes cellulaires de levure et differents adjuvants de nature polysaccharidique et azotée. *Connaissance de la Vigne et du Vin* (19): 229-240.
- Lonvaud-Funel, A. (1999). Lactic acid bacteria in the quality improvement and depreciation of wine. *Antonie van Leeuwenhoek*, 76: 317-331.
- Lonvaud-Funel, A. i A. Joyeux (1993). Antagonism Between Lactic Acid Bacteria of Wines - Inhibition of *Leuconostoc oenos* by *Lactobacillus plantarum* and *Pediococcus pentosaceus*. *Food Microbiology*, 10 (5): 411-419.
- Lonvaud-Funel, A. i A. Joyeux (1988). Une alteration bactérienne des vins: la maladie des vins filants. *Sci. Aliments*, 8: 33-49.
- Lonvaud-Funel, A., A. Joyeux i C. Desens (1988). Inhibition of malolactic fermentation of wines by products of yeast metabolism. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 44: 183-191.
- Lonvaud-Funel, A., A. Joyeux, O. Ledoux (1991) Specific Enumeration of Lactic Acid Bacteria in Fermenting Grape Must and Wine by Colony Hybridization with Non-Isotopic DNA Probes. *Journal of Applied Bacteriology*, 71 (6): 501-508.
- Lonvaud-Funel, A., N. Biteau i C. Fremaux (1989). Identification de *Leuconostoc oenos* par utilisation de sondes d'ADN. *Sciences des Aliments*, 9: 533-541.
- Lonvaud-Funel, A., Y. Guilloux i A. Joyeux (1993). Isolation of a DNA Probe for Identification of Glucan-Producing *Pediococcus damnosus* in Wines. *Journal of Applied Bacteriology*, 74 (1): 41-47.
- Lottenberg, R., C.C. Broder, M.D.P. Boyle, S.J. Kain, B.L. Schroeder I R. Curtis III (1992). Cloning, sequence analysis and expression in *Escherichia coli* of a streptococcal plasmina receptor. *Journal of Bacteriology*, 174: 5204-5210.
- Loubiere, P., P. Salou, M.J. Leroy, N.D. Lindley, A. Pareilleux (1992). Electrogenic malate uptake and improved growth energetics of the malolactic bacterium *Leuconostoc oenos* grown on Glucose-Malate mixtures. *Journal of Bacteriology*, 174 (16): 5302-5308.
- Madigan, M.T., J.M. Martinko i J. Parker (2000). *Brock Biology of Microorganisms*. New Jersey: Prentice Hall Inc., 9a ed.
- Maicas, S. (2001). The use of alternative technologies to develop malolactic fermentation in wine. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 56:35-39.
- Manca de Nadra, M. C. i A. M. Strasser de Saad (1987). Effect of pH, sulfur dioxide and ethanol concentrations on the growth of lactic acid bacteria isolated from Cafayate (Argentina) wines. *Microbiologie-Aliments-Nutrition*, 5: 241-245.



- Manca de Nadra, M.C., M.E. Fariás, V. Moreno-Arribas, E. Pueyo, M.C. Polo (1999). A proteolytic effect of *Oenococcus oeni* on the nitrogenous macromolecular fraction of red wine. *FEMS Microbiology Letters* 174, 41-47.
- Markwell M., S. Haas, N.E. Tolbert i L.L. Bieber (1978). Protein determination in membrane and lipoprotein samples: manual and automated procedures. *Analytical Biochemistry*, 87: 206.
- Martineau, B. i T. Henick-Kling (1995). Formation and degradation of diacetyl in wine during alcoholic fermentation with *Saccharomyces cerevisiae* strain EC1118 and malolactic fermentation with *Leuconostoc oenos* strain MCW. *American Journal of Enology and Viticulture*, 46 (4): 442-448.
- Martineau, B., T. E. Acree i T. Henick-Kling (1995). Effect of wine type on the detection threshold for diacetyl. *Food Research International*, 28: 139-143.
- Martínez-Múrcia, A. J. i M. D. Collins (1990). A phylogenetic analysis of the genus *Leuconostoc* based on reverse transcriptase sequencing of 16 S rRNA. *FEMS Microbiology Letters*, 58: 73-83.
- Marugg, J.D., R. van Kranenburg, P. Laverman, G.A.M. Rutten i W.M. de Vos (1996). Identical Transcriptional Control of the Divergently Transcribed *prtP* and *prtM* Genes That Are Required for Proteinase Production in *Lactococcus lactis* SK11. *Journal of Bacteriology*, 178 (6): 1525-1531.
- Masqué, C. i A. Bordons (1996). Isolation and selection of malolactic bacteria from southern catalan wines. *Journal of Wine Research*, 7 (2): 91-101.
- Mathews, C.K. i K.E. van Holde (1996). *Bioquímica*, 2a ed. (1998). McGraw-Hill- Interamericana.
- Mathews, S.A., K.M. Volp i P. Timms (1999). Development of a quantitative gene expression assay for *Chlamydia trachomatis* identified temporal expression of sigma factors. *FEBS Letters*, 458: 354-358.
- Matsudaira, P. (1987) N-terminal sequence from proteins purified by SDS polyacrylamide gel electrophoresis. *Journal of Biological Chemistry*, 262 (21): 10035-10038.
- McDonald, L.C., H.P. Fleming i H.M. Hassan (1990). Acid tolerance of *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactobacillus plantarum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 56: 2120-2124.
- Meijer, W., J.D. Marugg i J. Hugenholz (1996). Regulation of proteolytic enzyme activity in *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 62: 156-161.
- Merck, K.B.; , P.J.T.A. Groenen, C.E.M. Voorter, W.A. Dehaard-Hoekman, J. Horwitz, H. Bloemendal i W.W. Dejong (1993). Structural and functional similarities of bovine  $\alpha$ -crystallin and mouse small heat-shock protein, a family of chaperones. *Journal of Biological Chemistry*, 268: 1046-1052.
- Mira de Orduña, R., S.-Q. Liu, M. L. Patchett i G. J. Pilone (2001). Ethyl carbamate precursor citrulline formation from arginine degradation by malolactic wine lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 183: 31-35.
- Modun, B. i P. Williams (1999) The Staphylococcal Transferrin-Binding Protein Is a Cell Wall Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase. *Infection and Immunity*, 67 (3): 1086-1092.
- Monnet, V., D. LeBars i J.C. Gripon (1986). Specificity of a cell wall proteinase from *Streptococcus lactis* NCDO 763 towards bovine  $\beta$ -casein. *FEMS Microbiology Letters*, 36: 127-131.
- Mori, K. (seqüència introduïda al *GenBank* el 28 de maig de 1994). Katsumi Mori National Food Research Institute, M.A.F.F., 2-1-2 Kannondai, Tsukuba Ibaraki 305.
- Morimoto, R., A. Tissières i C.E. Georgopoulos (1990). *Stress Proteins in Biology and Medicine*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.

- Morrison, T.B., J. J. Weis i C.T. Wittwer (1998). Quantification of Low-Copy Transcripts by Continuous SYBR<sup>®</sup> Green I Monitoring during Amplification. *BioTechniques*, 24: 954-962.
- Müller Thurgau, H. Über die Ergebnisse neuer Untersuchungen auf den Gebiete der Weinbereitung. Ber. XII Dtsch. Weinbaukong (Worms): 128 (1891).
- Müller Thurgau, J. i A. Osterwalder. Die Bakterien im Wein und Obstwein und die dadurch verursachten Veränderungen Zentr. Bakt. Parasitenk. Hyg., Abt. 2. 36: 129-338 (1913).
- Nannen, N.L. i R.W. Hutkins (1991) Proton-Translocating Adenosine Triphosphatase Activity in Lactic Acid Bacteria. *Journal of Dairy Science*, 74(3): 747-751.
- Narberhaus, F. (2002)  $\alpha$ -Crystallin-Type Heat Shock Proteins: Socializing Minichaperones in the Context of a Multichaperone Network. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66(1): 64-93.
- Navarro, L., M. Zarazaga, J. Sáenz, F. Ruiz-Larrea i C. Torres (2000). Bacteriocin production by lactic acid bacteria isolated from Rioja red wines. *Journal of Applied Microbiology*, 88: 44-51.
- Neidhardt, F.C., R.A. VanBogelen i V. Vaughn (1984). The genetics and regulation of heat-shock proteins. *Annual Reviews in Genetics*, 18: 295-29.
- Nes, I.F., D.B. Diep, L.S. Håvarstein, M. B. Brurberg, V. Eijsink i H. Holo (1996). Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 70: 113-128.
- Nielsen, J. C., C. Prah i A. Lonvaud-Funel (1996a). Malolactic fermentation in wine by direct inoculation with freeze-dried *Leuconostoc oenos* cultures. *American Journal of Enology and Viticulture*, 47: 42-48.
- Nielsen, J.C., E. Pilatte, C. Prah (1996b). Maîtrise de la fermentation malolactique par l'ensemencement direct du vin. *Rev. Fr. Oenol.*, 160: 12-15.
- O'Driscoll, B., C.G.M. Gahan i C. Hill (1997). Two-Dimensional Polyacrylamide Gel Electrophoresis Analysis of the Acid Tolerance Response in *Listeria monocytogenes* LO28. *Applied and Environmental Microbiology*, 63 (7): 2679-2685.
- O'Sullivan, E. i S. Condon (1997). Intracellular pH is a Major Factor in the Induction of Tolerance to Acid and Other Stresses in *Lactococcus lactis*. *Applied And Environmental Microbiology*, 65 (6): 4210-4215.
- Ohnishi, T., R.S. Gall i M.L. Mayer (1975). An improved assay of inorganic phosphate in the presence of extralabile phosphate compounds: application to the ATPase assay in the presence of phosphocreatine. *Analytical Biochemistry*, 69: 261-267.
- Olsen, E. B., J. B. Russel i T. Henick-Kling (1991). Hectrogenic L-malate transport by *Lactobacillus plantarum*: a basis for energy derivation from malolactic fermentation. *Journal of Bacteriology*, 173: 6199-6206.
- Orberg, P.K. i W.E. Sandine (1984). Common occurrence of plasmid DNA and vancomycin resistance in *Leuconostoc* sp. *Applied and Environmental Microbiology*, 68: 1129-1133.
- Osborne, J.P., R. Mira de Orduña, G.J. Pilone i S.Q. Liu (2000). Acetaldehyde metabolism by wine lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 191, 51-55.
- Pancholi, V. i V.A. Fischetti (1992). A Major Surface Protein on Group A Streptococci Is a Glyceraldehyde-3-Phosphate-Dehydrogenase with Multiple Binding Activity. *Journal of Experimental Medicine*, 176: 415-426.

- Pancholi, V. i V.A. Fischetti (1993). Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase on the surface of group A streptococci is also an ADP-ribosylating enzyme. *Proceeding of National Academic of Sciences USA*, 90: 8154-8158.
- Pardo, I., García, M. J., Zúñiga, M. i F. Uruburu (1988). Evaluation of the API 50 CHL system for identification of *Leuconostoc oenos*. *American Journal of Enology and Viticulture*, 39 (4): 347-350.
- Pasteur, L. (1866). *Etudes sur le vin* (pp. 36-37). Paris: Masson.
- W. R. Pearson (1990) Rapid and Sensitive Sequence Comparison with FASTP and FASTA. *Methods in Enzymology*, 183: 63 - 98.
- Pederson, J.A., G.J. Mileski, B.C. Weimer i J.L. Steele (1999). Genetic characterization of a cell envelope-associated proteinase from *Lactobacillus helveticus* CNRZ32. *Journal of Bacteriology*, 181 (15): 4592-4597.
- Germond, J.E. Seqüència enviada directament al GenBank (06-OCT-1999) Nestle Research Center, Vers-chez-les-Blanc, Lausanne CH-1000, Switzerland.
- Pérez Chaia, A., Strasser de Saad, A.M., A.A. Pesce de Ruíz Holgado i G. Oliver (1994). Proton-ATPase activity in cells of lactobacilli grown in the presence of propionate. *Journal of Applied Bacteriology*, 77: 34-41.
- Persing, D. H., T. F. Smith, T. J. White i F. C. Tenover (1993). *Diagnostic molecular biology, principles and application*. Washington: ASM.
- Piard, J.C. i M. Desmazeaud (1992). Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria. 2. Bacteriocins and other antibacterial substances. *Lait*, 72: 113-142.
- Pilatte, E. i M. Nygaard (1999). Développement d'un activateur spécifique des bactéries malolactiques. *Rev. Oenol.*, 92 : 31-33.
- Pilatte, E. i J.C. Nielsen (1999). Mise au point d'un nouveau ferment malolactique à ensemencement direct, pour vins blancs. *Rev. Oenol.*, 93: 15-16.
- Pitotti, A., A. Dalbo i O. Boschelle (1992). Assay of Lysozyme by Its Lytic Action on *Leuconostoc oenos* - A Suitable Substrate at Acidic pH. *Journal of Food Biochemistry*, 15 (6): 393-403.
- Poblet-Icart, M., A. Bordons i A. Lonvaud-Funel (1998). Lysogeny of *Oenococcus oeni* (*syn. Leuconostoc oenos*) and study of their induced bacteriophages. *Current Microbiology*, 36: 365-369.
- Poolman, B., D. Molenaar, E.J. Smid, T. Ubbink, T. Abee, P.P. Renault, W.N. Konings (1991). Malolactic Fermentation : Electrogenic Malate Uptake and Malate/ Lactate Antiport Generate Metabolic Energy. *Journal of Bacteriology*, 173 (19): 6030-6037.
- Poolman, B. (1993). Energy transduction in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 12: 125-148.
- Poquet, I., V. Saint, E. Sez nec, N. Simoes, A. Bolotin i A. Gruss (2000). HtrA is the unique surface housekeeping protease in *Lactococcus lactis* and is required for natural protein processing. *Molecular Microbiology*, 35 (5): 1042-1051.
- Prahl C., A. Lonvaud-Funel, S. Korsgaard, E. Morrison i A. Joyeux (1988). *Connaissance de la Vigne et du Vin*, 22: 197-207.
- Puig-Deu, M., R.M. Lamuela-Raventós, S. Buxaderas i C. Torre-Boronat (1994). Determination of cooper and iron in must: comparison of wet and dry ashing. *American Journal of Enology and Viticulture*, 45 (1): 25-28.

- Radler, F., M. Schütz i H.W. Doelle (1970). Die beim abbau von L-Äpfelsäure durch milchsäurebakterien entstehenden isomeren der milchsäure. *Naturwissenschaften*, 57: 672-675.
- Radler, F. (1975). The metabolism of organic acids by lactic acid bacteria (pp. 17-27), en *Lactic acid bacteria in beverages and food*. J. G. Carr, C. V. Cutting i G. C. Whiting (Eds.) Academic Press, London.
- Rallu, F., A. Gruss, E. Maguin (1996). *Lactococcus lactis* and stress. *Antonie van Leeuwenhoek*, 70: 243-251.
- Rammelsberg, M., Radler, F. (1990) Antibacterial polypeptides of *Lactobacillus* species. *Journal of Applied Bacteriology*, 69: 177-184.
- Ramos, A., J.S. Lolkema, W.N. Konings i H. Santos (1995). Enzyme basis for pH regulation of citrate and pyruvate metabolism by *Leuconostoc oenos*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1303-1310.
- Rankine, B. C. (1977). Developments in malo-lactic fermentation of Australian red table wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 28 (1): 27-33.
- Reguant, C. (2001) *Identificació molecular de soques d'Oenococcus oeni i efecte de diverses condicions de vinificació sobre la seva dinàmica de poblacions*. Tesi doctoral, Universitat Rovira i Virgili.
- Requena, T. i C. Peláez (1995). Revisión: Actividad antimicrobiana de bacterias lácticas. Producción de bacteriocinas. *Revista Española de Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 35 (1): 19-44.
- Remize, F., M. Guilloux-Benatier, R. Carreté i J. Guzzo (2001). Hydrolyse de mannoprotéines levuriennes par *Oenococcus oeni* dans le vin. *11<sup>e</sup> Réunion du Club des Bactéries Lactiques*, nov. 2001, Bordeaux.
- Renault, P., C. Gaillardin i H. Heslot (1988). Role of malolactic fermentation in lactic acid bacteria. *Biochimie*, 70: 375-379.
- Ribéreau-Gayon, J. (1936) Sur la désacidification biologique des vins. *PV Séances Soc. Sci. Phys. Nat. Bordeaux*, pp. 23-25.
- Ribéreau-Gayon, J. i E. Peynaud (1961). *Traité d'oenologie*, Vol. 2 (pp. 433-505). Paris: Librairie polytechnique, Béranger.
- Ribéreau-Gayon, J., J. E. Peynaud, P. Ribéreau-Gayon i P. Sudraud (1975). Caracteres des vins. Maturation du raisin. Levures et bactéries. In: *Traité d'oenologie. Sciences et techniques de vin*, Vol. 2. Paris: Dunod.
- Ribéreau-Gayon, J., J. E. Peynaud, P. Ribéreau-Gayon i P. Sudraud (1977). Clarification et stabilisation. Matériels et installation. In: *Sciences et techniques du vin*, Vol. 4. Paris: Dunod.
- Ribéreau-Gayon, P. (1985). New developments in wine microbiology. *American Journal of Enology and Viticulture*, 36: 1-10.
- Ribéreau-Gayon, P., D. Dubourdieu, B. Donèche, A. Lonvaud (1998). *Traité d'œnologie I. Microbiologie du vin et vinifications*. Dunod, Paris.
- Richmond, C.S., J.D. Glasner, R. Mau, H. Jin i F.R. Blattner (1999). Genome-wide expression profiling in *Escherichia coli* K-12. *Nucleic Acids Research*, 27: 3821-3835.
- Rimpiläinen, M.A., K. Niskasaari, K.M.S. Juutinen, E.L. Nurmiaho-Lassila i R.I. Forsen (1986). The plasma membrane of *Streptococcus cremoris*: isolation and partial characterization. *Journal of Applied Bacteriology*, 60: 389-394.
- Rollán, G.C., M.E. Farías i M.C. Manca de Nadra (1993). Protease production by *Leuconostoc oenos* strains isolated from wine. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 9: 587-589.

- Rollán, G.C., M.E. Farías i M.C. Manca de Nadra (1995). Characterization of two extracellular proteases from *Leuconostoc oenos*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 11: 153-155.
- Rollán, G.C., M.E. Farías, A.M. Strasser de Saad i M.C. Manca de Nadra (1998). Exoprotease activity of *Leuconostoc oenos* in stress conditions. *Journal of Applied Microbiology*, 85: 219-223.
- Romano, P., G. Suzzi (1993) en *Wine Microbiology and Biotechnology*, Fleet, G.H. Ed., Harwood Academic Publishers.
- Roy, S.K., T. Hiyama i H. Nakamoto (1999). Purification and characterization of the 16-kDa heat-shock-responsive protein from the thermophilic cyanobacterium *Synechococcus vulcanus*, which is an  $\alpha$ -crystallin-related, small heat shock protein. *European Journal of Biochemistry*, 262: 406-416.
- Sá-Correia, I. (1986). Synergistic effects of ethanol, octanoic and decanoic acids on the kinetics and activation parameters of thermal death in *Saccharomyces bayanus*. *Biotechnology and Bioengineering*, 28: 761-763.
- Saguir, F.M. i M.C. Manca de Nadra (1996). Growth and metabolism of *Leuconostoc oenos* in synthetic media. *Microbiologie-Aliments-Nutrition*, 15: 131-138.
- Sala, C., F. Fort, O. Busto, F. Zamora, L. Arola i J. Guasch (1996). Fate of some common pesticides during vinification process. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 44: 3668-3671.
- Salema, M., B. Poolman, J. S. Lolkema, M. C. Loureiro Dias i W. N. Konings (1994). Uniport of monoanionic L-malate in membrane vesicles from *Leuconostoc oenos*. *FEBS European Journal of Biochemistry*, 124: 1-7.
- Salema, M., J. S. Lolkema, M. V. San Romão i M. C. L. Dias (1996). The proton motive force generated in *Leuconostoc oenos* by L-malate fermentation. *Journal of Bacteriology*, 178 (11): 3127-3132.
- Salou, P., P. Loubiere i A. Pareilleux (1994). Growth and energetics of *Leuconostoc oenos* during cometabolism of glucose with citrate or fructose. *Applied and Environmental Microbiology*, 1459-1466.
- Sanders, J.W., K.J. Leenhouts, A.J. Haandrikman, G. Venema i J. Kok (1995). Stress Response in *Lactococcus lactis*: Cloning, Expression Analysis, and Mutation of the Lactococcal Superoxide Dismutase Gene. *Journal of Bacteriology*, 177 (18): 5254-5260.
- Sanders, J.W., G Venema i J. Kok (1999) Environmental stress responses in *Lactococcus lactis*. *FEMS Microbiology Reviews*, 23: 483-501.
- Sauer, U. i P. Dürre (1993). Sequence and Molecular Characterization of a DNA region encoding a small heat shock protein of *Clostridium acetobutylicum*. *Journal of Bacteriology*: 3394-3400.
- Schreuder, M.P., A.T.A. Mooren, H.U. Toschka, C.T. Verrips i F.M. Kils (1996). Immobilizing proteins on the surface of yeast cells. *Trends in Biotechnology*, 14: 115-120.
- Schütz, M. i F. Radler (1973). Das "Malatenzym" von *Lactobacillus plantarum* und *Leuconostoc mesenteroides*. *Archiv für Mikrobiologie*, 91: 183-202.
- Serrano R. (1991). Transport across yeast vacuolar and plasma membrane. Volume I. The molecular and biology of the yeast *Saccharomyces*: genome dynamics, protein synthesis and energetics. Broach, J.R., Pringle, J.N. I Jones, E.W. (ed.) New York: Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor. 523-586.
- Serpa-Pimentel, M., M.H. Silva, I. Cortês i A. Mendes-Faia (1994). Growth and Metabolism of Sugar and Acids of *Leuconostoc oenos* Under Different Conditions of Temperature and pH. *Journal of Applied Bacteriology*, 76 (1): 42-48.

- Servant, P. i P. Mazodier (1995). Characterization of *Streptomyces albus* 18-kilodalton heat shock-responsive protein. *Journal of Bacteriology*, 177 (11): 2998-3003.
- Sinensky, M. (1974) Homeoviscous adaptation – a homeostatic process that regulates the viscosity of membrane lipids in *Escherichia coli*. *Proceeding of National Academic of Sciences USA*, 71: 522-525.
- Sirover, M.A. (1996) Emerging new functions of the glicolític protein, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, in mammalian cells. *Life Sciences*, 58: 2271-2277.
- Sirover, M.A. (1999) New insights into an old protein: the functional diversity of mammalian glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1432: 159-184.
- Sissons, C.H. i E.M. Hancock (1993). Urease activity in *Streptococcus salivarius* at low pH. *Arch. Oral Biol.*, 38: 507-516.
- Spettoli, P., M.P. Nuti, A. Zamorani (1984). Properties of malolactic activity purified from *Leuconostoc oenos* ML 34 by affinity chromatography. *Applied and Environmental Microbiology*, 48 (4): 900-901.
- Strasser de Saad, A.M., A.A. Pesce de Ruíz-Holgado i G. Oliver (1984). Purification and properties of malo-lactic enzyme from *Lactobacillus murinus* CNRZ313. *Journal of Applied Biochemistry*, 6: 373-383.
- Strasser de Saad, A.M., S.E. Pasteris i M.C. Manca de Nadra (1995). Production and stability of pediocin N5p in grape juice medium. *Applied Bacteriology*, 78 (5): 473-476.
- Suárez, J. A. i B. Iñigo (1992). Desacidificación a cargo de bacterias: la fermentación maloláctica. Requerimientos nutritivos. In: *Microbiología enológica. Fundamentos de vinificación* (pp.319-320). Madrid: Mundi-Prensa.
- Svensäter G., B. Sjögren i R. Hamilton (2000). Multiple stress responses in *Streptococcus mutans* and the induction of general and stress-specific proteins. *Microbiology*, 146 (1): 107-117.
- Tenreiro, R. (1995). *Análise taxonómica em Leuconostoc oenos. Uma perspectiva polifásica*. Tese doctoral. Universidade de Lisboa.
- Tenreiro, R., R. Santos, L. Brito, H. Paveia, G. Vieira i M.A. Santos (1993). Bacteriophages induced by mitomicin C treatment of *Leuconostoc oenos* strains from Portuguese wines. *Letters in Applied Microbiology*, 16, 207-209.
- Thompson J.D., F. Plewnial, J.-C. Thierry i O. Poch (2000). Rapid and reliable global multiple alignments of protein sequences detected by database searches. *Nucleic Acid Research*, 28 (15): 2919-2926.
- Tonon, T., J.-P. Bourdineaud i A. Lonvaud-Funel (2001). Catabolisme de l'arginine par *Oenococcus oeni*: aspects énergétiques et génétiques. *Lait*, 81: 139-150.
- Toriya, M.J., N. Rozès, J.M. Guillaumon i A. Mas (1999). Registre de la patent internacional RV1: "Selección de una levadura de TERRA ALTA y PRIORAT para su utilización como iniciador de fermentación".
- Tourdot-Maréchal, R. (1991). Etude du métabolisme de l'acide malique chez *Leuconostoc oenos*. Thèse de Doctorat, Université de Bourgogne, Dijon.
- Tourdot-Maréchal, R., J. F. Cavin, Z. Drici-Cachon i C. Diviès (1993). Transport of malic acid in *Leuconostoc oenos* strains defective in malolactic fermentation: a model to evaluate the kinetic parameters. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 39: 499-505.

Tourdot-Maréchal, R., D. Gaboriau, L. Beney i C. Diviès (2000). Membrane fluidity of stressed cells of *Oenococcus oeni*. *International Journal of Food Microbiology*, 55: 269-273.

Usseglio-Tomasset L., 1989. *Chimie oenologique*, Tec et Doc, Lavoisier, Paris.

Vaillant, H., P. Formisyn i V. Gerbaux (1995). Malolactic fermentation of wine: study of the influence of some physico-chemical factors by experimental design assays. *Journal of Applied Bacteriology*, 79: 640-650.

van Vuuren, H.J.J. i L.M.T. Dicks (1993). *Leuconostoc oenos* : a Reviews. *American Journal of Enology and Viticulture*, 44 (1): 99-112.

Veinger, L., S. Diamant, J. Buchner i P. Goloubinoff (1998). The Small Heat-shock protein IbpB from *Escherichia coli* stabilizes stress-denatured proteins for subsequent refolding by a multichaperone network. *The Journal of Biological Chemistry*, 273 (18): 11032-11037.

Versari, A., G. P. Parpinello i M. Cattaneo (1999). *Leuconostoc oenos* and malolactic fermentation in wine: a Reviews. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 23: 447-455.

Vidal, M.T. (1997) Interaccions dels pesticides, especialment el coure, amb els bacteris làctics del vi i efectes sobre la fermentació malolàctica. Tesi doctoral. Universitat Rovira i Virgili.

Vidal, M.T., M. Poblet, M. Constantí i A. Bordons (2001). Inhibitori Effect of Copper and Dichlofluaniid on *Oenococcus oeni* and Malolàctic Fermentation. *American Journal of Enology and Viticulture*, 52 (3): 223-229.

Viegas, C.A. i I. Sà-Correia (1991). Activation of plasma membrane ATPase of *Saccharomyces cerevisiae* by octanoic acid. *Journal of General Microbiology*, 137: 645-651.

Visser, S., C.J. Slangen, F.A. Exterkate i G.J.C.M. De Veer (1988). Action of a cell wall proteïnases ( $P_1$ ) from *Streptococcus cremoris* HP on bovine  $\beta$ -casein. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 29: 61-66.

Warth, A.D. (1988). Effect of benzoic acid on growth yield of yeasts differing in their resistance to preservatives. *Applied and Environmental Microbiology*, 54: 2091-2095.

Watson, K. (1990) Microbial stress proteins. *Advanced Microbial and Physiology*. 31: 183-223.

Welch, W.J. i C. Georgopoulos (1993) Function and regulation of heat shock proteins. *Annual Reviews in Cell Biology*.

Welsh, J. i M. McClelland (1990). Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research*, 18 (249): 7213-7218.

Wibowo, D., R. Eschenbruch, C. R. Davis ,G. H. Fleet i T. H. Lee (1985). Ocurrance and growth of lactic acid bacteria in wine: a Reviews. *American Journal of Enology and Viticulture*, 36 (4): 302-313.

Williams, G. K., A. R. Kubelik, K. J. Livak, J. A. Rafalski i S. V. Tingey (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 18 (22): 6531-6535.

Yang, D. i Woese, C.R. (1989). Phylogenetic structure of the *leuconostocs*: An interesting case of a rapidly evolving organism. *Systematic and Applied Microbiology*, 12: 145-149.

Yuan, Y., D.D. Crane i C.E. Barry (1996). Stationary phase-associated protein expression in *Mycobacterium tuberculosis*: function of the mycobacterial  $\alpha$ -crystallin homolog. *Journal of Bacteriology*, 178: 4464-4492.

Yura, T., H. Nagai i H. Mori (1993). Regulation of the heat-shock response in bacteria. *Annual Reviews in Microbiology*, 47: 321-350.

Zambonelli, C. (1988). *Microbiologia e biotecnologia dei vini*. Edagricole. Bologna.

Zapparoli, G., S. Torriani i F. Dellaglio (1998a). Differentiation of *Lactobacillus sanfranciscensis* strains by randomly amplified polymorphic DNA and pulsed-field gel electrophoresis. *FEMS Microbiology Letters*, 166: 325-332.

Zapparoli, G., S. Torriani, P. Pesente i F. Dellaglio (1998b). Design and evaluation of malolactic enzyme gene targeted primers for rapid identification and detection of *Oenococcus oeni* in wine. *Letters in Applied Microbiology*, 27: 243-246.

Zavaleta, A. I., A. J. Martínez-Múrcia i F. Rodríguez-Valera (1997). Intraspecific genetic diversity of *Oenococcus oeni* as derived from DNA fingerprinting and sequence analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 63 (4): 1261-1267.

Zhang, J. i C.D. Byrne (1999). Differential priming of RNA templates during cDNA synthesis markedly affects both accuracy and reproducibility of quantitative competitive reverse-transcriptase PCR. *Biochemical Journal*, 337: 231-241.



## **7. ANNEXOS**



---

- ANNEX A -

**PREPARACIÓ I ADDICIÓ D'ALGUNS COMPONENTS D'ESTRÈS**

➤ **Àcids grassos C10 i C12:**

Per facilitar la dissolució dels àcids grassos en un medi aquós com són els diferents medis de cultiu emprats i el most, cal saponificar-los prèviament, per la qual cosa es preparen en presència de NaOH en excés i d'un petit volum en etanol, per facilitar-ne la reacció i la dissolució posterior en aigua, el dissolvent amb el qual s'introduirà C10 i C12 en el medi, a partir d'una solució mare  $10^3$  concentrada (1000X), que es pot mantenir indefinidament a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

➤ **Coure:**

Quan parlem de la concentració de coure afegida al medi (10 o 20 mg/l), ens referim a la concentració de coure catiònic,  $\text{Cu}^{2+}$ . La solució mare es prepara també 1000X, a partir de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  i a pH 2,5 (amb  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ), per evitar que aquest precipiti, i s'autoclava.

➤ **SO<sub>2</sub>:**

El  $\text{SO}_2$  s'afegeix als medis i al most o vi en forma de bisulfit potàssic ( $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_5$ ), considerant que, estequiomètricament, 1,736 mg d'aquesta sal corresponen a 1 mg de  $\text{SO}_2$ .



## ANNEX B. Catàleg de reactius emprats en l'experimentació.

REACTIU	CASA COMERCIAL * i n° de catàleg
Ac 1ari contra GAPDH	Biogenesys, ab3792-1000
Ac 2ari IgG	Sigma, A-9452
Acetat d'amoni (CH <sub>3</sub> COO <sup>-</sup> NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> )	Panreac, 131114
Acetat de sodi	Merck, 232198 A
Acetona	Fluka Chemika, 00585
Àcid acètic 99-100 %	Prolabo, 20 103.364
Àcid acètic, assaig	Roche, 0148261
Àcid DL-màlic	Panreac, 372051
Àcid gras C10	Sigma, C 1875
Àcid gras C12	Sigma, D 9630
30 % Acril./bisacrilamida 29:1 (3,3 % C)	Bio-Rad, 161-0156
agar bacteriològic	Cultimed (Panreac), 402303
Agarosa (grau electroforesi)	GibcoBRL, 15510-019
Azida sòdica	Sigma, S 2002
blau de bromofenol	Sigma, B 0126
Bromur d'etidi	Sigma, E 7637
BSA	Sigma, A 2153
Casaminoàcids	Difco, 0230-15-5
Citrat de sodi	Panreac, 131656
Cítric, assaig	Roche, 0139076
Cloroform	Panreac, 211252
Cloroform-2-pentanol 24:1	Sigma, C 0549
Clorur d'hidroxilamina	Sigma, H-9876
Coomassie Blue R-250	Bio-Rad, M7294A
dATP*	Easytides,512H 10251
DCCD (N,N'-Diciclohexilcarbodiimida)	Sigma, D-3128
D-Fructosa	Panreac, 142728
D-glucosa	Panreac, 141341
D-glucosa/D-fructosa,assaig	Roche, 0139106
DL-GAP	Sigma, G 5251
DNAasa I	B. Mannheim, 104159
DNTPs (PCR grade)	Roche, 1969 064
DPCB	Sigma, D 5520
Esperma de salmó	Sigma, S 3126
Etanol (per a anàlisi)	Prolabo, 20 821.365
Etanol (per a B. Molecular)	Merck, 1.08543.0250
Etanol, assaig	Roche, 0176290
Extracte de llevat	DIFCO, 212750
Extracte de llevat DI 54 codi 30101	Bio Springer
Extracte de llevat estàndard	106, pols sense sal tipus B, standard (Bio Springer), codi B
FAST DAB®	Sigma, D 4418
Ficoll 400	Sigma, F 5415
Formaldehid 37 %	Merck, 1.04003.1000
Formamida	Carlo Erba, 452286

Glicerol	Panreac, 131339
Glicerol, assaig	Roche, 0148270
Glicina	Sigma, G 8898
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (96 %)	Carlo Erba, 410301
<i>Immobilon P</i>	Millipore
<i>Kaleidoscope Prestained Standards</i>	Bio-Rad, 161-0324
<i>Kit Random Primers DNA Labeling System</i>	Life Technologies, 18187-013
L-soleucina	Sigma, I 2752
Lisozim	B. Mannheim, 1585657
L-làctic, assaig	Roche, 1112821
L-màlic, assaig	Roche, 0139068
Mannoproteïnes de llevats	Guilloux-Benatier
Marker II	Roche, 236250
Marker VI	Roche, 1062590
Membrana niló NYTRAN <sup>®</sup>	NYTRAN <sup>®</sup>
β-mercaptoetanol	Sigma, M 3148
Metanol	Imatra, AL01396T
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	Panreac, 131404
Molibdat amònic	Labs RISER, 292006
MOPS	Q.Biogene, MOPS0250
MRS	DIFCO, 288130
Na <sub>2</sub> ATP	B.Mannheim, 519979
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	RECTAPUR, Prolabo, 27 766.292
Na <sub>2</sub> EDTA	Sigma, E 5134
NAD <sup>+</sup> (100 %, grau I)	Roche, 223 468
NADH (100 %, grau I)	Roche, 107 727
Nistatina	CALBIOCHEM, 475914
N-laurilsarcosina	Sigma, S 7672
Paper Saran <sup>®</sup>	Dow
Pepstatina A	Sigma, P 4265
Peptona bacteriològica	Cultimed, 403695
Peptona de llevat codi 222	Bio Springer, codi 222
Persulfat d'amoni	Bio-Rad, 161-0700
pimaricina	Sigma, P 9703
Piruvat sòdic	Sigma, P 2256
PMSF	Roche, 236608
PVP-40	Sigma, 9003-39-8
Reactiu de Bradford	Bio-Rad, 500-0006
Reactiu Folin-Ciocalteu	Merck , 1.09001.0500
RNAasa A	Sigma, R 5503
SDS	Merck, 13760
SyberGreen 2X PCR Màster Mix	AB, 4309155

Tampó 10X PCR	Ecogen, ETAQ500
Tampó amb MgCl <sub>2</sub> (25 mM) i Taq polimerasa (5 U/ml)	
Taq polimerasa (5 U/μl)	
TaqMan Reverse Transcription Reagents	AB, N808-0234
Tartrat sòdic	Panreac, 131729
TCA	Sigma, T 9159
TEMED	Bio-Rad, 161-0800
Tiocianat de guanidina	Fluka, Biochemika, 50990
TNBSA	Fluka, Chemika, 92823
TaqMan <sup>®</sup> Reverse Transcripton Reagents: inclou Transcriptasa MultiScribe <sup>™</sup> Reverse (50 U/μl)	A.B., Roche, N808-0234
trietanolamina	Panreac, 141750
<b>Tri-Reagent</b>	Sigma, T 9424
<b>Tris (per a electroforesi)</b>	Bio-Rad, 161-0719
Tris-HCl	B. Mannheim, 85560822
Tween 20	Sigma, P 1379
Tween80	Sigma, P 1754

\* Algunes cases comercials potser ja no existeixen com a tals, però en la taula s'indiquen la casa comercial i la referència corresponent per a cada producte utilitzat. Algunes abreviatures referides a cases comercials, emprades en la taula:

AB: Applied Biosystems (Roche)

Bio-Rad: Bio-Rad Laboratories

B. Mannheim: Boehringer Mannheim

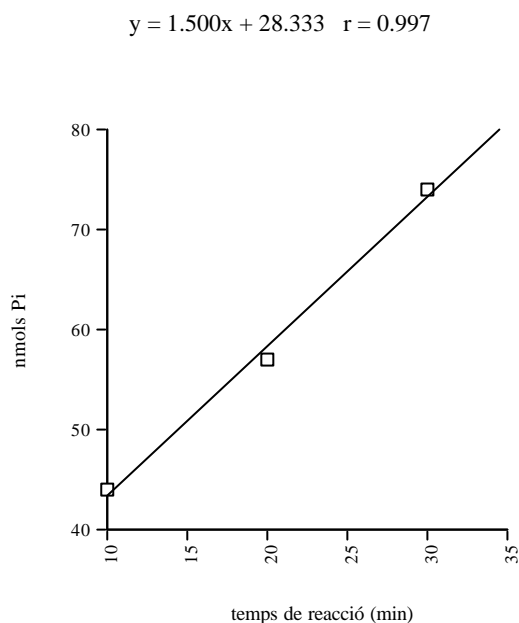
Carlo Erba: Carlo Erba Reagenti



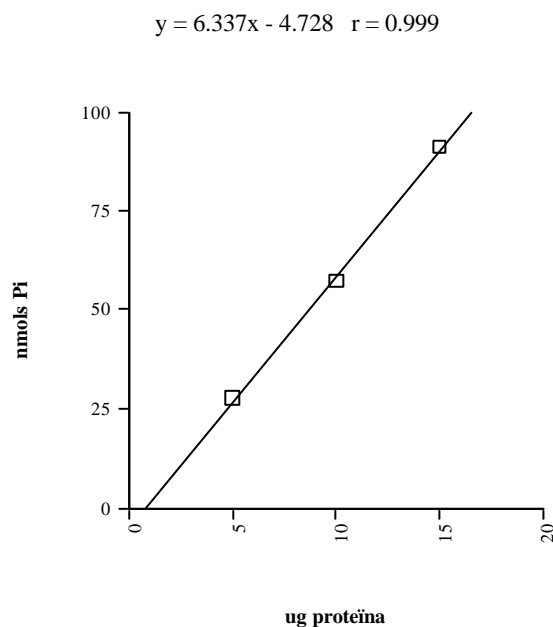


**- ANNEX C -**

Com es pot veure en la figures **C1** i **C2**, l'assaig ATPasa de membrana és lineal dins l'interval de 10 – 30 minuts com a mínim (C1), i per a diferents concentracions de substrat (5-15 µg de proteïna) (C2).



**Figura C1** Linealitat de l'assaig enzimàtic per a l'ATPasa al llarg del temps.



**Figura C2** Linealitat de la quantitat de mostra en l'assaig ATPasa respecte a la quantitat de P<sub>i</sub> alliberada.



## – ANNEX D –

a)

```

PrtP      KVTTLAKVYYPTDAKANSMANVQAVWSNYKYKGEGTVSVVIDSGIDPTHKDMRLSDDKDV 235
M83946    KVTTLAKVYYPTDAKANSMANVQAVWSNYKYKGEGTVSVVIDTGIDPTHKDMRLSDDKDV 235
AF133727  KSVTLAKVYYANDSSADNMANVSTVWNNYKYKGEGTVSVIITDGIDPNHKDLRLSDDSKV 224
L48487    KNVTPVKVYHPTDESADQMAQVQDVWQEQKLKGEGMVISIIITDGIDSSHQDLKLDSGVST 240
* . * * . * * * : . . * * . * : . * * * : * * * * * * : * * * * : * * * * * : . . * * * : . . . . .

```

Seqüència per a *PrtP-oenos-F*

```

PrtP      AACTCGATGGCGAATGTGCAAGCCGTATGGTCCAATTACAAATATAAAGGTGAAGGCAC 1837
M83946    TAACTCGATGGCGAATGTGCAAGCCGTATGGTCCAATTACAAATATAAAGGTGAAGGCAC 2276
AF133727  TGACAATATGGCTAACGTTTCAACCGTTTGGAAACAATTATAAATACAAGGGGAAGGTAC 599
L48487    TGATCAAATGGCCCAAGTGCAGGACGTTTGGCAAGAACAAAAGCTCAAGGGTGAAGGTAT 3290
*      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

```

PrtP      AGTTGTCTCGGTTATTGACAGTGGCATTGATCCAACACATAAAGACATGCGGCTAAGCGA 1897
M83946    AGTTGTCTCGGTTATTGACACTGGCATTGATCCAACACATAAAGACATGCGGCTAAGCGA 2336
AF133727  CGTCGTTTCTATCATCGATACTGGTATTGATCCAATCACAAGATTTGCGCTTAAGCGA 659
L48487    GGTCAATTCGATCATTGATACAGGGATCGACTCCAGCCACCAGGACTTGAAGTTGGACAG 3350
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

b)

```

PrtP      GAAIKAGS-NITVPAGKTAQIEFTLSLPKSFDQQQFVEGFLNFKGSDGSR--LNLPYMGF 828
M83946    GAAIKAGS-DITVPAGKTAQIEFTLSLPKSFDQQQFVEGFLNFKGSDGSR--LNLPYMGF 828
AF133727  GASVKASG-DIFVPANSTKELTLTLLPSDFKENQYVEGFLTFNSSDSSQ--LRLPYMGF 815
L48487    KGQLTTETPPKVTVQPGESVDVSFTLLTPPYSFQRQNFVEGYVGFEAKDQATPNLVLPYMGF 813
. : . : . : * . . . : : : * * * * * * . * . . . : * * * * * *

```

```

PrtP      FGDWN--DGKIVDSLNG-ITYSPAGGNFGTVPLLTKNKNTGTQYYGGMVTDADGNQTVDDQ 885
M83946    FGDWN--DGKIVDSLNG-ITYSPAGGNFYGTVPLLTNKNTGHQYYGGMVTDADGKQTVDDQ 885
AF133727  FGDWASSDLPIFASLNDPNVFPDNNMFG--TLVTVGNSSDNTNPGLSQDASGNLSFDSS 873
L48487    FGSYS--QASVSAPMLYEGGNSLNLINTIHSLVGVMFSNNNDMLGHTGYEGDDYSKYTDPD 871
* . : . : . : . : . : . : . : . : . : . : . : . : . : . : . : . : . : . : . : . : . :

```

Seqüència per a *PrtP-oenos-R*

```

PrtP      CTTGAACTTGCCATACATGGGCTTTTTTGGTGACTGG--AAT--GACGGTAAGATTGT 3718
M83946    CTTGAACTTGCCATACATGGGCTTTTTTGGTGACTGG--AAT--GACGGTAAGATTGT 4157
AF133727  ATTGCGTCTTCCATATATGGGCTTCTTTGGCGATTGGGCAAGTTCAGATCTTCCAATCTT 2480
L48487    CCTGGTTCTTCCATACATGGGCTTTTTTCGGCAGCTACAGTCAAGC-GAGTGTACGCGCAC 5116
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

*PrtP*: *L. lactis* subsp. *cremoris*  
 AF133727: *Lb. helveticus*

M83946: *Lactobacillus paracasei*  
 L48487: *Lactobacillus delbrueckii*

**Figura D1.** Fragments de seqüència, proteica i nucleotídica, de *PrtP*, alineats segons Clustal W (1.81) per al disseny dels encebadors degenerats *PrtP-oenos-F* i *PrtP-oenos-R*. En la llegenda inferior s'indica a quin organisme correspon cadascuna de les seqüències.

En vermell s'indica la seqüència consens emprada per al disseny de l'encebador *F* (*forward*) i per a l'encebador *R* (*reverse*). Les corresponents seqüències de bases nitrogenades, o un segment d'aquestes, també disponibles en les bases de dades (*GenBank*), serviren per a l'elaboració dels encebadors degenerats.

```

PrtP      SFKPDITAPGGNIWSTQNNNGYTNMSGTSMASPFIAGSQALLKQALNNKNPFYAYKQL 651
M83946    SFKPDITAPGGNIWSTQNNNGYTNMSGTSMASPF IAGSQALLKQALNNKNPFYADYKQL 651
AF133727  AFKPDISAPGGHIWSTQNNNGYTNMSGTSMASPF IAGTQALVSQTMNDKNGAFYATYQKM 639
L48487    DFKPEITAPGGKIYSLANDNKYQQMSGTSMASPFVAGSEALILQGIKKQG-----LNL 641
          *****:*** *:* * :*****:***:***: * :.:.  ::

```



```

PrtP      CTGGTCAACGCAAAACAACAATGGCTACACAAATATGTCTGGTACGTCAATGGCCTCACC 3076
M83946    CTGGTCAACGCAAAACAACAATGGCTACACAAATATGTCTGGTACGTCAATGGCCTCGCC 3515
AF133727  TTGGTCAACTCAAAATAACAATGGCTATACTAACATGTCTGGTACTTCAATGGCTTCTCC 1835
L48487    CTACTCGCTGGCCAACGACAACAAGTACCAGCAAATGAGTGGGACTTCAATGGCTTACC 4505
          * **          ** ****          * ** * ** * ** * ** * ** *

```

```

PrtP      ATTTATTGCCGGTTCACAAGCATTGTTGAAACAAGCATTGAATAACAAAAACAACCCATT 3136
M83946    ATTTATTGCCGGTTCACAAGCATTGTTGAAACAAGCGTTGAATAACAAAAACAACCCATT 3575
AF133727  ATTTATTGCTGGTACCCAAGCACTTGTGTAGTCAAACAATGAACGACAAGAATGGTGCTTT 1895
L48487    ATTTGTGCAGGTTCCGAAGCATTAATTTTGCAAG-----GTATCAAGAA----- 4550
          **** * ** ** * ** * ** * * **          *** **

```

**Figura D2.** Seqüències, proteica i nucleotídica, per al disseny de l'encebador degenerat *PrtP*-oenos-*F2*.

**Taula D1.** Diferents condicions d'amplificació aplicades en les proves per a identificar la presència del gen *PrtP* en *O. oeni*, mitjançant encebadors degenerats.

PROVA i encebadors		Nombre de cicles		Condicions de reacció	
				T (°C)	Temps
1	<i>PrtP</i> -oenos- <i>F</i> <i>PrtP</i> -oenos- <i>R</i>	1		94	3 min
		30	Hibridació	40	30 s
			Elongació	72	2 min
		1		72	4 min
2	<i>PrtP</i> -oenos- <i>F</i> <b><i>PrtP</i></b> -oenos- <b><i>F2</i></b> <i>PrtP</i> -oenos- <i>R</i>	1		<b>92</b>	<b>2 min</b>
		30	Hibridació	92	30 s
			Elongació	<b>52</b>	30 s
		1		72	<b>1 min</b>
3	<i>PrtP</i> -oenos- <i>F</i> <i>PrtP</i> -oenos- <b><i>F2</i></b> <i>PrtP</i> -oenos- <i>R</i>	1		72	<b>2 min</b>
		30		92	<b>3 min</b>
			Hibridació	92	30 s
		Elongació	52	30 s	
1		72	2 min		
4	<i>PrtP</i> -oenos- <i>F</i> <i>PrtP</i> -oenos- <b><i>F2</i></b> <i>PrtP</i> -oenos- <i>R</i>	1		72	<b>4 min</b>
		30		92	2 min
			Hibridació	92	30 s
		Elongació	<b>54</b>	30 s	
1		72	1 min		
1		72	2 min		



**Taula E1. Resultats de les anàlisis dels continguts d'amines biògenes (mg/l) en les mostres de vins de la campanya 2000 a final de vinificació:**

MOSTRA	TI <sup>a</sup>	HI	FE	SE	TRP	PU	CA	AG	ED	EM
1. CA1	ND <sup>b</sup>	≤ 0,25	≤ 0,25	ND	ND	2,00 (0,03) <sup>c</sup>	≤ 0,25	≤ 0,25	ND	≤ 0,5
2. CA2	ND	≤ 0,25	≤ 0,25	ND	ND	2,17 (0,01)	≤ 0,25	≤ 0,25	ND	≤ 0,5
3. LISO	ND	≤ 0,25	≤ 0,25	ND	ND	2,90 (0,01)	≤ 0,25	≤ 0,25	ND	≤ 0,5
4. CB1	ND	≤ 0,25	≤ 0,25	ND	ND	1,72 (0,06)	≤ 0,25	≤ 0,25	ND	≤ 0,5
5. CB2	ND	≤ 0,25	≤ 0,25	ND	ND	1,71 (0,01)	≤ 0,25	≤ 0,25	ND	≤ 0,5

<sup>a</sup>: TI, tiramina; HI, histamina; FE, β-feniletilamina; SE, serotonina; TRP, triptamina; PU, putrescina; CA, cadaverina; AG, agmatina; ED, espermidina; EM, espermina

<sup>b</sup>: No detectada.

<sup>c</sup>: Mitjana (desviació estàndard).

**Taula E2. Alguns paràmetres enològics de les mostres de vins de la campanya 2000 a final de vinificació:**

MOSTRA	IC	MATÍS	A. TOT.	LPVPP	I. ION.	TANINS	I. DIÀL.	I. HCL	I. GEL.	I. EtOH
1. CA1	8,51	64,2	464,6	11,9	25,07	3,07	60,0	33,4	28,0	23,0
2. CA2	8,5	64,0	462,9	12,9	23,79	3,11	60,6	35,9	19,2	22,8
3. LISO	8,3	62,1	444,5	17,8	25,48	2,82	59,6	37,0	5,8	19,8
4. CB1	5,9	67,3	482,1	25,1	16,36	2,45	55,0	35,5	11,3	14,2
5. CB2	5,61	69,7	483,9	24,9	14,94	2,39	54,9	30,0	11,1	13,0

**A. TOT.:** Antocians totals (mg/l); **I. PVPP:** índex de PVPP (%); **I. ION.:** Índex d'ionització (%); **TANINS** (g/l); **I. DIÀL.:** Índex de diàlisi (%); **I. HCL:** índex d'HCl (%); **I. GEL.:** índex de gelatina; **I. EtOH:** índex d'etanol.





## **ANNEX F**

