



**ESTUDIO BIOQUÍMICO Y MOLECULAR DE LA PRODUCCIÓN DE PRECURSORES
DE CARBAMATO DE ETILO POR BACTERIAS LÁCTICAS ASOCIADAS AL
PROCESO DE VINIFICACIÓN**

Maria Isabel Araque Granados

ISBN: 978-84-693-6429-1

Dipòsit Legal: T-1631-2010

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

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

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

María Isabel Araque Granados

**ESTUDIO BIOQUÍMICO Y MOLECULAR DE LA
PRODUCCIÓN DE PRECURSORES DE CARBAMATO DE
ETILO POR BACTERIAS LÁCTICAS ASOCIADAS AL
PROCESO DE VINIFICACIÓN**

TESIS DOCTORAL

Dirigida por: Dr Albert Bordons de Porrata–Doria y
Dra Cristina Reguant Miranda

Dpt. de Bioquímica i Biotecnologia
Grupo de Biotecnología Enológica, línea de Bacterias Lácticas



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Tarragona

2010



UNIVERSITAT
ROVIRA I VIRGILI

Departament de Bioquímica i Biotecnologia

Facultat d'Enologia
Campus Sescelades, URV
C. Marcel·li Domingo, s/n, E-43007 Tarragona
Tel. +34 977 55 80 43
Fax +34 977 55 82 32

Albert Bordons de Porrata-Doria i Cristina Reguant Miranda, professors del
Departament de Bioquímica i Biotecnologia de la Universitat Rovira i Virgili

CERTIFIQUEM

que aquest treball, titulat "**Estudio bioquímico y molecular de la producción de precursores de carbamato de etilo por bacterias lácticas asociadas al proceso de vinificación**", que presenta **María Isabel Araque Granados** per a l'obtenció del títol de Doctora, ha estat realitzat sota la nostra direcció al Departament de Bioquímica i Biotecnologia d'aquesta universitat.

Tarragona, 26 de febrer de 2010

Albert Bordons de Porrata-Doria

Cristina Reguant Miranda

"Hay hombres que luchan un día y son buenos, otros luchan un año y son mejores, hay quienes luchan muchos años y son muy buenos, pero están los que luchan toda la vida, y esos son los imprescindibles"

Bertolt Brecht

Agradecimientos

Llegados a esta etapa final me es muy difícil solo expresar mi agradecimiento a tanta gente que ha hecho que esta tesis por fin vea la luz.

En primer lugar a mis directores de tesis, Albert Bordons y Cristina Reguant, por haberme brindado la oportunidad de realizar la tesis en su grupo de investigación y por todo su apoyo, aliento, amistad y confianza en todos los momentos.

A la Universidad de Pamplona, por la comisión de estudio para realizar el doctorado gracias al convenio existente entre las dos universidades.

A bodegas Torres por los años de beca que me permitieron seguir adelante combinándome el proyecto con la tesis.

A la Dra. Carme Masqué, del INCAVI por su colaboración.

Agradezco a todos los miembros del departamento de Bioquímica y Biotecnología, han sido unos años increíbles que me han permitido descubrirles desde una perspectiva humana, muy cercana, tanto profes, como administrativos. He podido tener alguna vez una charla con todos, o bien porque hemos dado juntos alguna practica, o me habéis dado clase, o nos hemos cruzado en el corredor o me habéis ayudado con una duda existencial. Me quedo con el mejor de los recuerdo de todos y cada uno, son muchos años. También quiero expresar mi sincero agradecimiento al Dr. Xavier Rius, que al estar de director de la Escuela de Doctorado me dio un gran apoyo económico para poder seguir adelante y hoy día una estupenda amistad, gracias también por venir cada vez que la coral tenia concierto, ya sabía que siempre estabas.

A mis lácticos de la primera hornada cuando aterrice Cris, Joana y Ramón con ellos siempre me unirá un hilo especial, tantas horas de charlas, cafés, bromas, consejos, risas y lagrimas, momentos durísimos en lo que siempre habéis sabido estar, me quedare corta siempre para agradecerles todo lo que habéis hecho por mi. Además esta tesis es también vuestra. Os juro que no me bastan estas pocas líneas. Albert B, gracias por tantos momentos dentro y fuera de la tesis, los ratitos de fotos y nuestras charlas, gracias.

Los chicos de vino y salud de aquellos años Cesc, Nino, Montse y Joseph María nuestros coleguitas del lab de al lado, gracias por días de risas y cafés

Agradezco a Santiago Moreno, nunca sabré cómo agradecerle tu apoyo logístico, comercial y la amistad imperecedera, gracias por ayudarme a salir adelante en las horas bajas, gran amigo

La antigua facultad de enología, era pequeña pero tenía un encanto especial, sería el pisa?, los cafelitos o las cervecitas... oye cuánto tarda el HPLC hummm dos cigarrillos y medio jeje te contestaba Sumpta simpática. Allí siempre estaban para conversar un ratón, sacarte dudas o los colores si tocaba, siempre os recordaré chicos gracias. Nuria, Rosana, Roser, Mireia, Angel, Isabel, Joseph, Mayte, Gemma, Miriam, Carmelita (aún me duele tu ausencia, te haría feliz saberlo lo logre...!!!)

Con toda la gente que he podido compartir estos últimos años de laboratorio y garbeo por el departamento, Catalina, Gemma, Mayte, Carla, Yunuen, Carlos, Claudio todo un señor amigo y apoyo. Joan gracias por estar, lamentaré no haberte podido convencer de seguir pero se que tendrás opciones, eres bueno chico!! Albert H, y su mundo de olivas y productos naturales espero que te vaya todo sobre ruedas, Nair muy buen viento para un buen norte, ya veras que siempre se llega. Mery, ahora comienzas pero eres una crack!! de veras que saldrás super bien. Michi y Karol, nuestras visitantes austriacas gracias por venir me habeis permitido practicar mi ingles macarrónico jeje.

Mis chikis de levaduras, Imma, Marta, Boris, Javi, Marian gracias mil, las horas de despacho se han hecho menos duras, el congreso de Ourense fue el mejor. Gracias por tanto cariño conmigo y mi pancita.

Braulio y mi Rosita gracias por ayudarme en las gestiones del lab, en las peleas con los formularios de calidad, y en los ratos perezosos de las 8 am, al menos ves una cara conocida a esa hora y se te hace todo mucho menos pesado. A Mary, Montse, Helena, Guadalupe, estos últimos años habeis sido un encanto gracias por el soporte moral de cada madrugada.

No quiero olvidar agradecer también al grupo de Microbiología de la Universidad de Tucumán en Argentina, por haberme permitido conocerles, entre sus venidas y mis idas, también cosas de la tesis se han ido forjando. A la la Dra. Maria Cristina (QEPD) y la Dra. Fabiana, por sus consejos y amistad.

Tengo que agradecer a la coral de la Universidad, en cabeza de Montse Rios la dire, con quien me une un afecto especial. Gracias Montse por aceptarme y dejarme participar en este sueño, a los chicos de la coral me faltan las palabras

saben todo lo que les quiero, tantas horas maratonianas preparando repertorio, conciertos, concursos, notas perdidas, por el apoyo en las horas a ras de suelo, por ayudarme a buscarme la vida, y por tantas palabras de apoyo aunque la bioquímica y la micro la veáis en chino.

A mis amigos del alma Francesc, Cristina Salazar, Carolina, Isabel, no se que haria sin vosotros... en serio que no lo sé, las palabras y el espacio es muy corto. Silvana, compañera de viaje, gracias mil por tantos ratos, por volarte a comer conmigo entre bodega y bodega, por tu amistad y todo. Esto de la tesis es como las cuerdas de un violín te van afinando jeje.

A mi familia, quien ha sufrido cada momento de esta tesis, en los buenos y en los malos ratos. A mis padres que son el motor de mi existencia, gracias por aceptar el reto, siempre como ahora me habéis dado el apoyo para seguir adelante. Mami cuanto diera por que estuvieras bien y celebrarlo juntas, pero la vida nos ha jugado esta mala pasada.

A Dios por haberme dado la oportunidad de venir, vivir y vencer...

Por ultimo a los hombres de mi vida, Álvaro cariño ¿cuantos días desde que nos conocemos no te he dado lata con la tesis? Eres la razón por la que he seguido adelante desde que te conocí eres mi fortaleza, mi faro en el horizonte. Vida mía gracias por tu amor, tu comprensión, tu cariño, tu resolución de dudas con el Excel entre otras y por nuestro hijo Edgar que es quien me ha acompañado en la pancita este último tramo de escritura de tesis, alegrándome los ratos con sus pataditas cariñosas, hijo mío hemos llegado a tiempo....

Me imagino que se me quedaran muchos entre el tintero son tantos años y tantas vivencias dentro y fuera. Gracias muchas gracias a todos y cada uno.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
ESTUDIO BIOQUÍMICO Y MOLECULAR DE LA PRODUCCIÓN DE PRECURSORES DE CARBAMATO DE ETILO POR BACTERIAS LÁCTICA
ASOCIADAS AL PROCESO DE VINIFICACIÓN
ISBN:978-84-693-6429-1/DL:T-1631-2010

*Esta tesis doctoral
Quiero dedicarla a
Mis padres, a Álvaro y
A nuestro hijo, Edgar*

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
ESTUDIO BIOQUÍMICO Y MOLECULAR DE LA PRODUCCIÓN DE PRECURSORES DE CARBAMATO DE ETILO POR BACTERIAS LÁCTICA
ASOCIADAS AL PROCESO DE VINIFICACIÓN
ISBN:978-84-693-6429-1/DL:T-1631-2010

ÍNDICE GENERAL

I. Introducción	1
1. Las bacterias lácticas	3
1.1. Características generales de las bacterias lácticas	3
1.2. Clasificación de las BL	4
1.3. Las bacterias lácticas en el vino	8
2. Fermentación maloláctica	10
2.1. Antecedentes históricos de la FML	10
2.2. Mecanismo bioquímico de la fermentación maloláctica	11
2.3. Factores que influyen en la FML	13
2.4. Ecología de la vinificación y FML	16
3. Metabolismo de las BL y efectos sobre el vino	18
3.1. Efectos positivos	20
3.2. Efectos negativos	21
4. Carbamato de etilo	23
4.1. Efecto carcinogénico del CE	23
4.2. Carbamato de etilo en vino y otros alimentos	24
4.3. Formación del carbamato de etilo	26
4.4. La arginina como fuente de precursores de CE	28
5. Precursores del CE formados por BL	29
5.1. La vía de la arginina deiminasa (ADI)	29
5.2. Metabolismo energético de la arginina en las BL	32
5.3. Genética de la vía ADI en bacterias: operón <i>arc</i>	34
5.4. Regulación de la vía ADI en BL	38
5.5. Implicaciones enológicas de la degradación de la arginina por las BL	40
5.6. Propuestas para evitar la formación de Carbamato de Etilo	41
6. Bibliografía	43
II. Justificación, Hipótesis y Objetivos	65

III. Resultados	69
III.1. Identificación de bacterias lácticas del vino relacionadas con la degradación de la arginina. A multiplex PCR method for simultaneous species identification and strain typification of <i>Oenococcus oeni</i> <i>World Journal of Microbiology and Biotechnology</i> . 2009, 25: 15 – 18	71
III.2. Degradación de la arginina por bacterias lácticas de vino y otros alimentos fermentados	95
III.3. Detection of <i>arc</i> genes related with the ethyl carbamate precursors in wine lactic acid bacteria <i>Journal of Agricultural and Food Chemistry</i> 2009, 57 (5), 1841- 1847	121
III.4. Influence of wine– and beer-like conditions on arginine utilization by lactic acid bacteria <i>Artículo en preparación</i>	145
III.5. Effect of ethanol and pH on <i>arc</i> genes expression and on citrulline and ornithine accumulation/excretion by <i>Lactobacillus brevis</i> and <i>Pediococcus pentosaceus</i> <i>Artículo en preparación</i>	173
IV. Discusión general	203
V. Conclusiones	219
VI. Anexos	223

ABREVIATURAS

- AE: Actividad enzimática
- ADN: Ácido desoxiribonucleico
- ADI: Arginina deiminasa/arginine deiminase
- *arcA*: Gen de la arginina deiminasa
- *arcB*: Gen de la ornitina transcarbamilasa
- *arcC*: Gen de la carbamato kinasa
- *arcD*: Gen del transportador de membrana
- ARN: Ácido Ribonucleico
- ATP: Adenosin trifosfato
- BL: Bacterias lácticas
- BSA: Seroalbúmina bovina
- CE: Carbamato de etilo
- CECT: Colección española de Cultivos Tipo
- Col.: Colaboradores
- CK: carbamato quinasa/carbamate kinase
- DO: Densidad óptica
- FAL: Fermentación alcohólica
- FML: Fermentación maloláctica
- FMOC: 9-fluorenylmethylchloroformate
- g: Gravedades
- HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución /High Performance liquid chromatography
- *L.*: *Lactobacillus*
- *Lc.*: *Leuconostoc*
- LDH: Enzima lactato deshidrogenasa
- MRSmf: Medio MRS suplementado con malico y fructosa
- MRSm: Medio modificado MRS.
- NAD⁺: Dinucleótido de nitotinamida y adenina
- OPA-3-MPA: o-phthaldialdehyde-3-mercaptopropionic acid
- OTC: Ornitina transcarbamilasa/ornithine transcarbamilase
- *P.*: *Pediococcus*
- Pb: Pares de bases
- PCR: Reacción en cadena de la polimerasa /polimerase chain reaction.
- r.p.m: Revoluciones por minuto
- RT-PCR: Transcripción reversa del RNA/ retrotranscription of RNA
- SD: Desviación estándar
- SDS: Sulfato dodecil sódico
- UFC: Unidades formadoras de colonias.
- RAPD: Amplificación al azar de fragmentos polimorficos de ADN/ Random Amplified Polymorphic ends.
- PCRq: Cuantificación de la Reacción en cadena de la polimerasa o PCR en tiempo real /PCR quantification.
- 16s-ARDRA: Análisis de restricción del ADN ribosómico 16s amplificado/ amplified 16s rDNA restricción analysis.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
ESTUDIO BIOQUÍMICO Y MOLECULAR DE LA PRODUCCIÓN DE PRECURSORES DE CARBAMATO DE ETILO POR BACTERIAS LÁCTICA
ASOCIADAS AL PROCESO DE VINIFICACIÓN
ISBN:978-84-693-6429-1/DL:T-1631-2010

I.

INTRODUCCIÓN

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
ESTUDIO BIOQUÍMICO Y MOLECULAR DE LA PRODUCCIÓN DE PRECURSORES DE CARBAMATO DE ETILO POR BACTERIAS LÁCTICA
ASOCIADAS AL PROCESO DE VINIFICACIÓN
ISBN:978-84-693-6429-1/DL:T-1631-2010

1. Las bacterias lácticas

Unos de los principales organismos utilizados en la elaboración de alimentos fermentados sin duda son las bacterias lácticas (BL), un amplio grupo conformado por microorganismos clasificados en el Phylum Firmicutes. Lo constituyen especies bacterianas con complejos requerimientos nutricionales, aunque existen importantes excepciones que son altamente versátiles en cuanto a los medios de crecimiento, y en condiciones de restricción de nutrientes, incluso en ambientes inhóspitos como el vino. Esto refleja la diversidad de hábitats que ocupan las BL, que no solo incluyen vegetales, leche y carne, sino también salmueras, medios a bajos pH, y con etanol.

Elaborar alimentos fermentados se convirtió en una práctica ampliamente aplicada en todos los pueblos, y más cuando había tierras que conquistar, y había que alimentar ejércitos en guerra, ya que se aumentaba la vida media de los alimentos. Bebidas como vino y cerveza fueron preferibles sobre el agua que podía ser fácilmente contaminada. El queso, el vino y el pan se convirtieron en alimentos fermentados disponibles en todo el Mediterráneo y las áreas próximas.

1.1. Características generales de las bacterias lácticas

Las bacterias lácticas son un grupo no taxonómico que agrupa a todas aquellas bacterias capaces de producir ácido láctico a partir de azúcares, que tienen bajo porcentaje de G+C en su ADN y que no son formadoras de esporas. Comparten muchas características fisiológicas, genéticas y bioquímicas. Específicamente la mayor razón porque las BL son usadas en alimentos fermentados es debido a su habilidad de metabolizar azúcares, dando láctico y otros ácidos como producto final. Son bacterias cocoides o bacilares no móviles, Gram (+) y catalasa (-), que al microscopio aparecen aisladas, en parejas, tétradas o en cadenas de cocos o de bacilos. Su pared posee peptidoglucano y ácido teicoico, aunque algunas no contienen este compuesto. Se dividen por fisión binaria. Son parte de la microbiota normal de la superficie de vegetales (frutas y verduras), en alimentos ricos en azúcares, en tracto nasofaríngeo y gastrointestinal. Obtienen energía principalmente por fermentaciones de azúcares, carecen de ciclo de Krebs funcional.

Tienen un metabolismo anabólico muy limitado lo que contribuye a reducir el rendimiento en el crecimiento. Por ello forman normalmente colonias pequeñas. Requieren una gran cantidad de factores nutritivos (aminoácidos, bases nitrogenadas, vitaminas). Toleran bien concentraciones relativamente altas de ácidos, y valores de pH más bajos que el resto de las bacterias por lo que pueden desplazarlas de los hábitats que colonizan. Son bacterias mesófilas, ya que crecen generalmente bien a temperaturas ambientales normales entre 20 y 37° C. Pueden formar polímeros extracelulares de dextrano.

1.2. Clasificación de las BL

Además de sus formas esféricas o cilíndricas, el metabolismo homo o heterofermentativo del azúcar constituye un criterio decisivo para su clasificación. Las bacterias homofermentativas producen ácido láctico a partir de glucosa y/o fructosa (Figura 1). Las heterofermentativas producen dióxido de carbono, etanol, ácido acético y ácido láctico, a partir de los mismos hidratos de carbono. Las BL pueden poseer ambos tipos de metabolismo de hidratos de carbono, y las podemos clasificar en tres grupos:

- i) Homofermentativas estrictas, más del 90% del azúcar es convertido exclusivamente en ácido láctico y son incapaces de crecer en pentosas. Nunca se han detectado en vinos.
- ii) Heterofermentativas facultativas, son las más versátiles, se adaptan a cualquier fuente de carbono una molécula de glucosa se convierte en dos moléculas de ácido láctico, las pentosas se transforman en ácido acético y ácido láctico.
- iii) Heterofermentativas estrictas, sobre el 50% de la glucosa es transformada en ácido láctico, y el resto es ácido acético, etanol y CO₂. Las pentosas dan lugar a ácido láctico y ácido acético.

El rendimiento de la fermentación homoláctica (2 mol ATP/ mol de glucosa) es más alto que el de la heteroláctica (1 mol ATP / mol de glucosa)

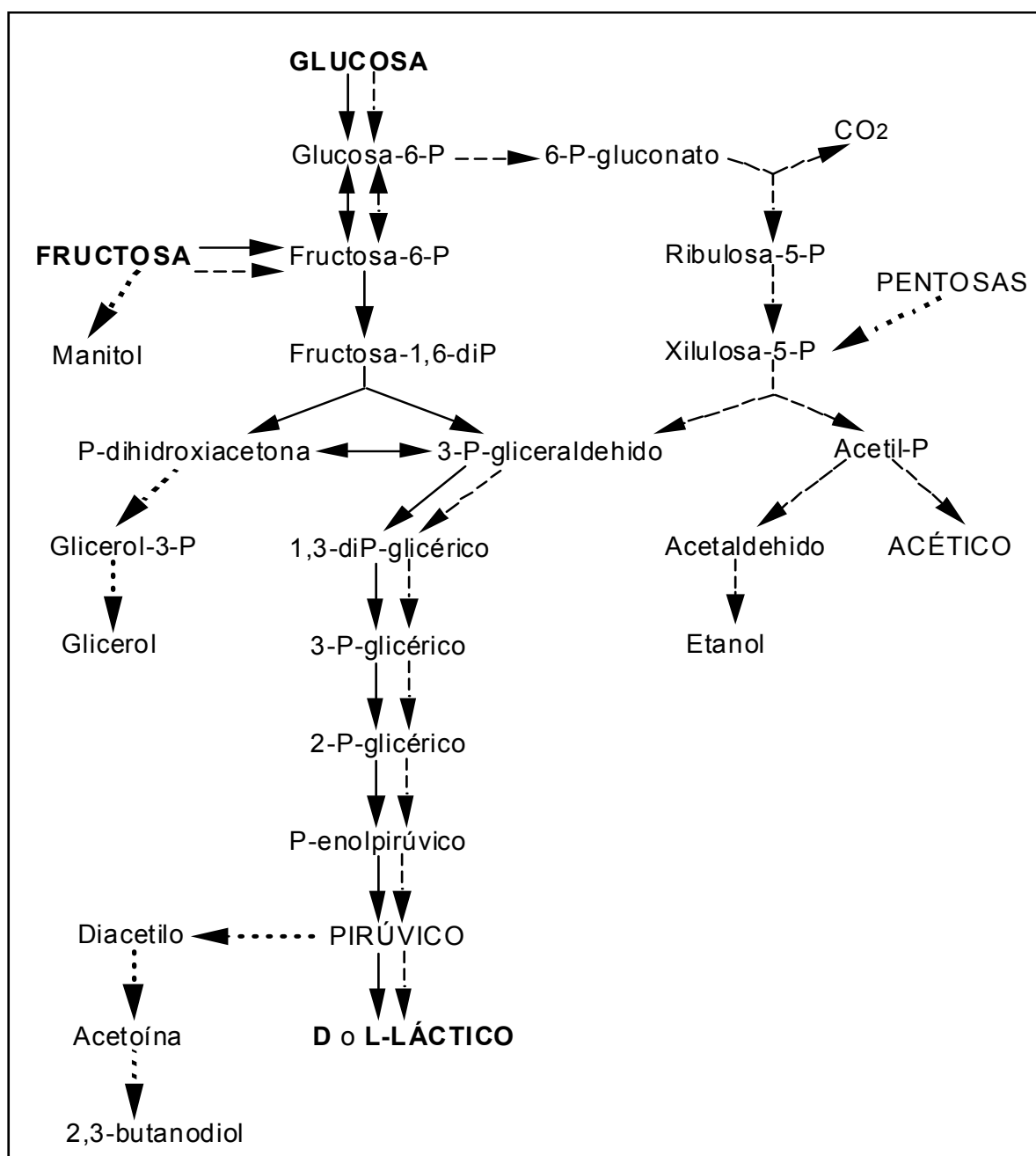


Fig. 1. Esquema de las rutas metabólicas de fermentación de azúcares por las bacterias lácticas: fermentación homoláctica (líneas continuas), fermentación heteroláctica (líneas a trazos) y otras rutas como formación de glicerol, formación de sustancias acetoínicas y utilización de pentosas (líneas de puntos)

La taxonomía de este grupo ha ido cambiando en los últimos años gracias a los avances en el campo de la biología molecular. La secuenciación del ARN ribosomal ha permitido obtener información que en muchos casos ha modificado las clasificaciones existentes basadas en trabajos morfológicos y bioquímicos.

De acuerdo a la actual clasificación taxonómica, basada en las secuencias de 16S ARNr, las BL pertenecen a 12 géneros, agrupados en 7 sub-grupos:

- 1) *Streptococcus*
- 2) *Lactococcus*
- 3) Enterococos: *Tetranogenococcus*, *Carnobacterium*, *Aerococcus*,
Enterococcus, *Vagococcus* (familias *Carnobacteriaceae*,
Aerococcaceae y *Enterococcaceae*)
- 4) *Lactobacillus* (familia *Lactobacillaceae*)
- 5) *Pediococcus* (familia *Pediococcaceae*)
- 6) *Oenococcus*
- 7) *Leuconostoc* y *Weisella* (familia *Leuconostocaceae*)

Algunos de estos géneros son usados directamente en la preparación de alimentos fermentados: *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus* y *Streptococcus*.

Lactobacillus incluye una gran heterogeneidad de especies y sus características ecológicas, fisiológicas, bioquímicas y genéticas son diversas. Son frecuentemente encontradas en productos lácteos, y material vegetal, en zumos y bebidas fermentadas, y en cereales y sus derivados. Están presentes en el tracto digestivo de animales y humanos, y por ello hay un acusado interés en su actividad como probiótico. En alimentos están involucrados en importantes fermentaciones y en el deterioro de alimentos, fermentados o no. Algunas son añadidas directamente como cultivo iniciador en alimentos, sobre todo lácteos y embutidos. *L. brevis* es utilizado en la elaboración del pan fermentado, chucrut, kimchi, y en cerveza. *L. plantarum* se utiliza como cultivo iniciador en la fermentación de vegetales en conserva como las aceitunas, por su capacidad de hidrolizar la oleuropeína de las aceitunas en salmueras, eliminando su amargor (Ciafardini y col, 1994). *L. sakei* participa en la elaboración del sake japonés, vino elaborado a partir del arroz fermentado, pero también puede ser aislado de embutidos madurados.

Lactococcus incluye 5 especies. *Lactococcus lactis* es una de las más investigadas y de las más utilizadas en alimentos fermentados, principalmente de la industria láctea.

Streptococcus incluye una gran cantidad de especies, con amplia variedad de hábitat. Muchos son patógenos humanos y de animales, o comensales orales o intestinales. *S. thermophilus* es la única especie utilizada en alimentos, como yogur y quesos.

Leuconostoc agrupa una serie de especies que están relacionados con el deterioro de alimentos como *L. gasicomitatum* y otros son usados en fermentaciones de productos lácteos y de vegetales como la chucrut. Esta diversidad de hábitats se refleja en la fermentación particular de carbohidratos. Los relacionados con vegetales fermentan azúcares como fructosa, sacarosa, arabinosa y trehalosa, mientras que los relacionados con la industria láctea fermentan lactosa, galactosa y glucosa. Son apreciados por su desarrollo de aromas como el diácetilo.

Oenococcus fue establecido como género en 1995. Antes estaba incluido dentro del género *Leuconostoc* con el nombre de *Leuconostoc oenos*. Es mucho más ácido-tolerante que *Leuconostoc*. Estudios filogenéticos basados en la secuencia de las subunidades de ARNr 16S y 23S demostraron su diferencia (Martínez-Múrcia y col, 1993), hecho que llevó a Dicks y col, 1995 a proponer reclasificarlo como un nuevo género, *Oenococcus* y su especie tipo *Oenococcus oeni*. Esta especie es la más etanol-tolerante, sin embargo tienen un crecimiento lento y fermenta un limitado número de azúcares. Tiene la habilidad de desacidificar el vino vía fermentación maloláctica donde el ácido málico es descarboxilado a ácido láctico. Recientemente se ha descrito otra especie de *Oenococcus*, *O. kitaharae* (Endo y col., 2006), a partir de un residuo de un destilado del Japón.

Pediococcus se encuentra en diversos hábitats como material vegetal, leche, salmueras y cerveza. Participan en la elaboración de la chucrut, en embutidos fermentados o madurados y en quesos madurados. También se les relaciona como bacterias de deterioro de alimentos como la cerveza, vino y sidra.

En la tabla 1 se citan algunas de las características diferenciales a nivel fenotípico de los principales géneros de bacterias lácticas. La producción de CO₂ va ligada a su carácter heterofermentativo.

Tabla 1. Características diferenciales de las bacterias lácticas (según Axelsson, 1998, con modificaciones).

Característica	Bacilos		Cocos						
	<i>Carnobacterium</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>Lactococcus/Vagococcus</i>	<i>Leuconostoc/Oenococcus</i>	<i>Pediococcus/Aerococcus</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Tetragenococcus</i>	<i>Weissella</i>
Formación de tétradas	-	-	-	-	-	+	-	+	-
CO ₂ de Glucosa	-	±	-	-	+	-	-	-	+
Crto. a 10°C	+	±	+	+	+	±	-	+	+
Crto. a 45°C	-	±	+	-	-	±	±	-	-
Crto. con NaCl 6,5%	ND	±	+	-	±	±	-	+	±
Crto. a NaCl 18%	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Crto. a pH 4	ND	±	+	±	±	+	-	-	±
Crto. a pH 9,6	-	-	+	-	-	-	-	+	-
Ácido láctico	L	D,L DL	L	L	D	L,DL	L	L	D,L, DL

ND: no detectado, +, positivo -, negativo, ± variable

D, L, DL: configuración del ácido láctico producido.

1.3. Las bacterias lácticas en el vino

El interés enológico de las bacterias lácticas deriva de la capacidad que poseen algunas de sus especies para realizar la fermentación maloláctica (FML). El aporte de nuevas características organolépticas al vino (Lonvaud-Funel, 1999) y su resistencia a los bajos pHs siendo selectivas en estas condiciones para utilizar ácido málico frente a los azúcares. (Peynaud, 1989)

Las BL del vino están presentes en la piel de la uva (Lafon-Lafourcade y col, 1983), en número bastante inferior a las bacterias acéticas y levaduras, y pasan al mosto durante la elaboración del mismo (Wibowo y col, 1985; Fleet y col., 1984). En mosto y en las primeras horas de la fermentación alcohólica el pH se convierte en un factor determinante en la presencia, evolución y variabilidad microbiana de las distintas especies de BL (Ribereau-Gayon y col 1975; Davis y col., 1986; Pardo y col., 1992; Riberau-Gayon y col, 2000).

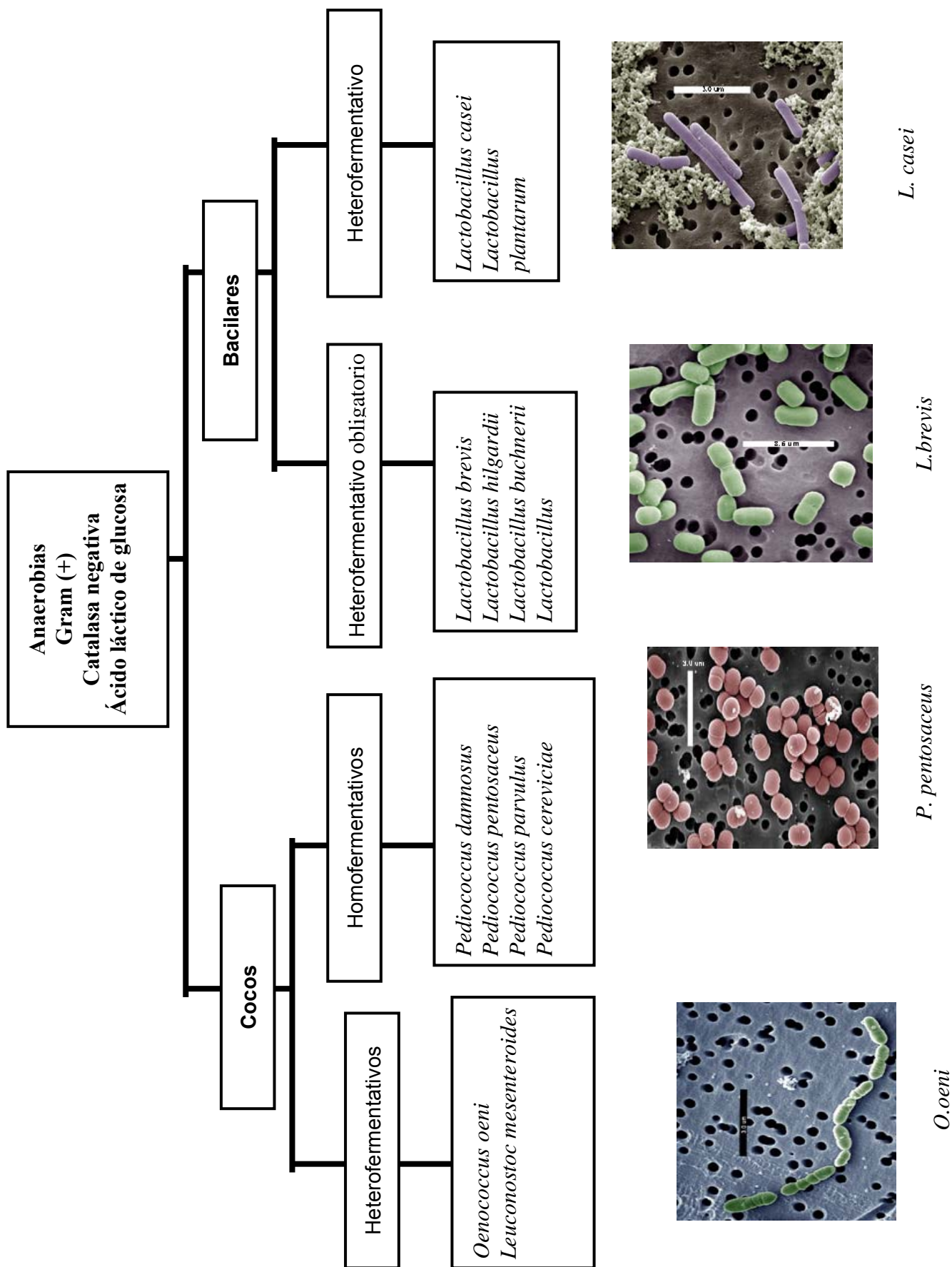


Fig. 2. Características, clasificación y especies de bacterias lácticas más frecuentemente encontradas en mosto y vino

Las principales especies de BL en mosto y en vino pertenecen a los géneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Oenococcus* (Vaughn y col., 1957; Radler 1963). En la figura 2 se puede apreciar la clasificación de las especies de bacterias lácticas más comunes en vino y en mosto, están dispuestas primero por su morfología y luego por su comportamiento fermentativo.

2. Fermentación Maloláctica

La vinificación es un proceso complejo en el cual el mosto es transformado en vino. Esto es provocado por la proliferación de las levaduras que realizan la fermentación alcohólica (FA), que degradan las fuentes de azúcares y lo convierten en alcohol. Seguidamente las bacterias lácticas (BL) proliferan y desarrollan la fermentación maloláctica (FML), deseable en vinos tintos y en algunos blancos con una acidez alta. La reacción principal es la descarboxilación del ácido L-málico del vino, en ácido láctico y CO₂, que contribuye al acabado mas fino de los vinos (Heinick-Kling y col. 1994). También aporta estabilidad microbiológica (Henick-Kling, 1993; Lonvaud-Funel 1995, 1999; Davis y col 1985). Las BL involucradas son diversas especies de *Lactobacillus*, *Pediococcus* y la especie *Oenococcus oeni*, siendo ésta última la principal implicada (Wibowo y col, 1985).

2.1. Antecedentes históricos de la FML

En 1837, Freiherr Von Babo describió el fenómeno de una “segunda” fermentación en los vinos jóvenes, que comenzaba con el incremento de las temperaturas al final de la primavera. Von Babo relacionó esta actividad con la “fusión de la grasa” de la fermentación alcohólica, y encontrándolo como un defecto en el vino, recomendaba trasiegos, adicción de SO₂, clarificación y reducción de la temperatura (Von Babo, 1837; Krieger, 2005). Louis Pasteur, en 1866 aisló las primeras bacterias del vino, y sobre ello escribió en “*Etudes sur le vin*” (Pasteur, 1866), en el cual se refería a las bacterias lácticas como microorganismos perjudiciales para la calidad del vino, con la producción de gas y con lo que él consideraba una pérdida de sabor, más tarde observó que algunos vinos embotellados perdían acidez a lo largo del tiempo, arguyendo que era

debida a la precipitación del ácido tartárico. Müller-Thurgau en 1891 consideró estos microorganismos como los responsables de la desacidificación biológica de los vinos, hecho que comprobaron experimentalmente Koch y Seiffert, que confirmaron en el 1897 y 1901, que consiguen aislar bacterias del vino y con ellas inducir la FML, demostrando esto como un hecho netamente biológico. En 1901 Möslinger y Seifert, independientemente, propusieron una ecuación general para la transformación (Kunkee, 1967; Lafon-Lafourcade, 1983; Ribéreau-Gayon y col., 1975). En 1913 Muller-Thurgau y Osterwalde explicaron la degradación bacteriana del ácido málico en ácido láctico y CO₂ bautizaron este proceso como “desacidificación biológica” o “fermentación maloláctica” y atribuyeron el proceso a *Bacterium gracile*. Sin embargo, hasta los estudios de Ferré (1922), en Borgoña, y los de J. Ribéreau-Gayon (1936-1946) en Burdeos no se comienza a considerar la fermentación maloláctica como un proceso de relevancia para la producción de vinos de calidad (Ribéreau-Gayon y col, 1975). En la década de 1950, la aplicación de nuevos métodos enzimáticos ayudo a explicar las reacciones que se producen durante la degradación del ácido málico. En la actualidad es ampliamente aceptado y son numerosos los estudios realizados sobre la presencia y el papel de las bacterias lácticas en vinos de diferentes países (Wibowo y col, 1985).

2.2. Mecanismo bioquímico de la Fermentación Maloláctica

Químicamente, la FML es la transformación del ácido L- málico en ácido L- láctico y anhídrido carbónico. Esta reacción requiere del cofactor NAD⁺ y manganeso (Morenzoni 1974; Kunkee, 1975). Provee una desacidificación con aumento del pH de 0,2 unidades aproximadamente. El ácido málico esta presente de forma natural en el vino en menor cantidad que en el mosto. En la uva se pueden alcanzar concentraciones hasta de 8 g/l, pero durante la vinificación la levadura lo consume en parte (Wibowo y col., 1985).

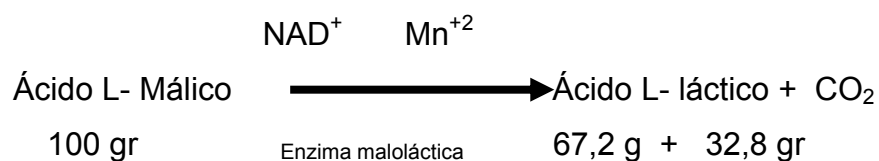


Fig. 3. Reacción de la fermentación maloláctica y balance teórico

La conversión de málico a láctico ocurre después que las BL alcanzan una población viable de 10^6 ufc/ml. Esta conversión no parece energéticamente favorable para las BL. La poca energía libre obtenida ($\Delta G = 8.3$ kJ/mole) no es disponible biológicamente en forma de ATP. Aunque NAD es un cofactor esencial, este no sirve en las funciones de oxidación/reducción ya que no hay un cambio neto del estado redox (Pilone y col., 1976; Renault y col, 1988; Kunkee, 1991; Henick-Kling, 1993; Boulton y col., 1998).

La conversión genera energía en forma de ATP por un mecanismo quimiosmótico que genera una fuerza motriz de protones (ΔP) a través de la membrana (Figura 4). El ácido L- málico entra en la bacteria siendo facilitada por una enzima de transporte la malato permeasa. (Hutking 2006, Konigs et al, 2002). Luego es descarboxilado intracelularmente por medio de la enzima maloláctica generando ácido L- láctico y CO_2 incrementando el pH intracelular que luego son expulsados de la célula.

Por cada molécula de ácido láctico que sale de la célula, un protón es también translocado al exterior de la célula. Esto establece un gradiente patrón a través de la membrana celular entre el citoplasma y el medio circundante. Este gradiente combinado con una ATPasa específica en la membrana celular facilita la generación de energía disponible para el proceso de transporte en forma de ATP. La síntesis de un ATP requiere la entrada de 3 protones a través de la ATPasa (Cox y col, 1989; 1990; Henick-Kling, 1993; 1995; Versaru y col, 1999).

La consecuencia de esta transformación es una importante caída de la acidez total del vino, estimada en unos 0,4 gramos/litro de SO_4H_2 ó de 0,6 gramos/litros en ácido tartárico, por cada 1 gramos/litro de ácido málico metabolizado. La razón de esta bajada de la acidez se explica por tres mecanismos: a) transformación de un ácido más fuerte con dos funciones ácidas, en otro más débil con una sola función ácida; b) el ácido málico se encuentra en el vino en equilibrio con sus sales o malatos, bajo formas perfectamente solubles, por lo que afecta la solubilidad del bitartrato potásico; c) al desaparecer total o parcialmente el málico, el bitartrato potásico que tiene una función ácida se insolubiliza y la acidez total del vino disminuye (Kunkee, 1991; Henick-Kling 1993; Boulton y col, 1998).

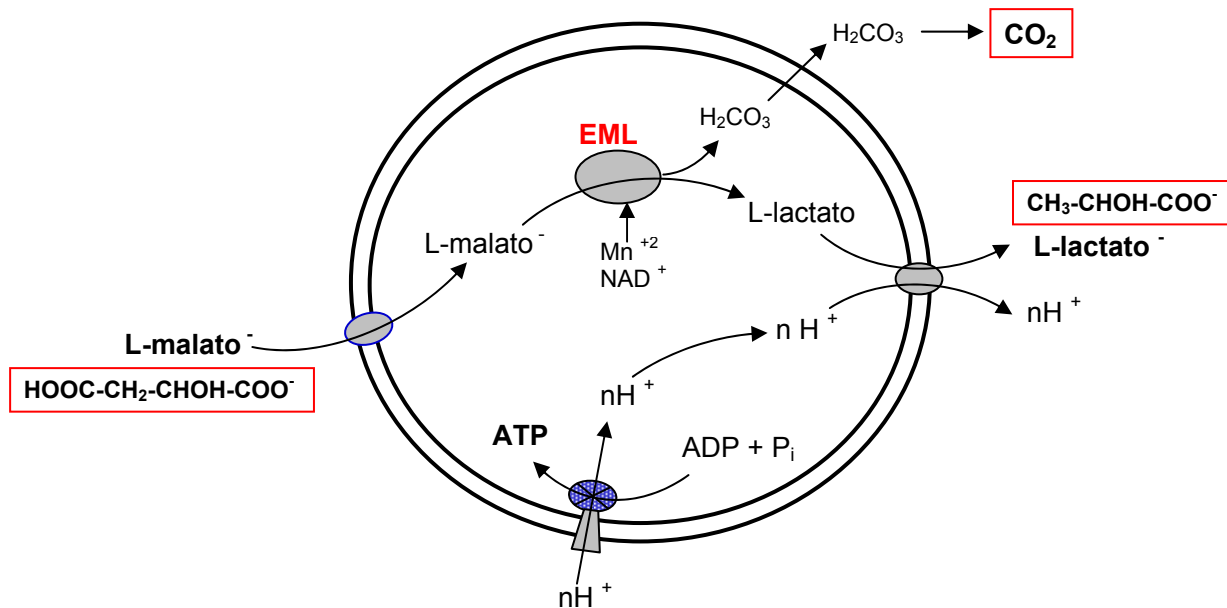


Fig. 4. Modelo de los mecanismos celulares implicados en el transporte del ácido málico y de los productos resultantes de la FML. (Tomado de Carreté, 2002)

2.3. Factores que influyen en la FML

La FML a menudo es un hecho incierto, debido a la combinación de una serie de factores presentes en el vino (Tabla 2), que influyen directamente sobre su desarrollo, así como en el crecimiento y la imposición de una cepa inoculada o las autóctonas. La inducción con cultivos iniciadores ofrece mayores garantías de desarrollo, estabilidad y calidad sensorial deseados. Las dos especies generalmente usadas son *O. oeni* y *L. plantarum*. El momento de inducción puede ser antes de la FA, paralela a esta o a término. En la primera y segunda opción se suele considerar el uso de *L. plantarum* debido a su sensibilidad al etanol, pero puede añadir un potencial peligro de picado láctico. La inducción con *O. oeni* suele ser después de la FA y es la opción más utilizada (Suarez y col., 2004).

El control de la FML y de estos factores es crucial para evitar resultados desagradables como los señalados en el apartado 3.2 debido al metabolismo incontrolado de las BL en vinos, entre los que cabe destacar la producción de precursores de carbamato de etilo, objeto de este estudio.

Tabla 2. Principales factores que afectan el desarrollo de la fermentación maloláctica.

Factores	Condición	Efecto
<p>Ampelográficos (Vidal y col, 2001)</p>	<p>Relación ácido tartárico y málico y perfil de aminoácidos según variedad de uva Edafoclimática que rodea el viñedo Técnicas de cultivo (poda, laboreo y abonado) Ttos fitosanitarios al viñedo</p>	<p>Posibilidad de desarrollo de una cepa concreta de BL Posicionamiento de BL sobre la uva Eliminación de un gran porcentaje de BL Pueden afectar la fermentación del mosto</p>
<p>Tecnológicos (Riberaud-Gayon y col 2000)</p>	<p>Operaciones enotécnicas: Encubado, escurrido, trasiegos, clarificaciones, filtraciones.</p>	<p>Empobrecimiento del medio de vitaminas y sustancias nitrogenadas. Eliminación de bacterias</p>
<p>pH (Riberaud – Gayon y col, 1975; Wibowo y col, 1985; García y col., 1992; Miranda y col, 1997)</p>	<p>Ideal para las bacterias 4,2 – 4,5 mientras el del vin es 2,8 – 3,8 Tolerancia de especies y cepas</p>	<p>Sustrato a metabolizar: - Malato por debajo de 3,2. - Azúcares sobre pH 3,5 La tasa de crecimiento, supervivencia, viabilidad y el comportamiento metabólico.</p>
<p>Temperatura (Riberaud – Gayon y col, 1975; Bauer y col 2004)</p>	<p>15 – 30°C, ideal entre 20-25°C. Depende de las cepas y del grado alcohólico</p>	<p>Por fuera de estos límites, la FML es lenta, riesgo de parada de fermentación. Incide en la tasa de crecimiento y la duración de la fase de latencia de BL. Degradación de otros compuestos distintos al ácido málico aumenta con la temperatura</p>
<p>Aireación, Oxígeno, CO₂ (García y col, 1992)</p>	<p>Anaerobiosis no estricta FML en Barrica Oxígeno molecular CO₂</p>	<p>Favorece el desarrollo de BL Oxidación de compuestos ácido sulfhídrico (Toxico para BL) Aireación lenta y mejora la FML - Estimula el crecimiento BL. - El espectro de producto final cambia, habría más acético La capacidad tamponadora del vino. Estimula el crecimiento y metabolismo de BL</p>

<p>Nutrientes (Melamed, 1962 ; Zickler, 1964; Radler, 1966; Ribéreau-Gayon y col, 1975; Feuillat y col, 1977; Guilloux –Benatier y col, 1985; Lonavud – Funel y col, 1985; Henick-kling, 1986; García y col, 1992; Grimaldi y col, 2000; Rosi y col, 2000; Patynowski y col, 2002; Bargallo, y col, 2004; Landete JM, 2006; Remize y col, 2006</p>	<p>Requerimientos nutricionales</p> <p>Presencia de Lías</p> <p>Azúcares, componentes nitrogenados, glicosilados aromáticos, ácidos orgánicos, otros comp del aroma y del color Concentración de glucosa y fructosa menor de 0,2g/l</p> <p>Sustancias nitrogenadas 2 mg N₂/L</p>	<p>BL son auxotrofas de aa, vitaminas, bases nitrogenadas, sales de Mn, Mg y K.</p> <p>Mejora el contenido nutriente del vino. Péptidos, proteínas y manoproteínas de pared celular fuentes de aa.</p> <p>Pueden ser metabolizados por las BL, mejora la complejidad organoléptica de vinos</p> <p>Inhibe la FML</p> <p>Asegura el desarrollo de BL. En exceso pueden generar compuestos indeseables como aminas biógenas y carbamato de etilo.</p>
<p>Grado Alcohólico (Ribéreau-Gayon y col, 1975)</p>	<p>Depende de especies y cepas de BL en vino</p> <p>Incremento moderado</p>	<p>Si es muy elevado, afecta el desarrollo de BL, la FML es lenta</p> <p>Las BL se adaptan modificando su pared celular, o produciendo glucano p.ej. <i>P. damnosus</i>.</p>
<p>Sulfitado (Lafon-Lafourcade., 1983; García y col, 1992)</p>	<p>SO₂</p>	<p>BL son muy sensibles y más si el vino es más ácido</p> <p>Destruye las proteínas enzimáticas, bloque función tiol.</p> <p>Potenciado por el OL, pH y T°</p>
<p>Otros (García y col, 1992; Radler, F., 1992; Palacios y col, 2006</p>	<p>Falta de ácidos orgánicos</p> <p>Taninos y polifenoles</p> <p>Interacciones microbianas</p>	<p>Falta de brillantez, aromas, estabilidad microbiológica.</p> <p>Gusto plano</p> <p>Dificultan la FML, siendo bactericida por desnaturalizar la pared celular</p> <p>Tipo de levadura, nutrientes, y metabolitos producidos.</p> <p>Hongos y otras BL pueden producir bacteriocinas, peroxido de hidrógeno</p> <p>Bacterias acéticas y bacteriófagos como contaminantes.</p>

Para controlar la FML, aparte de la inoculación, es preciso disponer de técnicas eficaces de identificación molecular de las diversas especies, sobretodo de las posibles contaminantes como otros lactobacilos y de pediococos, y también de métodos de tipificación de cepas, para comprobar que la FML la está realizando la cepa inoculada.

2.4. Ecología de la vinificación y FML

A través del racimo, las hojas de la viña o los utensilios de la bodega llega al vino una diversidad microbiana entre los que se cuentan hongos, levaduras, bacterias acéticas y bacterias lácticas. Esta diversidad queda reducida en los primeros días de la fermentación, las levaduras con metabolismo mas rápido son las primeras en crecer. Las poblaciones de bacterias acéticas están a niveles muy bajos y evolucionan muy poco. En cambio las bacterias lácticas (BL) están presentes a lo largo de la vinificación en números relativamente bajos (10^2 - 10^4 UFC/ml) debido a la competencia metabólica con las levaduras, el pH, el nivel de sulfitado de la uva (5 g/Hl a pH 3,2 – 3,4) como también de las condiciones edafoclimáticas del viñedo en el momento de la cosecha (Lonvaud-Funel, 1999). La presencia y desarrollo de cualquiera de estos grupos esta condicionada a las labores enotécnicas.

La dinámica de la población de BL va cambiando desde su concentración en el racimo de uva. Esta microbiota inicial es baja aunque es completada con la que está presente en el material de la bodega. Al inicio de la FA, las bacterias lácticas se mantienen en mínimos (10^2 a 10^3 células/ml) de las cuales *Oenococcus oeni* se encuentra en un bajo porcentaje (Lonvaud-Funel, 1999). La fase de latencia puede variar en días, semanas o meses, dependiendo de una serie de condiciones como la constitución del mosto, pH, grado alcohólico, temperatura, SO_2 .

En el curso de la FA, la repartición de las especies es siempre modificada en el sentido de una selección natural por las cepas más resistentes al medio alcohólico y el pH generado. Primero desaparecen los lactobacilos heterofermentativos y homofermentativos y poco después los cocos homofermentativos y *Leuconostoc*, quedando al final *O. oeni*, principal

responsable de llevar la FML cuando su crecimiento llega cerca de $10^6 - 10^7$ UFC/ml (Ribéreau-Gayon y col, 2000). La transformación del ácido málico se sucede hasta su desaparición completa que puede tomar días o semanas, y depende de las condiciones fisicoquímicas del medio.

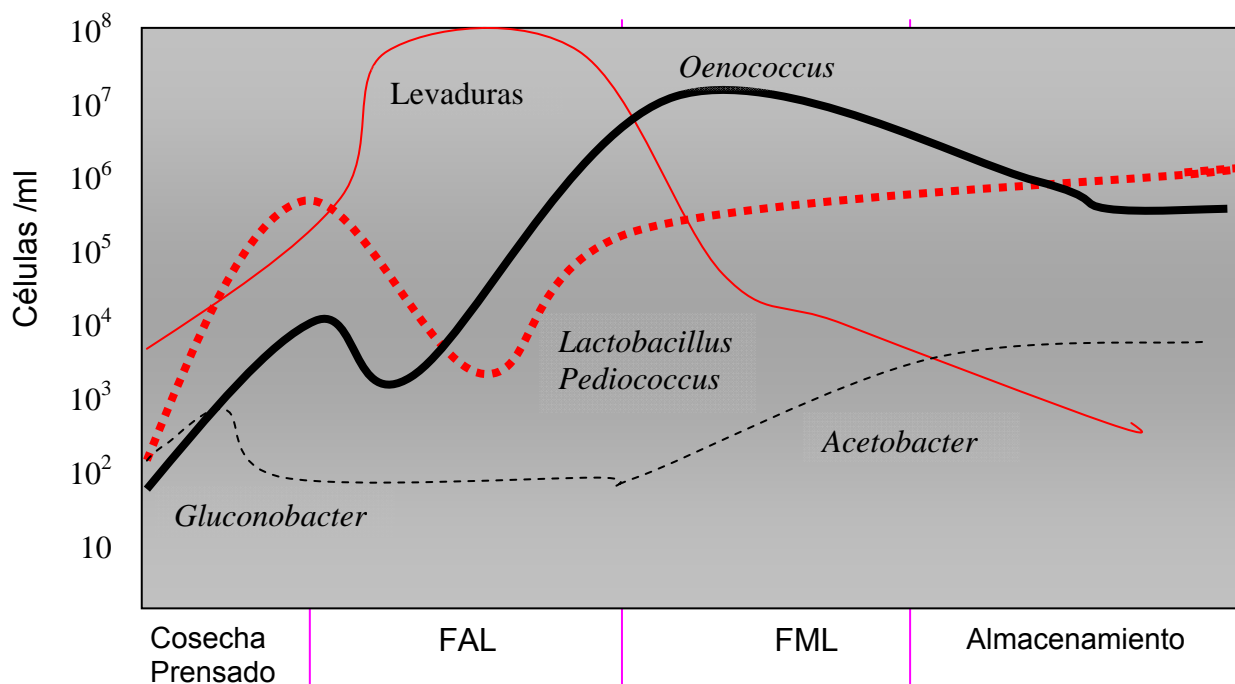


Fig. 5. Evolución de las distintas poblaciones de microorganismos durante la elaboración de un vino

Después de la FML las BL aun están a altos niveles (Figura 5) y el decrecimiento de la población depende de factores fisicoquímicos. Es preciso evitar que el vino conseguido sea estropeado por estas bacterias y/o que éstas produzcan compuestos no deseados, así como evitar que sea atacado con posterioridad por bacterias contaminantes. Las especies más habituales como contaminantes del vino final, aparte de las acéticas, son diversos lactobacilos (*Lb. hilgardii*, *Lb. brevis*, *Lb. buchneri*, etc) y pediococos (*P. parvulus*, *P. damnosus* y *P. pentosaceus*). Estas mismas especies son también presentes como contaminantes en otras bebidas alcohólicas como la cerveza (Sakamoto y Konings, 2003) o la sidra, donde *Pediococcus* o incluso cepas de *Oenococcus*

pueden producir exopolisacáridos, dando lugar a la enfermedad de la grasa (Fernández y col, 1996), como se comenta en el apartado 3.2.

Por lo tanto, se requiere mantener la higiene durante todo el proceso de elaboración, emplear técnicas enológicas como la sulfatación, la filtración, evitar la presencia de azúcares residuales y controlar la temperatura durante la conservación. La proliferación de bacterias no deseadas puede dar lugar, entre otros efectos negativos, a la producción de sustancias tóxicas para el ser humano como las aminas biógenas y los precursores de carbamato de etilo, eje central de este estudio.

3. Metabolismo de las BL y efectos sobre el vino

La principal habilidad de las BL es la producción de ácido láctico y de energía a partir de una fuente de carbohidratos fermentable (Kandler, 1983). Las BL puede utilizar un amplio rango de compuestos que pueden influir positiva o negativamente en el perfil sensorial del vino: polioles, lípidos, aminoácidos, péptidos y proteínas (Bartowsky y col., 1995; Bartowsky y col., 2002; Liu, 2002), carbohidratos, incluyendo hexosas (glucosa, fructosa, manosa y galactosa) y pentosas, y también polioles y oligosacáridos.

El ácido málico no puede ser la única fuente de carbono, y la habilidad y utilización de carbohidratos fermentables es esencial para posibilitar el inicio del crecimiento bacteriano y la ocurrencia de la FML. Estudios recientes han demostrado que los fenoles glicosidados también estimulan el crecimiento de *O. oeni* en vino sintético (Costello, 2005). Además de la FML hay un diverso rango de otras actividades metabólicas que están asociadas con el crecimiento y desarrollo de BL en el vino que repercuten en su calidad. Algunos de estos compuestos, como el lactato de etilo y diacetilo pueden ejercer una influencia positiva en el vino añadiendo complejidad sensorial cuando las concentraciones son apropiadas (Figura 6).

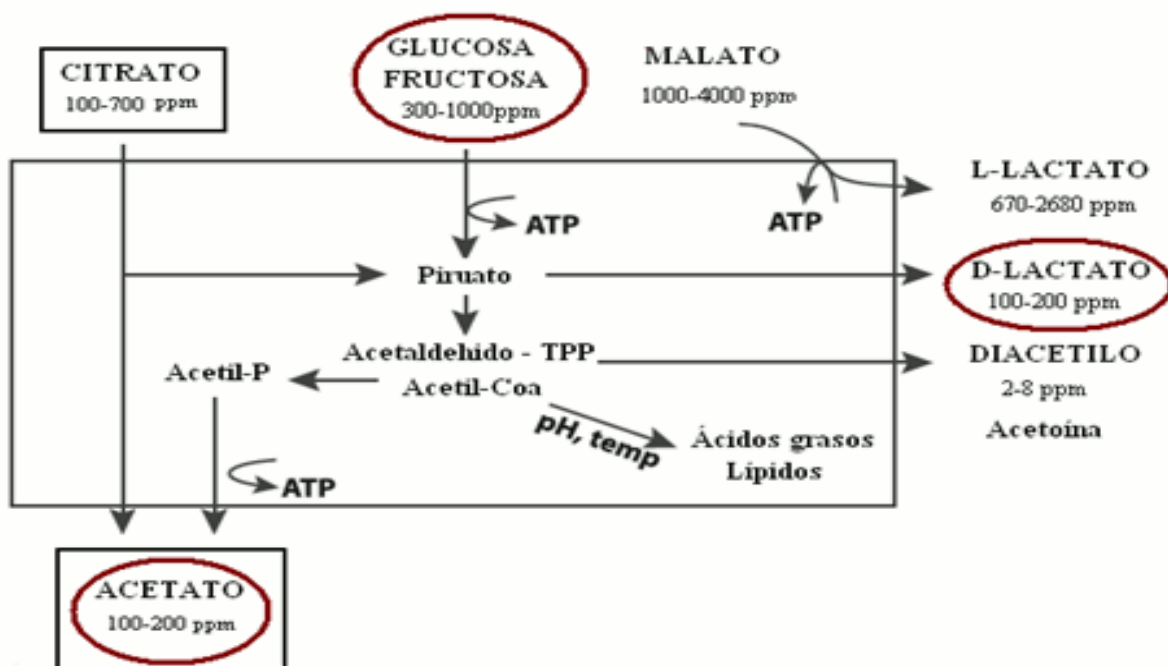


Fig. 6. Metabolismo de bacterias lácticas heterofermentativas. (Costello, 2005)

La degradación de los aminoácidos (aa), además de proveer un rol nutricional para soportar los requerimientos del crecimiento de las BL del vino (Ribereau-Gayon y col., 1975; Davis y col., 1986), puede dar lugar a ciertos productos finales que pueden también afectar las propiedades sensoriales del vino. La metionina al ser metabolizada produce metanetiol, dimetilsulfito 3-(metilsulfanil) propanol-1-ol, 3-(metilsulfanil) ácido propionico los cuales son compuestos sulfurados volátiles (Piripis -Nicolau y col., 2004). Esto puede generar aromas a chocolate, tostado y aumentar los aromas afrutados y terrosos. En contraste el metabolismo de otros aa como ornitina y lisina se asocia con la formación de N-heterociclinas, 2-acetil - 1-1 pirrolina y 2- acetilhidropiridina, que son aromas a ratón, y la degradación del triptofano produce índol (Costello y col, 2001; Costello y col, 2002; Hidalgo, 2002). También son derivados de aminoácidos la producción de aminas biógenas y de carbamato de etilo, que se describen mas adelante.

Los vinos que han pasado la FML son generalmente categorizados por descriptores positivos como: mantequilla, frutos secos, levadura, miel, vainilla, cuero, especias, tierra, pan tostado, taninos sedosos, y una mayor longitud al paladar.

La FML incontrolada, especialmente cuando ocurre a pH más alto que 3,5 puede dar lugar a descriptores negativos como: yogur rancio, sudor, acético, amargor intenso, notas animales, cuero mojado, frutas podrida y cerilla quemada entre otros.

3.1. Efectos positivos

Reducción de la acidez. Por cada molécula de ácido L-málico catabolizada a ácido L-láctico es una pérdida estequiométrica de un grupo carboxilo con lo cual hay una reducción de la acidez del vino. Este cambio en la acidez y por lo tanto en el pH incide en la capacidad de tamponante del vino.

Aumento de la acidez volátil. Este es un hecho que acompaña a gran parte de los vinos que realizan la FML, del orden de 0,1 a 0,2 g/litro en condiciones normales, debido a la degradación de los azúcares residuales, por las bacterias heterolácticas produciendo ácido acético y láctico.

Disminución de la intensidad del color. Durante la FML existe una caída de la intensidad colorante, explicada por una modificación del pH de 0,1 a 0,3 unidades del pH del vino (Davis y col., 1985). Con el aumento de pH, los antocianos pasan de su forma coloreada roja a una no coloreada y/o violácea, perdiéndose intensidad colorante. Se ha descrito una hidrólisis de antocianos por la actividad β -glicosidasa (Vivas y col., 1997). Los antocianos son hidrolizados la parte glucosídica liberando moléculas olorosas y quedando la molécula fenólica inestable. Ha sido descrita en cepas de *Oenococcus* y *Lactobacillus* (Hernández-Orte 2007).

Desarrollo de Aromas. La FML contribuye a las propiedades sensoriales de los vinos. Dependiendo de la cepa maloláctica utilizada podría aumentar o disminuir la intensidad de ciertos atributos aromáticos y sabores en el vino. El aroma dado por las pocas trazas de diáctilo (una diacetona aromática formado a partir de la degradación del ácido cítrico y con un inconfundible olor a mantequilla y nuez), acetoína, lactato de etilo, acético y fórmico. El diáctilo y otros compuestos dicarbonilos interactúan con el azufre de aminoácidos, produciendo un espectro de caracteres como de avellana, chocolate, queso, patata, repollo, palomitas de maíz, y nuez, dependiendo de la composición en aminoácidos del mosto o del vino. Un umbral normal en vino está entre 0,2-2,3 mg/L según el tipo

de vino. Esta da un carácter mantequilloso considerado deseable. Cuando la concentración se excede en exceso de 5 a 7 mg/L es perjudicial para la calidad del vino.

Estabilidad biológica. Con la FML se consigue estabilidad microbiológica al ser degradadas sustancias residuales potencialmente energéticas como los azúcares residuales, el ácido málico, ácido cítrico, y al mismo tiempo la producción de compuestos antimicrobianos por las BL, como bacteriocinas y el ácido láctico.

3.2. Efectos negativos

Desacidificación excesiva. Se da en vinos poco ácidos, lo cual lleva a vinos sin carácter, puede dar lugar al crecimiento de otras especies perjudiciales.

Degradación del ácido sórbico y cítrico. La degradación del ácido sórbico origina sorbitol que concede aroma a geranios, y la degradación del ácido cítrico genera compuestos acetoinicos, que en exceso dan aroma a rancio.

Picado láctico. Se produce por la utilización de los azúcares residuales que generan ácido láctico, acético y manitol lo que transmite al vino un sabor agridulce. Se produce sobretodo por especies de BL heterofermentativas, como *Leuconostoc* y *Oenococcus*. Especies homofermentativas, como *Pediococcus* y algunos *Lactobacillus*, también pueden producirlo, suele aparecer como una proliferación de las BL cuando aún no ha acabado la FA.

Vuelta. Consiste en la degradación del ácido tartárico originando ácido láctico, ácido acético, CO₂ y compuestos repugnantes como la tetrahidropiridina. Los vinos afectados son sin carácter, avinagrados, y turbios. Las principales responsables son cepas de *L. plantarum*, *L. brevis* y *Pediococcus* (Henick-Kling, 1988).

Enfermedad del amargor. Es debida a la transformación del glicerol, da un intenso sabor a amargo cuando se combina con los polifenoles del vino. Es común en vinos con elevados pH o con elevada carga microbiológica, siendo el género *Lactobacillus* su principal responsable (Sauvageot y col, 2000).

Producción de polisacáridos exocelulares, o enfermedad de la grasa. Son producidos por ciertas especies de BAL, como *P. damnosus*, *Lc. mesenteroides* y *L. brevis*, que se recubren de una sustancia viscosa de glucano derivada de la

glucosa confiriendo a los vinos un aspecto denso y viscoso (Ribéreau-Gayon y col., 2000).

Producción de fenoles volátiles: Aunque el principal causante de estos olores ha sido considerado *Brettanomyces*, determinadas cepas de *Pediococcus* y *Lactobacillus* han sido vinculadas a este efecto. Así, el 4-etilguaicol y 4-etilfenol son producidos por determinadas bacterias como *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus plantarum*, y *Pediococcus*. (Cavin y col., 1993; Chatonnet y col., 1997; Couto y col., 2006).

Compuestos tóxicos para la salud humana. El potencial tóxico del vino depende de los compuestos contenidos y del grado de toxicidad de estos, aunque depende también del grado de biodisponibilidad y la interacción sobre tejidos diana. Las moléculas relacionadas con el metabolismo de las BL y con la toxicidad para los humanos se encuentran, las aminas biógenas y el carbamato de etilo (Herraiz y Ough, 1993a; Herraiz y col., 1993b).

Producción de aminas biógenas: Las aminas biógenas se producen por descarboxilación de los aminoácidos (Lonvaud Funel, 2001, Ribéreau-Gayon y col., 2000). Esta reacción conlleva ventajas para las BL ya que supone un aumento de pH del vino y una ganancia energética derivada de la fuerza protón-motriz capaz de formar ATP. Las aminas biógenas son producidas en alimentos fermentados como quesos, embutidos, vegetales fermentados y vino. En el vino los aminoácidos que más habitualmente pueden ser descarboxilados a aminas biógenas son histidina, tirosina y ornitina, generando histamina, tiramina y putrescina respectivamente. Estas dos últimas se encuentran en mayor concentración pero se ha prestado más importancia a la histamina por los efectos tóxicos en el hombre. Causa síntomas neurológicos serios, complicaciones cardiovasculares y en glándulas endocrinas a concentraciones incluso bajas. La capacidad para producir histamina (al igual que las otras aminas biógenas) es un carácter asociado a cepa (Coton y col., 1998a; Landete y col., 2002). El desarrollo de sistemas moleculares de detección de cepas histaminogénicas basadas en el uso de sondas para hibridación o PCR específica para ese gen ha ayudado a su pronta detección (Coton y col., 1998a; Le Jeune y col., 1995; Landete y col., 2002). Tanto *Pediococcus* como *Lactobacillus* parecen ser los principales productores de aminas biógenas, aunque algunas cepas de *Oenococcus* también las pueden

producir (Delfini 1989; Lonvaud-Funel, 1994; Coton y col, 1998; Leitao 2000; Moreno-Arribas y col., 2002; Guerrini y col., 2002; Landete y col., 2004).

Producción de carbamato de etilo. La hidrólisis de la arginina por determinadas bacterias lácticas, conduce a la liberación de citrulina y carbamil-fosfato, precursores del carbamato de etilo, sustancia considerada como cancerígena. Ver apartado siguiente. (Mira de orduña y col. 2000a).

4. Carbamato de etilo

El carbamato de etilo (CE) o uretano es un éster del ácido carbámico ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OCONH}_2$) resultante de la reacción de esterificación de éste con el alcohol etílico. Es una sustancia que a diferencia del ácido del cual deriva posee una mayor estabilidad química. Su carbono carbonílico posee menor carga positiva siendo menos susceptible a ser atacado por nucleófilos como el agua. Es un polvo cristalino blanco, de tenue aroma aromático, un postgusto a clavo, y es soluble en disolventes orgánicos como el etanol, éter y soluciones hidroalcohólicas.

4.1. Efecto carcinogénico del CE

Debido a su ligera lipofilia penetra en el sistema nervioso central donde ejerce una acción sedante y anestésica. En medicina se ha llegado a usar como antipirético, analgésico, antirreumático y como un sustituto del yodoformo.

El CE y la de sus metabolitos activos, el N-hidroxiuretano, el vinilcarbamato y el epoxicarbamato, son descritos por primera vez como cancerígenos en 1968 por Mirvish y col. Su capacidad de interaccionar con el ADN formando enlaces covalentes se vió tanto *in vivo* como *in vitro* (Sotomayor y col. 1990). Su uso fue reducido en 1987 después de las evaluaciones realizadas por *Centro Internacional de Investigación sobre el Cáncer (IARC)* que lo clasificó en el grupo de sustancias 2A (IARC, 2007). En esta categoría están aquellos compuestos de los que se dispone de suficiente información sobre su potencial carcinogénico en animales de experimentación, pero insuficiente en el hombre.

Estos datos sobre experimentación animal se han utilizado de base para el cálculo de la ingesta diaria máxima en humanos. Hay una gran disparidad a la

hora de señalar la dosis máxima sin efecto significativo en el hombre. Ello es debido a los efectos estocásticos implícitos en la carcinogénesis. De los trabajos de Schmahl y col, 1977 se fijaba una dosis sin efecto significativo en humanos de 0,3 mg/kg/ día, que equivale a **21 mg/día** para un individuo de 70 kg de peso (al ser dividida la dosis en ratas por un factor de seguridad de 5000). De los trabajos de Schlatter y col, 1990, se estableció que la dosis era de 0,08 mg/kg/día de carbamato de etilo, que equivale a una ingesta tolerable de **5,6 mg/día/70 kg**. En el “National Programme in Toxicology” de Estados Unidos (NTP), report 25, “Urethane TP toxicity”, se indica que la dosis diaria sería de 4 mg/kg/día, es decir **308 mg/día/70 kg**. El *Joint FAO/WHO Expert comité on Food Additives (JCF)*, en su reunión del 2008, establece un margen de exposición (MDE) para el carbamato de etilo de **2000** para la exposición media y de **3800** para la exposición mas elevada, y concluye que *“El riesgo sanitario para la población en general es bajo y sólo los grupos de la población que consumen grandes cantidades de determinadas bebidas alcohólicas podrían estar expuestos a ciertos riesgos para la salud”* (Parrafo 190-191. Codex Alimentarius, 2008).

4.2. Carbamato de etilo en vino y otros alimentos

El CE se sintetiza de manera espontánea en alimentos y bebidas fermentados como pan, yogurt, vino, cerveza, saque, chucrut, salsa de soja y especialmente en aquellas que se han sometido a un calentamiento como las bebidas destiladas: whisky, ron, vodka, aguardientes, etc. (Vahl., 1993; Ouhg. 1976).

En vinos empezó a tener interés en la década de los 70, cuando es denunciada su presencia en ellos por la revista *Science*. Löfroth y col. (1971) dan una primera voz de alerta en cuanto al uso del Baycovin (Diethyl pirocarbonato - DEPC) en bebidas, un producto fungicida empleado para estabilizar los vinos, que se intuía como precursor de la formación de uretano. Según sus determinaciones se generaban cantidades considerables de CE en las bebidas al estar el DEPC presente. Con estos datos la “Federal Food Drug and Cosmetics Act” en 1972 prohibió su uso en las bebidas.

Los resultados obtenidos por Walter y col. (1974), en una amplia muestra de vinos tintos, pan, cerveza, olivas, sake, queso, y leches entre otros, demostraba que la presencia de CE estaba relacionada con el proceso de fermentación. La

relación con compuestos intrínsecos de las materias primas, las técnicas de fermentación o la manipulación de los productos con la presencia de CE era clara. El uso DEPC y las cantidades observadas de CE en el vino no tenían mayor relevancia puesto que la acción de este se ve disminuida frente a otros compuestos (Ough y col. 1976b).

A mediados de los 80 la "*Liquor Control Board of Ontario (LCBO)*" en Canadá descubrió cantidades relativamente importantes de CE en vinos, en destilados y licores de frutas fijando un límite máximo permisible de 30 µg/l (ppb) en vinos de mesa. En 1988 la "*Food and Drug Administration (FDA)*" de Estados Unidos se incorpora estableciendo un límite voluntario de 15 µg/l en vinos de mesa y 60 µg/l para vinos de postre (Stevens y col., 1993). A raíz de las distintas legislaciones en cada país se enfatiza en la producción de vinos libres de CE y se publica el "*Manual de Acción Preventiva para el Manejo del CE*" (Butzke C y col 1997). Se reconoce el CE como un componente natural de todos los alimentos fermentados y se acuerdan los consejos generales para ayudar a reducir su presencia.

La *Joint FAO/WHO Expert Comitee on Food Additives (JECFA)* publica una serie de datos sobre el CE, en su 64º encuentro en Roma en el 2005. Presenta un estudio global a nivel mundial y en una cantidad relativa de años, que los niveles en vino habían progresiva y significativamente disminuido con el tiempo como resultado de la aplicación de las medidas de mitigación impuestas. Los datos coincidían con los reportados por la *FDA*, la *UK Food Standard Agency* y *Wine Institute* de Estados Unidos. En 2007 la *European Food Safety Authority (EFSA)* recopiló los datos existentes en todas las agencias estatales respecto al CE. Sólo se publicó un par de recomendaciones refiriéndose al brandy y al tequila y la reducción del ácido hidrocianico como precursor del CE pero no hay ninguna referencia al vino. En todas las recientes revisiones en datos depositados en las agencias *JECFA*, *EFSA*, *LCBO* y *FDA* se encuentra que las medidas han resultado efectivas aunque no hay que descartar la presencia de CE en el vino. Se recomienda en todo caso que se continúe profundizando en las medidas ya impulsadas para reducir las concentraciones de CE en sus productos (TRS 930-JECFA 64/31, 2005). En la tabla 3 se señalan los límites legales del CE permitido en bebidas alcohólicas de acuerdo al programa FAO/OMS sobre normas alimentarias.

Tabla 3. Límites legales de carbamato de etilo permitido en bebidas alcohólicas. (FAO/OMS Comité Codex sobre aditivos alimentarios y contaminantes de los alimentos. 25ª reunión, La Haya, del 22-26 de marzo de 1993).

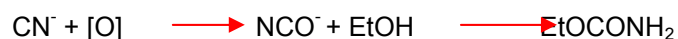
Bebidas reguladas	µg/L CE
Vino de mesa	30
Vinos generosos	100
Destilados y aguardientes	150
<i>Sake</i>	200
Licores	400

4.3. Formación del carbamato de etilo

La formación del CE depende de la presencia de sus precursores y de una serie de factores externos como el calor, la luz y el tiempo. La naturaleza del alimento y la disponibilidad juegan un rol importante (Zimmerli y col., 1991). Los principales precursores involucrados son cianuro, urea, citrulina, otros compuestos N- carbamílicos y sustancias exógenas (*Safety Evaluation of certain contaminants in food. World Health Organization. Series N. 55, 2006*).

Cianuro

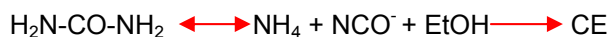
En bebidas destiladas como el brandy de frutas de hueso y el whisky, el precursor de CE es el cianuro de hidrogeno. Es un constituyente natural de las frutas de hueso y otras frutas. El CE se forma al ser calentada la mezcla madre para la destilación. El cianuro es oxidado a cianato y por acción de la luz el cianato reacciona con el etanol. En whisky, el cianohidrina de isobutirato esta presente en la mezcla antes de destilar. En presencia de cobre del alambique la reacción es acelerada (Riffkin y col, 1989; Cook, 1990).



Urea

La urea es considerada el precursor más importante de CE en vinos. La urea es formada por el metabolismo de la arginina por la vía arginasa de las levaduras. Su concentración depende de la variedad de viña, el clima, el suelo, la fertilización, de la concentración de arginina en el mosto, la cepa de levadura, el

etanol, el pH, la fortificación, la temperatura y el tiempo de almacenamiento. La urea es disociada en cianato de amonio (NH_4^+ : NCO^-). El cianuro reacciona con el etanol. La presencia de CE se incrementa con el tiempo (Field y col 1988, Tegmo-Larsson, 1990a; Stevens y col, 1993; Fleet y col., 1993; Muller y col, 1996; Uthurry y col., 2004). Un exceso de nitrógeno incrementa la producción de urea (Ough y col., 1988; Monteiro y col., 1989; Varnan y col., 1997).



Citrulina y otros compuestos N-carbamil

La mayoría de compuestos carbamílicos pueden reaccionar con el etanol especialmente a pH ácido. Estos compuestos incluyen urea, citrulina, N- carbamil α -aminoácidos, N-carbamil β -aminoácidos, alantoína y carbonil fosfato (Ough y col., 1988; Tegmo-Larsson y col, 1990a), generalmente procedentes del metabolismo nitrogenado de los microorganismos que los fermentan (Kodama y col 1994, Monteiro y col, 1989; Ough, 1991)

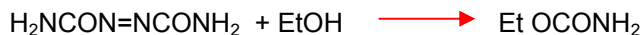


Formación desde sustancias exógenas

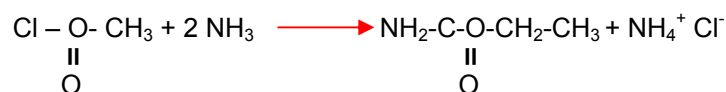
El **dietilpirocarbonato** ha sido usado como un inhibidor de la fermentación en bebidas. Puede reaccionar con el amonio y producir CE.



La **azodicarbamida**, un aditivo utilizado en pan y cerveza, se ha visto involucrado aunque el CE generado no alcanza concentraciones superiores a 10 $\mu\text{g/L}$ (Dennis y col 1997).



El **cloroformato de etilo** al reaccionar con el amonio da lugar a CE (Merck, 1989).



4.4. La arginina como fuente de precursores de CE

La arginina es el aminoácido principalmente involucrado en la generación de precursores de CE. En uva se puede encontrar en concentración de >400 mg/L, dependiendo del tipo de viñedo. Es el más abundante en el mosto, por lo tanto como una de las principales fuentes de nitrógeno para las levaduras es consumido más rápido al inicio de la FA llegando a concentraciones alrededor de 10 mg/l. Al final de la FA se encuentra en cantidades que varían entre 0,1 a 2,3 g/L debido a la autólisis (Lehtonen, 1996). La arginina y sus precursores están involucrados en la biosíntesis de diferentes metabolitos como las poliaminas (agmatina - vía N-carbamoilputrescina; la putrescina - vía arginina deiminasa) (Arena y col., 2001), la pirimidina (vía carbamifosfato) y algunos antibióticos.

Han sido descritas múltiples vías para la degradación de la arginina en microorganismos y ocasionalmente algunas de ellas presentes simultáneamente (Abdelal, 1979; Cunin y col., 1986). La catálisis de la arginina se da al menos por 6 rutas principales: arginasa, arginina deiminasa, arginina succiniltransferasa, arginina transaminasa, arginina oxidasa, oxigenasa y arginina descarboxilasa (Schriek y col., 2007). Las principales vías involucradas son la arginasa en levaduras y la arginina deiminasa (ADI), siendo esta la ruta anaeróbica más extendida para la degradación de la arginina en bacterias lácticas del vino. (Liu y col, 1998). Sin embargo también ha sido descrita en protozoos primitivos como *Giardia intestinales*, *Tricomonas vaginalis*, *T. fetus* (Kondler, 1998).

Vía Arginasa en Levaduras

La arginina se condensa en la vacuola de donde es liberada al citoplasma. Allí es degradada a L-ornitina y urea mediante la enzima arginasa (EC 3.5.3.1) (Middlehoven, 1964). Parte de la urea producida es asimilada por la levadura y el resto es liberado al vino principalmente cuando la concentración de la arginina es alta en mosto. La urea acumulada en el vino puede reaccionar espontáneamente con el etanol y formar el carbamato de etilo (Ough y col., 1990; Kodama y col., 1994; Uthurry y col., 2006). La vía esta ligada a represión catabólica del nitrógeno (NCR).

5. Precursores del CE formados por BL

5.1. La vía arginina-deiminasa (ADI)

La vía de la arginina deiminasa (ADI, Figura 7), comprende la actuación de tres enzimas: arginina deiminasa (ADI), ornitina transcarbamoilasa (OTC) y carbamato quinasa (CK).

ADI

Cataliza la conversión de arginina a citrulina y amonio, con un ligero aumento del pH. Es un dímero con subunidades de 54000 y 49000 kDa respectivamente. La forma de la enzima que se produce en fase logarítmica es diferente a la que se produce en fase estacionaria, con diferencias electroforéticas y propiedades espectrales, aunque posee el mismo peso molecular y la misma afinidad por la arginina.

OTC

Cataliza la fosforólisis de citrulina a ornitina y carbamoil-fosfato, paso que es termodinámicamente limitado hasta que el equilibrio de su reacción es fuertemente favorecida para la formación de la citrulina;

Muchos organismos degradan arginina por vía ADI y poseen 2 OTC diferentes, una catabólica y una anabólica. Estas pueden ser reprimidas por carbono o amonio y son activadas a concentraciones altas o bajas de arginina y en presencia de bajas concentraciones de oxígeno. El perfil de las enzimas catabólicas/anabólicas es diferente en cuanto a su cinética, su regulación, sus propiedades estructurales, y en su habilidad en las dos direcciones de la reacción. La evolución de estas dos enzimas a partir de un gen primitivo de la carbamoiltransferasa sucedió por la duplicación en tándem de éste. Cada una de estas nuevas duplicaciones se especializó en una función con el fin de aprovechar nuevos sustratos y controlar los flujos energéticos. La OTC evolucionó seguramente a partir de una transferasa con un sustrato ambiguo que hacía la carbamilación del aspartato. La OTC anabólica/catabólica y la subunidad catalítica ATCasa comparten un gen ancestral común. La OTC catabólica (cOTC) está relacionada con la anabólica OTC. El motivo proteico F-M-L-H-C-L-P está presente en todas las OTC en tanto que el residuo Cys-274 es el sitio de unión a la ornitina. Todos estos motivos son ampliamente conservados en todas las OTC (catabólica y anabólica). La cOTC es incapaz de desarrollar una actividad

anabólica debido a la alta cooperatividad y la pobre afinidad con respecto al carbamil fosfato.

CK

La carbamato quinasa cataliza la conversión reversible del carbamil fosfato a CO_2 y NH_3 , generando ATP, estando desplazado el equilibrio hacia estos últimos. La principal función de esta enzima es la generación de nitrógeno en forma de amonio y energía en ATP. La represión puede suceder por catabolito de carbono y por nitrógeno.

La vía ADI incluye además una proteína presente en la membrana plasmática, como antipuerto, que cataliza uno a uno el cambio de la arginina a ornitina, asegurando que las concentraciones de arginina intracelular se mantenga a niveles bajos (Poolman y col, 1987).

En el balance global de la reacción se produce 1 mol de Ornitina y CO_2 , 2 mol de amonio, y 1 mol de ATP por nivel de sustrato fosforilado por mol de arginina metabolizada. (Poolman y col., 1987; Cunnin y col., 1986).

Las tres enzimas de la vía ADI en las BAL aisladas del vino no son constitutivas pero son simultáneamente inducidas cuando el crecimiento sucede en presencia de arginina (Liu y col, 1998). En contraste, solo ADI y OTC son inducidas por la arginina mientras la enzima CK es constitutiva en *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (Crown y col, 1982).

La presencia de la vía ADI durante muchos años fue una incógnita en el estudio de las bacterias lácticas. En 1974, Kuensch y col., llegaron a proponer el ciclo de la urea como la vía de degradación de la arginina que utilizaba *O. oenos* y otras BL (Sponholz, 1992). La actividad de las enzimas de la vía ADI, la arginasa y ureasa fue examinada en extractos celulares. Se incluyeron cepas de BL relacionadas con vinos tanto lactobacilos como pediococos homo y heterofermentativos crecidos en medios en presencia de arginina. Se encontró actividad ADI en los lactobacillos heterofermentativos, no así en las cepas homofermentativas (Pilone y col, 1991). La actividad de la arginasa y la ureasa no fueron detectadas en ningún caso. Por lo tanto la vía ADI es la ruta exclusiva para el catabolismo de la arginina en BL aisladas del vino (Sponholz y col, 1992; Liu y col, 1994; 1995; 1996).

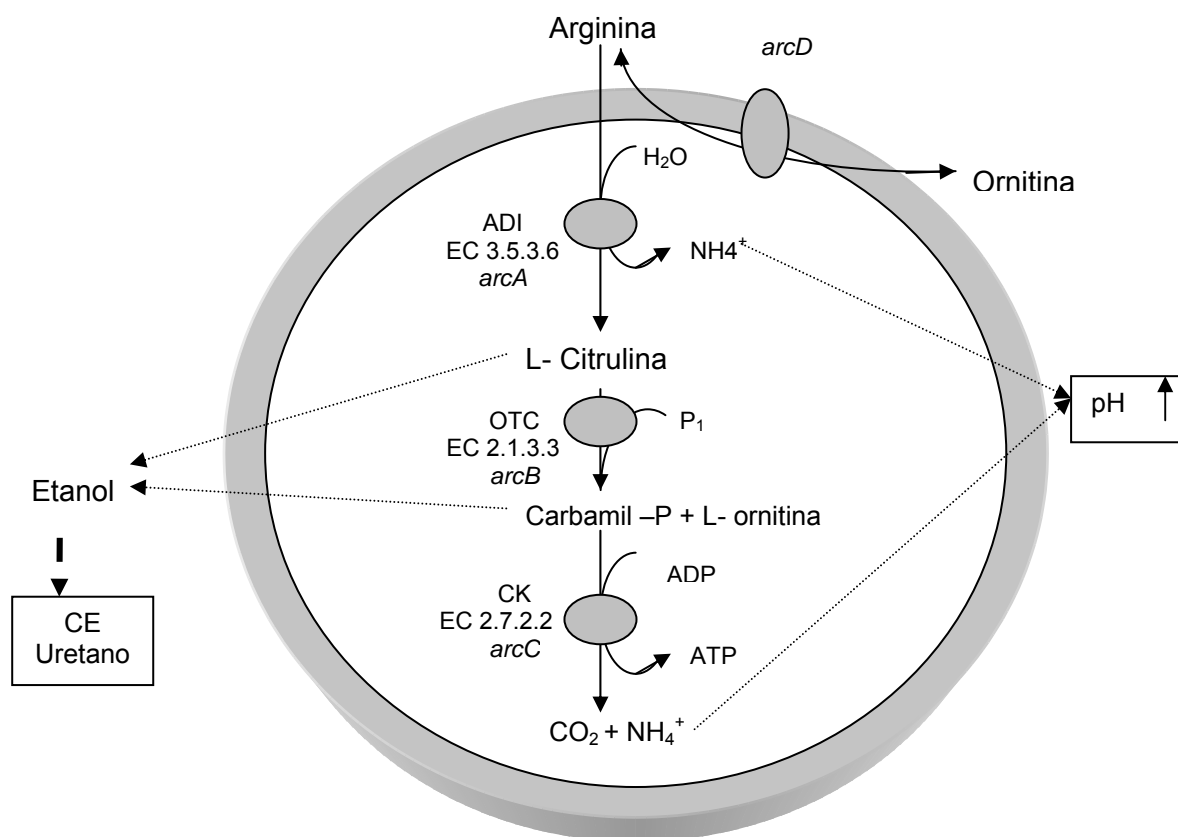


Fig. 7. Vía ADI para la degradación de la arginina en BAL y su implicación enológica. (ADI: Arginina deiminasa; OTC: ornitina transcarbamilasa; CK, carbamato quinasa; CE, carbamato de etilo).

La cinética de las actividades enzimáticas es cepa-dependiente. Esta variabilidad por lo tanto es independiente del crecimiento celular. Se ha demostrado que las actividades específicas de las enzimas de la vía ADI en extractos celulares de *O. oeni* son muy variables entre cepas (Liu y col, 1995). En algunas de ellas sólo se encontraron actividades de OTC y CK explicando el hecho de su inhabilidad para la degradación de la arginina. En cepas de *Lactococcus lactis* subs. *cremoris* se encontró solo actividad CK pero no ADI ni OTC. Al parecer los 2 genes que codifican para las dos primeras enzimas se han perdido o no son expresados debido a una mutación en ellos o del gen regulador. ADI y OTC son inducibles y dependientes del tipo de azúcar y la concentración de arginina. CK es constitutivo con una actividad específica inmutable en todas

las condiciones probadas pareciendo ser constitutivo (Jonson y col, 1983; Arena y col, 1999; Spano y col, 2004; 2006; 2007). De todo ello se deduce que la degradación de la arginina no es una característica útil para la clasificación taxonómica (Granchi y col, 1998).

5.2. Metabolismo energético de la arginina en las BL

Los microorganismos capaces de derivar energía del catabolismo de la arginina serán más competitivos en ambientes extremos como el vino (Tonon y col., 2000), ya que su degradación implica la obtención de 1 mol de ATP por cada mol de arginina hidrolizada. La energía generada puede ser acoplada al crecimiento celular siempre en presencia de una pequeña cantidad de glucosa (Liu y col, 1996; 1998). La ganancia neta de energía metabólica sin embargo depende del coste energético de la toma de la arginina y la excreción de la ornitina.

La vía ADI esta involucrada en los mecanismos de protección a los ambientes ácidos como la cavidad oral (Curran y col, 1995), el queso (Stuart y col. 1999) y el vino (Arena y col, 2005). La acumulación de citrulina intracelular combinado con los protones que generan los iones amonio eleva el pH del citoplasma y protege contra los posibles daños ácidos. Esto depende de la cantidad de la arginina y la composición del vino (capacidad tamponante). El incremento del pH puede consecuentemente alentar el crecimiento de organismos oportunistas que dañarían la calidad del vino como los lactobacilos y pediococos generalmente menos ácido-tolerantes que *O. oenos* (Liu y col, 1998).

La mayoría de las reacciones enzimáticas son fuertemente dependientes del pH por lo que un valor externo por debajo del pH interno puede inhibir o disminuir la toma de la arginina. En *O. oeni* la degradación de la arginina disminuye a pH 3,2. Sin embargo en *L. hilgardii* al disminuir el pH el consumo específico de la arginina no se modifica (Mira de Orduña y col, 2001). Cuando se combinan más de dos factores de estrés como la presencia de etanol y un bajo pH la degradación específica de la arginina se puede ver afectada ya que incide sobre la síntesis y expresión de enzimas en cepas aisladas de vino (Liu y col, 1995; Arena y col, 2005). La actividad específica de la enzima varía con las condiciones de crecimiento, la concentración de arginina y el pH. Si la concentración es baja la actividad enzimática se ve aletargada. La cantidad de energía de mantenimiento

requerida a bajo pH es alta y la energía obtenida en esa condición probablemente se destine a la supervivencia más que para el crecimiento. (Terrade y col, 2009).

A nivel fisiológico la presencia de la vía ADI en *O. oeni* aporta a la célula una fuente de energía en condiciones extremas donde células viables no cultivables (CVNC) pueden volver a adquirir la capacidad de crecer en medios sólidos. (Tonon y col., 2000; Bourdineaud, 2006). La arginina en *O. oeni* influye en el crecimiento y la viabilidad celular. Representa una fuente de energía alternativa aumentando la masa celular y el tiempo de supervivencia. La presencia de arginina en el medio es necesaria para estimular la actividad enzimática de la vía ADI en *O. oeni*. Cepas de *L. hilgardii* cultivadas en medios sin arginina añadida tienen actividades con un alto nivel basal, lo que podría explicar que sean capaces de usarla rápidamente (Tonon y col, 2000). En medios de cultivo continuo la degradación de la arginina se produce cuando no hay azúcares. En cultivo discontinuo el metabolismo de la glucosa y la arginina es secuencial. En presencia de galactosa son metabolizados a la vez y la energía obtenida se acopla al crecimiento.

Las cepas son capaces de almacenar citrulina intracelularmente durante el crecimiento en medios ricos en arginina. (Poolman y col, 1987). También durante la hidrólisis de la arginina pequeñas cantidades de citrulina pueden ser excretadas. Esta luego puede ser reutilizada en condiciones favorables (Azevedo y col, 2002). La excreción de la citrulina es conocida en otros microorganismos capaces de degradar la arginina a través de la vía ADI (Liu y col 1998; Vrancken y col, 1999). Está asociada a una rápida conversión de la arginina y a un exceso de ATP por la vía de la fermentación de azúcares que podría inhibir la enzima OTC (Mira de Orduña y col 2000). En la fase final logarítmica e inicio de estacionaria la energía producida a través de la arginina hidrolizada no es acoplada al crecimiento de la célula. El lento metabolismo en esa fase y un desequilibrio entre una elevada actividad de la enzima ADI y una baja o nula actividad del enzima OTC, favorecerían que la citrulina se acumule en el vino (Liu y col., 1994; Spano y col. 2007).

La reutilización de la citrulina como fuente de carbono es típica en algunas especies, incluso se involucra la ornitina como intermediaria. La cepa *OENO* de *Leuconostoc oenos* (*O. oeni*) y la cepa *CUC-3* de *L. buchnerii* son capaces de

excretar como citrulina el 7-28 % de la arginina presente en vino. La citrulina es reutilizada después del agotamiento de la arginina en el caso del *L. buchnerii* CUC-3 pero no en *O. oeni* (Liu y col, 1996).

5.3. Genética de la vía ADI en bacterias: operón *arc*

Se ha sugerido que los tres genes involucrados en la vía de la arginina deiminasa, *arcA* que codifica la enzima arginina deiminasa (ADI), *arcB* codifica la ornitina transcarbamilasa (OTC), *arcC* codifica la carbamato kinasa (CK) evolucionaron independientemente y más tarde se ensamblaron en un solo agrupamiento (cluster o operon) con interdependencia funcional, arguyendo una hipótesis de reclutamiento de genes (Zúñiga y col. 2002).

La existencia de la agrupación de los genes principales de la ruta ADI en un operon ha sido ampliamente estudiada en diversos organismos. La organización genética del operon *arc* no es conservada en todas las especies, y hay diversos ejemplos en la Figura 8, donde se puede observar los diferentes agrupamientos que han hecho estos genes *arc* en diversos organismos.

En *Pseudomonas aeruginosa* se encuentra conformado como *arcDABC* (Verhoogt, 1992). En *Halobacterium salinarum* (*H. halobium*) los transcritos de los genes que conforman el operon están organizados *arcRACB*, siendo la *arcR* una proteína reguladora de la expresión del operón (Ruepp y col, 1996). La comparación entre estos dos operones genera muy poca homología entre sus genes indicando que la vía ADI no estaba presente en el común antecesor de las dos especies indicando que su evolución fue por separado. *P. aeruginosa* solo tiene un promotor, y en el caso de *H. salinarum*, presenta 4 promotores individuales uno por cada gen.

En *Rhizobium etli*, la conformación del operon es *arcABC*, y no hay evidencia de la presencia de ningún *arcD* o *arcR*. En *B. licheniformis* y *Clostridium perfringens*, el arreglo del operón es *arcABDC* e igualmente interviene en su activación la presencia de la *ArgR* (Maghnouj, 1998). En *Lb. sakei* ha sido caracterizado en detalle encontrando una agrupación genética *arcABCTD*. El gen *arcT* codifica una transaminasa no muy bien caracterizada y *arcD* codifica un antiporter arginina-ornitina (Zúñiga y col, 1998).

En *O. oeni*, el arreglo genético de los genes del arc ADI corresponde a *arcABCD* (Tonon y col, 2001; Tonon y col 2001b, Tonon y col, 2001c). La relación de los aminoácidos que conforman las enzimas allí agrupadas está íntimamente relacionada con las de *Lb sakei* (Tonon y col, 2001c). El operón fue secuenciado e identificado a nivel fisiológico, enzimático y genético. En algunos casos solo se ha encontrado la presencia de solo la primera enzima de la vía ADI en algunas especies de bacterias lácticas (Manca de Nadra, 1982).

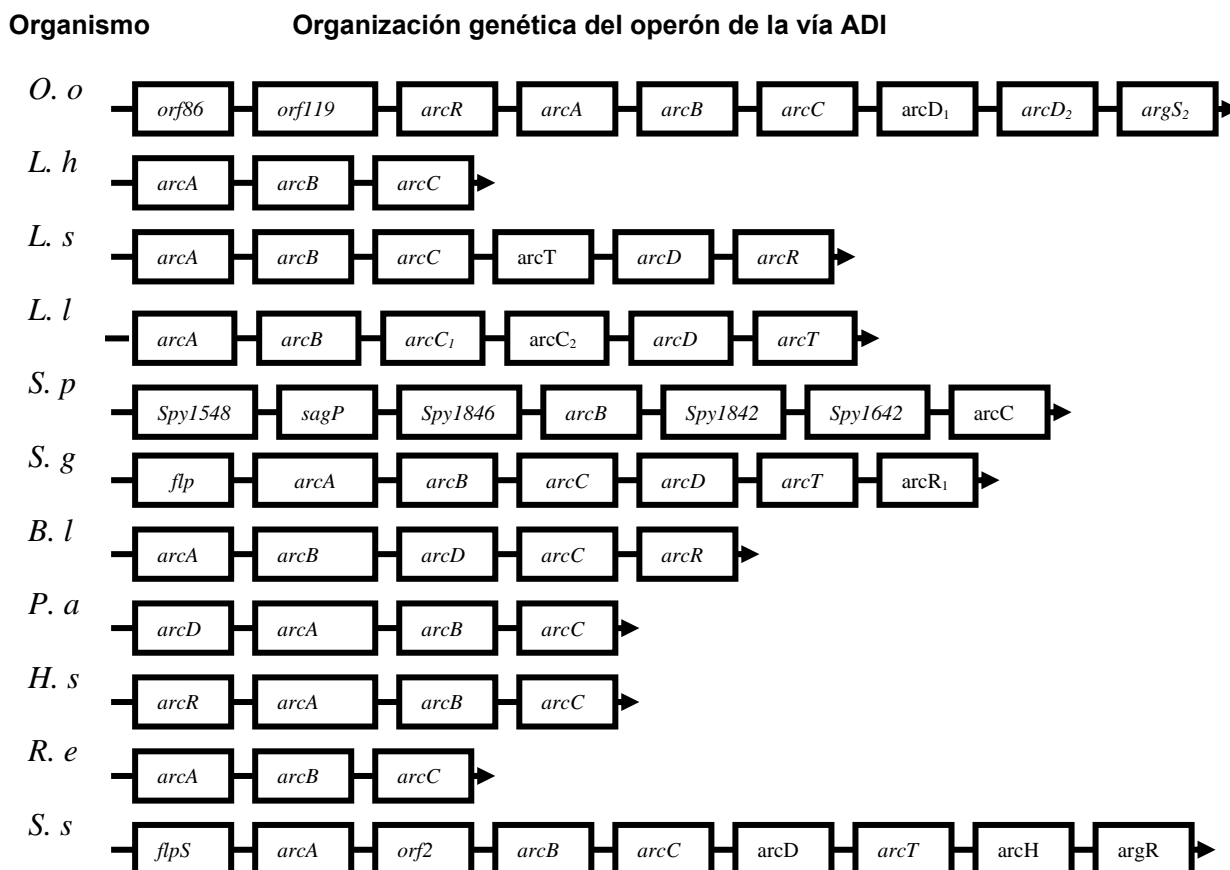


Fig. 8. Comparación de la organización genética y regulación de conocidos operones ADI: (O.o) *Oenococcus oeni* (Tonon y col, 2001^a; Divol y col, 2003; Nehmé y col, 2005), (L.h) *Lactobacillus hilgardii* (Arena y col, 2002) (L.s), *L. sakei* (Zúñiga y col,1998), (L.l) *Lactococcus lactics* (Bolotin y col, 2001), (S.p) *Streptococcus pyogenes* (Degnan y col, 2000), (S.g) *Streptococcus gordonii*,(Dong y col, 2002, 2004), (B.l) *Bacillus licheniformis*, (Maghnouj y col, 2000) (P.a) *Pseudomonas .aeruginosa* (Gamper y col, 1991), (H.s) *Halobacterium salinarium* (Ruepp y col, 1996), (R.e) *Rhizobium etili* (D’Hooghe y col, 1997), (S.s) *Streptococcus suis* (Grueining y col, 2006).

En *L. plantarum* han sido descritos los genes *arcA*, *arcB*, y *arcC* (Spano y col, 2004). Su expresión basal incluso en ausencia de arginina y a pH por debajo de 4 favorece que sea capaz de derivar energía de la degradación de la arginina para sobrevivir en condiciones estresantes como las encontradas en vino. Estos genes a su vez no están sujetos a represión catabólica por glucosa. La habilidad para degradar arginina depende de la presencia de los genes y por lo tanto es también cepa dependiente como ya se había reportado para *O. oeni* (Tonon y col, 2000; Divol y col., 2003; Spano y col, 2006; Zaubmüller y col, 2006). Pese a ello sus actividades enzimáticas son diferentes debido a que las velocidades de activación de las enzimas varían, aunque son teóricamente transcritas en el mismo operón, que aún no ha sido reportado para *L. plantarum* (Spano y col 2007).

El gen *arcD* que codifica una proteína altamente hidrofóbica ubicada en la membrana plasmática tiene una función de transporte siendo específico antiporter arginina-ornitina (Lüthi E. y col., 1990). Exhibe una cinética de saturación con respecto a la arginina externa y la concentración de la ornitina interna. El cambio estequiométrico entre la arginina y la ornitina es electroneutral y es independiente de la magnitud de la fuerza motriz de protones (Tonon y col, 2000). Este transportador es influido por el pH externo (Poolman 1993). La arginina permite la producción de energía por la fosforilación a nivel de sustrato por lo que se podría dar a través de una difusión facilitada sin mediar una energía metabólica para el transporte a través de la membrana (Konings y col, 1989). Pero este sistema es operativo solo después de la iniciación de la toma de arginina con una activación previa del transportador, con la energía generada de la fermentación de carbohidratos ya que no se conoce que este transporte se pueda hacer sin la presencia de un azúcar fermentable. (Manca de Nadra y col, 1986; Liu y col, 1995; Tonon y col, 2002). En *O. oenos* se ha encontrado que es capaz de catabolizar la arginina aún después de la desaparición de la glucosa (Liu y col, 1996). En *L. buchnerii* se ha visto que es capaz de reasimilar la citrulina excretada aún después del agotamiento de la arginina y la glucosa, lo que sugiere un antiporter citrulina-ornitina (Liu y col, 1996). No se ha descrito ningún intercambiador de este tipo en *Lactococcus* (Poolman y col, 1987) y tampoco en *O. oeni* (Liu y col, 1996). Se evidencia que un intercambiador arginina-ornitina

podría funcionar a su vez para arginina-citrulina en *O. oeni* y citrulina-ornitina en *L. buchnerii* (Liu y col, 1998). Algunos otros tipos de transportadores han sido investigados en las BL de vino, como un cargador dependiente de lisina, encontrado en bacteria de rumiantes o un transportador de arginina dependiente de sodio pero aún no se han encontrado ninguna evidencia (Liu y col, 1998).

En *O. oeni* Divol y col., al 2003 encontraron en el operon dos copias del *arcD* designadas como *arcD₁* y *arcD₂*. Estos son expresados constitutivamente a diferencia de los otros genes miembros del cluster como *arcA*, *arcB*, y *arcC*. Este patrón observado sugiere que los *arcD* estarían presentes en la membrana durante el crecimiento de *O. oeni*, facilitando la incorporación de la arginina que posteriormente estimula la expresión del operon como tal.

Este tipo de antiporter ha sido estudiado en *L. lactis* y en *Pseudomonas* donde es una proteína esencial para el crecimiento anaeróbico en arginina. En *Enterococcus faecalis* funciona para el intercambio de agmatina - putrescina.

En *O. oeni* se encontró ubicado topológicamente un *orf229* antes del *arcA* denominado posteriormente por Divol y col, 2003 como *arcR*, que estaría involucrado en la inducción de la expresión en presencia de arginina. Es un activador del sistema ADI y tiene una alta similaridad con los reguladores *CRP-FNR* (*Cyclic AMP Protein - Fumarate and Nitrate Reduction Regulator*) encontrados en otros microorganismos. Este tipo de regulador está relacionado con la activación de genes en condiciones de anaerobiosis. La localización de este regulador y la presencia de un sitio de anclaje a un *CRP* situado en la región promotora del *arcA* sugieren que es un sitio consenso para una regulación positiva del catabolismo de la arginina en *O. oeni* (Tonon y col, 2001^a y Tonon y col, 2001b). El regulador *arcR* es expresado constitutivamente en el transcurso del crecimiento celular y su transcripción es estimulada por la arginina. En un estudio en *O. oeni* cultivado en un medio suplementado con fructosa y arginina se encontró una respuesta que le permitió protegerse contra el subsiguiente shock en las condiciones del vino. La expresión de los genes *omrA* y *ftsH* claves en la respuesta a estrés como del *arcR* hace suponer que este es un factor de transcripción involucrado en la respuesta a estrés. (Bourdineaud, 2006).

Un gen *argS2* fue hallado en *O. oeni* un arginyl tRNA sintetasa al final del locus de ADI (Nehmé y col, 2005). Solo ha sido encontrado en cepas degradadoras. Este hecho refleja la flexibilidad de la regulación de la expresión

del operón, ya que se han detectado transcritos policistrónicos y monocistrónicos que pueden ser generados estos últimos por transcritos independiente de cada gen.

5.4. Regulación de la vía ADI en BL

El control de la síntesis de enzimas de la vía ADI se han estudiado en muchas BL como *L. buchnerii*, *L. leichmannii*, *L. sake*, *L. lactics* y *O. oeni* (Crown, 1982; Cunnin, 1986, Abdelal, 1979).

La vía ADI además de ser fuente de energía en algunas bacterias es fuente de nitrógeno en ausencia de otra mejor. El represor catabólico de nitrógeno de ADI es el amonio. Una señal ideal para la inducción de la vía ADI es una baja disponibilidad energética. Aparte de esta primera señal se necesita una segunda respuesta inductora de la existencia de arginina. La presencia del aminoácido estimula la transcripción del antiporter arginina-ornitina (Tonon y col, 2002). En general la inducción de la expresión de las enzimas de la vía ADI sucede frente a la presencia de una fuente de carbono y nitrógeno como la misma arginina, de nucleótidos monofosfatos y del fosfato inorgánico todo ellos también están involucrados en la restablecimiento de la cinética enzimática.

El fosfato es un metabolito importante en la regulación de la vía ya que OTC lo requiere. Otras condiciones ambientales como bajas concentraciones de oxígeno y de glucosa, presencia de ribosa y arginina, son estimulantes. Señales del estado celular como niveles de ATP, NADH, y otros metabolitos intermedios podrían estimular la expresión de la vía ADI. Esto le permite a la bacteria generar energía en condiciones extremas de agotamiento de nutrientes (D'Hooghe y col, 1997).

La represión de la vía se da generalmente por la presencia de un sustrato fácilmente fermentable así como otras fuentes de energía y por la activación anabólica por aerobiosis. La regulación de la vía ADI se puede dar en la CK por la presencia del ATP ya que el ADP es un sustrato y un ATP un producto (Cunnin y col, 1986; Stalon, 1972).

En cepas de BL aisladas del vino como *L. buchnerii*, *L. brevis*, *O. oeni*, el metabolismo de la arginina y la glucosa se da de manera simultánea, mientras que la arginina y la fructosa es secuencial (Liu y col 1996). *L. buchneri* degrada la

glucosa y la citrulina simultáneamente después del agotamiento de la arginina. El catabolismo secuencial está relacionado con que la fructosa podría inhibir la toma de la arginina o su degradación. También se encuentra relacionada con la inhibición de la producción de amonio en algunas BAL del vino (Liu y col, 1995).

El tipo de azúcar afecta la síntesis de las enzimas de la vía ADI. Algunos carbohidratos pueden reprimir la síntesis de la ornitina por lo que es regulada por el flujo de concentraciones de los metabolitos. En algunas cepas la presencia de glucosa, sacarosa y fructosa puede reprimir la actividad principalmente en BAL homofermentativas. El mecanismo de esta inhibición se atribuye a una represión catabólica. En *Streptococcus* las enzimas ADI y OTC se ven alteradas al crecer las células en medios en presencia de galactosa no así en glucosa o lactosa (Crown y col, 1982). La CK no se ve alterada su función, actúa como constitutiva. Algunas cepas que no degradan la arginina, son capaces de tener actividad CK y la enzima ADI es la menos estable de las tres enzimas.

L. sake degrada la arginina vía ADI, siendo auxótrofo para la arginina pero es incapaz de crecer en arginina como única fuente de carbono (Champomier y col., 1999). Aun así los azúcares presentes en el medio pueden generar una represión catabólica en la regulación de la vía. La presencia de dos secuencias *cre* en la región promotora antes de *arcA* son responsables de la represión catabólica en la transcripción del operon *arc* (Zúñiga y col, 1998).

La glucosa es requerida a bajas concentraciones para el transporte aunque a concentraciones altas reprime la vía ADI (Montel, 1987). La degradación de la arginina está asociada a la supervivencia durante la fase estacionaria por lo tanto comienza cuando la glucosa se ha agotado. La glucosa-6-fosfato, piruvato, malato, o glicerol aumentan la actividad de la OTC no así cuando está presente la ribosa. La represión por carbohidratos es dependiente de la cepa y tipo de carbohidrato. La inducción de la vía ocurre cuando el oxígeno es escaso.

En el caso de *O. oeni* la presencia de glucosa no interfiere en la expresión de los genes del operon. No está sometido a una represión catabólica. (Mira de Orduña y col, 2001; Liu y col, 1998). En *Lactococcus lactis*, la síntesis de ADI y OTC se ve controlada por presencia de glucosa, no así para CK. Un elemento regulatorio es compartido con los mecanismos responsables de la des-represión por nitrógeno, glucosa, oxígeno y amonio.

Han sido descritos una serie de genes reguladores de la vía ADI en diferentes cluster. Por ejemplo, *arcR* en *Halobacterium salinarum*, y *ahrC* (un regulador de la biosíntesis de la arginina y el catabolismo) en *Clostridium perfringens* y en *L. lactis* (Rallu y col, 1996). Un gen *arcT* ha sido encontrado en *L. sakei* y en *L. lactis* que puede codificar un transaminasa de clase I.

5.5. Implicaciones enológicas de la degradación de arginina por las BL

La concentración de arginina en mosto está entre unos pocos miligramos/L, hasta los 10 g/L dependiendo de una serie de condiciones previamente revisadas. La arginina esta presente en el vino en cantidades de 100 mg/L a 2,3 g/L al final de la FA (Sponholz, 1991; Huang y col, 1991). Por lo tanto la arginina estará disponible para el metabolismo de las BL durante la FML. El catabolismo de la arginina por cepas capaces de hidrolizarla puede tener una ventaja significativa, ya que pueden crecer más rápidamente que otras imponiéndose en la fermentación. La presencia de lías de levaduras durante la FML estimula el crecimiento bacteriano, porque proporcionan más sustrato nitrogenado lo cual implica más posibilidades de la presencia de citrulina en el medio (Terrade y col, 2006).

Liu y col, (1994) demostraron una buena correlación entre la degradación de la arginina, la producción de citrulina y formación de CE durante la FML con cepas de *O. oenos* y *L. buchnerii* en un vino sintético. En vinos de mesa se encontró que 20 mg/L de citrulina podría reaccionar y generar una media de 30 µg/L de CE después de 3 años de almacenamiento a 15°C y a esta temperatura la citrulina iguala el potencial formación de CE por la urea (Mira de Orduña 2001).

Aunque la citrulina que es excretada al vino por las BL puede ser convertida en concentraciones de CE bastante por debajo de los límites recomendados en Estados Unidos (Liu y col, 1994). Este potencial es dependiente de la cepa y también depende de la disponibilidad de arginina (Liu y col, 1998).

Considerando que la arginina tiene un sabor amargo y mustio, es necesaria su degradación para la calidad organoléptica del vino. La ornitina como producto de la desaminación de la arginina tiene un efecto inhibitorio fuerte sobre el crecimiento de levaduras vínicas “salvajes”, por lo tanto concentraciones altas de ornitina podrían conferir una estabilidad biológica al vino. Un aumento del pH

debido a la liberación de amonio podría afectar el sulfitado, siendo éste un paso importante en los procesos de vinificación, necesario para la estabilidad microbiológica antes del almacenamiento y añejamiento del vino. La eficiencia del dióxido de sulfuro para eliminar las BL decrece con el incremento del pH, por lo tanto altos niveles de pH podrían ser encontrados después del tratamiento incluso después de varios meses. En estas condiciones la probabilidad de un vino con problemas es mayor, sumado a la presencia de otros compuestos del vino como ácido gálico y catequina, que podrían estimular el crecimiento de bacterias oportunistas como *L. hilgardii*, *L. buchnerii* y *L. brevis* (Tonon y col, 2002; Liu y col, 1996).

5.6. Propuestas para evitar la formación de Carbamato de etilo

Debido al riesgo implícito que tiene la degradación de la arginina por parte de las BAL, esto tiene un alto impacto en el desarrollo de la FML en la industria del vino. Las FML espontáneas deberían ser evitadas y utilizar cultivos iniciadores garantizados donde la inhabilidad para excretar la citrulina a partir de la arginina degradada sería uno de los criterios a seguir. La investigación de las actividades enzimáticas es necesaria para evitar que una vía ADI deficiente conlleve a problemas.

Por lo tanto los programas de selección de cepas malolácticas deberían incluir como criterio que las cepas seleccionadas sean incapaces de excretar citrulina a partir de la arginina siendo capaces de la degradación completa de la arginina hasta amonio y CO₂, de tal manera que no se acumularan los intermediarios precursores de CE. Las cepas de *O. oeni* varían en su habilidad de degradar arginina ya que varía la velocidad de las enzimas que catabolizan la arginina entre las BAL aisladas del vino (Liu y col, 199). Cepas particularmente peligrosas son aquellas que poseen solo parte del sistema enzimático, las que tengan el enzima ADI pero no el enzima OTC, o ambas pero con una actividad OTC muy baja (Granchi y col., 1998).

La arginina es degradada después de la FML por lo que el papel de la arginina como agente estimulante del crecimiento sería improbable en condiciones prácticas de vinificación. Se podría evitar la generación de precursores del carbamato de etilo cuidando la FML. Aplicar una cepa iniciadora arginina-negativa

que probablemente no estaría en desventaja con ninguna cepa con características menos deseables (Terrade y col, 2005).

Una propuesta interesante se da en el uso de ureasas producidas a partir de microorganismos (Tegmo-Larsson y col, 1990b). Estas enzimas que degraden la urea son una herramienta potencial para reducir la concentración de urea en vinos y así evitar las concentraciones de CE. La mayoría de las ureasas comerciales son derivadas de otras fuentes (p.ej., judías) siendo inadecuadas ya que tiene un pH óptimo distinto al del vino (Kodama y col 1991). Ureasas derivadas de BL han sido investigadas como enzimas alternativas para remover el exceso de urea en vino. La enzima se añade después de la fermentación y antes de la filtración final. Las ureasas ácidas producidas de *L. fermentum* (Kodama y col 1991; Ough y col, 1988; Trioli y col, 1989; Yoshizawa y col., 1988) y *L. reuteri* (Kakimoto y col 1989) son muy efectivas en un rango de pH de 2 – 4 donde está incluido los típicos valores de pH del vino. Los niveles de uso se rigen por el alcohol, el pH, la concentración de urea, el período de contacto de la enzima y la temperatura. No tienen efectos perceptibles en el sabor o el aroma del vino. Los niveles de adición de enzimas son mucho mayores de lo que normalmente requiere llegando hasta 500 mg / L (Zoecklein y col., 1995).

Diversos componentes del vino como los compuestos fenólicos, dióxido de sulfuro, etanol y ácidos orgánicos podrían inhibir la actividad de la ureasa de *L. fermentum* (Trioli y col, 1989; Matthews y col, 2004). Las ureasas pueden reducir la formación de CE pero como que la urea no es el único precursor, la formación del CE completa aun no ha sido cuantificada.

Como resumen, para controlar la aparición del CE en vino, se dan las siguientes recomendaciones, extraídas del Manual de Butzke y col, 1997:

- **Evitar la sobre fertilización**, ya que elevan los niveles de nitrógeno asimilable en los mostos conduciendo a niveles de urea residual elevados en el vino resultante. No añadir cantidades innecesarias de fosfato diamónico a los mostos, ya que es mejor conocer el estado nitrogenado de los mostos.
- **Selección de la levadura correcta**, porque las diferentes levaduras difieren en la capacidad de reutilizar la urea formada desde la arginina. La

elección correcta de la levadura para el mosto puede significar niveles bajos de CE.

- **Evitar la fermentación maloláctica espontánea, que** puede contribuir a los elevados niveles de CE. Usar cepas de uso comercial que no produzcan altos niveles de citrulina.
- **Evitar el contacto con lías**, ya que el envejecimiento sobre lías puede contribuir a los niveles de CE. Sobre todo sería necesario evitarlas en caso de cultivos que contienen nitrógeno con altas concentraciones de α -aminoácidos.
- **Almacenamiento y transporte.** La formación de CE es exponencialmente mayor a temperaturas elevadas. Es conveniente el mantenimiento de la cadena de frío adecuada desde el lugar de producción hasta el lugar de la venta.
- **Eliminación de la urea enzimática residual**, mediante ureasa comercial. Sin embargo las condiciones generales en vino pueden limitar la eficacia. El uso de este enzima en cada tipo de vino debe ser evaluado para confirmar su actividad.

6. Bibliografía

- Abdelal A. **1979**. Arginine Catabolism by Microorganisms. Ann. Rev. Microbiol. 33: 139-168.
- Arena, M.E.; Saguir, F.M.; Manca de Nadra, M.C. **1999**. Arginine dihydrolase pathway in *Lactobacillus plantarum* from orange Int. J. Food Microbiol. 47. 203-209.
- Arena, M.E.; Saguir, F.M.; Manca de Nadra, M.C. **1999**. Arginine, citrulline and ornithine metabolism by lactic acid bacteria from wine. Int. J. Food Microbiol., 52, 155-161
- Arena M.E., Manca de Nadra MC. **2001**. Biogenic amine production by *Lactobacillus*. J. Applied Microbiol. vol. 90 p.158-162

- Arena M.E., Manca de Nadra M.C. **2002**. Comparative Survey in *Lactobacillus plantarum* of the Growth and Metabolism of Arginine and Citrulline in Different Media. *J. Agricultural and Food Chemistry*. vol. 50 p.6497-6500.
- Arena M.E., Manca de Nadra M.C., Muñoz R. **2002**. The arginine deiminase pathway in the wine lactic acid bacterium *Lactobacillus hilgardii* X1B: structural and functional study of the arcABC genes. *Gene*, 301. 1-2. 61-66
- Arena M.E., Manca de Nadra M.C. **2005**. Influence of ethanol and low pH on arginine and citrulline metabolism in lactic acid bacteria from wine. *Research in Microbiol.* 156 (8). 858-864.
- Axelsson L. **1998**. Lactic acid bacteria: classification and physiology. MATFORSK, Norwegian Food Research Institute, Ås, Norway. Editors: Salminen, S., von Wright, A., Ouwehand, A. Document Title: Lactic acid bacteria: microbiology and functional aspects. Publisher: Marcel Dekker.
- Azevedo Z., Couto J.A., Hogg T. **2002**. Citrulline as the main precursor of ethyl carbamate in model fortified wines inoculated with *Lactobacillus hilgardii*: a marker of the levels in a spoiled fortified wine. *Lett. Appl. Microbiol.* 34. 32-36.
- Bargallo RN, Spagna G. Palmieri R. Torriani S. **2004**. Assessment of β -glucosidase activity in selected wild strains of *Oenococcus oeni* for malolactic fermentation. *Enzyme Microb Technol.* 34:292-
- Bartowsky, E. J., Henschke P.A. **1995**. Malolactic fermentation and wine flavour. *Aust. Grapegrower & Winemaker*.378a:83-94.
- Bartowsky, E. J., Costello, P., Henschke, P.A. **2002**. Management of the malolactic fermentation – wine flavour manipulation. *Aust. & N.Z. Grapegrower & Winemaker*. 461a:7-8, 10-12.
- Bauer R., Dicks L.M.T. **2004**. Control of Malolactic Fermentation in wine. A Review. *S.Afr. J. Enol. Vitic.*, 25. (2).74-88.
- Bolotin A., Wincker P., Mauer S., Jaillon O., Malarme K., Weissenbach J., Ehrlich S. D., Sorokin A. **2001**. The complete genome sequence of the

- lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* ssp. *Lactis* IL1403. Genome res.. 11: 731 – 753.
- Bordons A., Gil J., Araque I., Carreté R., Reguant C. **2004**. Estudios para minimizar la producción de aminas biógenas y de carbamato de etilo por parte de las bacterias lácticas. XIX Cursos Rioja (Haro). “El concepto de seguridad de los alimentos en enología”. Ed. Quintana industrias gráficas. Dep Legal: LR-36-2005
 - Bourdineaud J.P. **2006**. Both arginine and fructosa stimulate pH-independent resistente in the wine bacteria *Oenococcus oeni*. Int. J. Food Microbiol. 107. 274 - 280.
 - Boulton, R. B., V. L. Singleton, L. F. Bisson, and R. E. Kunkee. **1998**. Malolactic fermentation. In: *Principles and practices of winemaking*. Chapman & Hall, Aspen Publishers, Maryland.
 - Butzke C.E, Bisson L. **1997**. Ethyl Carbamate Preventive Action Manual. Dpto de Viticuluta y Enologia University of California, Davis, and wine institute San Francisco. FDA. Washington. (www.cfsan.fda.gov/~frf/ecation.html)
 - Cavin J.F., Andioc V., Etiévant P.X., Diviès C. **1993**. Ability of wine lactic acid bacteria to metabolize phenol carboxylic acids. Am. J. Enol. Vitic. 44:76-80.
 - Carreté R. **2002**. Influencia de components del vins sobre el metabolism de *Oenococcus oeni* i sobre la seva dinàmica de poblacions a la fermentació malolàctica. Tesis Doctoral. Universidad Rovira i Virgili.
 - Chatonnet, P., C. Viala, and D. Dubourdieu. **1997**. Influence of polyphenolic components of red wines on the microbial synthesis of volatile phenols. Am. J. Enol. Vitic. 48:443-448.
 - Champomier –Vergès M.C., Zuñiga M., Morel-Deville F., Perez-Martinez G., Zagorec M., Dusko Ehrlich S. **1999**. Relationships between arginine degradation, pH and survival in *Lactobacillus sakei*. FEMS Microbiol. Lett. 180. 297-304
 - Ciafardini G.; Marsilio V.; Lanza B.; Pozzi N. **1994**. Hydrolysis of oleuropein by *Lactobacillus plantarum* strains associated with olive fermentation. Appl. Environ. Microbiol. Vol. 60, No. 11.

- Codex Alimentarius. **2008**. Informe segunda reunión del codex sobre contaminantes de alimentos. La Haya, Países Bajos, (ALINORM 08/31/41. párrafo 190-191). www.codexalimentarius.net
- Cook R., McCaig N., McMillan J.M. B., Lumsden W.B.J. **1990**. Ethyl carbamate in alcoholic beverages. *Inst. Brew.* 96, 233.
- Costello, P. J., T. H. Lee, and P. A. Henschke. **2001**. Ability of lactic acid bacteria to produce N-heterocycles causing mousy off-flavour in wine. *Aust. J. Grape Wine Res.* 7:160-167.
- Costello, P. J., and P. A. Henschke. **2002**. Mousy off-flavour of wine: precursors and biosynthesis of the causative N-heterocycles 2-ethyltetrahydropyridine, 2-acetyltetrahydropyridine, and 2-acetyl-1-pyrroline by *Lactobacillus hilgardii* DSM 20176. *J. Ag. Food Chem.* 50:7079-7087.
- Costello P. **2005**. The chemistry of malolactic fermentation. Part 1: Malolactic Fermentation in wine: Understanding the science and the practice..Ed. Morenzoni R. Canada. Lalleman.4:1 – 4:11.
- Couto J.A., Campos F.M., Figueiredo A.R., Hogg T.A. **2006**. Ability of Lactic Acid Bacteria to Produce Volatile Phenols. *Am. J. Enol. Vitic.* 57 (2): 166-171.
- Coton E., Rollan G., Bertrand A., Lonvaud-Funel A. **1988**. Histamine-producing lactic acid bacteria in wines: early detection, frequency, and distribution. *Am J Enol Vitic.* 49: 199-204
- Coton, E., Rollan, G., Bertrand, A. y Lonvaud-Funel, A. **1998**. Histamine-producing lactic acid bacteria in wines: early detection, frequency and distribution. *Am. J. Enol. Vitic.* 49, 199-204.
- Coton, E., Rollan, G. C. y Lonvaud-Funel., A. **1998**. Histidine decarboxylase of *Leuconostoc oenos* 9204: purification, kinetic properties, cloning and nucleotide sequence of the *hdc* gene. *J. Appl. Microbiol.* 84, 143-151.
- Cox, D. J., T. Henick-Kling. **1989**. Chemiosmotic energy from malolactic fermentation. *J. Bacteriol.* 171:5750-5752.
- Cox, D. J., and T. Henick-Kling. **1990**. A comparison of lactic acid bacteria for energy-yielding (ATP) malolactic enzyme systems. *Am. J. Enol. Vitic.* 41:215-21.

- Crow V.L., Thomas T.D. **1982**. Arginine Metabolism in Lactic Streptococci. *J. Bacteriol.* 150,3: 1024 – 1032.
- Curran T.M., Lieou J., Marquis R.E. **1995**. Arginine deiminase systems and acid adaptation of oral streptococci. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 4494 – 4496.
- Cunin R., Glandsdorff N., Piérard A., Stalons V. **1986**. Biosíntesis and Metabolism of Arginine in Bacteria. *Microbiol. Rev.* 50: 314 – 352.
- D'Hooghe I., Vander Wauven C., Michelis J., Tricot C., Wilde P., Vanderleyden J., Stalon V. **1997**. The arginine deiminase pathway in *Rhizobium etli*: DNA sequence analysis and functional study of the *arcABC* genes. *J. Bacteriol.* 179, 23: 7403 – 7409.
- Davis C.R., Wibowo D., Eschenbruck R., Lee T.H., Fleet G.H. **1985**. Practical implications of malolactic fermentation: a Reviews. *American J. of Enol and Vitic.* 36(4): 290 – 301.
- Davis C.R., Wibowo D., Lee T.H. Fleet G.H. **1986**. Growth and metabolism of lactic acid bacteria during fermentation and conservation of some Austrian wines. *Food Techn. In Australia*, 38 (1): 35-40.
- De Angelis M., Mariotti L., Rossi J., Servli M., Fox P.F., Rollá, G., Gobbetti M. **2002**. Arginine catabolism by sourdough lactic acid bacteria: purification and characterization of the arginine deiminase pathway enzymes from *Lactobacillus sanfranciscensis* CB1. *Appl. Environ. Microbiol.* 68 (12). 6193 – 6201.
- Delfini, C. **1989**. Ability of wine malolactic bacteria to produce histamine. *Science des Aliments.* 9, 413-416.
- Dennis M.J. Massey R.C. Ginn R., Parker I., Crews C., Zimmerli B. Zoller O., Rhyn P., Osborne B. **1997**. The effect of azodicarbonamide concentration on ethyl carbamate concentration in bread and toast. *Food Addit. Contam.* 14, 95-100.
- Dicks L.M.T., Loubser P.A., Augustyn O.P.H., **1995**. Identification of *Leuconostoc oenos* from South African Fortified wines by numerical analysis of total soluble cell proteins patterns and DNA-DNA hybridizations. *J. of App. Bacteriol.* 79: 43 – 48.

- Dignan B.A., Fontaine M.C., Doebereiner A.H., Lee J.J., Mastroeni P., Dougan G., Goodacre J.A., Kehoe M.A. **2000**. Characterization of an isogenic mutant of *Streptococcus pyogenes* Manfredo lacking the ability to make streptococcal acid glycoprotein. *Infect. Immun.* 68: 2441 – 2448.
- Divol B., Tonon T., Morichon S., Gindreau E., Lonvaud-Funel A. **2003**. Molecular characterization of *Oenococcus oeni* genes encoding proteins involved in arginine transport. *J. Applied Microbiol.* 94 (4). 738 – 746.
- Dong Y., Chen Y.Y., Snyder J.A., Burne R.A. **2002**. Isolation and Molecular Analysis of the Gene Cluster for the Arginine Deiminase System from *Streptococcus gordonii* DL1. *Applied and Environm.* 68 (11). 5549-5553.
- Dong Y., Chen Y. Y., Burne R.A. **2004**. Control of expression of the arginina deiminasa operon of *Streptococcus gordonii* by *CcpA* and *Flp*. *J. Bacteriol.* 186:2511-2514.
- Endo A., Okada S. **2006**. *Oenococcus kitaharae* sp. nov., a non-acidophilic and non-malolactic-fermenting oenococcus isolated from a composting distilled shochu residue. *Int J Syst Evol Microbiol* 56 2345-2348.
- FAO/OMS Comité Codex sobre aditivos alimentarios y contaminantes de los alimentos. 25ª reunión, La Haya, del 22-26 de marzo de **1993**
- Federal Food Drug and Cosmetics Act” en **1972**
- Fernández, K., M. Dueñas, A. Irastorza, A. Bilbao, G. Del Campo. **1996**. Characterization and DNA plasmid analysis of ropy *Pediococcus* spp. strains isolated from Basque Country ciders. *Journal of Food Protection*, 59, 35–40.
- Feuillat, M., P. Bidan, and Y. Rosier. **1977**. Croissance de bactéries lactiques à partir des principaux constituants azotés du vin. *Ann. Technol. Agric.* 26:435-447.
- Field K.J. Lang C.M. **1998**. Hazards of urethane (ethyl carbamate): a review of literature. *Lab. Anim.* 22, 3, 255-262
- Fleet G.H., Lafon – Lafourcade S., Ribéreau-Gayon P. **1984**. Evolution of yeast and lactic acid bacteria during fermentation and storage of boudeaux wines. *Appl. And Environm. Microbiol.* 48 (5): 1034 – 1038.

- Fleet, G. H., Heard, G. M. **1993**. Yeasts-Growth during fermentation, pp.41. In Wine Microbiology and Biotechnology (Fleet G.H. ed.). Harwood Academic Publishers, Chur, Switzerland,
- Gamper M., Zimmermann A., Hass D. **1991**. Anaerobic regulation of transcription initiation in the *arcDABC* operon of *Pseudomonas aeruginosa*. J. bacterial. 173:4742-4750.
- García M. J., Zuñiga M., Uruburu F. **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.
- Granchi L. Raperi R., Roselli D., Vincenzini M. **1998**. Strain variation of arginine catabolism among malolactic *Oenococcus oeni* strains of wine origin. Ital. J. Food. Sci. 4 (10). 351-357.
- Grimaldi, A., H. McLean, and V. Jiranek. **2000**. Identification and partial characterization of glycosidic activities of commercial strains of the lactic acid bacterium *Oenococcus oeni*. *Am. J. Enol. Vitic.* 51/4:362-369.
- Gruening P., Fulde M., Valentin-Weigand P., Goethe R. **2006**. Structure, regulation, and putative function of the Arginine Deiminase System of *Streptococcus suis*. J. Bacteriol. 188, 2:361-369
- Guerrini S. Mangani S., Grnachi L., Vincenzini M. **2002**. Biogenic amine production by *Oenococcus oeni*. Current Microbiol. 44, 5, 374-378.
- Guilloux-Benatier M, Feuillat M. Ciolfi B. **1985**. Controbuton à l'étude de la dégradation de l'acide L-malique par les bactéries isolées du vin : effect stimulatn des autolysats de levures. Vitis 24 : 59-74
- Henick-Kling, T. **1986**. Growth and metabolism of *Leuconostoc oenos* and *Lactobacillus plantarum* in wine. PhD thesis. University of Adelaide, South Australia
- Henick-Kling, T. **1988**. Yeast and bacterial control in winemaking. In: Linskens, H. F. and J. F. Jackson, (Eds). *Modern Methods of Plant Analysis, New Series, Vol. 6*. Springer Verlag. 296-316.
- Henick-Kling, T. **1993**. Malolactic fermentation. G. H. Fleet (Ed.). Wine microbiology and biotechnology (pp. 289-326). Amsterdam: Harwood Academic.

- Henick-Kling T., Acree T. E., Krieger A. S, Laurent M.H., Edinger W.D. **1994**. Modification of wine flavour by malolactic fermentation. Vignevini, 4,41-47
- Henick-Kling, T. **1995**. Control of malo-lactic fermentation in wine: energetics, fl avour modifi cation and methods of starterculture preparation. Board, R. G., D. Jones, and B. Jarvis (Eds) Microbial fermentations: beverages, foods and feeds. Society for applied bacteriology symposium series No. 24. Blackwell Science. J. Appl. Bacteriol. Symposium Supplement 79:29S-37S
- Hernández, T.; Estrella, I.; Pérez-Gordo, M.; Alegría, E.G.; Tenorio, C.; Ruiz-Larrea, F.; Moreno-Arribas, M.V. **2007**.Contribution of *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus plantarum* to the non anthocyanin phenolic composición of red wine during malolactic fermentation. *J. Agric. Food Chem.*; 55 (13): 5260-5266.
- Herraiz T. **1993**. Amino acids and ethyl esters of amino acids in sparkling and “sur lie” wines. Italian journal of food science. vol. 5, no1, pp. 11-20
- Herraiz T. **1993**. Formation of ethyl esters of amino acids by yeast during the alcoholic fermentation of grape juice.
- Hidalgo Togores J. Tratado de Enología. Tomo II. Ed. Mundi prensa. **2002**. Madrid. España. ISBN:84-8476-134-7.
- Huang Z., Ough C. **1991**. Amino acids profiles of commercial grape juices and wines. Am. J. Enol. Vitic. 1991, 42, 261-267
- Hutkings R.W. **2006**. Microbiology and Technology of Fermented Foods. Iowa Ed. Blackwell publishing. ISBN: 978-0-8138-0018-9
- IARC. **2007**. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Vol. 96, Alcoholic Beverage Consumption and Ethyl Carbamate (Urethane). Lyon, France.
- Jonson S., Clausen E., Raa J. **1983**. Amino acid degradation by a *Lactobacillus plantarum* strain from fish. Syst. Appl. Microbiol. 4. 148 – 154.
- Kakimoto S., Sumino Y., Akiyama S.I., Nakao Y. **1989**. Purification and characterization of acid urease from *Lactobacillus reuteri*. Agric. Biol. Chem. 53. 1119-1125

- Kandler, O. **1983**. Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*. 49:209-224.
- Kodama S., Suzuki T., Fujinawa S., De la Teja P., Yotsuzuka F. **1991**. Prevention of ethyl carbamate formation in wine by urea degradation using acid urease. Proceeding of the international Symposium on Nitrogen in grapes and wine. Am. Society for Enol. And Viticulture 18- 19 June. Davis, Calif. pp 270-273
- Kodama S., Toshimasa S., Fujinawa S., De la Teja P., Yotsuzuka F. **1992**. Urea contribution to ethyl Carbamate formation in comercial wines during storage. *Am. J. Enol. Vitic*, 45:1:17-24.
- Kodama S., Suzuki T., Fujinawa S., De la Teja P., Yotsuzuka F. **1994**. Urea Contribution to Ethyl Carbamate Formation in Comercial Wines During Storage. *Am. Jo. Of Enology and Vitic*. 1 (45): 17-24.
- Kodama S., Yotsuzuka F. **1996**. Acid Urease: Reduction of Ethyl Carmabate Formation in Sherry under Simulated Baking Conditions. *J. of Food Science*. 61 (2): 304 - 307.
- Kodama S. **1996**. Optime Conditions for Effective Use of Acid Urease in Wine. *J Food Sci* 61(3) 548-551
- Konings W.N., Poolman B., Driessen AJ .**1989**. Bioenergetics and solute transport in lactococci. *Crit Rev Microbiol* 16:419–476
- Konings W.N., Lolkema J.S., Bolbuis H., van Veen H.W., Poolman B. y Driessen A.J.M. **1997**. The role of transport processes in survival of lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 71, 117-128.
- Konings, W.N. **2002**. The cell membrane and struggle for life of lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 82:3-27.
- Kondler L., Sekyere E.O., Stewart T.S., Schofield P. J. Edwards M.R. **1998**. Cloning and Expression of a Prokaryotic Enzyme, Arginine deiminase, from a primitive Eukaryote *Giardia intestinales*. *J. Biolol Chem*. 273, 8: 4470 – 4477.
- Krieger S. **2005**. MLF: History of MLB in wine! Published in malolactic fermentation in *Wine: Understanding the science and the practice*. Capitulo. Edit. Rich Morenzoni. Lalleman inc. Canada. ISBN: 0-9739147-0-X.

- Kuensch U. Termpferli A., Mayer K. **1974**. Conversion of arginine to ornithine during malolactic fermentation in a red Swiss wine. *Am. J. Of Oenology and Viticulture*. 25, 191-193.
- Kunkee, R. E. **1967**. Malolactic fermentation. *Adv. Appl. Microbiol.* 9:235-279.
- Kunkee, R. E. **1975**. A second enzymatic activity for decomposition of malic acid by malo-lactic bacteria. In: Carr, J. G., C. V. Cutting and G. C. Whiting (Eds) *Lactic acid bacteria in beverages and food*. Academic Press, London. 29-42.
- Kunkee, R. E. **1991**. Some roles of malic acid in the malolactic fermentation in winemaking. *FEMS Microbiol. Rev.* 88:55-72.
- Lafon-Lafourcade, S., Carre E., Ribereau-Gayon P. **1983**. Occurrence of lactic acid bacteria during the different stages of vinification and conservation of wines. *Applied and Enviromental Microbiology* 46 (4): 874 – 880.
- Landete J.M., Ferrer S., Pardo I. **2002**. Correlation between histidine decarboxilase activity and the presence of *hdc* gene. Xth International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology. París, Abstract book pp. 132.
- Landete J.M. Ferrer S. Pardo I. **2004**. Improved enzymatic method for the rapid determination of histamine in wine. *Food. Add. Contam.* 21, 1149-1154.
- Landete J.M. **2005**. Estudio y caracterización molecular de la producción de aminas biógenas por parte de bacterias lácticas de origen enológico. Tesis doctoral. Universitat de Valencia.
- Lehtonen, P. **1996**. Determination of amines and amino acid in wine- a review. *Am. J. Enol Vitic.* 47, 127 – 133.
- Le Jeune C., Lonvaud-Funel A., Ten Brink B., Hofstra H., Van der Vossen J.M.B.M. 1995. Development of a detection system for histidine decarboxylating lactic acidi bacteria based on DNA probes, PCR and activity test», *J Appl Bacteriol.* 78: 316-326.
- Leitao M.C., Teixeira H.C., Barreto M.T., Nad M.V., San Romao M.V. **2000**. Biogenic amines occurrence in wine. *Amino Acid Decarboxylase and*

- Proteolytic activities Expression by *Oenococcus oeni*. J. Agric. Food. Chem. 48: 2780 – 2784.
- Liu S.-Q., Pritchard G.G., Hardman M.J., Pilone G. J. **1994**. Citrulline production and ethyl carbamate (urethane) precursor formation from arginine degradation by wine lactic acid bacteria *Leuconostoc oenos* and *Lactobacillus buchnerii*. Am. J. Enol. Vitic; 45: 235-242.
 - Liu S.-Q., Pritchard G.G., Hardman M.J., Pilone G.J. **1995**. Occurrence of arginine deiminase pathway enzymes in arginine catabolism in wine lactic acid bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 61 (1). 310-316.
 - Liu S.Q., Pritchard G.G., Hardman M.J. Pilone G.J. **1996**. Arginine catabolism in wine lactic acid bacteria: is it via arginina deiminase pathway or the arginina –urease pathway? J. of Applied Microbiol. 81, 486-492.
 - Liu, S.Q., Pilone, G.J. **1998**. A review: Arginine metabolism in wine lactic acid bacteria and its practical significance. Journal of Applied Microbiology, 84, 315-327.
 - Liu, S.-Q. **2002**. Malolactic fermentation in wine – beyond deacidification. J. Appl. Microbiol. 92:589-601.
 - Löfroth G., Gejvall T. **1971**. Diethyl Pyrocarbonate : Formation of Urethan in Treated Beverages. Science 174 (4015) 1248 – 1250.
 - Lonvaud –Funel A., Desens C., Joyeux A., **1985**. Stimulation de la fermentation malolactique par l’addition au vin d’enveloppes cellulaires et différents adjuvants vde nature polysaccharidique et azotée. Conn Vigne Vin 19 : 229 – 240.
 - Lonvaud-Funel A., Joyeux A. **1994**. Histamine production by wine lactic acid bacteria: isolation of a histamine-producing strain of *Leuconostoc oenos*. J Appl Bacteriol. 77: 401 - 407.
 - Lonvaud –Funel A. **1995**. Microbiology of the malolactic fermentation: Molecular aspects. FEMS Microbiology Letters.126: 209-214.
 - Lonvaud-Funel, A. **1999**. Lactic acid bacteria in the quality improvement and depreciation of wine. Antonie van Leeuwenhoek. 76. 371 – 331.
 - Lonvaud-Funel A. **2001**. Biogenic aminas in wines: role of lactic acid bacteria. FEMS Microbiol Lett, 199, 1, 9-13.

- Lüthi E., Baur H., Gamper M., Brunner F., Villeval D., Mercenier A., Hass D. **1990**. *arc* operon for anaerobic arginine catabolism in *Pseudomonas aeruginosa* contains an additional gene, *arcD*, encoding a membrane protein. *Gene* 87:37-43.
- Maghnoij A., Franco T., Cabral S., Stalon V., Vander Wauven C. **1998**. The *arcABDC* gene cluster, encoding the arginine deiminasa pathway of *Bacillus licheniformis*, and its activation by the arginine repressor *ArgR*. *J. Bacteriol.* 180, 24:6468 – 6475.
- Maghnoij A. Abu-Bakr A.A.W.,Baumberg S., Stalon V., Vander Wauven C. **2000**. Regulation of anaerobic arginine in *Bacillus licheniformis* by a protein of the Crp/Fnr family. *FEMS Microbiol. Lett.* 191, 227-234.
- Manca de Nadra M. C., Ruiz Holgado P.A., Oliver, G., **1982**. Arginine dihydrolase activity in lactic acid bacteria. *Milchwissenschaft.* **37**, pp. 669–670.
- Manca de Nadra M. C., Nadra C. A., Ruiz Holgado A. P., Oliver G. **1986**. Synthesis of the arginine dihydrolase pathway enzymes in *Lactobacillus buchnerii*. *Current Microbiol.* 13 (5). 261-264
- Martinez-Múrcia A.J., Harland N.M., Collins M.D. **1993**. Phylogenetic analysis of some *Leuconostoc* and related organism as determined from large-subunit rRNA gene sequences : assesment of congruence of small and large –subunit rRNA derived trees. *J. App. Bacteriol.* 74 : 532 – 541.
- Matthews A., Grimaldi A., Walker M., Bartowsky E., Grbin P., Jiranek V. **2004**. Minireview: Lactic Acid Bacteria as a potential source of enzymes for use in vinification. *App. And Envir. Microbiol.* 70(10) 5715-5731
- Melamed, N. **1962**. Détermination des sucres résiduels du vin, leur relation avec la fermentation malolactique. *Ann. Techn.Agric.* 11:5-11, 107-119.
- Merck S. Budavari (editor). **1989**. The Merck Index, 11th Edition, no. 9789,
- Middlehoven W.J. **1964**. The pathway of arginine breakdown in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta.* 93, 650-652.
- Mira De Orduña, R., Liu, S.Q., Patchett, M.L., Pilone, G.J. **2000a**. Ethyl carbamate precursor citrulline formation from arginine degradation by malolactic wine lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 183, 31-35.

- Mira de Orduña R. Liu S.Q., Patchett M.L., Pilone G.J. **2000b**. Kinetics of the arginine metabolism of malolactic wine lactic acid bacteria *Lactobacillus buchnerii* CUC-3 and *Oenococcus oeni* Lo111. *J. App. Microbiol.* 89. 547 – 552.
- Mira de Orduña R., Patchett M.L., Liu S.Q., Pilone G.J. **2001**. Growth and arginine metabolism of the wine lactic acid bacteria *Lactobacillus buchnerii* and *Oenococcus oeni* at different pH values and arginine concentrations. *App. And Enviromental Microbiol* 67, 4. 1657 -1662
- Miranda, M., A. Ramos, M. Veiga-da-Cunha, M. C. Loureiro-Dias, and H. Santos. **1997**. Biochemical basis for glucose-induced inhibition of malolactic fermentation in *Oenococcus oeni*. *J. Bacteriol.* 179:5347-5354.
- Mirvish S.S. **1968**. The carcinogenic and metabolism of urethane and N-hydroxy urethane. *Adv. Cancer. Res.* 11, 1-42.
- Monteiro F.F. Trousdale E.K., Bisson L.F. **1989**. Ethyl carbamate formation in wine: use of radioactively labelled precursors to demonstrate the involved urea. *American J. of Enology and Viticulture.* 1 (40). 1-8.
- Montel M.C., Champomier M.C. **1987**. Arginine Catabolism in *Lactobacillus sake* isolated from meat. *App. Envirom. Microbiol.* 53, 11: 2683 – 2685.
- Moreno-Arribas, M. V., Polo C., Jordanes F., Muñoz R.. **2002**. Screening of Biogenic amine production by lactic acid bacteria isolated from grape must and wine. *International Journal of Food Microbiology.* 2610.
- Morenzoni, R. **1974**. The enzymology of malo-lactic fermentation. In: Webb, A. D. (Ed) *Chemistry of winemaking*. Adv. Chem. Ser. American Chemical Society, Washington, DC. 171-183.
- Muller C.J., Fugelsang K.C. **1996**. 3a6a-Dimethylglycoluril, the product of the interaction of urea and diacetyl, as a source of post-bottling ethyl carbamate in wines. *Viticulture and Enology Research Center. Research notes.* CATI publications# 960502
- Nehmé, B.; Ganga, M.A.; Lonvaud-Funel, A. **2005**. The arginine deiminase locus of *Oenococcus oeni* includes a putative arginyl-tRNA synthetase ArgS2 at its 3'-end. *Appl. Microbiol Biotechnol.*, 70, 590-597

- Ough C.S. **1976**. Ethylcarbamate in fermented beverages and foods. I. Naturally occurring ethylcarbamate. *J Agric Food Chem.* Mar-Apr;24(2):323-8.
- Ough C.S. **1976** Ethylcarbamate in fermented beverages and foods. II. Possible formation of ethylcarbamate from diethyl dicarbonate addition to wine. *J Agric Food Chem.* 1976 Mar-Apr; 24(2):328-31.
- Ough C.S., Crowell E.A., Mooney L.A. **1988**. Formation of Ethyl Carbamate Precursors During Grape Juice (Chardonnay) Fermentation. I. Addition of Amino Acids, Urea, and Ammonia: Effects of Fortification on Intracellular and Extracellular Precursors. *Am. J. Enol. Vitic.* 39:3:243-249.
- Ough, C.S., Crowell, E.A., Gutlove, B.R. **1988**. Carbamyl compound reactions with ethanol. *Amer. J. Enol. Vitic.* 39, 239-242.
- Ough C.S., Stevens D., Almy J. **1989**. Preliminary comments on effects of grape vineyard nitrogen fertilization on the subsequent ethyl carbamate formation in wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 40(3):219-220.
- Ough C S, Stevens D, Sendovski T, Huang Z, An D. **1990**. Factors contributing to urea formation in commercially fermented wines. *American Journal of Enology and Viticulture.* 41, 68
- Palacios-García A, Suárez-Martinez C., Heras Manso J.M. **2006**. ACE *Revista de Enología.* Ed. Rubes Editorial. Enoreports online (fechado el 28-02-2006).
- Pardo I., Zuñiga M. **1992**. Lactic acid bacteria in Spanish red wine, rosé and white musts and wines under cellar conditions. *J. Food. Sci.* 57: 392 – 405.
- Pasteur, L. **1866**. *Études sur le vin.* Paris : Masson. pp : 36-37.
- Patynowski R.J., Jiranek V., Markides A.J. **2002** Yeast viability during fermentation and sur lie ageing of a defined medium and subsequent growth of *Oenococcus oeni*. *Aust J Grape Wine Res* 8:62–69
- Peynaud E. **1989**. *La fermentation malolactique et les bactéries lactiques.* Aubin Imprimeur Connaissance et travail du vin Dunod. Bordas, Paris, France. Cap. 10. 110- 127.
- Pilone, G. J., Kunkee R.E. **1976**. Stimulatory effect of malo-lactic fermentation on the growth rate of *Leuconostoc oenos*. *Appl. Environ. Microbiol.* 32:405-408.

- Pilone G. J., Miranda G.C., Van Duivenboden J. **1991**. Characterization of wine lactic acid bacteria: Single broth cultura for tests of heterofermentation, manitol from fructose, and ammonia from arginine. *Am. J. Enol. Vitic.* 42(2). 153-157.
- Pripis-Nicolau, L., Revel G., Bertrand A., Lonvaud-Funel A. **2004**. Methionine catabolism and production of volatile sulphur compounds by *Oenococcus oeni*. *J. Appl. Microbiol.* 96:1176-1184.
- Poolman B., Driessen A.J.M., Konings W.N. **1987**. Regulation of Arginine – Ornithine exchange and the arginine deiminase pathway in *Streptococcus lactics*. *J. Bacteriol.* 169, 12: 5597 – 5604.
- Poolman B. **1993**. Energy transduction in lactic acid bacteria. *FEMS microbiology reviews.* 12, p. 125-148.
- Radler, F. **1963**. Über die Milchsäurebakterien des Weines und den biologischen Säureabbau. Übersicht. II. Physiologie und Ökologie der Bakterien. *Vitis.* 3:207-236.
- Radler, F. **1966**. Die mikrobiologischen Grundlagen des Säureabbaus in Wein. *Zentralbl. Bakteriol. Parasiten Abt. II.* 120:237-287.
- Radler F. **1992**. Malolactic fermentation and the effect of antimicrobial compounds on lactic acid bacteria. *Memorias de Universidad de Burdeos.* 35-42
- Rallu F., Gruss A., Maguin E. 1996. *Lactococcus lactics* and stress. *Antonie Van Leeuwenhoek,* 70. 243 – 251.
- Remize F., Gaudin A., Kong Y., Guzzo J. Alexandre H., Krieguer S., Guilloux-Benatier M. **2006**. *Oenococcus oeni* preference for peptides: qualitative and quantitative analyses of nitrogen assimilation. *Arch Microbiol* 185: 459-469.
- Renault, P., Gaillardin, C., Heslot, H. **1988**. Role of malolactic fermentation in lactic acid bacteria. *Biochimie* 70:375-379.
- Ribéreau-Gayon, J., E. Peynaud, P. Ribéreau-Gayon, and P. Sudraud. **1975**. Sciences et Techniques du vin. *Traité d'oenologie* (Tome 2). Dunod, Paris.

- Ribéreau-Gayon P., Dubordieu D., Donèche B., Lonvaud A. **2000a**. Handbook of Enology Vol. 1: The microbiology of wine and vinifications, John Wiley & Sons Ltd.
- Ribéreau-Gayon P., Glories Y., Maujean A., Dubourdieu D. **2000b**. Handbook of Enology Vol. 2: The chemistry of wine. Stabilization and treatments, Londres, John Wiley & Sons Ltd.
- Riffkin H.L., Wilson R., Howie D., Muller S.B. **1989**. Ethyl carbamate formation in the production of pot still whisky. J. Inst. Brewing, 2, 95. 115-119.
- Rosi I., Gheri A., Domizio P., Fia G. **2000**. Production de macromolécules pariétales de *Saccharomyces cerevisiae* au cours de la fermentation et leur influence sur la fermentation malolactique. *Revue des Enologues*. 94:18-20.
- Ruepp, A., Soppa J. **1996**. Fermentative Arginine Degradation in *Halobacterium salinarum* (formerly *Halobacterium halobium*): Genes, Gene Products, and Transcripts of the *arcRACB* Gene Cluster. J. of bacterial. 178, 8: 4942 - 4947.
- Safety Evaluation of certain contaminants in food. World Health Organization. Series N. 55, **2006**
- Sakamoto, K., Konings, W.N. **2003**. Beer spoilage bacteria and hop resistance. International Journal of Food Microbiology, 89, 105-124.
- Sauvageot N., Gouffi K., Laplace J.M., Auffray Y. **2000**. Glycerol metabolism in *Lactobacillus collinoides* productions of 3-hydroxypropionaldehyde, a precursor of acrolein. Int. J.of Food Microbiol. 55 (1-3): 167 - 170.
- Schalatter J., Lutz W.K. **1990**. The carcinogenic potential of ethyl carbamate (urethane): risk assessment at human dietary exposure levels. Food Chem. Toxicol. 28. 205-211.
- Schleifer, Karl Heinz. Gram-Positive Cocci. **1986**. Bergey's Manual of Systematics Bacteriology Vol 2 VII. Section 12. 999-1079. Vol 2. Baltimore: The Williams and Wilkins Co.
- Schmahl D., Port R., Wardendorf J. **1977**. A dose-response study of urethane carcinogenesis in rats and mice., Int J Cancer 19), 77-80.

- Schriek S., Rückert C., Staiger D., Pistorius E.K., Michel K.P. **2007**. Bioinformatic evaluation of L-arginine catabolic pathway in 24 cyanobacteria and transcriptional analysis of genes encoding enzymes of L-arginine catabolism in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *BMC Genomics*. 8. 437.
- Sotomayor R.E., Collins T.F.X. **1990**. Mutagenicity, metabolism, and DNA interactions of urethane. *Toxicol. Ind. Health*. Jan. 1, 6. 71-108.
- Spano, G., Beneduce, L., Tarantino D., Giammanco G.M., Massa, S. **2004**. Preliminary characterization of wine lactobacilli able to degrade arginine. *Word J. Microbiol and Biotech*. 18. 821-825.
- Spano, G., Chieppa, G., Beneduce, L. Massa, S. **2004**. Expression analysis of putative *arcA*, *arcB* and *arcC* genes partially cloned from *Lactobacillus plantarum* isolated from wine. *J. Appl. Microbiol.*, 96, 185-193.
- Spano G., Beneduce L., de Palma L., Quinto M., Vernile A., Massa S. **2006**. Characterization of wine *Lactobacillus plantarum* by PCR-DGGE and RAPD-PCR analysis and identification of *Lactobacillus platarum* strains able to degrade arginine. *Wordl J. Microbiol and Biotech*. 22. 769-773.
- Spano, G., Mass S., Arena M.E., Manca de Nadra M.C. **2007**. Arginine metabolism in wine *Lactobacillus plantarum*: in vivo activities of the enzymes arginine deiminase (ADI) and ornithine transcarbamilase (OTCase). *Annals of Microbiol*. 57(1). 67-70.
- Spano, G., A. Lonvaud-Funel, O. Claisse, and S. Massa. **2007**. In vivo PCR-DGGE analysis of *Lactobacillus plantarum* and *Oenococcus oeni* populations in red wine. *Curr. Microbiol*. 54: 9-13.
- Sponholz W.R. **1991**. Nitrogen compounds in grapes, must and wine. In: *Proceeding of the International Symposium on Nitrogen in Grapes and Wine*. ASEV ed.
- Sponholz W.R. **1992**. The breakdown of arginine by lactic acid bacteria and it's relation to ethylcarbamate production. *Biology Oggi VI* (1-2). 15-24.
- Sponholz W.-R. **1993**. *Wine Spoilage by Microorganisms*. En: G.H. Fleet: *Wine Microbiology and Biotechnology* (ed.), Suiza, Hardwood Academic Publishers, : 395-420

- Stalon V., Ramos F., Piérard A., Wiame J.M. **1972**. Regulation of the catabolic ornithine carbamoyltransferase of *Pseudomonas fluorescens*. A comparison with the anabolic transferase and with a mutationally modified catabolic transferase. Eur. J. Biochem. 18; 29 (1): 25 – 35.
- Stevens D.F., Ough C.S. **1993**. Ethyl Carbamate Formation: Reaction of Urea and Citrulline with Ethanol in Wine Under Low to Normal Temperature Conditions Am. J. Enol. Vitic. 44:3:309-312.
- Stuart M.R., Chou L.S., Weimer B.C. **1999**. Influence of Carbohydrate starvation and Arginine on culturability and Amino Acid Utilization of *Lactococcus lactics* subs. *lactics*. App. Environ. Microbiol. 65, 2: 665 – 673.
- Suarez Lepe J.A. E Iñigo Leal B. **2004**. Microbiología enológica. Fundamentos de Vinificación. 3 edición. Ediciones mundi-prensa. Madrid
- Tegmo-Larsson I.M. Spittler T.D. **1990**. Inhibition by wine of tumorigenesis induced by ethyl carbamate formation in wine during storage. J. Food Sci. 55, 4, 1166-1169.
- Tegmo-Larsson I.M., Henick-Kling T. **1990a**. The effect of fermentation and extended lees contact on ethyl carbamate formation in wine. Am. J. Enol. Vitic. 41:269-272.
- Tegmo Larsson I.M. y Henick Kling T. **1990b**. Ethyl carbamate precursors in grape juice and the efficiency of acid urease on their removal. Am. J. Enol. Vitic. 41(3) 189-192.
- Terrade, N., Mira de Orduña R. **2006** Impact of winemaking practices on arginine and citrulline metabolism during and after malolactic fermentation Journal of Applied Microbiology 101 (2) , 406–411
- Terrade N. Mira de Orduña R. **2006**. Energetics of arginine and citrulline degradation in wine lactic acid bacteria. *J. Appl. Microbiol.* 101. 406-411
- Terrade N., Mira de Orduña R. **2009**. Determination of the essential nutrient requirements of wine-related bacteria from the genera *Oenococcus* and *Lactobacillus*. Int. J. Food Microbiol. 133. 8 – 13.
- Terrade N., Mira de Orduña R. **2009**. Arginine and citrulline do not stimulate growth of two *Oenococcus oeni* strains in wine. FEMS Microbiol Lett. 209. 98-104.

- Tonon T., Lonvaud-Funel A. **2000**. Metabolism of arginine and its positive effect on growth and revival of *Oenococcus oeni*. J. App Microbiol. 89, 3. 526-531
- Tonon, T., Bourdineaud, J.P., Lonvaud-Funel, A. **2001a**. The *arcABC* gene cluster encoding the arginine deiminase pathway of *Oenococcus oeni*, and arginine induction of a CRP-like gene. Res. Microbiol. 152, 653-661
- Tonon, T.; Bourdineaud, J.P.; Lonvaud-Funel, A. **2001b**. Catabolisme de l'arginine par *Oenococcus oeni* : aspects énergeéiques et génetiques. Lait, 81, 139-159.
- Tonon T., Lonvaud –Funel A. **2001c**. Étude génetique de L'opéron arginina deiminase chez *Oenococcus oeni*. Capitulo de libro. Memorias de la Universidad de Bordeous. 238-241.
- Tonon, T.; Lonvaud-Funel, A. **2002**. Arginine metabolism by wine *Lactobacilli* isolated from wine. Food Microbiol., 19, 451-461
- Trioli G., Ough C.S. **1989**. Causes for inhibition of an acid urease from *Lactobacillus fermentus*. Am. J. Enol. Viticul 40. 245-252
- Trioli G., Colagrande O. **1991**. El Carbamato de etilo en vino. Viticultura. 45-49.
- TRS 930-JECFA 64/31, 2005
- Uthurry, C.A.; Varela, F.; Colomo, B.; Suárez Lepe, J.A.; Lombardero, J.; García del Hierro, J.R. **2004**. Ethyl carbamate concentrations of typical Spanish red wines. *Food Chem.*, 88, 329-336.
- Uthurry C.A., Suárez Lepe J.A., Lombardero J., García del Hierro, J.R. **2006**. Ethyl carbamate production by selected yeast and lactic acid bacteria in red wine. Food Chem. 94. 262 – 270.
- Vahl M. **1993**. A survey of ethyl carbamate in beverages, bread and acidified milks sold in Denmark. Food Add and Contaminants, 5 (10). 585-592.
- Varnan A.H., Sutherland J.P. **1997**. Bebidas-Tecnología, química y microbiología. Acribia AS. España. P.417-465.
- Vaughn, R. H., Techlistcheff, A. **1957**. Studies of the malolactic fermentation of California table wines. I. An introduction to the problem. Am. J. Enol. Vitic. 8:74-79.

- Verhoogt H.J.C., Smit H., Abee T., Gamper M., Driessen A. J. M., Haas D., Konings W.N. **1992**. *arcD*, the first gene of arc operon for anaerobic arginine catabolism in *Pseudomonas aeruginosa*, encodes an arginine – ornithine exchanger. *J. Bacteriol.* 174, 5: 1568 – 1573.
- Versari, A., Parpinello G.P., Cattaneo M. **1999**. *Leuconostoc oenos* and malolactic fermentation in wine: a review. *J.Ind. Microbiol. Biotechnol.* 23:447-455.
- Vidal M.T., M. Poblet, M. Constante and Albert Bordons (2001). Inhibitory effect of Copper and Dichlofluanid on *Oenococcus oeni* and Malolactic Fermentation. *Am.J. Enol. Vitic.* 52:3. p.223-229.
- Vivas, N. M. Augustin, and A. Lonvaud-Funel. **1997a**. Influence of oak wood and grape tannins on the lactic acid bacterium *Oenococcus oeni* (*Leuconostoc oenos*, 8413). *J. Sci. Food Agric.* 80:1675-1678
- Von Babo, Freiherr. **1837**. Die Mängel und Krankheiten des Weines und deren Verbesserung. In: *Kurze Belehrung über die zweckmäßige Behandlungsart der eingekellerten Weine*. Heidelberg. 59-73.
- Vrancken G. Romaux T, Wouters D., Leroy F., De Vuyst L. **2009**. The arginine deiminase pathway of *Lactobacillus fermentum* IMDO 130101 responds to growth under stress conditions of both temperature and salt. *Food Microbiol.* Doi:10.1016/j.fm.2009.07.006
- Walter G., Winterlin W., Fonda H., Seiber J. **1974**. Gas Chromatographic Analysis of Urethane (Ethyl Carbamate) in wine. *J. of Agricultural and Food Chemistry*, 6, 22. 944-947.
- Wibowo, D.; Eschenbruch, R.; Davis, C. R.; Fleet, G.H.; Lee, T.H. **1985**. Occurrence and growth of lactic acid bacteria in wine: a Reviews. *Amer. J. Enol. Vitic.*, 36, 302-313
- Yoshizawa K, Takahashi K. **1988**. Utilization of urease for urea decomposition in Sake. *J Brew Soc Jpn* 83:142–144
- Zaunmüller T., Eichert M., Richter H., Unden G. **2006**. Variation in the energy metabolism of biotechnologically relevant heterofermentative lactic acid bacteria during growth on sugars and organics acids. *App. Microbiol. Biotech.* 72. 421 - 429.

- Zickler, F. **1964**. Mikrobiologische Untersuchungen des biologischen Säureabbaus in Wein. *Zentr. Bakteriol. Parasitenk. Abt. II* 117:702-713
- Zimmerli B., Schlatter J. **1991**. Ethyl carbamate: analytical methodology, occurrence, formation, biological activity and risk assessment. *Res. Genetic Toxicol.* 259, 325-35.
- Zoecklein B., Fugelsang K., Gump B., Nury F. **1995**. Wine Analysis and production. Kluwer Academic /Plenum Publishers. NY. ISBN:0.8342-1701-5
- Zuñiga M., Champomier-Verges M., Zagorec M., Perez-Martinez G. **1998**. Structural and functional analysis of the gene cluster encoding the enzymes of the arginine deiminasa pathway of *Lactobacillus sake*. *J. Bacteriol.* 180: 4154-4159.
- Zúñiga M., Pérez G., González-candelas F. **2002**. Evolution of arginine deiminase (ADI) pathway genes. *Mol. Phyl. and Evol.* 25, 3: 429-444.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
ESTUDIO BIOQUÍMICO Y MOLECULAR DE LA PRODUCCIÓN DE PRECURSORES DE CARBAMATO DE ETILO POR BACTERIAS LÁCTICA
ASOCIADAS AL PROCESO DE VINIFICACIÓN
ISBN:978-84-693-6429-1/DL:T-1631-2010

II.

JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
ESTUDIO BIOQUÍMICO Y MOLECULAR DE LA PRODUCCIÓN DE PRECURSORES DE CARBAMATO DE ETILO POR BACTERIAS LÁCTICA
ASOCIADAS AL PROCESO DE VINIFICACIÓN
ISBN:978-84-693-6429-1/DL:T-1631-2010

JUSTIFICACIÓN

Actualmente, y a pesar de las importantes mejoras alcanzadas, se plantea más que nunca la necesidad de garantizar un alto grado de calidad y seguridad alimentaria. La seguridad alimentaria tiene una prioridad a nivel internacional y no hay tolerancia sobre la presencia de patógenos o cualquier otro peligro en los alimentos fermentados.

Los alimentos fermentados han sido consumidos y preferidos desde la prehistoria. Actualmente tienen en general una vigilancia estricta de los parámetros de calidad, debido a que el producto final depende de la intervención y desarrollo de microorganismos. Hay razones de peso para que los alimentos fermentados sean elegidos: preservación y conservación de alimentos por varios días sin perecer, un mayor perfil nutricional, mayor funcionalidad, ganancia en propiedades organolépticas, inocuidad y un mayor valor económico. El consumo de estos productos han tenido un gran interés como alimentos funcionales ya que hay estudios que avalan su potencial efecto positivo sobre la salud, como el vino tinto ayuda a reducir el riesgo de infarto cardiaco, y las bacterias lácticas presentes en las leches cultivadas como el yogur podrían influir positivamente en la salud gastrointestinal.

Los diferentes países, individual o colectivamente, se han dotado de diversas normativas con el fin de garantizar la salud humana y las condiciones de producción y comercialización de alimentos entre los países (Codex Alimentarius, 2007; OIV, 2006a). Dentro del ámbito estrictamente vitivinícola, la normativa de la Organización Internacional de la Viña y el Vino es la principal referencia a nivel internacional. El Reglamento (CE) 1493/1999 del Consejo, de 17 de mayo, por el cual se establece la organización común del mercado vitivinícola (OCM), y las disposiciones que lo desarrollan, son la base legal más inmediata en la Unión Europea (UE) y el Estado español.

El consumo de vino forma parte de los hábitos alimentarios cotidianos de la mayoría de la población adulta, tanto en España como en el resto de los países productores de vino. Es considerado parte de la dieta, por el aporte nutricional y

sus efectos beneficiosos (composición fenólica, contenido de resveratrol y el mismo etanol que le otorgan propiedades antioxidantes, antimutagénicas y antiagregantes de plaquetas, entre otras). La composición y elaboración tiene un prestigio reconocido por sus características sensoriales cada vez más cuidadosamente buscadas, lo cual hace que sea altamente competitivo a nivel nacional e internacional. Desafortunadamente se le ha relacionado con la probabilidad del aporte de sustancias tóxicas como la presencia de los metales pesados, los plaguicidas, las aminas biógenas, el carbamato de etilo y la ocratoxina A, entre otros.

En este trabajo se pretende profundizar en la producción de precursores del Carbamato de Etilo por parte de las bacterias lácticas que pueden estar presentes en las tempranas fases de la vinificación o en contados casos aparecer después de la fermentación maloláctica.

HIPÓTESIS

La hipótesis de este trabajo es que un mejor conocimiento a nivel bioquímico y genético de la ruta de la arginina deiminasa (ADI) en las bacterias lácticas relacionadas con el vino puede servir para ver el efecto de las diversas condiciones y variables del vino en la posible aparición de precursores de carbamato de etilo. Con este conocimiento, se podrá actuar para minimizar la producción del carbamato de etilo.

OBJETIVOS

Este tesis doctoral está enmarcada en un proyecto financiado AGL2000-0827-C02-02, titulado: *“Minimización de la producción de aminas biógenas y de carbamato de etilo durante la fermentación maloláctica mediante selección y caracterización molecular de bacterias lácticas y el estudio de la influencia de las condiciones de vinificación”*.

En este trabajo de investigación se ha desarrollado uno de los objetivos de este proyecto que se cita a continuación, y que sería el objetivo general de este estudio que se presenta:

Estudio del riesgo de producción de precursores de carbamato de etilo por parte de la microbiota láctica asociada al proceso de vinificación, a nivel bioquímico y molecular, para desarrollar sistemas de detección de estas actividades y definir sistemas de control que eviten la proliferación de cepas no deseadas en este aspecto.

En base a la hipótesis establecida, este objetivo se desglosó en los siguientes sub-objetivos, que se abordan en diferentes etapas convergentes unas en otras, tratadas en los diversos capítulos.

1. Identificación de cepas de bacterias lácticas aisladas en vinificaciones reales y determinación de su capacidad de degradación de la arginina.
2. Estudio de la capacidad de hidrolizar la arginina por parte de diferentes especies de bacterias lácticas, asociadas a alimentos fermentados.
3. Desarrollo de técnicas moleculares para la detección de los genes implicados en la ruta de degradación de la arginina y estudio de la presencia de dichos genes en diferentes especies de bacterias lácticas.
4. Estudio de la expresión de los genes de degradación de la arginina en diferentes condiciones de vinificación.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
ESTUDIO BIOQUÍMICO Y MOLECULAR DE LA PRODUCCIÓN DE PRECURSORES DE CARBAMATO DE ETILO POR BACTERIAS LÁCTICA
ASOCIADAS AL PROCESO DE VINIFICACIÓN
ISBN:978-84-693-6429-1/DL:T-1631-2010

III.

RESULTADOS

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
ESTUDIO BIOQUÍMICO Y MOLECULAR DE LA PRODUCCIÓN DE PRECURSORES DE CARBAMATO DE ETILO POR BACTERIAS LÁCTICA
ASOCIADAS AL PROCESO DE VINIFICACIÓN
ISBN:978-84-693-6429-1/DL:T-1631-2010

III. 1.

IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS LÁCTICAS DEL VINO RELACIONADAS CON LA DEGRADACIÓN DE ARGININA

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
ESTUDIO BIOQUÍMICO Y MOLECULAR DE LA PRODUCCIÓN DE PRECURSORES DE CARBAMATO DE ETILO POR BACTERIAS LÁCTICA
ASOCIADAS AL PROCESO DE VINIFICACIÓN
ISBN:978-84-693-6429-1/DL:T-1631-2010

Introducción

Uno de las principales acciones de las bacterias lácticas (BL) en el vino es generar una serie de cambios organolépticos que contribuyen a su complejidad y a su estabilidad microbiológica (Davis y col, 1985). Durante la vinificación se pueden encontrar toda una serie de especies de BL entre las que se cuentan *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Pediococcus* y *Oenococcus*, cuya especie *O. oeni* finalmente se encarga del desarrollo de la fermentación maloláctica (Wibowo y col., 1985).

Diferentes aspectos de las BL del vino han sido evaluados en diversos trabajos (Wibowo y col., 1985; Davis y col 1985; Henick-Kling, 1993; Lonvaud – Funel 1995; Liu y col., 1998; Lonvaud –Funel y col., 1999; Arena y col., 1999; 2002; 2005 Tonon y col., 2001; Terrade y col., 2009^a y ^b). La degradación de la arginina era considerada como una característica fenotípica más para tipificar las especies, pero se ha demostrado poco fiable como herramienta taxonómica puesto que dentro del mismo género se han descrito especies como arginina – variable. La clasificación bacteriana resultante era bastante complicada por el hecho de que algunas cepas arginina ⁻ pueden convertirse en arginina ⁺, como esta descrito para *Lactococcus lactis* Subs. *cremoris* (Davey y col., 1993). En el caso de las BL del vino no esta descrito que esta situación pueda suceder (Liu y col., 1998), pero se debe extremar el cuidado a la hora de tomar esta característica como clasificatoria para cepas que se utilizan como iniciadores de fermentación.

La presencia del CE en alimentos fermentados y especialmente al final de vinos tintos empezó a ser una gran preocupación en la década de los 70 (Ough y col., 1976; Walter y col, 1974; Vahl, 1993). La relación de la degradación de la arginina por parte de las BL con la producción de precursores del carbamato de etilo (CE) ha sido estudiada como lo demuestran los estudios de Sponholz., 1992; Liu y col., 1994; Champomier, 1999.

Por lo tanto la identificación a nivel de cepas se convirtió en este trabajo en un paso clave. El estudio del comportamiento frente a la arginina de cepas aisladas de vinos era un punto crítico para definir las metodologías a emplear.

En el caso de las BL, al ser un grupo taxonómicamente cercano, requiere una acurada identificación y caracterización en todos sus aspectos.

En los últimos años con el desarrollo de la biología molecular, el análisis genotípico ha pasado a ser un complemento indispensable del análisis fenotípico.

Identificación fenotípica

En la identificación de cepas aisladas desde mosto o vino se estudia la morfología, la movilidad, el tipo de pared celular (tinción de Gram), así como la presencia de la enzima catalasa, hecho que hace distinguir las bacterias lácticas del resto de microorganismos presentes en vino (Lafon-Lafourcade y col., 1983).

Existen en el comercio galerías bioquímicas destinadas a la identificación de bacterias lácticas hasta su especie como API 50 CHL (Analytab Products, Plainview, USA), que permite tener un perfil de la fermentación de azúcares, u otras complementarias como API ZYM o el API 20E que permite tener un perfil bioquímico general. Aunque hay una gran ventaja sobre los análisis tradicionales, estas galerías no poseen suficiente sensibilidad para algunas cepas de bacterias lácticas aisladas de vino. (Pardo y col., 1988; Masqué C. 1996).

Otras técnicas empleadas en la identificación de bacterias lácticas son, el análisis inmunológico (Garvie, 1984), los perfiles de sensibilidad a bacteriófagos (Tenreiro y col., 1993), perfiles de proteínas totales (Dicks y col., 1995) y el análisis cuantitativo de los constituyentes de la pared celular (Van Vuuren y col., 1993), entre otros.

Análisis genotípico

Las técnicas descritas aplicadas para la identificación de bacterias lácticas en el vino a nivel genotípico son variadas, desde el dot-blot o la hibridación con sondas de DNA total, el ribotipaje o RFLP, el análisis por restricción enzimática (REA), macrorestricción-PFGE, cada una de ellas con diferentes resultados, algunos más discriminativos que otros (Lonvaud-Funel y col., 1989; Zapparoli y col., 1998^a y 1998^b).

La identificación de las BL mediante el método de 16s-ARDRA (Rodas y col, 2003) se ha convertido en una herramienta excepcional, para una clara

identificación a nivel de especie. Para algunas especies más complejas se han diseñado PCR específicas como la utilizada en este trabajo para la identificación de *L. plantarum*, *L. paraplantarum* y *L. pentosaceus* mediante el método descrito por Torriani y col. (2001).

El predominio de técnicas basadas en el uso de la PCR se ha hecho evidente en los últimos años más centrados en identificar cepas de *O. oeni*, estableciéndose métodos de amplificación de fragmentos específicos de DNA, a nivel de especie de forma relativamente rápida y segura.

Para *O. oeni* se han descrito dos protocolos de PCR específica de especie, uno publicado por Zapparoli y col., (1998b), basado en la amplificación de un fragmento del gen de la enzima maloláctica; y otro descrito por Bartowsky y col., 1999, basado en la amplificación de un fragmento de la región ADNr 16S. En ambos casos se obtiene una identificación fiable de *O. oeni*, como especie.

A nivel de cepa se han hecho avances al aplicar la RAPD-PCR (Random Amplified Polymorphic DNA), que se basa en el polimorfismo generado por la amplificación al azar de fragmentos de DNA por la PCR utilizando un cebador de secuencia inespecífica, para lo cual no se requiere conocer previamente la secuencia de ADN a estudiar. Reguant y col, 2003, consiguió por combinación de 2 cebadores diferentes en la misma PCR (múltiple RAPD-PCR) generar perfiles de cepas, fácilmente tipificables y reproducibles.

Una nueva herramienta molecular a este nivel se consiguió en el trabajo que aquí se muestra a continuación, publicado en el *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, ya que la mayoría de cepas aisladas desde vino eran *O. oeni*. La identificación de *O. oeni* a nivel de especie y cepa en una misma PCR se logró al incorporar a la reacción de RAPD-PCR el cebador faltante de la reacción de la específica. La PCR múltiple permite obtener en el mismo gel la banda del gen de la enzima maloláctica que indica la especie a la vez que un perfil tipificado de la cepa evaluada, reduciendo en tiempo el trabajo de caracterización de cepas aisladas durante el seguimiento de vinificaciones, y comprobar rápidamente el grado de implantación de las cepas inoculadas.

Algunas de estas vinificaciones se inocularon con cepas a las que previamente se les hizo un estudio previo de degradación de la arginina, observando que tenían un muy bajo nivel de degradación, entre el 3-23% (ver

capítulo 2, tabla 2) suponiendo este rango bastante bajo para suponerlas un riesgo para el desarrollo de precursores del carbamato de etilo.

Estas cepas fueron inoculadas en vino tempranillo, se hizo un seguimiento de la FML y luego se identificaron las cepas que llevaron a cabo las fermentaciones. Las cepas recuperadas en los recuentos de viabilidad del último día de fermentación fueron evaluadas por la técnica molecular descrita a continuación, obteniendo resultados para las diferentes cepas y vinos. Las cepas obtenidas al final de las vinificaciones eran *O. oeni* y en la mayoría de casos pertenecían a las cepas inoculadas al inicio.

**Metodo de PCR multiplex para la simultánea identificación de
especie y tipificación de cepas de *Oenococcus oeni***

*A multiplex PCR method for simultaneous species identification and
strain typification of *Oenococcus oeni**

Articulo publicado:

World Journal of Microbiology and Biotechnology

2009, 25: 15 – 18.

A multiplex PCR method for simultaneous species identification and strain typification of *Oenococcus oeni*

María Isabel Araque, Albert Bordons, Cristina Reguant*

Departament de Bioquímica i Biotecnologia, Universitat Rovira i Virgili,
Carrer Marcel·lí Domingo s/n, 43007, Tarragona, Catalonia, Spain

Cristina Reguant* (Corresponding author):

Dept. Bioquímica i Biotecnologia, Universitat Rovira i Virgili

Carrer Marcel·lí Domingo s/n, 43007 Tarragona, Catalonia, Spain

Email: cristina.reguant@urv.net

Phone: +34 977558280

Fax: +34 977558232

Abstract

Selected starter cultures of *Oenococcus oeni* are widely used to initiate malolactic fermentation (MLF) in wine. Nevertheless, the inoculated culture does not always develop as expected and undesired strains can grow causing wine spoilage. Therefore, methods that can reliably differentiate *O. oeni* strains are essential to monitor the population dynamics of MLF. This work presents a new multiplex PCR method that allows the simultaneous species identification and strain typification of *O. oeni*, based on the combined use of species-specific PCR primers and a RAPD (Random Polymorphic DNA)-PCR primer. This method represents an useful tool for the control of wine MLF.

Key words: *Oenococcus oeni*, malolactic fermentation, wine, Multiplex PCR, identification, strain typification.

Introduction

Oenococcus oeni is the main bacterial species responsible for malolactic fermentation (MLF) in wine (Van Vuuren and Dicks 1993). MLF deacidifies wine by converting L-malic acid into L-lactic acid. The metabolic activity of *O. oeni* has been described to improve organoleptic wine quality due to the acidity decrease and the production of desirable aromas (Henick-Kling 1993). Nevertheless, changes in wine composition caused by *O. oeni* are strain dependent (Lonvaud-Funel 1999). For this reason, selected *O. oeni* starter cultures are used to perform MLF in wine (Maicas et al. 2000). Since starter cultures do not always develop as expected, a supervision of *O. oeni* strains evolution during MLF is advisable.

Several molecular methods have been used to identify *O. oeni*, such as species-specific PCR (Zapparoli et al. 1998) or PCR-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (PCR-DGGE) (Spano et al. 2007). At the strain level, the significant *O. oeni* intraspecific homogeneity complicates the typification of different strains (Zavaleta et al. 1996, Lechiancole et al. 2006). Different methods have been used in the attempts to distinguish *O. oeni* strains, such as Restriction Enzyme Analysis-Pulsed Field Gel Electrophoresis (REA-PFGE) and Random Polymorphic DNA-PCR (RAPD-PCR) (Zapparoli et al. 2000, Guerrini et al. 2003). Whatever the choice of methods, two analyses are required to determine the species and the type of strain. This results in a time-consuming process when the control of a MLF starter strain is pursuit.

In this work, a multiplex PCR based method has been optimised, accomplishing the simultaneous identification of *O. oeni* isolates and the strains typification by a single PCR reaction. The identification of *O. oeni* at the species level is based on a species specific PCR (Zapparoli et al. 1998). The strain typification is based on the use of a RAPD primer, Coc (Coconcelli et al. 1995), successfully applied in the differentiation of *O. oeni* strains in a previous work (Reguant and Bordons 2003).

Materials and methods

Strains and culture conditions.

Lactic acid bacteria strains used: *O. oeni* mf15, PSU-1, and Vitilactic; *Leuconostoc mesenteroides* Bifi 54, *Pediococcus pentosaceus* Enolab 4214 and *Lactobacillus brevis* Enolab 3824. Sources of the strains: Mf, authors' collection, Tarragona, Spain; PSU-1, Pennsylvania State University, USA; Vitilactic, Martin Vialatte Oenologie, Epernay, France; Enolab, Dpt. Microbiologia, Fac. Biologia, Universitat de València, Spain; Bifi, Instituto de Fermentaciones Industriales, CSIC, Madrid, Spain. These strains were grown anaerobically at 27°C in MRS (De Man et al. 1960) supplemented with 4 g/l DL-malic acid and 5 g/l D(-)-fructose.

Optimization of multiplex PCR reaction conditions.

To establish the optimum primer ratio for the simultaneous detection of species and strains, several oligonucleotide concentrations were tested at different annealing temperatures (T_a) (Table 1). Other PCR components were always used as follows: 0.25 mM dNTP (Roche, Darmstadt, Germany), 3.5 mM $MgCl_2$, 1x Ecotaq Buffer and 0.5 U Taq polymerase (Ecogen, Barcelona, Spain) in a final volume of 20 μ l. In order to determine the optimum temperature for both On1/On2 and Coc primers, several temperatures were tested (Table 1). The PCR program used for all the tested conditions was: 5 min at 94°C; 30 cycles: 1 min at 94°C, 1 min at the tested T_a (Table 1), 1 min at 72°C; and 10 min at 72°C. For all PCR reactions, 10 ng of total DNA were used. DNA was extracted as previously described (Reguant and Bordons 2003). Finally, several formamide concentrations (Table 1) were assayed.

Table 1. Tested conditions for multiplex PCR optimization. Selected conditions are shown in bold characters.

Primers concentration (μM)								
Coc	0.5	1	1.25	1.5	2	2.5	3	3.5
On1/On2	0.02	0.05	0.1	0.2	0.3	0.4		
T _a , annealing temperature ($^{\circ}\text{C}$)								
	29	35	40	45	50			
Formamide % (v/v)								
	0	0.5	1	2	5			

Isolation of O. oeni strains during MLF

To confirm the applicability of the new method, MLF samples were collected from two wines (GR1 and GR2) made with grape variety Grenache belonging to D.O. Priorat (Tarragona, Spain). Both wines were inoculated with a population of 2×10^6 CFU/ml of *O. oeni* strain Mf-P. Diluted wine samples were plated on MRS (De Man et al. 1960) supplemented with 5 g/l DL-malic acid, 0.5 g/l cysteine-HCl, 50 mg/l nystatin, 100 mg/l sodium azide and 20 g/l agar, and adjusted to pH 5.0. After growing 7 days anaerobically at 27°C, thirty colonies were randomly chosen from each sample and grown individually in MRS with 5 g/L DL-malic acid and 6 g/L fructose, at pH 5.0. Isolates were confirmed as LAB by positive Gram staining and

negative catalase reaction. These isolates were further identified and typified using the multiplex PCR method optimized in this work.

Results and discussion

In order to accomplish the simultaneous identification and typification of *O. oeni* strains, a combination of three PCR primers was used: two species-specific primers (On1/On2) amplifying a 1,025 bp fragment of the malolactic enzyme gene (Zapparoli et al. 1998) and a short primer Coc-1 used in RAPD-PCR analysis of *O. oeni* (Zapparoli et al. 2000, Reguant and Bordons 2003).

Several parameters affecting the PCR performance were optimized (Table 1), using DNA from 10 different *O. oeni* strains. The best results were obtained with a 15:1 ratio between the RAPD primer Coc (3 μ M), and the species-specific pair On1/On2 (0.2 μ M). These concentrations are enough to amplify the species-specific fragment, minimizing the competition among primers. Lower amounts of On1/On2 resulted in the lack of amplification, and higher concentrations generated only the species-specific band inhibiting RAPD products formation (data not shown). The recommended T_a for primer Coc is 29°C (Coconcelli et al. 1995), although this primer is able to generate amplification products at T_a as high as 45°C (Reguant and Bordons 2003). The specific pair On1/On2 is used in a standard PCR at 64°C (Zapparoli et al. 1998); nonetheless, it is able to maintain the specificity at lower temperatures such as 29°C, as shown in this work. Best results were obtained at T_a 29°C; lower temperatures are not recommended because of increasing variability, while higher temperatures produced only few bands and, in some cases, only the species-specific band was visible. Formamide has been reported to improve reproducibility in the amplification reaction (Sakar et

al. 1990). In our case, an optimal amplification was obtained using 0.5% (vol/vol) of formamide.

Multiplex PCR reaction generated a clear *O. oeni* species-specific product of 1025 bp (Fig. 1). RAPD primer Coc amplified several fragments, providing a unique pattern for each analysed strain. Although some of the bands produced by Coc were coincident for all the *O. oeni* strains, each strain showed a minimum of two bands differing from the other patterns. Also, the simplicity of band profiles represents an advantage in terms of feasibly monitoring a particular strain. None of the other species analysed, different than *O. oeni*, resulted in the amplification of the species-specific fragment (Fig. 1). Moreover, the band patterns obtained with other lactic acid bacteria species were clearly different than those observed with *O. oeni* strains.

The reproducibility of the method was confirmed by performing the analysis in two different thermal cyclers. The band patterns generated by both cyclers resulted identical, showing only some differences in band intensity (Fig. 1). Moreover, the reproducibility using the same equipment was also confirmed. As can be seen in Fig. 1 (lane 1 and 2), two duplicated samples of the strain Mf15, obtained from independent cultures, DNA extraction and PCR reaction, yielded identical electrophoretic patterns.

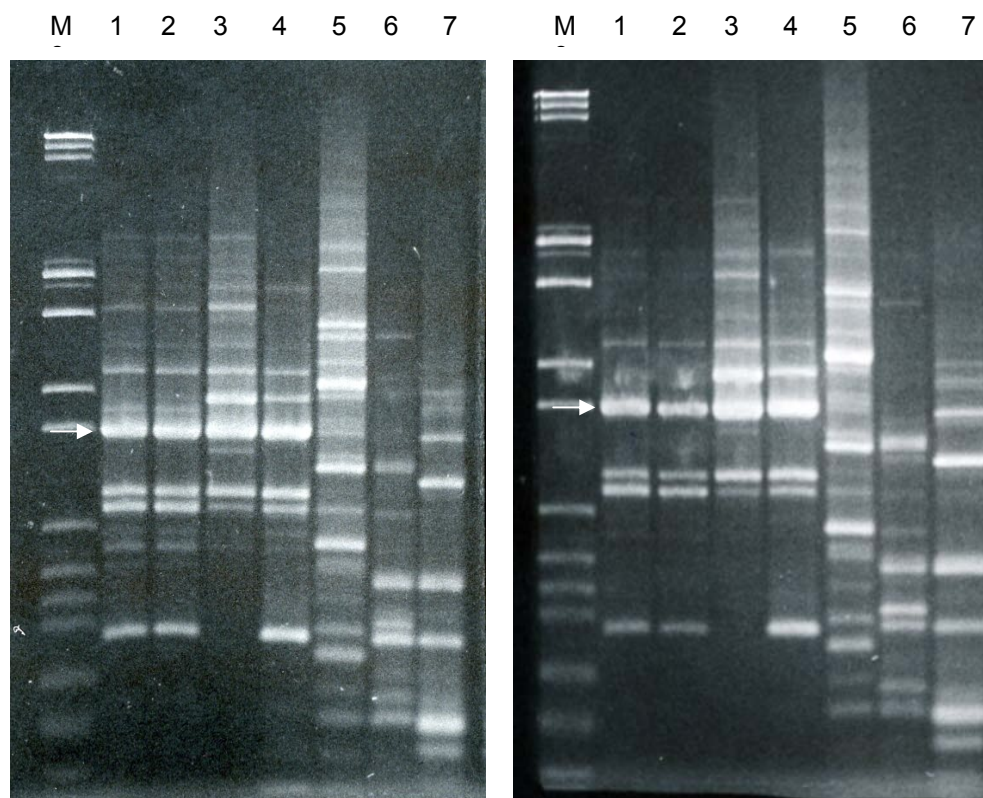


Figure 1. Electrophoretic patterns obtained by multiplex PCR by using two different thermal cyclers: **(a)** Gene Amp PCR System 2400 (Applied Biosystems) **(b)** and Gene Amp PCR System 2700 (Applied Biosystems). **(a), (b):** *O. oeni* strains Mf15, Mf15 (duplicate from an independent culture, DNA extraction and PCR reaction), PSU-1 and Vitilactic (Martin Vialatte Oenologie) (lanes 1-4), and *Leuconostoc mesenteroides* Bifi 54, *Lactobacillus brevis* Enolab 3824 and *Pediococcus pentosaceus* Enolab 4214 (lanes 5-7). Lane M, DNA molecular weight marker II and VI (Roche). The 1,025 bp fragment generated by primer pair On1/On2 is indicated with a white arrow

The multiplex PCR species/strain method was successfully used to analyse the population at the end of MLF in two wines (GR1 and GR2) inoculated with the *O. oeni* strain Mf-P. As can be seen in Fig. 2, all the obtained patterns showed the *O. oeni* species-specific band (1,025 bp) and distinguishable strain-characteristic bands. In wine GR1, all the obtained band profiles corresponded to the inoculated strain Mf-P; hence, the imposition of the inoculated strain was verified.

Nevertheless, in wine GR2 only three of the isolates corresponded to the inoculated strain (lanes 3, 4 and 7), while the other isolates showed two different patterns (lane 2 and lanes 1, 5, 6, 8). These results are in accordance with previous studies where it was shown that, depending on wine characteristics, indigenous *O. oeni* strains can take over the inoculated population at the end of MLF (Reguant and Bordons 2003). This fact reinforces the advisability of the analysis of *O. oeni* strain populations in order to determine the effectiveness of the used starter culture.

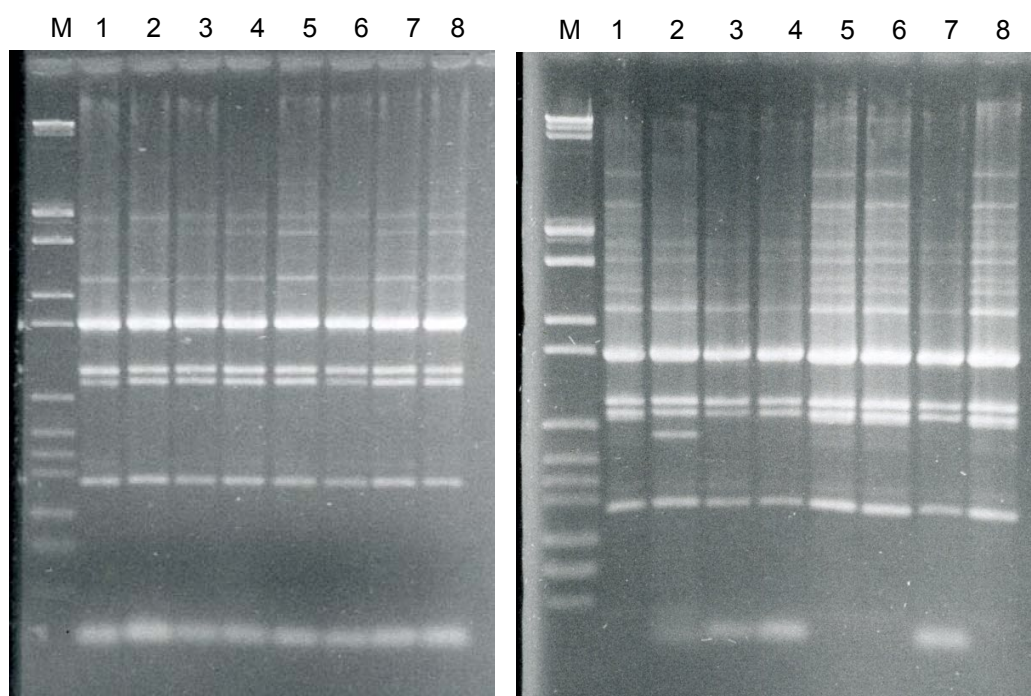


Figure 2. Simultaneous species identification and strain typification by multiplex PCR of isolates during two malolactic fermentations ((a) and (b)) of two different red wines (GR1 and GR2) inoculated with *O. oeni* Mf-P. (a) lane 1, inoculated strain profile, lane 2-8, *O. oeni* isolates from GR1. (b) lanes 1-10, isolates from GR2. Lane M ((a) (b)), DNA molecular weight marker II and VI (Roche). PCR reactions performed using Gene Amp PCR System 2400 (Applied Biosystems).

Conclusion

This work reports a new method based on a multiplex PCR reaction for the simultaneous identification and typification of *O. oeni* strains. The described method allows the reliable species identification and strain typification of *O. oeni* in a single PCR reaction generating a low complexity band profile. The multiplex PCR may be particularly useful to monitor *O. oeni* starter cultures, since the known band pattern of the inoculated strain can be easily compared to the generated by other strains present in wine.

Acknowledgements

This work was supported by grants AGL2000-0827-C02-02 and AGL2006-3700 from the Spanish Ministerio de Ciencia y Tecnología.

References

- Arena, M.E.; Saguir, F.M.; Manca de Nadra, M.C. (1999). Arginine, citrulline and ornithine metabolism by lactic acid bacteria from wine. *Int. J. Food Microbiol.*, 52, 155-161.
- Arena M.E., Manca de Nadra M.C. (2002). Comparative Survey in *Lactobacillus plantarum* of the Growth and Metabolism of Arginine and Citrulline in Different Media. *J. Agricultural and Food Chemistry*. vol. 50 p.6497-6500.
- Arena M.E., Manca de Nadra M.C. (2005). Influence of ethanol and low pH on arginine and citrulline metabolism in lactic acid bacteria from wine. *Research in Microbiol.* 156 (8). 858-864.

Bartowsky E.J., Hendchke P.A. 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.

Champomier –Vergès M.C., Zuñiga M., Morel-Deville F., Perez-Martinez G., Zagorec M., Dusko Ehrlich S. 1999. Relationships between arginine degradation, pH and survival in *Lactobacillus sakei*. FEMS Microbiol. Lett. 180. 297-304.

Cocconcelli PS, Porro D, Galandini S, Senini L (1995) Development of RAPD protocol for typing of strains of lactic acid bacteria and enterococci. Lett Appl Microbiol 21: 376-379. doi:[10.1111/j.1472-765X.1995.tb01085.x](https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.1995.tb01085.x)

Davis C.R., Wibowo D., Eschenbruck R., Lee T.H., Fleet G.H. 1985. Practical implications of malolactic fermentation: a Reviews. American J. of Enol and Vitic. 36(4): 290 – 301.

Davey G. P., Heap H.A. 1993. Appearance of the arginine phenotype in *Lactococcus lactics* subsp. *cremoris* 2204 following phage transduction. Canadian Journal of Microbiology. 39, 754 – 758.

De Man JC, Rogosa M, Sharpe ME (1960) A medium for the cultivation of lactobacilli. J Appl Bacteriol 23: 130–135

Dicks L.M.T., Loubser P.A., Augustyn O.P.H., 1995. Identification of *Leuconostoc oenos* from South African Fortified wines by numerical analysis of total soluble cell proteins patterns and DNA-DNA hybridizations. J. of App. Bacteriol. 79: 43 – 48.

Henick-Kling T (1993) Malolactic fermentation. In: Fleet GH (ed) Wine Microbiology and Biotechnology, Harwood Academic Publishers, Chur, Switzerland, pp. 289-326

Garvie E.I. 1984. Separation of species of the genus *Leuconostoc* and differentiation of the *Leuconostoc* from other lactic acid bacteria. *Methods in Microbiology*. 16: 147-17

Guerrini S, Bastianini A, Blaiotta G, Granchi L, Moschetti G, Coppola S, Romano P, Vicenzini M (2003) Phenotypic and genotypic characterization of *Oenococcus oeni* strains isolated from Italian wines. *Int J Food Microbiol* 83: 1-14. doi:[10.1016/S0168-1605\(02\)00323-9](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00323-9)

Lafon-Lafourcade, S., Carre E., Ribereau-Gayon P. 1983. Occurrence of lactic acid bacteria during the different stages of vinification and conservation of wines. *Applied and Environmental Microbiology* 46 (4) : 874 – 880.

Lechiancole T, Blaiotta G, Messina D, Fusco V, Villani F, Salzano G (2006) Evaluation of intra-specific diversities in *Oenococcus oeni* through analysis of genomic and expressed DNA. *Syst Appl Microbiol* 29: 375-381. doi: [10.1016/j.syapm.2005.10.001](https://doi.org/10.1016/j.syapm.2005.10.001)

Liu S.-Q., Pritchard G.G., Hardman M.J., Pilone G. J. 1994. Citrulline production and ethyl carbamate (urethane) precursor formation from arginine degradation by wine lactic acid bacteria *Leuconostoc oenos* and *Lactobacillus buchnerii*. *Am. J. Enol. Vitic*; 45: 235-242.

Liu, S.Q., Pilone, G.J. 1998. A review: Arginine metabolism in wine lactic acid bacteria and its practical significance. *Journal of Applied Microbiology*, 84, 315-327.

Lonvaud-Funel A., Biteau N., Fremaux C. 1989. Identification de *Leuconostoc oenos* par utilisation de sondes d'ADN. *Sciences des Aliments*. 9 : 533 – 541.

Lonvaud –Funel A. 1995. Microbiology of the malolactic fermentation: Molecular aspects. *FEMS Microbiology Letters*.126: 209-214

Lonvaud-Funel A (1999) Lactic acid bacteria in the quality improvement and depreciation of wine. *Antonie van Leeuwenhoek* 76: 317-331. doi: [10.1023/A:1002088931106](https://doi.org/10.1023/A:1002088931106)

Masquè C., Bordons A. 1996. Isolation and selection of malolactic bacteria from southern catalan wines. *Journal of wines research*. 7(2): 91 101.

Maicas S, Pardo I, Ferrer S (2000) The effects of freezing and freeze-drying of *Oenococcus oeni* upon induction of malolactic fermentation in red wine. *Int J Food Microbiol* 35: 75-79.

Ough C.S. (1976). Ethylcarbamate in fermented beverages and foods. I. Naturally occurring ethylcarbamate. *J Agric Food Chem*. Mar-Apr;24(2):323-8.

Pardo I., García M.J., Zúñiga M., Uruburu F. 1988. Evaluation of the API 50 CHL systemes for Identification of *Leuconostoc oenos*. *American Journal of Enology and Viticulture*. 39 (4): 347 – 350.

Reguant C, Bordons A (2003) Typification of *Oenococcus oeni* strains by multiplex RAPD-PCR and study of population dynamics during malolactic fermentation. *J Appl Microbiol* 95: 344-353. doi: [10.1046/j.1365-2672.2003.01985.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.01985.x)

Rodas A.M., Ferrer S., Pardo I. 2003. 16S- ARDRA, a tool for identification of lactic acid bacteria isolated from grape must and wine. *Systematic and Applied Microbiology*. 26: 412 - 422.

Sakar G, Kapelner S, Sommer SS (1990) Formamide can dramatically improve the specificity of PCR. *Nucleic Acids Res* 18: 7465. doi: [10.1093/nar/18.24.7465](https://doi.org/10.1093/nar/18.24.7465)

Spano G, Lonvaud-Funel A, Claisse O, Massa S (2007) In vivo PCR-DGGE analysis of *Lactobacillus plantarum* and *Oenococcus oeni* populations in red wine. *Curr Microbiol* 54: 9-13. doi: [10.1007/s00284-006-0136-0](https://doi.org/10.1007/s00284-006-0136-0)

Sponholz W.R. 1992. The breakdown of arginine by lactic acid bacteria and it's relation to ethylcarbamate production. *Biology Oggi VI* (1-2). 15-24.

Tenreiro R., Santos R., Brito L., Paveia H., Vieira G., Santos M.A. 1993. Bacteriophages induced by mitomicin C treatment of *Leuconostoc oenos* strains from Portuguese wines. *Letters in Applied Microbiology*. 16: 207-209.

Terrade N., Mira de Orduña R. 2009^a. Determination of the essential nutrient requirements of wine-related bacteria from the genera *Oenococcus* and *Lactobacillus*. *Int. J. Food Microbiol.* 133. 8 – 13.

Terrade N., Mira de Orduña R. 2009^b. Arginine and citrulline do not stimulate growth of two *Oenococcus oeni* strains in wine. *FEMS Microbiol Lett.* 209. 98-104.

Tonon, T., Bourdineaud, J.P., Lonvaud-Funel, A. 2001a. The *arcABC* gene cluster encoding the arginine deiminase pathway of *Oenococcus oeni*, and arginine induction of a CRP-like gene. *Res. Microbiol.* 152, 653-661

Torriani S., Felis G.E., Dellaglio F. 2001. Differentiation of *Lactobacillus plantarum*, *L. pentosus*, and *L. paraplantarum* by *recA* gene sequence analysis and Multiplex PCR assay with *recA* gene-derived primers. *Applied and Environmental Microbiology*. 67 (8):3450 – 3454.

Vahl M. 1993. A survey of ethyl carbamate in beverages, bread and acidified milks sold in Denmark. *Food Add and Contaminants*, 5 (10). 585-592.

Van Vuuren HJJ, Dicks LMT (1993) *Leuconostoc oenos*: a review. *Am J Enol Vitic* 44: 99-112.

Walter G., Winterlin W., Fonda H., Seiber J. 1974 .Gas Chromatographic Analysis of Urethane (Ethyl Carbamate) in wine. *J. of Agricultural and Food Chemistry* 6, 22. 944-947

Wibowo D, Eschenbruch R, Davis CR, Fleet GH, Lee TH. 1985. Occurrence and growth of lactic acid bacteria in wine: a Reviews. *Amer. J. Enol. Vitic.* 36, 302-313

Zapparoli G, Torriani S, Pesente P, Dellaglio F (1998) Design and evaluation of malolactic enzyme gene targeted primers for rapid identification and detection of

Oenococcus oeni in wine. Lett Appl Microbiol 27: 243-246. doi: [10.1046/j.1472-765X.1998.00448.x](https://doi.org/10.1046/j.1472-765X.1998.00448.x)

Zapparoli G., Torriani S., Dellaglio F. (1998a). Differentiation of *Lactobacillus sanfranciscensis* strains by randomly amplified polymorphic DNA and pulsed-field gel electrophoresis. FEMS Microbiology letters. 166:325-332.

Zapparoli G, Reguant C, Bordons A, Torriani S, Dellaglio F (2000) Genomic DNA fingerprinting of *Oenococcus oeni* strains by pulsed-field electrophoresis and randomly amplified polymorphic DNA-PCR. Curr Microbiol 40: 351-355. doi: [10.1007/s002840010069](https://doi.org/10.1007/s002840010069)

Zavaleta AI, Martínez-Murcia AJ, Rodríguez-Valera F (1996) 16S-23S DNA intergenic sequences indicate that *Leuconostoc oenos* is phylogenetically homogeneous. Microbiol 142: 2105-2114

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
ESTUDIO BIOQUÍMICO Y MOLECULAR DE LA PRODUCCIÓN DE PRECURSORES DE CARBAMATO DE ETILO POR BACTERIAS LÁCTICA
ASOCIADAS AL PROCESO DE VINIFICACIÓN
ISBN:978-84-693-6429-1/DL:T-1631-2010

III. 2.

DEGRADACIÓN DE ARGININA POR BACTERIAS LÁCTICAS DE VINO Y DE OTROS ALIMENTOS FERMENTADOS

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
ESTUDIO BIOQUÍMICO Y MOLECULAR DE LA PRODUCCIÓN DE PRECURSORES DE CARBAMATO DE ETILO POR BACTERIAS LÁCTICA
ASOCIADAS AL PROCESO DE VINIFICACIÓN
ISBN:978-84-693-6429-1/DL:T-1631-2010

INTRODUCCIÓN

Las bacterias lácticas (BL) están presentes en la mayoría de los alimentos fermentados y pueden metabolizar algunos aminoácidos presentes en ellos. En el vino las BL llevan a cabo la fermentación maloláctica y en esa etapa la principal fuente de aminoácidos es la autólisis de las levaduras, que son utilizados como nutrientes o fuentes de energía. La degradación de estos compuestos produce numerosos compuestos aromáticos, que aportan un perfil organoléptico complejo al vino. Por otro lado, la degradación de los aminoácidos aumenta el pH, contribuyendo a la adaptabilidad y protección de las bacterias lácticas al ambiente ácido. Además, con ello, las bacterias obtienen energía suplementaria para sobrevivir durante largos periodos de tiempo en ambientes extremos como los del queso y el vino (Stuart y col., 1999; Bourdineaud 2006).

La arginina es uno de los principales aminoácidos presentes en el mosto y en el vino, en concentraciones de 0.1 – 2.3 g/l al final de la fermentación alcohólica (Lehtonen, 1996). La degradación de la arginina por las BL ocurre por la vía de la arginina deiminasa (ADI) (Figura 1), que es la ruta anaeróbica de catabolismo de la arginina más extendida entre los organismos procariontes (Cunin y col., 1986).

La degradación de la arginina tiene implicaciones enológicas, ya que la arginina como tal tiene un sabor amargo, mustio y su degradación es necesaria para la calidad organoléptica del vino. Además, las cepas que la pueden degradar pueden crecer más rápidamente, imponiéndose en la fermentación (Tonon y col., 2000). Por otro lado, su degradación en vino origina posibles precursores del carbamato de etilo como la citrulina y carbamil fosfato. También puede dar lugar indirectamente a aminas biógenas por la degradación de la ornitina a putrescina y ésta a su vez en espermidina y espermina, o la misma arginina puede ser descarboxilada a agmatina directamente por la vía N-carbamoylputrescina (Arena y col., 2001). La ornitina producida tiene un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de las levaduras vinicas autóctonas, confiriendo una estabilidad biológica al vino. Finalmente, el aumento del pH debido a la liberación del amonio puede disminuir la concentración real de sulfuroso molecular, aumentando el riesgo de desarrollo de microorganismos indeseables (Tonon y col., 2002; Liu y col., 1996).

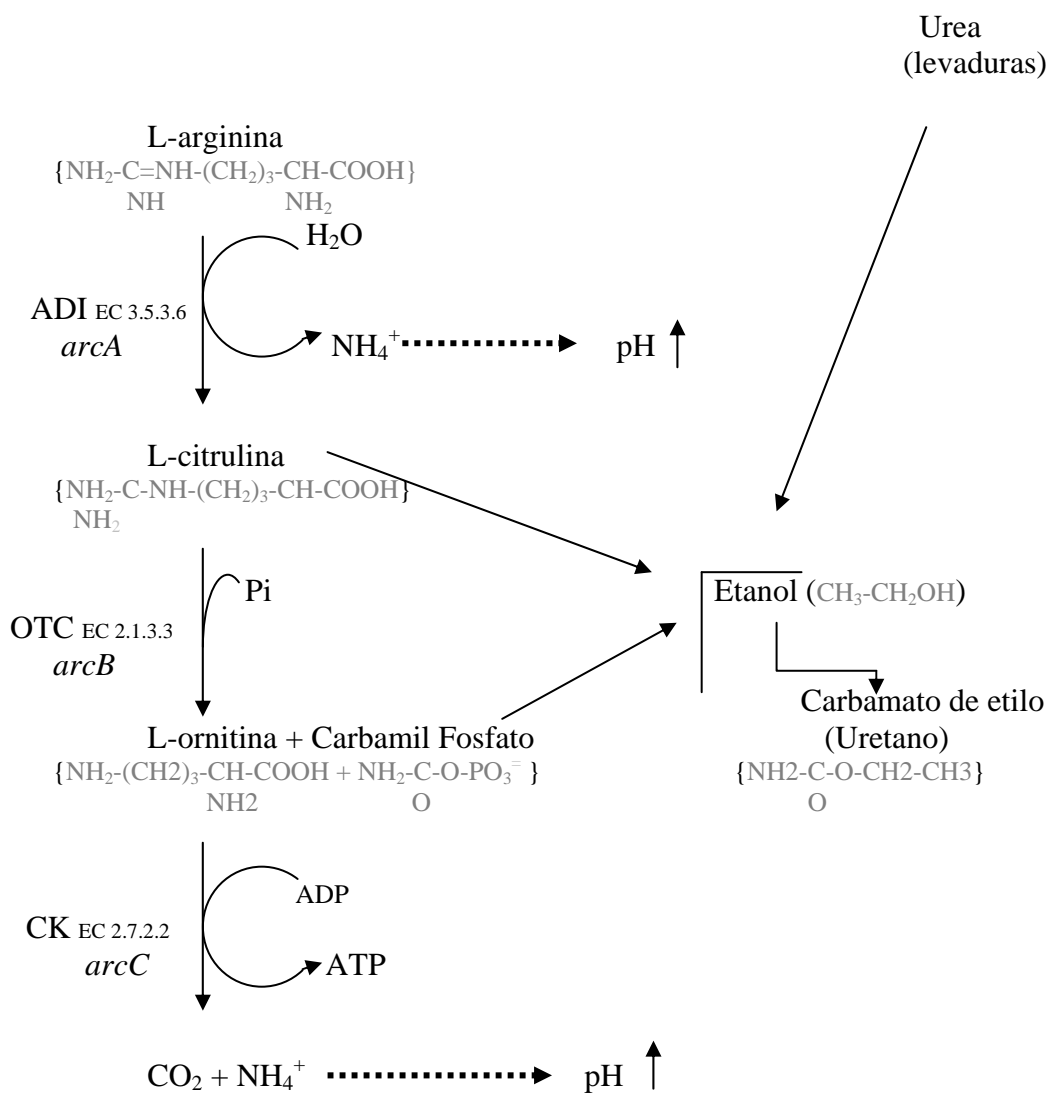


Fig 1. Vía ADI de degradación de arginina por bacterias lácticas y posible formación de carbamato de etilo.

En este capítulo se describen los estudios hechos en condiciones estándar de la capacidad de degradación de la arginina que poseen las BL que intervienen en muchos alimentos fermentados. En primer lugar se realizó un screening general de la habilidad de la degradación de la arginina de 109 cepas. A continuación se estudiaron las actividades enzimáticas de un grupo más reducido de aislados de vinos. Finalmente se llevó a cabo un estudio preliminar del efecto de la glucosa sobre el perfil degradativo de arginina, tanto en situación de células no proliferantes (*resting cells*), como de células en crecimiento en un medio de cultivo, en este caso MRS modificado (MRSm).

MATERIALES Y MÉTODOS

Microorganismos de estudio

Las cepas estudiadas están reseñadas en las Tablas 1 y 2. Son cepas que provienen de alimentos fermentados como vino, cerveza, destilados, productos lácteos, embutidos, zumos y verduras fermentadas.

Medios y condiciones de cultivo

Las cepas de estudio se mantuvieron en medio MRS (De Man y col., 1960) suplementado con ácido DL málico 4 g/l y fructosa 5 g/l (MRSmf) (Ver Anexos). Una vez crecidas se pasaron a los medios de trabajo. Los cultivos se incubaron a 27°C, durante 24 - 36 horas, con un 10% CO₂.

El seguimiento de la DO (Abs_{600nm}) se hizo por espectrofotómetro (Hitachi U-2000), a lo largo del crecimiento.

Medios de trabajo

Para los estudios de screening de arginina y de las actividades enzimáticas, se empleó MRS modificado (MRSm) (Tonon et al, 2001) (Ver Anexos) suplementado con L-arginina y glucosa (5 g/l de cada) y a pH 4.5

Para el screening cualitativo de la arginina, se diseñó para este trabajo un

medio de determinación de la degradación de la arginina, basado en un medio para su determinación en *Pseudomonas sp* (Thornley, 1960). Los ingredientes son de Sigma. Se ajustó el pH a 4,5 con HCl 0,1 M. Lleva un indicador de pH, el rojo de clorofenol, el cual al aumento del pH cambia de amarillo a fucsia. Su composición es por litro: Peptona 1 g, cloruro de sodio 5 g, K_2HPO_4 0.3 g, rojo de fenol 0.01 g, L-Arginina-HCl 10 g, agar 3 g, y a pH 4.5. Se esteriliza a 121°C/15 min.

Para los estudios de células en reposo metabólico (*resting cells*) se empleó TJAG, que es MRS suplementado con zumo de tomate estéril, L-arginina (5 g/l) y glucosa (2 g/l), a pH 5.

Para estudios de la implicación de la arginina en la estimulación del crecimiento de las BL se utilizó MRSm suplementado con arginina solamente, así como MRS suplementado con glucosa (5 g/l) y/o con L-arginina (5 g/l), a pH 4.5.

Identificación de cepas aisladas de vino

Se han identificado las especies de las cepas aisladas de vino por el método de 16S-ARDRA (Rodas y col, 2003). Para ello se ha hecho la extracción de DNA por medio de la técnica de microextracción propuesta por Ruiz-Barba y col. (2005). Para distinguir entre *L. plantarum*, *L. paraplantarum* y *L. pentosaceus* se han utilizado los cebadores descritos por Torriani y col. (2001).

Determinación de la degradación de la arginina

Las células se crecieron en 5 ml de medio MRSm al 1% (v/v), y se incubaron a 27°C durante 36 horas y 10% CO_2 . Las muestras (1 ml) fueron obtenidas a tiempo 0 h y al final de la fase exponencial/principio de fase estacionaria. Las células se eliminaron por centrifugación a 15500 x g durante 5 min., y se guardó el sobrenadante congelado hasta el análisis por el método colorimétrico de Sakaguchi, modificado por Gilboe y col (1956). Las muestras fueron cuantificadas frente a una recta patrón de L-Arginina-HCl comprendida entre 0 – 20 µg/ml.

El análisis cualitativo, se hizo en el medio Thornley modificado. Las células estaban previamente crecidas en MRSm, hasta llegar a una fase final de exponencial. Se hizo un pase por picado de 2 µl de cultivo sobre el medio y se dejó incubar por 24-48 horas a 27°C y 10% CO_2 .

Células no proliferantes (*Resting cells*)

En base al método de Mira de Orduña y col. (2000), las células se cultivaron en medio MRSmf hasta obtener una DO (A_{600nm}), entre 0.8 a 1. A continuación se hizo un pase de 0.4% (v/v) en 200 ml TJAG. Los cultivos se incubaron a 27°C con 10% CO₂ hasta alcanzar la fase tardía logarítmica, temprana estacionaria (DO ~ 2). El cultivo celular se centrifugó a 5000 x g durante 10 min., se descartó el sobrenadante y se hicieron 2 lavados con tampón de lavado (Ver Anexos), y después se resuspendió en 2.5 – 3 ml de tampón de *resting cells* (Ver Anexos). Posteriormente se inoculó con 1 ml de células resuspendidas apropiadamente en tampón de rcell en viales que contenían una solución acuosa de 4 ml arginina - glucosa y también solo arginina (400 mg/l de cada). Se incubó a 25°C con agitación constante y se recolectaron muestras a 0, 1 y 2 horas. Éstas se centrifugaron a 10000 x g durante 10 min., y se guardó el sobrenadante congelado hasta el análisis de arginina por el método de Staron – Allard (Micklus y col, 1973). Este método se desarrolló para la determinación de guanidinas mono y disustituidas en fluidos biológicos y se basa en la reacción del grupo amino con el 4-cloro-3-metilfenol en medio alcalino, produciendo una coloración amarilla que es medida por espectrofotómetro 440 nm.

Medida de las actividades enzimáticas

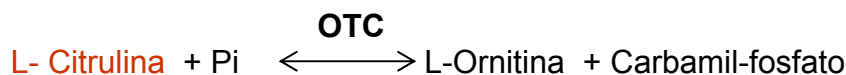
Las cepas fueron crecidas en 50 ml de medio MRSm, inoculado al 0.1% (V/V), a 27° C y a 10% CO₂. Las células fueron recogidas al final de la fase exponencial/ principio de la fase estacionaria. Se recogieron por centrifugación a 7000 x g durante 5 min, se limpió el *pellet* dos veces con 10 ml de tampón fosfato sódico a 0.01 M pH 7, luego fue resuspendido con 3 ml de tampón fosfato suplementado con glutation reducido (1.8 mM), y 3 g de perlas de vidrio de 0.3 mm de diámetro (v/v).

Las células se rompieron mediante vórtex durante 8 minutos con intervalos de 30 segundos en hielo. La muestra se centrifugó a 15500 x g durante 10 minutos. El sobrenadante con la proteína total se recuperó en nuevos tubos y se mantuvo en hielo hasta su análisis. El contenido de proteína del extracto se determinó por el microensayo del método de Bradford (Biorad) frente a una recta patrón de 0 a 25 µg/ml de BSA (Albúmina de Suero Bovino).

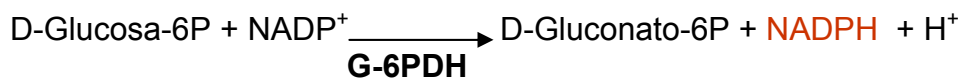
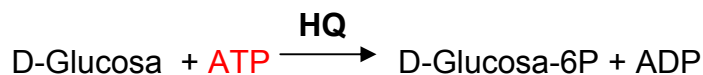
Los ensayos enzimáticos de las tres enzimas de la vía, arginina-deiminasa (ADI), ornitina transcarbamilasa (OTC) y carbamato quinasa (CK), están basados en los estudios de Liu y col (1995) y Crow y col (1982).

La citrulina producida en los ensayos de ADI y OTC se midió a través de un método colorimétrico (Mira de Orduña, 2000) que se basa en el desarrollo de una coloración ocre por la presencia de la citrulina en una mezcla ácida 1:3 de ácido sulfúrico y ácido fosfórico. Una unidad de actividad enzimática específica (AEs) es definida como la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1 μmol de citrulina por minuto, y se expresa:

$$U (\mu\text{mol}/\text{min}) \cdot \text{ml} / \text{proteína (mg/ml)}.$$



La determinación de la actividad CK se basa en la medida del NADPH obtenido en concentración equimolar al ATP consumido en la reacción. El ATP y la D-glucosa son sustratos de la hexoquinasa (HQ) generando D-glucosa-6-fosfato y ADP. La D-glucosa-6P junto al NADP^+ serán transformados en D-gluconato-6P, NADPH y H^+ por la Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G-6PDH) a pH 7.9. La medida de la absorbancia del NADPH se hizo durante 4 minutos a 340 nm hasta que la recta pierde linealidad. Una unidad de enzima de actividad enzimática CK es definida como la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1 μmol de ATP por minuto.



$$[\text{ATP}] = [\text{NADP}] = (\text{dif Abs /min} * \text{vol (1ml)}) / (\text{desviación (1cm)} * 6.3 \text{ cm}^2/\text{ml}) = \mu\text{mol/min}$$

$$\text{Actividad Enzimática específica} = \frac{U (\mu\text{mol/min})}{\text{Proteína (mg)}} \rightarrow \text{linealidad de la pendiente}$$

RESULTADOS

Degradación de arginina

Los resultados están recogidos en las Tablas 1 y 2. Se han incluido cepas de 24 especies de BL, donde el 37.5% son especies homofermentativas y el 62.5% restantes son heterofermentativas de diferentes orígenes relacionadas con vinos y otros alimentos fermentados.

Las cepas fueron crecidas en medio MRSm a pH 4.5, suplementado con 5 g/l de arginina. La arginina basal aportada por los componentes del medio (extracto de carne, extracto de levadura, peptona) de cultivo está alrededor de 1 g/l.

El consumo de la arginina empezó inmediatamente al crecer las células, y en menos de 36 horas en la mayoría de casos. Las muestras fueron tomadas cuando la DO ($\text{Abs}_{600\text{nm}}$) estaba alrededor de 0.9 – 1.2 coincidiendo con el final de la fase exponencial para todas las cepas (~ 36 y 48 horas de cultivo). Por lo tanto la tasa de crecimiento no influyó en la diferencia entre los perfiles encontrados.

Dentro de una misma especie hay grandes diferencias en el perfil degradador, como es el caso de *L. plantarum*, con sólo 12% negativas de 25 cepas evaluadas, o de *L. brevis* que sin ser negativas en ningún caso, hay diferencias entre cepas, igual que se ha reportado para cepas de *O. oeni* (Pilone y col, 1991).

Interesantemente cepas de *Lactobacillus* homofermentativas como *L. mali* y *L. delbrueckii* son capaces de degradar la arginina parcial o completamente.

Como confirmación, para todas las cepas se hizo una determinación cualitativa de la degradación de la arginina en medio Thornley modificado, coincidiendo las reacciones positivas con las obtenidas por el método colorimétrico de Sakaguchi. Para todas las cepas probadas de *Lactobacillus*, *Pediococcus* y *Oenococcus* se

obtuvieron resultados en las primeras 24 horas. Se dejaron un par de días más ya que hay cepas que tienen un metabolismo más lento y así confirmar el desarrollo del color por el cambio del pH al producirse el amonio ([Figura 2](#)).

Tabla 1. Degradación de arginina por lactobacilos en MRSm. (CECT, Colección Española de Cultivos Tipo, Valencia. URV, Universitat Rovira i Virgili, Tarragona. UV, Universidad de Valencia. IFI, Instituto de Fermentaciones Industriales, CSIC, Madrid.)

Espece	Cepa y procedencia	Origen	% Deg. Arginina
<i>Lactobacillus acetotolerans</i>	4019 ^T (CECT)	Vinagre de arroz	0
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	903 (CECT)	Leche fermentada	0
	362 (CECT)	Yogurt	92.7
	4179 (CECT)	Lácteos	98.6
<i>Lactobacillus brevis</i>	4121 ^T (CECT)	Materia fecal	78.1
	216 (CECT)	Cerveza	97.3
	3824 (UV)	Vino	99.6
	4246 (UV)	Vino	98.5
	4300 (UV)	Vino	98.7
	C12 (URV)	Vino	97.8
	C13 (URV)	Vino	100
	L16 (URV)	Vino	97.5
	JM11 (URV)	Vino	100
	JM12 (URV)	Vino	100
	J12 (URV)	Vino	33.3
	JM6a (URV)	Vino	96.6
<i>Lactobacillus buchnerii</i>	4111 ^T (CECT)	Tomate	99.1
	4674 (CECT)	Cerveza	61.9
<i>Lactobacillus casei</i>	475 ^T (CECT)	Queso	0
	278 (CECT)		0
<i>Lactobacillus collinoides</i>	922 ^T (CECT)	Zumo de manzana fermentada	95.1
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	4686 (CECT)	Destilerías	0
	286 ^T (CECT)	Granos fermentados	0
	287 (CECT)	Queso, destilados	25.9
<i>Lactobacillus fermentum</i>	4007 (CECT)	Remolacha fermentada	94.7
<i>Lactobacillus fructivorans</i>	4785 ^T (CECT)	Frutas en Conservas	19.0
<i>Lactobacillus hilgardii</i>	4786 ^T (CECT)	Vino	88.5
	4681 (CECT)	Vino	88.7
	4682 (CECT)	Vino	88.6
<i>Lactobacillus mali</i>	4149 (CECT)	Mosto de vino de Japón	99.5
	O11 (URV)	Vino	97.5
	O12 (URV)	Vino	98.9
<i>Lactobacillus plantarum</i>	220 (CECT)	Ensilados	0
	748 (CECT)	Col ácida	0
	C11 (URV)	Vino	0
	Cd019 (URV)	Vino	85.2
	Cd1415 (URV)	Vino	64.8
	Cd1423 (URV)	Vino	82.1
	Cd149 (URV)	Vino	85.1

	Cd023 (URV)	Vino	88.4
	E10d1418 (URV)	Vino	59.7
	Cd1411 (URV)	Vino	55.9
	Cd144 (URV)	Vino	88.5
	Cd1416 (URV)	Vino	51.2
	Cd1417 (URV)	Vino	54.2
	I5d146 (URV)	Vino	80.6
	E5d1414 (URV)	Vino	74.8
	I10d1412 (URV)	Vino	79.9
	I10d1422 (URV)	Vino	74.6
	I10d1420 (URV)	Vino	77.7
	I5d145 (URV)	Vino	77.3
	E5d147 (URV)	Vino	76.2
	I10d1423 (URV)	Vino	75.5
	E5d145 (URV)	Vino	77.0
	I10d145 (URV)	Vino	80.7
	CB21 (URV)	Vino	92.7
	L16 (URV)	Vino	93.1
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	278 ^T (CECT)	Vino	12.3
<i>Lactobacillus sakei</i>	906 ^T (CECT)	Sake	32.2



Figura 2. Determinación de la degradación cualitativa de la arginina en medio Thornley modificado. El color lila es degradación positiva. El amarillo es degradación negativa.

Tabla 2. Degradación de arginina por otras bacterias lácticas no lactobacilos: *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Weissella* y *Oenococcus* en MRSm (Siglas de procedencia: ver Tabla 1. Todas las cepas aisladas en la URV han sido previamente identificadas).

Especie	Cepa y procedencia	Origen	% Deg. Arginina
<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	4027 ^T (CECT)	Azúcar de caña	95.2
	CF21 (URV)	Vino	99.1
	O43 (URV)	Vino	90.5
	F41 (URV)	Vino	97.4
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	219 ^T (CECT)	Vino	0
	394 (CECT)	Azúcar	0
	BIF154 (IFI)	Vino	0
	V41 (URV)	Vino	98.9
	L17 (URV)	Vino	99.2
<i>Pediococcus damnosus</i>	793 (CECT)	Cerveza	49.2
	E1210 (URV)	Vino	85.5
	E2111 (URV)	Vino	84.1
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	Cd1418 (URV)	Vino	72.5
	4695 ^T (CECT)	Cerveza	81.9
	923 (CECT)	Leche fermentada	87.7
	4208 (UV)	Vino	99.7
	4214 (UV)	Vino	99.8
	E229 (URV)	Vino	81.6
	E2137 (URV)	Vino	92.7
	E228 (URV)	Vino	86.8
	E226 (URV)	Vino	90.8
	E225 (URV)	Vino	76.4
	E223 (URV)	Vino	87.4
	E184 (URV)	Vino	94.2
	E187 (URV)	Vino	91.2
	E189 (URV)	Vino	85.8
	E123 (URV)	Vino	82.0
	E1813 (URV)	Vino	73.8
	E129 (URV)	Vino	80.1
	E2120 (URV)	Vino	83.6
	E2113 (URV)	Vino	84.6
	Cd1420 (URV)	Vino	98.9
	Cd148 (URV)	Vino	94.7
I10d1415 (URV)	Vino	97.7	
I10d143 (URV)	Vino	98.4	
I10d142 (URV)	Vino	98.4	
E221 (URV)	Vino	82.7	
<i>Pediococcus acidilactici</i>	98 (CECT)	Cerveza	99.3
	4784 ^T (CECT)	Cerveza	97.3
<i>Pediococcus inopinatus</i>	813 ^T (CECT)	Ensilados	0
<i>Pediococcus parvulus</i>	3908 (UV)	Vino	0
	3909 (UV)	Vino	0
	3911 (UV)	Vino	0
	4707 ^T (CECT)	Azúcar de caña	98.0
<i>Weissella confusa</i>	4268 ^T (CECT)	Embutidos	26.7
<i>W. paramesenteroides</i>	Uvaferm Alpha® (Lallemand)	Vino	20.8
<i>Oenococcus oeni</i>	CH16 (Chr. Hansen)	Vino	3.0
	CH29 (Chr. Hansen)	Vino	11.8
	Viniflora oenos® (Chr. Hansen)	Vino	17.3
	CR1 (URV)	Vino	23.2

Influencia de la glucosa en la degradación de la arginina

En la Tabla 3 se muestran los valores de degradación de arginina y la DO (Abs_{600nm}) de cepas cultivadas en medio MRSm a pH 4.5 con arginina y arginina-glucosa, con una concentración inicial a 5 g/l respectivamente.

La presencia de arginina y glucosa en el medio proporciona un rápido crecimiento. La glucosa en la mayoría de los casos incide en un consumo parcial de la arginina. En cepas como *L. brevis* 3824, *L. buchnerii* 4111, o *P. pentosaceus* 4214 la presencia de glucosa no disminuye la hidrólisis de la arginina.

Lc. mesenteroides L17 es un caso único entre las cepas estudiadas ya que la presencia de la glucosa mejora la hidrólisis de la arginina en casi un 20% y el crecimiento es mucho mejor en presencia de ambos compuestos. Utiliza mejor la arginina que la glucosa para el crecimiento. Para esta cepa el ratio porcentual del crecimiento obtenido cuando se relacionan los metabolitos solos arginina y glucosa con respecto a las dos en conjunto en el medio es distinto, obteniéndose 72.4% para arginina y 20.3% para glucosa.

En el caso de las cepas de *L. hilgardii* con arginina y la glucosa juntas, la degradación es un 10% menor que con solo arginina. Sin embargo, el crecimiento es más rápido en presencia de ambas.

Con solo la arginina presente la degradación es más alta, excepto para los casos de *L. brevis* 3824, *Lc. mesenteroides* L17 y *P. pentosaceus* 4214, donde la degradación en presencia de glucosa es mejor que cuando se hace sola.

Cinética de la degradación de la arginina

En la Tabla 4 se muestran los resultados de la cinética de degradación de la arginina después de 2 horas. Las cepas fueron crecidas en TJAG hasta alcanzar una DO de aproximadamente 2. Se recogían y procesaban para situarlas en reposo metabólico, como se ha descrito anteriormente. Las muestras fueron recogidas durante cada hora, de soluciones acuosas con solo arginina y combinando ésta con glucosa (400 mg/l) a pH de 3.6.

Tabla 3. Influencia de glucosa en la degradación de arginina (5 g/l de cada) en MRSm y sobre el crecimiento (medido por DO Abs 600 nm).

A. arginina. G. Glucosa. Ratio 1: ratio porcentual entre degradación de la arginina en presencia de glucosa y degradación sin glucosa. Ratio 2: ratio porcentual DO arginina / DO arginina-glucosa. Ratio 3: ratio porcentual DO glucosa / DO arginina-glucosa.

Cepa	% deg.con G	% deg. sin G	Ratio 1	DO A-G	D.O A	D.O G	Ratio 2	Ratio 3
<i>L. hilgardii</i> 4786	88.5	99.6	88.8	1.96	0.99	1.07	50.5	54.6
<i>L. hilgardii</i> 4681	88.7	99.4	89.2	1.97	1.08	1.40	54.8	71.1
<i>L. brevis</i> 4121T	78.0	99.6	78.4	1.85	0.84	1.39	45.4	75.1
<i>L. brevis</i> 3824	99.6	99.5	100.1	1.95	1.19	1.58	61.0	81.0
<i>L. buchnerii</i> 4111	99.1	99.6	99.5	1.68	1.33	1.14	79.2	67.9
<i>L. buchnerii</i> 4674	61.9	99.5	62.2	1.78	1.30	1.75	73.0	98.3
<i>Lc. mesenteroides</i> 219	0	0		1.23	0.39	0.68	31.6	55.2
<i>Lc. mesenteroides</i> L17	99.2	80.8	122.7	1.23	0.89	0.25	72.4	20.3
<i>P. pentosaceus</i> 4695T	81.9	99.4	82.3	2.06	0.95	1.55	46.1	75.2
<i>P. pentosaceus</i> 4214	99.8	99.3	100.5	2.01	1.16	1.58	57.7	78.6
<i>P. parvulus</i> 813T	0	0		1.20	0.43	1.15	35.8	95.8
<i>P. parvulus</i> 3908	0	0		1.50	0.80	1.50	53.3	100.0

Tabla 4. Cinética de la degradación de arginina durante 2 horas. Arginina inicial 5 g/l, glucosa inicial 2 g/l.

Cepa	Con glucosa		Sin glucosa	
	% Deg.	Vel. Deg. mg*ml ⁻¹ /min	% Deg.	Vel. Deg. mg*ml ⁻¹ /min
<i>L. acetotolerans</i> 4019	46.2	0.3	30	1.6
<i>L. acidophilus</i> 362	69.3	1.9	74.5	2.1
<i>L. brevis</i> 216	40.6	1.2	56.1	2.2
<i>L. buchnerii</i> 4111T	67.7	4.1	77.0	4.5
<i>L. casei</i> 278	6.4	0.3	3.5	0.1
<i>L. casei</i> 475	6.9	0.1	7.7	0.3
<i>L. collinoides</i> 922	71.4	4.3	76.6	4.8
<i>L. delbrueckii</i> 287	39.5	1.5	19.1	0.1
<i>L. fermentum</i> 4007	44.2	1.0	53.6	1.8
<i>L. fructivorans</i> 4785 ^T	22.3	1.0	27.1	1.6
<i>L. hilgardii</i> 4786	70.6	4.2	64.0	3.8
<i>L. hilgardii</i> 264	37.1	1.1	52.8	1.8
<i>L. mali</i> 4149	85.9	5.3	83.5	5.1
<i>L. plantarum</i> 220	1.8	0.1	0.9	0.0
<i>L. plantarum</i> 748	4.1	0.3	0.8	0.1
<i>L. rhamnosus</i> 278	34.2	1.8	19.5	0.6
<i>Lc. mesenteroides</i> 394	44.8	2.8	11.1	0.2
<i>Lc. mesenteroides</i> 219	3.7	0.1	22.8	0.9
<i>Lc. pseudomensen</i> 4027	74.2	4.8	74.3	4.8
<i>P. damnosus</i> 793	11.3	0.1	7.9	0.2
<i>P. pentosaceus</i> 923	62.7	4.2	86	5.3
<i>W. confusa</i> 4707	40.8	1.3	42.5	1.5
<i>W. paramesenteroides</i> 4268	25.2	0.5	40.5	2.2

En la [Figura 3](#) se muestran los datos de la cinética del consumo de la arginina con y sin glucosa. La cinética de la degradación se ve afectada por la presencia de la glucosa. En estos 4 ejemplos hay distintas tendencias del perfil de degradación. En *L. buchnerii* 4674 la glucosa aletarga la incorporación de la arginina y afecta su cinética de degradación. Cuando la arginina está sola la degradación es casi completa. En *L. brevis* 3824, cepa aislada de vino, la arginina es degradada de igual forma tanto en presencia o ausencia de glucosa. Para *L. delbrueckii* 287 la degradación es parcial, y la presencia de la glucosa solo hace que haya menor degradación. En el caso de *L. plantarum* 220 es claramente negativo para la degradación de la arginina.

Con la pendiente obtenida en estas gráficas se determinó la velocidad de degradación de la arginina. Para *L. delbrueckii* 287 esta velocidad es mayor en presencia de glucosa. En cambio en *L. fermentum* 4007, la presencia de glucosa ralentiza la degradación de la arginina. En otros casos, como *L. buchnerii* 4111T o *L. collinoides* 922, la velocidad de degradación no varía en presencia de glucosa.

Actividad enzimática obtenida en extractos celulares

En la [Tabla 5](#) se presentan los valores de las actividades enzimáticas específicas de las tres enzimas involucradas en la vía ADI.

Para optimizar la cantidad de proteína del extracto celular que se debía agregar a cada uno de los ensayos enzimáticos sin saturar la reacción, se hicieron pruebas con un *pellet* procedente de la cepa comercial de *O. oeni* Viniflora oenos® cultivada en MRSm, en 50 ml, 10% CO₂, 27°C, 5 días. Se probó midiendo primero la carbamato-quinasa (CK), ya que era un ensayo rápido, y se podía obtener resultados en el mismo momento. Con 10, 25, 50, 100, 500 µg/ml, se observó el valor de linealidad de esta enzima a un tiempo determinado de reacción y se calculó la actividad específica, al comparar con la ya descrita (Mira de Orduña y col, 2000, Tonon y col, 2001; Tonon y col, 2002). Se comprobó que 10 µg/ml de proteína eran suficientes para no saturar la reacción y que la actividad enzimática específica obtenida era superior. Para arginina-deiminasa (ADI) y ornitina-transcarbamilasa (OTC), se utilizó el mismo *pellet* y se realizó la medida de la actividad enzimática para cada una de ellas como se describió

anteriormente. Se optó por fijar la cantidad de 100 µg/ml de proteína y 10 µg/ml para ADI y OTC respectivamente.

La lisis celular fue determinada utilizando un *pellet* de la cepa comercial de *O. oeni* Microenos® B1 (Laffort S.A., Rentería, España) procedente de 150 ml de TJAG. Se probaron diferentes tiempos de lisis y se determinó la actividad específica (U/mg proteína) y el porcentaje de proteína respecto a la proteína total.

La proteína total se determinó por digestión con NaOH 1N a 100°C, durante 15 minutos. El porcentaje de recuperación se obtuvo dividiendo el contenido de proteína del extracto por el contenido de la proteína total. La actividad enzimática del extracto se analizó mediante la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) (Tabla 6). Con estos resultados se optó por el tiempo de lisis de 4 minutos ya que daba el porcentaje de recuperación más elevado y una actividad enzimática específica superior a la obtenida con más tiempo.

Para el inicio de los ensayos de ADI y OTC se realizó una preincubación de 10 minutos a 37°C. La reacción se detuvo con 50 µl de ácido perclórico al 65%, se centrifugó a 15500 x g durante 5 min, y el sobrenadante se reservó congelado hasta su análisis por el método colorimétrico descrito por Mira de Orduña (2000). Este método, como la mayoría de los métodos colorimétricos es engorroso y la repetibilidad muestra a muestra tiene una trazabilidad baja. Se tomaron de un cultivo dos extractos y se hicieron por duplicado cada uno de ellos. Se obtuvieron por lo tanto cuatro valores.

Con respecto a las AEs en todas las cepas coincide con las descritas previamente por Liu y col. (1995; 1996) y Tonon y col (2002). Hay una gran variabilidad entre las especies y las cepas evaluadas.

En términos generales la actividad de la enzima OTC es relativamente alta con respecto a las otras dos enzimas, ADI y CK y con valores dispares incluso en cepas de la misma especie. En casos como *L. brevis* 216 y 4300 se puede ver una actividad específica alta de ADI al comparar con los valores obtenidos para el resto de especies y cepas. Sin embargo la actividad de la OTC en *L. brevis* 216 es baja en relación a la actividad de ADI, lo que acarrearía más presencia de citrulina en el medio sobre la ornitina producida. De esta misma especie, *L. brevis* JM11 tiene una actividad OTC bastante baja que se ve compensada por una alta actividad CK.

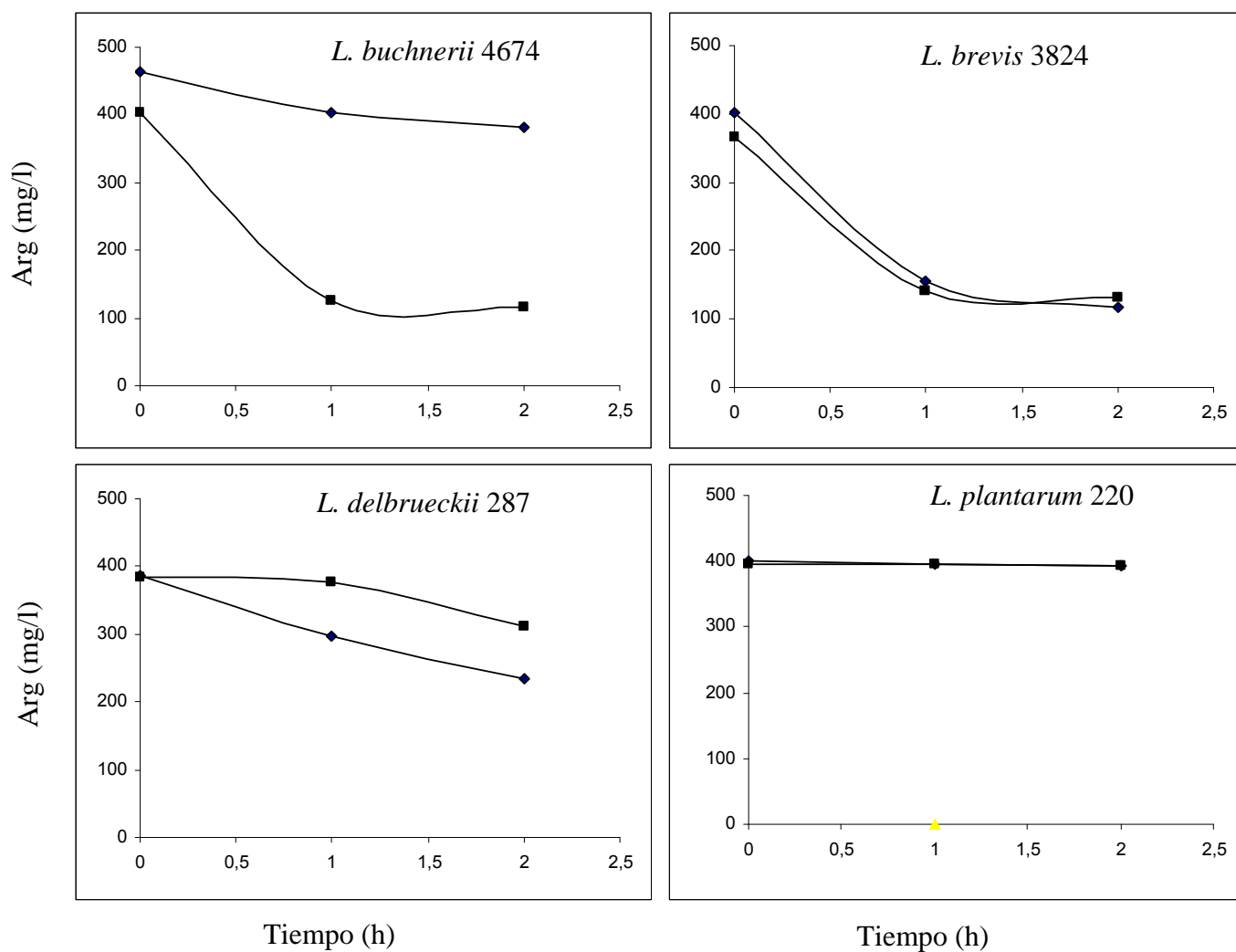


Figura 3 Cinética de degradación de la arginina con cepas en reposo metabólico durante 2 horas en solución acuosa de arginina (--■--) y arginina-glucosa (--◆--)

Tabla 5. Actividades enzimáticas específicas de las enzimas involucradas en la vía ADI en extractos celulares de diferentes cepas de bacterias lácticas cultivadas en medio MRSm suplementado con arginina 5 g/l.

Cepa	ADI		OTC		CK	
	AEs	SD	AEs	SD	AEs	SD
<i>L. buchnerii</i> 4111	0.5	0.04	35.0	1.2	5.8	0.6
<i>L. buchnerii</i> 4674	0.1	0.01	11.2	0.8	6.1	0.5
<i>L. brevis</i> JM11	0.6	0.2	6.0	1.7	12.9	0.2
<i>L. brevis</i> JM12	0.6	0.05	41.5	3.6	14.6	2.2
<i>L. brevis</i> 4121 ^T	0.2	0.1	34.9	7.3	4.8	0.5
<i>L. brevis</i> 4246	0.1	0.04	74.6	4.9	6.0	1.1
<i>L. brevis</i> 3824	0.3	0.3	64.8	6.8	6.8	1.1
<i>L. brevis</i> 216	1.5	0.4	18.2	1.5	6.3	0.5
<i>L. brevis</i> 4300	1.4	0.2	47.0	1.3	7.1	1.3
<i>L. hilgardii</i> 4786 ^T	0.4	0.1	16.2	2.9	6.9	5.0
<i>L. hilgardii</i> 4681	0.8	0.3	41.1	5.5	9.8	2.7
<i>L. hilgardii</i> 4682	0.3	0.1	45.1	7.6	6.9	1.3
<i>P. pentosaceus</i> 4695 ^T	0.1	0.04	13.9	1.9	3	1.0
<i>P. pentosaceus</i> 923	0.6	0.06	18.7	3.4	2.8	0.1
<i>P. pentosaceus</i> 4208	0.5	0.03	20.5	3.9	2	0.5
<i>P. pentosaceus</i> 4214	0.3	0.1	18.5	3.3	2.7	1.4

AEs: Actividades enzimáticas específicas U/mg
 SD: Desviaciones estándar

Tabla 6. Optimización del tiempo de lisis en base a la recuperación de proteína y la Actividad enzimática de lactato deshidrogenasa (LDH) obtenida.

Tiempo de lisis (min)	% recuperación	AE _{LDH} (U/mg)
2	39.6	2.3
3	47.1	2.5
4	53.6	3.3
5	59.3	2.9

Para los pediococcos, siendo homofermentativos y con una habilidad entre 81 al 99% en degradar la arginina, la actividad en todas las 3 enzimas son relativamente bajas al compararlas con los valores obtenidos para el resto de especies heterofermentativas evaluadas.

DISCUSIÓN

La vía ADI representa un metabolismo adaptativo singular en las bacterias lácticas que lo poseen. Contribuye a la homeostasis del pH interno de la célula y la tolerancia de la acidez porque se consumen dos protones en la vía y por la generación de amonio. La vía ADI contribuye además a una adaptación e imposición en un sistema de fermentación en condiciones de estrés ácido (Gänzle y col., 2007). A nivel tecnológico la vía ADI es interesante, ya que la degradación de la arginina aparte de suavizar el sabor, está involucrado en la producción de aromas como el del 2-acetil-1-pirrolina, importante en la industria de masas fermentadas (Vrancken y col., 2009)

En la industria enológica la actividad ADI de las BL es considerada indeseable, debido a la potencial formación del carbamato de etilo a partir de la reacción del etanol y citrulina (Liu y col., 1998; Spano y col., 2007). Por este motivo se hace esencial entender e investigar la cinética de la conversión de arginina a ornitina y las condiciones que le afectan.

Las cepas estudiadas han sido escogidas por su presencia en alimentos fermentados principalmente aislados de vinos. La cuantificación de la disminución de la arginina se efectuó en células crecidas en medio MRSm, suplementado con arginina y glucosa a 5 g/l respectivamente. La presencia del aminoácido y la glucosa estimula la ruta de degradación del aminoácido en la mayoría de los casos. La presencia de solo glucosa favorece el crecimiento cuando está presente en el medio, a diferencia de cuando está presente únicamente la arginina.

Hay variabilidad en la capacidad de degradación de la arginina por parte de las cepas evaluadas, no estando relacionada esta capacidad con la especie. Aproximadamente un tercio de las 109 cepas evaluadas degradan completamente la arginina, el 30% la degradan parcialmente, mientras que solo el 14.6 % no la degradan. Los lactobacilos heterofermentativos ensayados han degradado total o parcialmente la arginina. En los lactobacilos homofermentativos como *L.*

delbrueckii y *L. mali* la variedad en la habilidad de utilizar la arginina va desde los que no degradan, a los que lo hacen total a parcialmente. Varios pediococos, siendo todos homofermentativos, han demostrado tener capacidad degradadora, desde parcial como el *P. damnosus* 793 que degrada cerca del 50% a los *P. pentosaceus* que pueden llegar al 100%. Esto es interesante para un grupo que no estaba definido como degradador (Ribéreau-Gayon y col., 2000; Kandler 1986; Schleifer, 1986). En estudios anteriores referentes a pediococos no se había tenido en cuenta la especie *P. pentosaceus* (Liu y col., 1995).

La determinación cualitativa de la degradación de la arginina es una herramienta sencilla y practica que se desarrolló en el transcurso de este trabajo. Se obtiene el resultado en un solo paso sin tener que hacer un análisis posterior. Su composición y uso es bastante sencillo, lo que permitió realizarla paralelamente con otros experimentos. El medio posee en su composición un indicador de pH (Rojo de Clorofenol) ácido – base que permite diferenciar claramente las reacciones positivas. Tiene un rango de pH de 5.4 - 6.8 siendo su forma ácida amarilla y la alcalina es roja.

Las actividades enzimáticas fueron cuantificadas en cepas que habían sido previamente caracterizadas. Las cepas fueron escogidas por estar relacionadas con el vino y su alto porcentaje de degradación.

La variabilidad interespecífica observada en la degradación de arginina se corresponde con la diferencia que presenta la actividad enzimática de cada una de las enzimas que están involucradas en la vía ADI. Por ejemplo, *L. brevis* 4121^T tiene un porcentaje de degradación más bajo que las otras cepas de la misma especie, y las AEs obtenidas son relativamente menores al ser comparada con las otras cepas de *L. brevis*. Otro caso parecido es *L. buchnerii* 4111, que tiene un porcentaje de degradación del 99.1%, y AEs de 0.5, 35, 5.8 para ADI, OTC y CK respectivamente. La cepa *L. buchnerii* 4674 con un porcentaje de degradación del 61.9% tiene actividades de 0.1, 11.2 y 6.1 para ADI, OTC y CK, lo que explicaría que su habilidad para la degradación de la arginina sea relativamente más bajo.

En algunos casos la degradación parcial es debida a una actividad ADI más baja, aunque las otras dos enzimas OTC y CK sean altas. En casos como *L. brevis* 216, la actividad ADI es 16 veces mas alta que la de una cepa aislada de vino como *L. brevis* 4246. Al contrario, *L. brevis* 4246 posee la actividad enzimática específica OTC bastante activa, unas 4 veces mayor que la cepa 216

aislada de cerveza. Las cepas aisladas de vinos tienen la actividad de OTC sensiblemente más alta que las procedentes de otros alimentos

En términos generales aunque la actividad de la enzima ADI sea relativamente mas baja no se aprecian grandes diferencias significativas. En todos los casos cuando se recogen las muestras la arginina esta completamente degradada. La degradación de la arginina supone una fuente energética supletoria para el crecimiento, conduciéndose su degradación después de haberse agotado la principal fuente energética, la glucosa. Cepas con mayor actividad de la enzima ADI comportan que la arginina es hidrolizada tempranamente.

En *L. brevis* JM11 la AEs para OTC es la más baja de las cepas estudiadas. En contrapartida las AEs para ADI y CK son altas. El riesgo con esta cepa es la alta acumulación de citrulina que se pueda producir en el medio más que la ornitina producida.

Es posible que el origen de la cepa condicione de alguna manera que la vía este mejor o peor activada. Todos los aislados de cerveza al compararlas con los aislados de vino poseen valores relativamente bajos de todas las actividades de sus enzimas, especialmente de la OTC. En el caso del vino, con un ambiente de estrés, el bajo pH, presencia de etanol y de otros metabolitos tóxicos (compuestos fenolicos, anhídrido sulfuroso y ácidos grasos de cadena pesada) podrían dar lugar a la activación de la vía ADI como mecanismo de protección a este tipo de ambiente (Bourdineaud y col, 2006; Vrancken y col., 2009).

Comprender la cinética de la conversión de la arginina a citrulina –ornitina – amonio y ATP es muy importante. La influencia de la presencia de glucosa sobre la cinética de degradación de la arginina representa una diferente función de la vía ADI en cada una de las cepas en la adaptación a esas condiciones. El estudio de la distinta cinética de la vía ADI de acuerdo a las diferentes condiciones sugiere un mecanismo de adaptación de la cepa. Generalmente la degradación de la arginina requiere un azúcar fermentable de partida para mejorar la toma del aminoácido, pero está condicionada por la actividad de sus enzimas.

Las dos fuentes de energía glucosa y arginina cuando están presentes en el medio mejoran el crecimiento y la densidad celular. La energía que se obtiene del azúcar es utilizada para iniciar la degradación de la arginina. Cuando el azúcar ya esta agotado, empieza la degradación de la arginina. La energía obtenida de allí se invierte para el mantenimiento celular pero no se invierte en el crecimiento.

Esto está relacionado con el hecho de que la vía ADI está involucrada en sistemas de protección y supervivencia en largos periodos de tiempo en ambientes difíciles como la cavidad oral, el queso y el vino (Curran y col, 1995; Stuart y col. 1999; Arena y col, 2005; Bourdineaud, 2006; Terrade y col, 2009).

Esta cinética de degradación puede ser desequilibrada por diferentes condiciones favoreciendo o no la actividad enzimática apropiada de cada una de las enzimas. Por lo tanto la degradación de la arginina es una habilidad condicionada a la presencia de ciertas condiciones y a la cepa que la posee. Champomier y col., 1999; Mira de Orduña y col., 2000^a; 2000^b; 2001; Tonon y col, 2002; Arena y col., 2005; Vrancken y col., 2009.

Estos resultados son relevantes como criterio adicional para seleccionar cepas, tanto de *O. oeni*, como starter en FML en vinos, o cualquiera de las otras especies utilizadas en la preparación de otros alimentos, como *L. sakei*, *L. casei*, *L. plantarum*, *L. delbrueckii*. También es importante la evaluación de algunas especies que actúan como oportunistas y contaminantes, como *L. brevis*, *P. pentosaceus* y *P. damnosus*, ya que interesa que estas cepas sean no degradadoras de arginina y en el caso de serlo, que tengan unos niveles enzimáticos altos que aseguren que ninguno de los metabolitos secundarios no deseables se acumulen, como citrulina o carbamil-fosfato.

REFERENCIAS

- Arena, M.E.; Saguir, F.M.; Manca de Nadra, M.C. **1999**. Arginine dihydrolase pathway in *Lactobacillus plantarum* from orange. Int. J. Food Microbiol. 47. 203-209.
- Arena M.E., Manca de Nadra MC. **2001**. Biogenic amine production by *Lactobacillus*. J. Applied Microbiol. vol. 90 p.158-162
- Arena M.E., Manca de Nadra M.C. **2005**. Influence of ethanol and low pH on arginine and citrulline metabolism in lactic acid bacteria from wine. Research in Microbiol. 156 (8). 858-864
- Bourdineaud J.P. **2006**. Both arginine and fructose stimulate pH-independent resistance in the wine bacteria *Oenococcus oeni*. Int. J. Food Microbiol. 107. 274 - 280.

- Crow V.L., Thomas T.D. 1982. Arginine Metabolism in Lactic Streptococci. *J. Bacteriol.* 150,3: 1024 –1032
- Curran T.M., Lieou J., Marquis R.E. 1995. Arginine deiminase systems and acid adaptation of oral streptococci. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 4494 – 4496.
- De Man, J.C.; Rogosa, M.; Sharpe, M.E. A medium for the cultivation of lactobacilli. *J. Appl. Bacteriol.* **1960**, 23, 130–135
- Gänzle M., Vermeulen N., Vogel R.F. 2007. Carbohydrate, peptide and lipid metabolism of lactic acid bacteria in sourdough. *Food Microbiol.* 24, 128-138.
- Gilboe, D.D.; Williams, J.N. Evaluation of the Sakaguchi reaction for quantitative determination of arginine. *Proc. Soc. Experim. Biol. Med.* **1956**, 91, 535 –536.
- Henick-Kling, T. 1986. Growth and metabolism of *Leuconostoc oenos* and *Lactobacillus plantarum* in wine. PhD thesis. University of Adelaide, South Australia.
- Henick-Kling T., Edinger W., Daniel P., Monk P. **1998**. Selective effects of sulfur dioxide and yeast starter culture addition on indigenous yeast populations and sensory characteristics of the wine. *J. Appl. Microbiol.* 84. 865-876.
- Jonson S., Clausen E., Raa J. 1983. Amino acid degradation by a *Lactobacillus plantarum* strain from fish. *Syst. Appl. Microbiol.* 4. 148 – 154.
- Krieger, S. A., Hammes W. P., Henick-Kling T.. **1992**. Effect of medium composition on growth rate, growth yield and malolactic activity of *Leuconostoc oenos* LoZH1-t7-1. *Food Microbiology.* 9:1-11.
- Liu S.-Q., Pritchard G.G., Hardman M.J., Pilone G.J. **1995**. Occurrence of arginine deiminase pathway enzymes in arginine catabolism in wine lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 61 (1). 310-316.
- Liu, S.Q., Pilone, G.J. **1998**. A review: Arginine metabolism in wine lactic acid bacteria and its practical significance. *Journal of Applied Microbiology*, 84, 315-327.
- Mira de Orduña R. Liu S.Q., Patchett M.L., Pilone G.J. **2000**. Kinetics of the arginine metabolism of malolactic wine lactic acid bacteria *Lactobacillus buchnerii* CUC-3 and *Oenococcus oeni* Lo111. *J. App. Microbiol.* 89. 547 – 552

- Mira de Orduña R., Patchett M.L., Liu S.Q., Pilone G.J. **2001**. Growth and arginine metabolism of the wine lactic acid bacteria *Lactobacillus buchnerii* and *Oenococcus oeni* at different pH values and arginine concentrations. *App. Environ. Microbiol* 67, 4. 1657 -1662
- Micklus M. J, Stein I,M. 1973. The colorimetric determination of mono- and disubstituted guanidines. *Anal. Biochem.* 54, 545 – 553.
- Pripis-Nicolau L., Revel G., Marchand S., Beloqui A., Bertrand A. **2001**. Automated HPLC method for the measurement of free amino acids including cysteine in musts and wines; first applications. *J. Science of Food and Agriculture.* 81, 8. 731-738.
- Rodas A.M., Ferrer S., Pardo I. 2003. 16S-ARDRA, a tool for identification of lactic acid bacteria isolated from grape must and wine. *Syst. App. Microbiol* 26. 412 – 422.
- Ruiz-Barba J.L., Maldonado A., Jiménez-Díaz R. 2005. Small-scale total DNA extraction from bacterial and yeast for PCR applications. *Analytical Biochemistry.* 347. 333 – 335.
- Spano, G., Chieppa, G., Beneduce, L.; Massa, S. **2004**. Expression analysis of putative *arcA*, *arcB* and *arcC* genes partially cloned from *Lactobacillus plantarum* isolated from wine. *J. Appl. Microbiol.*, 96, 185-193.
- Stuart M.R., Chou L.S., Weimer B.C. **1999**. Influence of Carbohydrate starvation and Arginine on culturability and Amino Acid Utilization of *Lactococcus lactis* subs. *lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 2: 665 – 673.
- Terrade N., Mira de Orduña R. **2009**. Arginine and citrulline do not stimulate growth of two *Oenococcus oeni* strains in wine. *FEMS Microbiol Lett.* 209, 98-104.
- Thornley M.J. **1960**. The differentiation of *Pseudomonas* from other gram-negative bacteria on the basis of arginine metabolism. *J. Appl. Bacteriol.* 23, 27 – 52.
- Tonon, T., Bourdineaud, J.P., Lonvaud-Funel, A. **2001a**. The *arcABC* gene cluster encoding the arginine deiminase pathway of *Oenococcus oeni*, and arginine induction of a CRP-like gene. *Res. Microbiol.* 152, 653-661
- Tonon, T.; Lonvaud-Funel, A. **2002**. Arginine metabolism by wine *Lactobacilli* isolated from wine. *Food Microbiol.*, 19, 451-461.

- Torriani S., Felis G.E., Dellaglio F. **2001**. Differentiation of *Lactobacillus plantarum*, *L. pentosus*, and *L. paraplantarum* by *recA* gene sequence analysis and multiplex PCR assay with *recA* gene-derived primer. *App. Environ. Microbiol.* 67 (8). 3450 3454.
- Vrancken G., Rimaux T., Wouters D., Leroy F., De Vuyst L. 2009. The arginine deiminase pathway of *Lactobacillus fermentum* IMDO 130101 responds to growth under stress conditions of both temperature and salt. *Food Microbiology.* 1-8. doi: 10.1016/j.fm.2009.07.006.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
ESTUDIO BIOQUÍMICO Y MOLECULAR DE LA PRODUCCIÓN DE PRECURSORES DE CARBAMATO DE ETILO POR BACTERIAS LÁCTICA
ASOCIADAS AL PROCESO DE VINIFICACIÓN
ISBN:978-84-693-6429-1/DL:T-1631-2010

III. 3.

DETECCION DE LOS GENES *arc* RELACIONADOS CON LOS PRECURSORES DEL CARBAMATO DE ETILO EN BACTERIAS LACTICAS DEL VINO

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
ESTUDIO BIOQUÍMICO Y MOLECULAR DE LA PRODUCCIÓN DE PRECURSORES DE CARBAMATO DE ETILO POR BACTERIAS LÁCTICA
ASOCIADAS AL PROCESO DE VINIFICACIÓN
ISBN:978-84-693-6429-1/DL:T-1631-2010

**Detección de los genes *arc* relacionados con los precursores del
carbamato de etilo en bacterias lácticas del vino**

**Detection of *arc* Genes Related with the Ethyl Carbamate
Precursors in Wine Lactic Acid Bacteria**

Artículo publicado:

Journal of Agricultural and Food Chemistry

2009, 57 (5), 1841- 1847.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
ESTUDIO BIOQUÍMICO Y MOLECULAR DE LA PRODUCCIÓN DE PRECURSORES DE CARBAMATO DE ETILO POR BACTERIAS LÁCTICA
ASOCIADAS AL PROCESO DE VINIFICACIÓN
ISBN:978-84-693-6429-1/DL:T-1631-2010

Detection of *arc* Genes Related with the Ethyl Carbamate Precursors in Wine Lactic Acid Bacteria

**ISABEL ARAQUE, JOANA GIL, RAMON CARRETÉ,
ALBERT BORDONS, AND CRISTINA REGUANT ***

Departament de Bioquímica i Biotecnologia, Facultat d'Enologia, Campus
Sescelades, Universitat Rovira i Virgili, Tarragona, Catalonia, Spain

Cristina Reguant* (Corresponding author):

Dept. Bioquímica i Biotecnologia, Universitat Rovira i Virgili

Carrer Marcel·lí Domingo s/n, 43007 Tarragona, Catalonia, Spain

Email: cristina.reguant@urv.net

Phone: +34 977558280

Fax: +34 977558232

Abstract

Trace amounts of the carcinogen ethyl carbamate can appear in wine by the reaction of ethanol with compounds such as citrulline and carbamyl phosphate, which are produced from arginine degradation by some wine lactic acid bacteria (LAB). In this work, the presence of *arc* genes for arginine-deiminase pathway was studied in several strains of different species of LAB. Their ability of degrading arginine was also studied. To detect the presence of *arc* genes, degenerate primers were designed from the alignment of protein sequences in already sequenced LAB. The usefulness of these degenerated primers has been proven by sequencing some of the amplified PCR fragments and searching for homologies with published sequences of the same species and related ones. Correlation was found between presence of genes and ability to degrade arginine. Degrading strains included all heterofermentative lactobacilli, *Oenococcus oeni*, *Pediococcus pentosaceus*, and some strains of *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactobacillus plantarum*.

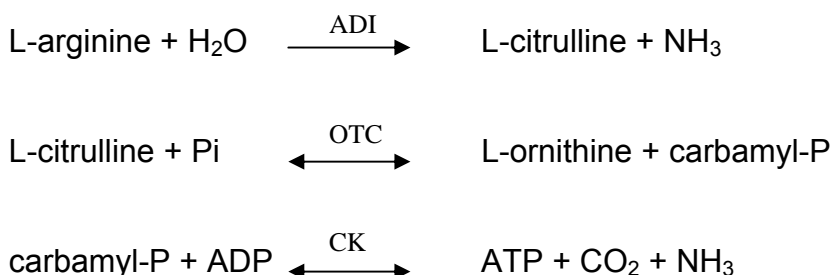
KEYWORDS: *arc* genes; arginine deiminase; ethyl carbamate; lactic acid bacteria, wine

INTRODUCTION

Two groups of undesirable substances for the health of the wine consumer may be released by lactic acid bacteria (LAB) during and after winemaking: biogenic amines and ethyl carbamate precursors (1). Wine, like most fermented foods and beverages (2), contains trace amounts of ethyl carbamate (EC) (3). EC, also referred to as urethane, is a genotoxic compound *in vitro* and *in vivo*, and it binds covalently to DNA and is an animal carcinogen (4, 5). EC is formed by a spontaneous chemical reaction between ethanol and some compounds that contain a carbamyl group such as urea, citrulline and carbamyl phosphate (6, 7). This reaction is favoured by increasing temperature and acid pH (8). The content of EC is therefore higher in wines that have been stored for a long time and where temperature has not been well controlled (9).

Even though the urea produced by yeast is the main potential EC precursor in wine, LAB can contribute to the formation of EC due to the production of citrulline and carbamyl-P from arginine (10-12). Some wine LAB are known to degrade L-arginine, which is one of the main amino acids found in grapes and wine (13). It has been demonstrated that arginine catabolism by these LAB involves the arginine deiminase (ADI) pathway (14-16). This pathway is the most widespread anaerobic route for arginine degradation (17, 18) and its presence has been reported in Bacteria, Archaea and some anaerobic eukaryotes (19).

This pathway includes three enzymes, ADI (EC 3.5.3.6), ornithine transcarbamylase (EC 2.1.3.3, OTC) and carbamate kinase (EC 2.7.2.2, CK), which catalyze the following reactions:



This pathway contributes positively to growth and viability of LAB due to ATP formation and the acidity decrease caused by ammonium production (20). However, the degradation of arginine yields citrulline and carbamyl phosphate, which can react spontaneously with ethanol to form EC.

Moreover, the ADI pathway is sometimes indirectly related with biogenic amines production, specifically putrescine, since this amine can be produced from ornithine by LAB such as *Oenococcus oeni* (21).

Wine lactobacilli vary in their ability to degrade arginine. All heterofermentative lactobacilli are found to be degradative (22). Facultative heterofermentative lactobacilli from wine were believed not to degrade arginine (14, 23) but recently some *Lactobacillus plantarum* have shown to be arginine-consuming by ADI pathway (24). Likewise, no homofermentative pediococci isolated from wine seem to degrade arginine but some of the isolated ones from other fermented food (cheese, sausages) can do it (22).

As reported for other bacteria (25-27), genes encoding the three enzymes of this pathway in LAB are clustered in an operon-like structure: *arcA* (ADI), *arcB* (OTC) and *arcC* (CK). These genes have been characterized in different LAB such as *Lactobacillus sakei* (28), *Lb. hilgardii* (29), *Lb. plantarum* (24), and *Oenococcus oeni* (30).

Related to this pathway, other proteins, such as transcriptional regulators (ArcR, ArgR/AhrC) and arginine/ornithine transporters (ArcD1, ArcD2), have been characterised for some LAB species (31-34). Genes coding for other enzymes not related to the ADI pathway have also been described as part of an *arc* operon, such as *arcT* (a putative transaminase) and *argS* (arginyl-tRNA synthetase), both in *Lactococcus lactis* (33, 35), and *argS2* (a putative arginyl-tRNA synthetase) in *O. oeni* (36).

Due to the relevance of *O. oeni* in winemaking, there are several molecular studies of their ADI pathway genes (30, 34, 39). Although *O. oeni* is the main species responsible for MLF (37, 38), other LAB may proliferate during the early stages of MLF (1) or later if the conditions are propitious, such as low acidity (1). Nevertheless, few information is available about the potential of these LAB species to degrade arginine under wine conditions. The presence of the *arc* genes has been analysed only in *Lb. hilgardii* and *Lb. plantarum*. However, there are no studies regarding the other wine LAB species.

In this work, we studied the presence of *arc* genes in LAB frequently found in wine. We analysed a wide range of different strains in order to establish the relation between their ability to degrade arginine and the presence of the ADI pathway genes.

MATERIALS AND METHODS

Microorganisms and growth conditions. We used 39 strains of different species of *Lactobacillus*, *Oenococcus*, *Leuconostoc* and *Pediococcus*, most of which were isolated from wine (**Table 1**). These strains were grown anaerobically at 27°C in MRS (40) supplemented with 4 g/l DL-malic acid and 5 g/l D(-)-fructose.

Arginine degradation. Cells grown as above detailed were inoculated (1% v/v) in 5 ml of a modified MRS medium adjusted at pH 4.5, following Tonon *et al.* (29), supplemented with 5 g/l of arginine, and incubated anaerobically at 27°C. Samples were taken at the end of the logarithmic phase. Arginine in supernatants was quantified by the colorimetric method of Sakaguchi (41). To confirm the production of citrulline by some strains, it was quantified with HPLC, following the method of Gómez-Alonso *et al.* (42).

Genomic DNA extraction. DNA was prepared by extraction with chloroform and previous incubation with lysozyme (2.5 mg/ml) in TE buffer, following the method of Persing *et al.* (43) with some modifications, as published by Reguant and Bordons (44).

Detection of arc genes in different species of LAB. Degenerate primers were designed (**Table 2**) from multiple alignment of conserved regions of protein sequences of the three enzymes of ADI pathway (ADI, OTC and CK). These sequences are known in other already sequenced LAB: *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* ML3 (GenBank data library accession number AF282249), *O. oeni* ATCC23279^T (AF124851), *Lb. sakei* BL13 (AJ1330) and *Lb. hilgardii* X1B (AJ421514). General recommendations on primer design were followed (45, 46) and parameters (%GC, T_m and specificity) were optimized using Primer Express v1.5 from Applied Biosystems (Foster City, CA., USA) and Amplify 1.2 (47). Likewise, two specific primers were used to amplify the region downstream *arcA* in *Leuc. mesenteroides* strains: LM-F: 5'- GAAGGTTATACGGTCA TCCCTATC-3' and LM-R: 5'- GCAACCGTCCACGACGATCA-3'.

Amplification was performed using the described primers synthesized by Ecogen (Barcelona, Spain). The PCR volume was 20 μ l and contained 2 μ g of genomic DNA, 1.5 mM Mg₂Cl, 0.2 mM of each dNTP, 0.5 U Taq DNA polymerase and 2 μ M of each primer in 10x PCR buffer. The amplification profile was 94°C for 2 min, 55°C for 2 min and 72°C for 2 min, and this was repeated for 30 cycles. Also included were a pre-incubation step of 94°C for 2 min and a final extension of 72°C for 10 min. The amplification products were resolved by electrophoresis in 1% (w/v) agarose TBE gels.

Table 2. Degenerated primers used for the detection of *arc* genes in strains of different lactic acid bacteria.

Primer name	Sequence (5' to 3') *	Fragment amplified (bp)
ADI deg-F1	CAYGCNATGATGCAYYTNGAYACNGT(26)	266 bp
ADI deg-R1	GTRTTNSWNCRCRTRTTCCAYTGYTC(26)	
OTC deg-F3	ATGCAYTGYYTNCNGCNTTYCAYGA(26)	181 bp
OTC deg-R3	CCNARNGTNGCNGCCATDATNGCYTT(26)	
CK deg-F1	CAYGGNAAAYGGNCCNCARGTNGGNAA(26)	343 bp
CK deg-R1	CKNCKNYANCCNCKNCCNGCRTCYTC(26)	

* Nomenclature for incompletely specified bases in nucleic acid sequences, following the recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/misc/naseq.html>):

Y: T or C; N: A, T, C or G; R: A or G; S: G or C; W: A or T; D: G, A or T; K: G or T.

Sequencing of amplified DNA fragments. Amplicons were purified from the gel bands in minicolumns Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega Biotech Ibérica SL, Barcelona, Spain) and sequenced by Biopremier Inc. (Lisbon, Portugal). The homology of their sequences was compared with all published sequences using the BLAST program at NCBI and the ClustalW software from the European Bioinformatics Institute (<http://www.ebi.ac.uk/>).

Nucleotide accession numbers. The nucleotide sequence of these amplified fragments were deposited in the GenBank database under the accession numbers shown in **Table 4**.

RESULTS

Arginine degradation by wine LAB strains. As can be seen in **Table 1**, most of the tested strains of heterofermentative lactobacilli (*Lb. hilgardii*, *Lb. brevis* and *Lb. buchneri*) degraded over 50% of 5 g/l arginine. Most of them degraded it quickly, in less than 2 days, before ending the log phase. Regarding the facultative heterofermentative *Lb. plantarum*, only the strain isolated from wine showed the ability to degrade arginine. All the tested *O. oeni* strains resulted arginine degrading, but it was found a great variability in arginine consumption rate depending on the strain. This variability was not related with different growth of strains, since samples were taken at the end of logarithmic phase, with values of O.D. around 0.9-1.4 for all strains. Regarding the *Pediococcus* genus, none of the tested strains of *P. parvulus* degraded arginine, while all *P. pentosaceus* representatives did so. In the case of *Leuconostoc mesenteroides*, two strains isolated from wine were found to degrade arginine. Nevertheless, other two strains of this species, one isolated from wine and the other from olives, did not. The contents of citrulline found in the supernatants of the arginine-degrading strains of *Leuc. mesenteroides* were significantly higher than in assays with all other species (**Table 3**). Molar ratio of citrulline produced versus arginine consumed was around 30% while for other arginine-degrading species, such as *Lb. hilgardii*, it was less than 10%.

Table 3. Molar ratio of citrulline produced versus arginine consumed by some strains of *Leuconostoc mesenteroides*, and a reference arginine-degrading strain of *Lactobacillus hilgardii*.

Strain	Arginine consumed (mM)*	Citrulline produced (mM)*	Citrulline produced / arginine consumed (%)
<i>Leuc. mesenteroides</i> 219 ^T	0	0	---
<i>Leuc. mesenteroides</i> V41	1.02	0.29	28.4
<i>Leuc. mesenteroides</i> L17	0.91	0.30	33.0
<i>Lb. hilgardii</i> 4786 ^T	0.99	0.09	9.1

*These values are the differences from initial and 24 h after inoculating MRS medium at pH 4.5, with initial 2.9 mM arginine. Values are the averages of two cultures for each strain.

Detection of arc genes. The degenerated primers, designed in this work, were used to detect the genes *arcA*, *arcB* and *arcC* in 39 strains of 8 different species of LAB (**Table 1**). The three genes were detected in all the tested strains of *Lb. hilgardii*, *Lb. brevis*, *Lb. buchneri*, *O. oeni* and *P. pentosaceus*. The corresponding amplification products were not obtained with *P. parvulus*. In all these cases, the presence or absence of the *arcA* gene agreed with their ability to degrade arginine. Results of the electrophoretic gels, showing the amplified bands of one strain from each of these species, are shown in **Figure 1**.

Table 1. Arginine degradation and presence of *arc* genes in strains of different lactic acid bacteria.

Strain	Source ^a	Origin	Degradation of arginine (%) ^b	Presence of <i>arc</i> genes		
				<i>arcA</i>	<i>arcB</i>	<i>arcC</i>
<i>Lactobacillus hilgardii</i>						
4786 ^T	CECT	wine	88	+	+	+
4681	CECT	wine	88	+	+	+
4682	CECT	wine	88	+	+	+
<i>Lactobacillus brevis</i>						
4121 ^T	CECT	fecal	78	+	+	+
216	CECT	beer	97	+	+	+
3824	UV	wine	99	+	+	+
4246	UV	wine	98	+	+	+
4300	UV	wine	98	+	+	+
C12	CM	wine	92	+	+	+
JM11	CM	wine	93	+	+	+
J12	CM	wine	33	+	+	+
<i>Lactobacillus buchneri</i>						
4111 ^T	CECT	tomato	99	+	+	+
4674	CECT	beer	61	+	+	+

<i>Lactobacillus plantarum</i>						
CB21	CM	wine	93	+	+	+
220	CECT	silage	0	-	+	-
<i>Oenococcus oeni</i>						
217 ^T	CECT	wine	89	+	+	+
4727	CECT	wine	99	+	+	+
4733	CECT	wine	45	+	+	+
4772	CECT	wine	13	+	+	+
Mf15	URV	wine	23	+	+	+
E2201	URV	wine	83	+	+	+
O43	CM	wine	90	+	+	+
F41	CM	wine	97	+	+	+
<i>Pediococcus pentosaceus</i>						
923	CECT	milk	88	+	+	+
4695 ^T	CECT	beer	82	+	+	+
4208	UV	wine	100	+	+	+
4214	UV	wine	100	+	+	+
E2137	URV	wine	93	+	+	+
E2203	URV	wine	87	+	+	+
E1804	URV	wine	94	+	+	+
E1203	URV	wine	82	+	+	+
<i>Pediococcus parvulus</i>						
813 ^T	CECT	silage	0	-	-	-
3908	UV	wine	0	-	-	-
3909	UV	wine	0	-	-	-
3911	UV	wine	0	-	-	-
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>						
219 ^T	CECT	olives	0	-	+	-
BIFI-54	IFI	wine	0	-	+	-
V41	CM	wine	99	+	-	-
L17	CM	wine	99	+	-	-

^a CECT, Colección Española de Cultivos Tipo, Valencia, Spain; UV, S. Ferrer, Enolab, Fac. Biología, Universitat de València, Spain; CM, M.C. Masqué, Incavi, Reus, Spain; URV, authors collection, Rovira i Virgili University, Tarragona, Spain; IFI, R. Muñoz, Instituto de Fermentaciones Industriales, CSIC, Madrid.

^b Degradation of 5 g/l (29 mmol/l) arginine in MRS medium at pH 4.5. Values are the averages of two cultures for each strain.

To verify the identity of the amplicons obtained from the species *Lb. brevis*, *Lb. buchneri* and *P. pentosaceus* (not used in the primer design) the purified fragments of a representative strain of each were sequenced and compared to published sequences. **Table 4** shows the highest homologies found between the sequences obtained and the possible published sequences. The three fragments of *arcA*, *arcB* and *arcC* obtained from *Lb. brevis* 4246 presented homologies of > 90% with the corresponding sequences published for strain 367 from the same species. With regard *Lb. buchneri* 4674, for the moment, there are no available

sequences of the ADI pathway genes for this species other than those reported in this work. The greatest homologies for this strain were found with *Lb. brevis* in the case of *arcA*, and *L. hilgardii* in the case of *arcB* and *arcC*. With regard to the fragments of *P. pentosaceus* 4214, homologies of > 94% were found with the corresponding published sequences for strain 25745 from the same species.

With regard to *Lb. plantarum*, the arginine-degrading strain CB21 presented the bands corresponding to the three genes *arc* (**Figure 1**). The identity of these fragments was confirmed by sequencing, showing high homology with the homologous *arc* genes of *Lb. hilgardii* (**Table 4**). Nevertheless, the non arginine-degrading strain 220 presented exclusively the band of the OTC gene, lacking *arcA* and *arcC*. The fragment amplified using the *arcB* primers was sequenced to confirm its identity and showed a 94% homology with *Lb. plantarum argF* (**Table 4**), coding for the anabolic counterpart of OTC.

Likewise, the two non arginine-degrading *Leuc. mesenteroides* strains presented only the *arcB* band (**Figure 1**). In these cases, such as strain 219, the amplification of ornithine transcarbamoyltransferase gene was confirmed by DNA sequencing of the obtained amplicon, presenting a 99% homology with the published sequence (**Table 4**). Surprisingly, the arginine-degrading strains of *Leuc. mesenteroides* presented the *arcA* gene but not the other two (**Figure 1**). The absence of an *arcABC* organization in this strain was confirmed by sequencing the downstream region of *arcA*. In this case, the amplification showed that both V41 and L17 strains had a *ribD* gene downstream *arcA* (GenBank FJ426345, FJ426343, FJ426344).

Tabla 4. Highest homologies (%) found between gene fragments sequenced in this work and published sequences.

Sequences obtained in this work*	Highest homology found†
<i>Lb. brevis</i> 4246	<i>arcA</i> (EF54853) 95% <i>Lb. brevis</i> ATCC 367 <i>arcA</i> (LVIS_2027) <i>arcB</i> (EF54854) 91% <i>Lb. brevis</i> ATCC 367 <i>arcB</i> (LVIS_2026) <i>arcC</i> (EF54855) 96% <i>Lb. brevis</i> ATCC 367 <i>arcC</i> (LVIS_2023)
<i>Lb. buchneri</i> 4674	<i>arcA</i> (EF54856) 79% <i>Lb. brevis</i> ATCC 367 <i>arcA</i> (LVIS_2027) <i>arcB</i> (EF54857) 81% <i>Lb. hilgardii</i> X1B <i>arcB</i> (AJ421514) <i>arcC</i> (EF54858) 69% <i>Lb. hilgardii</i> X1B <i>arcC</i> (AJ421514)
<i>P. pentosaceus</i> 4214	<i>arcA</i> (EF54850) 94% <i>P. pentosaceus</i> ATCC 25745 <i>arcA</i> (PEPE_1629) <i>arcB</i> (EF54851) 94% <i>P. pentosaceus</i> ATCC 25745 <i>arcB</i> (PEPE_1631) <i>arcC</i> (EF54852) 99% <i>P. pentosaceus</i> ATCC 25745 <i>arcC</i> (PEPE_1630)
<i>Lb. plantarum</i> CB21	<i>arcA</i> (FJ426339) 98% <i>Lb. hilgardii</i> X1B <i>arcA</i> (AJ421514) <i>arcB</i> (FJ426340) 95% <i>Lb. hilgardii</i> X1B <i>arcB</i> (AJ421514) <i>arcC</i> (FJ426341) 72% <i>Lb. hilgardii</i> X1B <i>arcC</i> (AJ421514)
<i>Lb. plantarum</i> 220	<i>argF</i> (FJ426338) 94% <i>Lb. plantarum</i> <i>argF</i> (X99978.2)
<i>Leuc. mesenteroides</i> 219	<i>arcB</i> (FJ426342) 99% <i>Leuc. mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> ATCC 8293 <i>arcB</i> (LEUM_1457)
<i>Leuc. mesenteroides</i> V41	<i>arcA</i> (FJ426345) 100% <i>Leuc. mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> ATCC 8293 <i>arcA</i> (LEUM_0821) <i>ribD</i> (FJ426345) 97% <i>Leuc. mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> ATCC 8293 <i>ribD</i> (LEUM_0822)
<i>Leuc. mesenteroides</i> L17	<i>arcA</i> (FJ426343) 88% <i>Leuc. mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> ATCC 8293 <i>arcA</i> (LEUM_0821) <i>ribD</i> (FJ426344) 94% <i>Leuc. mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> ATCC 8293 <i>ribD</i> (LEUM_0822)

* Nucleotide accession numbers of the sequenced fragments, deposited in the GenBank database, are shown in parenthesis.

† Highest homology found of the sequence of interest against all the published sequences. The locus tag or accession number of the NCBI GenBank database of these genes are shown in parenthesis.

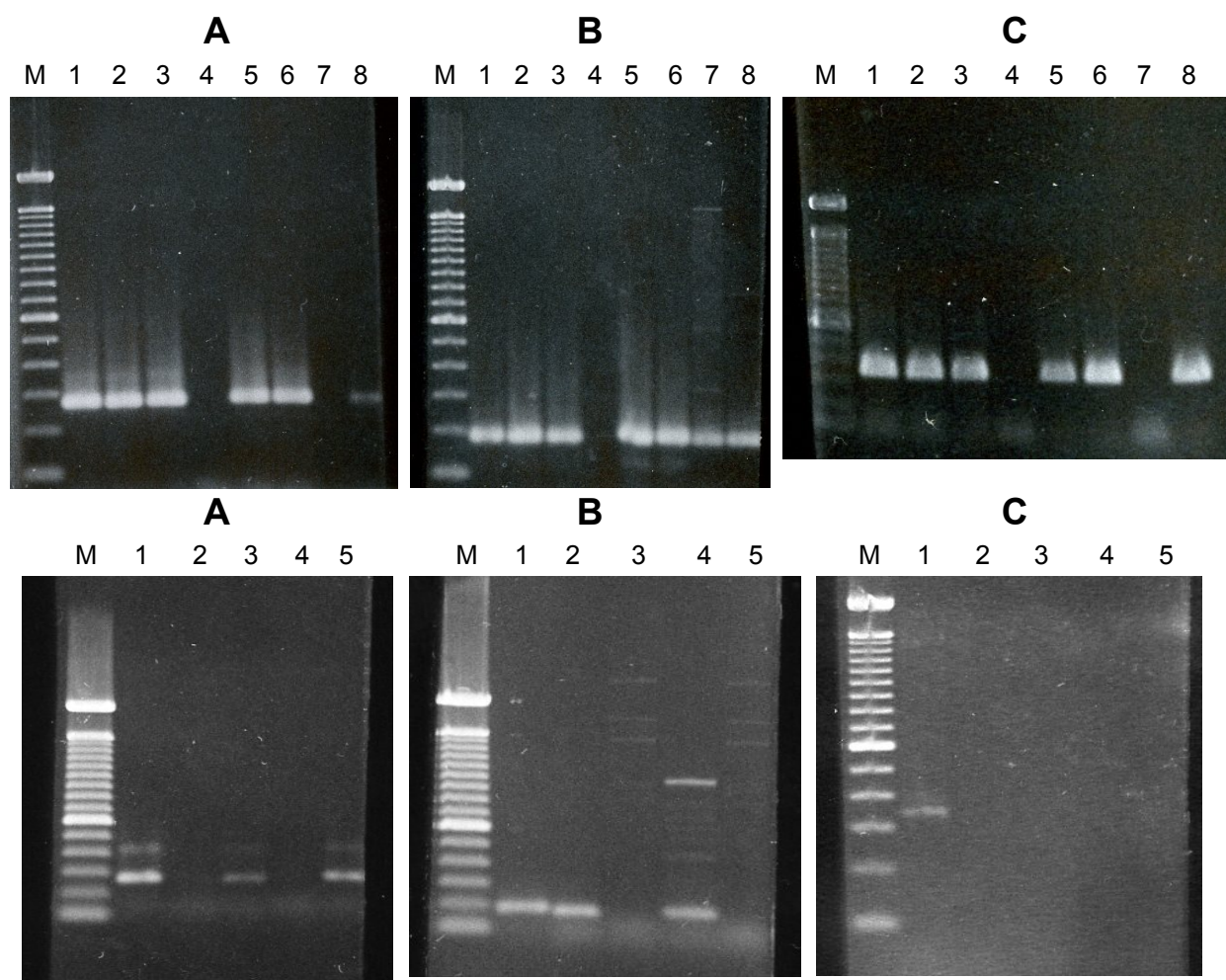


Figure 1. PCR-amplified fragments of *arcA* (A), *arcB* (B) and *arcC* (C) genes (266, 181 and 343 bp, respectively) of different lactic acid bacteria obtained with degenerated primers. Top: lanes 1 to 8 correspond respectively to *Lb. hilgardii* 4786^T, *O. oeni* 217^T, *Lb. brevis* 4246, *P. parvulus* 813^T, *Lb. buchneri* 4111^T, *P. pentosaceus* 4695^T, *Lb. plantarum* 220 and *Lb. plantarum* CB21. Bottom: lanes 1 to 5 correspond respectively to *O. oeni* 217^T, *Leuc. mesenteroides* 219^T, *Leuc. mesenteroides* V41, *Leuc. mesenteroides* BIFI-54 and *Leuc. mesenteroides* L17. Lane M is a ladder DNA of 250 bp of Invitrogen (Barcelona, Spain).

DISCUSSION

For the detection of *arcA*, *arcB* and *arcC* genes in any wine LAB, three pairs of degenerate primers were designed. The available sequences of three LAB species (*O. oeni*, *Lb. sakei* and *Lactococcus lactis*) were used for the design of the primers. The amplified fragments had the expected sizes and the designed degenerated primers showed to be useful in detecting *arc* genes in all these species. The three *arc* genes (A, B, C) were found in the tested strains of heterofermentative

lactobacilli and *Oenococcus*, but also in all tested strains of *P. pentosaceus*. All these strains were able to degrade arginine.

This work reports the presence of *arc* genes in *Pediococcus* strains isolated from wine. All tested strains of *P. pentosaceus*, including six strains from wine, were able to degrade arginine, and the three *arc* genes were detected in all them. Some *Pediococcus* from other fermented foods were found to degrade arginine (22) but those isolated from the wine environment until now did not seem to do so. On the other hand, and accordingly to the previous description of *P. parvulus* (48), we did not find the *arc* genes in any of the tested strains of this species, that included three strains from wine.

Until recently, arginine-degrading strains of *Lb. plantarum* had been isolated only from sources other than wine, such as fish (49) and orange juice (12), but Spano *et al.* (24) demonstrated the presence of *arc* genes in some wine strains of this species, which are able to degrade arginine. Our results agree with that, because the strain CB21 of *Lb. plantarum* isolated from wine analyzed in this work degrades arginine and it has the three *arc* genes. On the other hand, we found that the strain CECT220 (= ATCC 8014) of *Lb. plantarum* is non arginine consuming. This well-studied strain was originally isolated from corn silage, and it is almost more known than the type strain (ATCC 14917), isolated from pickled cabbage. It has also been shown that this type strain is non-degrading and that lacks the *arc* genes (24). The absence of arginine consumption in other strains of *Lb. plantarum* from wine has been shown previously (14, 50). All of this suggests that arginine degradation would be strain-characteristic for some wine isolates of this species. On the other hand, we obtained an amplicon when using *arcB* primers in this non-degrading strain 220. According to sequencing results, this DNA fragment resulted to belong to *argF*, coding for the anabolic OTC activity. In the draft sequence genome of *Lb. plantarum* strain WCFS1 available at GenBank database ([AL935263](#)), there is no evidence of an *arc* operon, while appears an *argF* gene ([NP_784310](#)) for OTC function near other genes related arginine metabolism, such as *argD*, coding for an acetylornithine aminotransferase. This is in agreement with the presence of the biosynthetic OTC gene reported in this study in non arginine-degrading strains.

In relation to *Leuc. mesenteroides*, it was found that some strains of this species are able to degrade arginine. Apparently, all leuconostoc have been

always described as non-arginine-degrading (48) and the only exception was *O. oeni* (then still considered as *Leuc. Oenos*) because several strains of this wine LAB had been found to degrade arginine, as reviewed by Liu and Pilone (22). The detection of arginine-degrading strains of *Leuc. mesenteroides* reinforces the idea stated by these authors of considering the genus *Leuconostoc* as arginine-variable.

Surprisingly, these arginine-degrading strains (V41 and L17) of *Leuc. mesenteroides* isolated from wine presented the *arcA* gene but not the other two. The sequencing of the region downstream *arcA* showed the presence of a *ribD* gene, coding for a 5-amino-6-(5-phosphoribosylamino) uracil reductase. The same gene organization has been observed in the complete genome sequence available of *Leuc. mesenteroides* (CP000414). Therefore, these strains have the ability to degrade arginine with ADI but not the complete operon. In consequence, they are not able to catabolyze the citrulline produced and it can be excreted. As confirmation, a molar ratio of 30% citrulline/arginine was found in the supernatant of these strains, significantly higher than that for other arginine-degrading species (< 10%).

On the other hand, the two non arginine-degrading strains of *Leuc. mesenteroides* (219 and BIFI-54) presented only the band of *arcB*, but not *arcA* or *arcC*. In relation to this, in the sequence genome (CP000414) of *Leuc. mesenteroides* ATCC 8293 there is no evidence of an *arc* operon, and there are reported putative genes only for ADI (YP_818302.1) and OTC (YP_818923) distantly located in the genome. Altogether, it seems that the presence of *arc* genes in *Leuc. mesenteroides* is variable. Arginine-degrading strains may have lost *arcA*, or part of this gene, or complete pathway, remaining unable to catabolyze arginine.

With regard to *O. oeni*, the species most used as starter of MLF in wine, the *arc* genes have been found in all tested strains, although there was found variability of degradation, including some strains with very little degradation.

The purified fragments sequenced and compared to published sequences confirm their identity (Table 4). These sequences are available in the GenBank database and might be useful for further studies on these LAB species.

This work shows the utility of the detection of the *arc* genes using degenerated primers in a representative group of wine LAB. A good correlation between the

presence or absence of the *arc* genes, and mainly with *arcA* gene, with the degradation or lack of degradation of arginine has been found in the different tested wine-related LAB strains. The sole presence of the ADI gene in some arginine-degrading strains of *Leuc. mesenteroides* requires special consideration because these strains would be able to accumulate higher amounts of citrulline, increasing the potential risk of ethyl carbamate formation. Therefore, to detect strains like these it is necessary to analyze the presence of *arcB* and *arcC*, meaning that it is worth testing all three genes, not just *arcA*. Finding these strains is clearly an advantage of this genetic methodology over the test of arginine degradation.

These results suggest the usefulness of the detection of the *arc* genes as a tool for screening strains of different wine LAB species for their ability to generate or not ethyl carbamate precursors. Nevertheless, the variability of arginine degradation found in strains of *O. oeni* despite having the *arc* genes, suggests that further studies related with the expression of these genes are needed. In any case, the results of our study contribute to the knowledge of the influence of the different LAB present in wine on the formation of ethyl carbamate precursors, and the methodology developed and used in this work might be also useful for the study of other LAB species relevant for food processing.

Acknowledgements

This work was supported by grants AGL-2000-0827-C02-02 and AGL2006-3070ALI from the Spanish Ministerio de Ciencia y Tecnología. I. Araque and J. Gil were the recipients of predoctoral fellowships from the Universidad de Pamplona (Colombia), and the Universitat Rovira i Virgili (Tarragona, Spain), respectively.

LITERATURE CITED

- (1) Lonvaud-Funel, A. Lactic acid bacteria in the quality improvement and depreciation of wine. *Anton. van Leeuw.* **1999**, *76*, 317-331
- (2) Vahl, M. A survey of ethyl carbamate in beverages, bread and acidified milks sold in Denmark. *Food Addit. Contamin.* **1993**, *10*, 585-592.
- (3) Ough, C.S. Ethyl carbamate in fermented beverages and foods. I. Naturally occurring ethyl carbamate. *J. Agric. Food Chem.* **1976**, *24*, 323-328.

- (4) Schlatter, J.; Lutz, W.K. The carcinogenic potential of ethyl carbamate (urethane): risk assessment at human dietary exposure levels. *Food Chem. Toxicol.* **1990**, *28*, 205-211.
- (5) Zimmerli, B.; Schlatter, J. Ethyl carbamate - analytical methodology, occurrence, formation, biological-activity and risk assessment. *Mutation Res.* **1991**, *259*, 325-350
- (6) Ough, C.S.; Crowell, E.A.; Gutlove, B.R. Carbamyl compound reactions with ethanol. *Amer. J. Enol. Vitic.* **1988**, *39*, 239-242.
- (7) Monteiro, F.F.; Trousdale, E.K.; Bisson, L.F. Ethyl carbamate formation in wine: Use of radioactively labeled precursors to demonstrate the involvement of urea. *Amer. J. Enol. Vitic.* **1989**, *40*, 1-8.
- (8) Stevens, D.F.; Ough, C.S. Ethyl carbamate formation: reaction of urea and citrulline with ethanol in wine under low to normal temperature conditions. *Amer. J. Enol. Vitic.* **1993**, *44*, 309-312.
- (9) Uthurry, C.A.; Varela, F.; Colomo, B.; Suárez Lepe, J.A.; Lombardero, J.; García del Hierro, J.R. Ethyl carbamate concentrations of typical Spanish red wines. *Food Chem.* **2004**, *88*, 329-336.
- (10) Tegmo-Larsson, I.M.; Splittler, T.D.; Rodríguez, S.B. Effect of malolactic fermentation on ethyl carbamate formation in chardonnay wine. *Amer. J. Enol. Vitic.* **1989**, *40*, 106-108.
- (11) Liu, S.Q.; Pritchard, G.G.; Hardman, M.J.; Pilone, G.J. Citrulline production and ethyl carbamate (urethane) precursor formation from arginine degradation by wine lactic acid bacteria *Leuconostoc oenos* and *Lactobacillus buchneri*. *Amer. J. Enol. Vitic.* **1994**, *45*, 235-242.
- (12) Arena, M.E.; Saguir, F.M.; Manca de Nadra, M.C. Arginine, citrulline and ornithine metabolism by lactic acid bacteria from wine. *Int. J. Food Microbiol.* **1999**, *52*, 155-161.
- (13) Lehtonen, P. Determination of amines and amino acids in wine – a review. *Amer. J. Enol. Vitic.* **1996**, *47*, 127-133.
- (14) Liu, S.Q.; Pritchard, G.G.; Hardman, M.J.; Pilone, G.J. Occurrence of arginine deiminase pathway enzymes in arginine catabolism by wine lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **1995**, *61*, 310-316.

- (15) Liu, S.Q.; Pritchard, G.G.; Hardman, M.J.; Pilone, G.J. Arginine catabolism in wine lactic acid bacteria: is it via the arginine deiminase pathway or the arginase-urease pathway? *J. Appl. Bacteriol.* **1996**, *81*, 486-492.
- (16) Mira de Orduña, R.; Liu, S.Q.; Patchett, M.L.; Pilone, G.J. Ethyl carbamate precursor citrulline formation from arginine degradation by malolactic wine lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **2000**, *183*, 31-35.
- (17) Abdelal, A.T. Arginine catabolism by microorganisms. *Ann. Review Microbiol.* **1979**, *33*, 139-168.
- (18) Cunin, R.; Glansdorff, N.; Piérard, A.; Stalon, V. Biosynthesis and metabolism of arginine in bacteria. *Microbiol. Rev.* **1986**, *50*, 314-352.
- (19) Zúñiga, M.; Pérez, G.; González-Candelas, F. Evolution of arginine deiminase (ADI) pathway genes. *Mol. Phylogenet. Evol.* **2002**, *25*, 429-444.
- (20) Tonon, T.; Lonvaud-Funel, A. Metabolism of arginine and its positive effect on growth and revival of *Oenococcus oeni*. *J. Appl. Microbiol.* **2000**, *89*, 526-531.
- (21) Mangani, S.; Guerrini, S.; Granchi, L.; Vincenzini, M. Putrescine accumulation in wine: Role of *Oenococcus oeni*. *Current Microbiol.* **2005**, *51*, 6-10.
- (22) Liu, S.Q.; Pilone, G.J. A Review: Arginine metabolism in wine lactic acid bacteria and its practical significance. *J. Appl. Microbiol.* **1998**, *84*, 315-327.
- (23) Edwards, C.G.; Powers, J.R.; Jensen, K.A.; Weller, K.M.; Peterson, J.C. *Lactobacillus* spp. from Washington State wines: isolation and characterization. *J. Food Sci.* **1993**, *58*, 453-458.
- (24) Spano, G.; Chieppa, G.; Beneduce, L.; Massa, S. Expression analysis of putative *arcA*, *arcB* and *arcC* genes partially cloned from *Lactobacillus plantarum* isolated from wine. *J. Appl. Microbiol.* **2004**, *96*, 185-193.
- (25) D'Hooghe, I.; Vander Wauven, C.; Michiels, J.; Tricot, C.; De Wilde, P.; Vanderleyden, J.; Stalon, V. The arginine deiminase pathway in *Rhizobium etli*: DNA sequence analysis and functional study of the *arcABC* genes. *J. Bacteriol.* **1997**, *179*, 7403-7409.
- (26) Maghnouj, A.; Cabral, T.F.S.; Stalon, V.; Wauven, C.V. The *arcABDC* gene cluster, encoding the arginine deiminase pathway of *Bacillus licheniformis*,

- and its activation by the arginine repressor ArgR. *J. Bacteriol.* **1998**, *180*, 6468-6475.
- (27) Griswold, A.; Chen, Y.Y.M.; Snyder, J.A.; Burne, R.A. Characterization of the arginine deiminase operon of *Streptococcus rattus* FA-1. *Appl. Environ. Microbiol.* **2004**, *70*, 1321-1327.
- (28) Zúñiga, M.; Champomier-Verges, M.; Zagorec, M.; Pérez-Martínez, G. Structural and functional analysis of the gene cluster encoding the enzymes of the arginine deiminase pathway of *Lactobacillus sakei*. *J. Bacteriol.* **1998**, *180*, 4154-4159.
- (29) Arena, M.E.; Manca de Nadra, M.C.; Muñoz, R. The arginine deiminase pathway in the wine lactic acid bacterium *Lactobacillus hilgardii* X₁B: structural and functional study of the arcABC genes. *Gene* **2002**, *301*, 61-66.
- (30) Tonon, T.; Bourdineaud, J.P.; Lonvaud-Funel, A. The arcABC cluster encoding the arginine deiminase pathway of *Oenococcus oeni*, and arginine induction of a CRP-like gene. *Res. Microbiol.* **2001**, *152*, 653-661.
- (31) Poolman, B.; Driessen, A.J.M.; Konings, W.N. Regulation of arginine-ornithine exchange and the arginine deiminase pathway in *Streptococcus lactis*. *J. Bacteriol.* **1987**, *169*, 5597-5604.
- (32) Verhoogt, H.J.C.; Smit, H.; Abee, T.; Gamper, M.; Driessen, A.J.M.; Haas, D.; Konings, W.N. arc D, the first Gene of the arc operon for anaerobic arginine catabolism in *Pseudomonas aeruginosa*, encodes an arginine-ornithine exchanger. *J. Bacteriol.* **1992**, *174*, 1568-1573.
- (33) Kok, J.; Buist, G.; Zomer, A.L.; van Hijum, A.F.T.; Kuipers, O.P. Comparative and functional genomics of lactococci. *FEMS Microbiol. Rev.* **2005**, *29*, 411-433.
- (34) Divol, B.; Tonon, T.; Morichon S.; Gindreau, E.; Lonvaud-Funel, A. Molecular characterization of *Oenococcus oeni* genes encoding proteins involved in arginine transport. *J. Appl. Microbiol.* **2003**, *94*, 738-746.
- (35) Bolotin, A.; Wincker, P.; Mauder, S.; Jaillon, O.; Malmgren, K.; Weissenbach, J.; Ehrlich, S.D.; Sorokin, A. The complete genome sequence of the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IL1403. *Genome Res.* **2001**, *11*, 731-753.

- (36) Nehmé, B.; Ganga, M.A.; Lonvaud-Funel, A. The arginine deiminase locus of *Oenococcus oeni* includes a putative arginyl-tRNA synthetase ArgS2 at its 3'-end. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2006**, *70*, 590-597.
- (37) Wibowo, D.; Eschenbruch, R.; Davis, C. R.; Fleet, G.H.; Lee, T.H. Occurrence and growth of lactic acid bacteria in wine: a Reviews. *Amer. J. Enol. Vitic.* **1985**, *36*, 302-313
- (38) Henick-Kling, T. Malolactic fermentation. In: Fleet, G.H. (Ed.), *Wine microbiology and biotechnology*. Harwood Academic, Chur, Switzerland, **1993**, pp. 289-326.
- (39) Tonon, T.; Bourdineaud, J.P.; Lonvaud-Funel, A. Catabolisme de l'arginine par *Oenococcus oeni* : aspects energetiques et genetiques. *Lait* **2001**, *81*, 139-159.
- (40) De Man, J.C.; Rogosa, M.; Sharpe, M.E. A medium for the cultivation of lactobacilli. *J. Appl. Bacteriol.* **1960**, *23*, 130-135
- (41) Gilboe, D.D.; Williams, J.N. Evaluation of the Sakaguchi reaction for quantitative determination of arginine. *Proc. Soc. Experim. Biol. Med.* **1956**, *91*, 535-536.
- (42) Gómez-Alonso, S.; Hermosín-Gutiérrez, I.; García-Romero, E. Simultaneous HPLC analysis of biogenic amines, amino acids, and ammonium ion as aminoenone derivatives in wine and beer samples. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 608-613.
- (43) Persing, D.H.; Smith, T.F.; White, T.J.; Tenover, F.C. *Diagnostic Molecular Biology, Principles and Application*. ASM, Washington, DC., **1993**.
- (44) Reguant, C.; Bordons, A. Typification of *Oenococcus oeni* strains by multiplex RAPD-PCR and study of population dynamics during malolactic fermentation. *J. Appl. Microbiol.* **2003**, *95*, 344-353.
- (45) Ausubel, F.M.; Brent, R.; Kingston, R.E.; Moore, D.D.; Seidmann, J.G.; Smith, J.A.; Struhl, K. *Current Protocols in Molecular Biology*. Wiley, New York, vols. 1-3, **1989**.
- (46) Iowa State University. *The DNA Facility of the Iowa State University Office of Biotechnology*. <http://www.dna.iastate.edu>, **2005**.
- (47) Engels, WR. Contributing software to the Internet: the Amplify program. *Trends Biochem. Sci.* **1993**, *18*, 448-450.

- (48) Holt, J.G. (ed.in.chief) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 1st ed; Volume 2, P.H.A. Sneath, editor volume; Williams & Wilkins: Baltimore, MD, USA, **1986**.
- (49) Jonsson, S.; Clausen, E.; Raa, J. Amino acid degradation by a *Lactobacillus plantarum* strain from fish. *System. Appl. Microbiol.* **1983**, *4*, 148–154.
- (50) Tonon, T.; Lonvaud-Funel, A. Arginine metabolism by wine *Lactobacilli* isolated from wine. *Food Microbiol.* **2002**, *19*, 451-461.

III. 4.

INFLUENCIA DE LAS CONDICIONES DEL VINO Y LA CERVEZA EN LA UTILIZACIÓN DE LA ARGININA POR LAS BACTERIAS DEL ACIDO LÁCTICO

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
ESTUDIO BIOQUÍMICO Y MOLECULAR DE LA PRODUCCIÓN DE PRECURSORES DE CARBAMATO DE ETILO POR BACTERIAS LÁCTICA
ASOCIADAS AL PROCESO DE VINIFICACIÓN
ISBN:978-84-693-6429-1/DL:T-1631-2010

***Influencia de las condiciones del vino y la cerveza
en la utilización de la arginina por las bacterias lácticas***

**Influence of wine –and beer-like conditions on
arginine utilization by lactic acid bacteria**

Artículo en preparación

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
ESTUDIO BIOQUÍMICO Y MOLECULAR DE LA PRODUCCIÓN DE PRECURSORES DE CARBAMATO DE ETILO POR BACTERIAS LÁCTICA
ASOCIADAS AL PROCESO DE VINIFICACIÓN
ISBN:978-84-693-6429-1/DL:T-1631-2010

Influence of wine- and beer-like conditions on arginine utilization by lactic acid bacteria

Isabel Araque, Cristina Reguant *, Nicolas Rozès, Albert Bordons

*Departament de Bioquímica i Biotecnologia, Facultat d'Enologia, Universitat
Rovira i Virgili, Campus Sescelades, c/ Marcel·lí Domingo, s/n, Tarragona 43007,
Catalonia, Spain*

Cristina Reguant* (Corresponding author):

Dept. Bioquímica i Biotecnologia, Universitat Rovira i Virgili

Carrer Marcel·lí Domingo s/n, 43007 Tarragona, Catalonia, Spain

Email: cristina.reguant@urv.net

Phone: +34 977558280

Fax: +34 977558232

Keywords:

arginine, ethyl carbamate, lactic acid bacteria, wine, beer, ADI pathway, citrulline,
Lactobacillus, Pediococcus

ABSTRACT

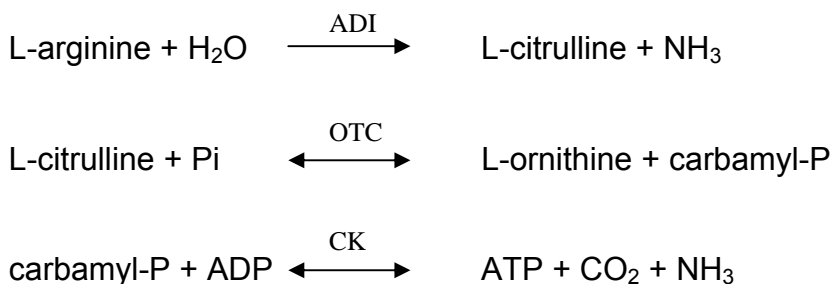
Wine and beer can contain trace amounts of ethyl carbamate, formed by reaction of ethanol with carbamyl compounds such as citrulline. This is produced from arginine by lactic acid bacteria (LAB) such as *Lactobacillus* and *Pediococcus*. The aim of this study was evaluate the effects of ethanol, glucose, malic acid and the pH on the ability to degrade arginine and excrete citrulline by strains of LAB using resting cells.

Malic acid clearly inhibited the arginine consumption in all strains. This work showed by the first time that the ratio of citrulline produced from arginine is clearly higher in the presence of ethanol (10-12%) and at low pH (3.0). This higher ratio citrulline/arginine observed agreed with the decreased ratio ornithine/arginine, and also with a lower degradation of arginine. Strains of *L. brevis* and *L. buchneri* isolated from wine and beer respectively showed to be those with a higher ratio citrulline/arginine.

1. Introduction

Wine and beer, like most fermented foods and beverages (Vahl, 1993), contains trace amounts of ethyl carbamate (EC) (Ough, 1976). EC, also referred to as urethane, can bind covalently to DNA, being so an animal carcinogen (Schlatter & Lutz, 1990). EC is formed by reaction between ethanol and N-carbamyl compounds, such as urea, citrulline and carbamyl phosphate, at acid pH levels, and its formation is dependent on reactant concentration (Ough, Crowell, & Gutlove, 1988). This reaction is favoured by increasing temperature and acid pH (Stevens & Ough, 1993). The content of EC is therefore higher in wines that have been stored for a long time and where temperature has not been well controlled (Uthurry, Varela, Colomo, Suárez Lepe, Lombardero, & García del Hierro, 2004). The highest levels (in the mg/l range) of EC have been found in some spirits (Weber & Shapyrow, 2009).

Urea produced by yeast is the main potential EC precursor in wine and beer, but lactic acid bacteria (LAB), and mainly spoilage ones, can contribute to the formation of EC due to the production of citrulline and carbamyl-P from arginine (Liu, Pritchard, Hardman, & Pilone, 1994; Arena, Saguir, & Manca de Nadra, 1999), and significant levels of EC found in some wines have been correlated with the former presence of LAB (Uthurry et al., 2004). L-arginine is one of the main amino acids found in grapes and wine (Lehtonen, 1996) and some wine LAB are known to degrade it. Arginine catabolism by these LAB involves the arginine deiminase (ADI) pathway (Liu, Pritchard, Hardman, & Pilone, 1996; Mira de Orduña, Liu, Patchett, & Pilone, 2000), which includes three enzymes, ADI (EC 3.5.3.6), ornithine transcarbamylase (EC 2.1.3.3, OTC) and carbamate kinase (EC 2.7.2.2, CK), catalyzing the following reactions:



This pathway is supposed to contribute positively to growth and viability of LAB due to ATP formation and the acidity decrease caused by ammonium production (Tonon & Lonvaud-Funel, 2000). Nevertheless, this does not seem so clear for *Oenococcus oeni*, the main malolactic bacteria in wine, because it has been shown recently that arginine and citrulline do not stimulate growth of some strains of this species in wine (Terrade & Mira de Orduña, 2009), but they stimulate growth in *Lactobacillus buchneri*. Anyway, the degradation of arginine yields citrulline and carbamyl phosphate, which can react with ethanol to form EC.

Moreover, the ADI pathway is sometimes indirectly related with biogenic amines production, specifically putrescine, since this amine can be produced from ornithine by LAB (Mangani, Guerrini, Granchi, & Vincenzini, 2005).

Wine lactobacilli vary in their ability to degrade arginine. All heterofermentative lactobacilli are found to be degradative (Liu & Pilone, 1998; Araque, Gil, Carreté, Bordons, & Reguant, 2009). In particular, *Lactobacillus hilgardii* is an important organism in fermented beverage spoilage and those isolated from wine have been shown to degrade arginine (Tonon & Lonvaud-Funel, 2002; Uthurry, Suárez Lepe, Lombardero, & García del Hierro, 2006). Different strains of *Lactobacillus brevis* and *L. buchneri* isolated from wine have been also shown to degrade arginine (Liu et al., 1994; Liu, Davis, & Brooks, 1995)

Facultative heterofermentative lactobacilli from wine were believed not to degrade arginine (Liu, Pritchard, Hardman, & Pilone, 1995; Edwards, Powers, Jensen, Weller, & Peterson, 1993) but recently some *Lactobacillus plantarum* have shown to be arginine-consuming by ADI pathway (Spano, Chieppa, Beneducce, & Massa, 2004; Araque et al., 2009). Likewise, homofermentative pediococci isolated from other fermented food (cheese, sausages) can degrade arginine (Liu & Pilone, 1998) and recently we have shown that also some *L. plantarum* isolated from wine degraded it (Araque et al., 2009). In this work, a correlation was found between the presence of genes and the ability to degrade arginine of the different wine species.

Although *O. oeni* is the main species responsible for MLF (Wibowo, Eschenbruch, Davis, Fleet, & Lee, 1985; Henick-Kling, 1993) and can degrade arginine (Arena, Manca de Nadra, & Muñoz, 2002; Tonon, Bourdineaud, & Lonvaud-Funel, 2001; Araque et al., 2009), other LAB may proliferate during the early stages of MLF or later if the conditions are propitious, such as low acidity

(Lonvaud-Funel, 1999).

Some lactic acid bacteria, mainly *Pediococcus* and *Lactobacillus*, are known as spoilage microorganisms of beer (Sakamoto & Konings, 2003). Its conditions of acidic pH and ethanol, similarly to wine, are suitable for production of EC precursors by these bacteria. Also, there are other foods with lower quantities of ethanol, such as some dairy or bakery products, that can also be spoiled by similar LAB.

Nevertheless, little information is available about the potential of these LAB species to degrade arginine under wine or beer conditions. The metabolic activity of LAB is known to be influenced by ethanol concentrations, but no information is available on the ethanol influence on the activity of the arginine deiminase pathway in wine LAB.

The main aim of this paper was to study the effects of ethanol, glucose, malic acid, and pH on their ability to degraded arginine and excrete citrulline, ornithine, and ammonia, in eight strains from acid lactic bacteria mainly found in the wine and beer in four species.

Another objective was to compare this ability of degrading arginine and excretion of citrulline among different species, and also among strains, in function of their origin.

This work has focused in the main species considered to spoil these beverages, and for that reason we did not use *Oenococcus oeni*, the main species of the malolactic fermentation in wine. Moreover, the ability of arginine degradation and the metabolism and genetics of ADI pathway has been more studied in this species (Arena & Manca de Nadra, 2005; Liu et al., 1994; Liu & Pilone, 1998; Mira de Orduña, Patchett, Liu, & Pilone, 2001; Terrade & Mira de Orduña, 2009; Tonon & Lonvaud-Funel, 2000; Tonon et al., 2001). No effect of ethanol on arginine degradation has been seen in *O. oeni* (Arena & Manca de Nadra, 2005) but instead it has been observed that the low pH, under 3.5, inhibit arginine consumption (Terrade & Mira de Orduña, 2006).

This work has been done using resting cell experiments, consisting of growing the cells in a complex medium followed by the examination of highly concentrated cell suspensions in a defined medium. Resting cells experiments, as used for other works (Mira de Orduña et al., 2000), have the advantages of avoiding other compounds that could interfere, they are an easy way to follow degradation

kinetics and are done in a very short time in under conditions similar to wine or beer, in comparison of growth experiments.

2. Materials and Methods

2.1. Microorganisms and growth conditions

We used a pair of strains for each of four different species of lactic acid bacteria frequently found in wine or beer. Each pair included the corresponding type culture strain (*Lactobacillus brevis* 4121^T, *Lactobacillus hilgardii* 4786^T, *Lactobacillus buchneri* 4111^T and *Pediococcus pentosaceus* 4695^T) and another strain isolated in wine (*L. brevis* 3824, *L. hilgardii* 4681 and *P. pentosaceus* 4214) or beer (*L. buchneri* 4674). The type culture strains of *L. hilgardii* and *P. pentosaceus* had been originally isolated also from wine and beer, respectively. All strains were from the CECT (Colección Española de Cultivos Tipo, Valencia, Spain), except *L. brevis* 3824 and *P. pentosaceus* 4214, which were kindly contributed by Dr. S. Ferrer, from Enolab, Universitat de València (Valencia, Spain).

These strains were grown anaerobically at 27°C in MRS (De Man, Rogosa, & Sharpe, 1960) supplemented with 4 g/l DL-malic acid and 5 g/l D(-)-fructose. Bacterial growth was measured by determining the O.D. of the bacterial suspension at 600 nm and by direct cell counts with a Neubauer chamber.

2.2. Culture condition and resting cells experiments

For each strain, cells were grown anaerobically in 500 ml of MRS supplemented with 5 g/l L-arginine, at 27°C, to the late-log/early-stationary phase. Then, cells were harvested by centrifugation at 6000 x *g* for 5 min at room temperature. The procedure for resting cells experiments was made following Mira de Orduña et al. (2000). The cells pellets were then resuspended in appropriate amounts of resting cells buffer and transferred into small glass vials containing aqueous solutions of arginine 0.5 g/l, at pH 3.6 (control assay, without ethanol nor glucose nor malic acid). The other conditions assayed were, keeping the same arginine concentration, different pH values (3.0, 4.0, 4.5), different concentration of ethanol added (0%, 5%, 10%, 12%), or different glucose added (0.5, 3.0, 5.0 g/l), or L-

malic acid added (0.5, 2.0 g/l). Assays with increasing concentration of arginine (1.5, 3.0, 5.0 g/l) and the same conditions of control were also done. The glass vials were placed in a waterbath (25°C) and stirred gently. Samples were taken periodically, centrifuged 13000 x g for 5 min and the supernatant was frozen and kept at -20°C until analyzed.

2.3. Analyses of arginine, citrulline and ornithine by HPLC

This HPLC method was based on a previously described one (Soufleros & Bertrand, 1998; Gratzfeld-Huesgen, 1998) and adapted to improve the resolution of the 3 peaks of these amino acids. The analyses were carried out on a HPLC 1100 series Agilent (Agilent Technologies, Wilmington, DE, USA) equipped with an automatic sampler system. The samples were filtered on a 0.45 µm, 4 mm membrane (Millipore) before injection. Two µl of each sample were mixed with 5 µl of borate buffer 0.4 M at pH 10.2, 1 µl of L-norvaline (internal standard) and 1 µl of each of the derivatization agents: o-phthaldehyde-3-mercaptopropionic acid (OPA-3-MPA), and 9-fluorenylmethylchloroformate (FMOC). One µl of this mix was injected into a 4.0 x 250 mm ID column filled with Hypersil-ODS, formed by a layer of octadecyl silane (C18) chemically bound to a support of silica Hypersil (Agilent Technology), with a 4 mm x 5 µm guard-column packed with the same phase.

The separation of the amino acids under study lasted 30 minutes using a flow rate of 1.5 ml/min. The mobile phase was composed of two different solvents, A and B. Solvent A was a mixture of 2.2 gr of sodium acetate (Sigma), 220 µl triethanolamine (TEA, Sigma) and 6 ml tetrahydrofurane (Aldrich). After mixing the pH was adjusted to 7.2 with 1% acetic acid, followed by the addition of MilliQ water to a final volume of 1000 ml. Then it was filtered on a 0.45 µm membrane. Solvent B was a mixture of 1.8 g sodium acetate (Sigma), 320 ml of methanol (Panreac), 400 ml of acetonitrile (Panreac), and the pH was adjusted to 7.0 with 1% acetic acid, followed by the addition of MilliQ water until 1000 ml. Gradient was 100% A for 7.5 min, 10 min with 15% B, 1 min with 60% B, 2 min more at 100% B, and ending with 100% A for 5 min, in order to prepare the column for the next sample. The temperature of analysis was 40°C.

Amino acids were detected by the retention time established for the individual aminoacids and a mix of them. Linearity of the peak areas for each aminoacid was

determined for different concentration ranging from 0-1000 μ M. Calculation was based on the area under the peak established for a given amino acid of know concentration and normalized by internal standard.

2.4. Other analyses

The pH was measured with a pH meter GLP 21 (Crison, Barcelona, Spain). Ammonia was quantified with an enzymatic kit from Boehringer-Mannheim (Roche Biopharma GmbH, Darmstadt, Germany).

2.5. Statistical analysis

Data univariate (ANOVA) and multivariate (PCA) analysis were made using the SPSS version 17.0. Variable means showing statistical significance were compared using Scheffé *post hoc* comparisons at the significance level of 0.05 after testing the homogeneity of variance assumption between the various groups. Principal Component Analysis (PCA) with varimax rotation was performed on all the samples (408: 4 species x 2 strains x 3 replicates x 17 conditions). The observed variables were the ratio between ornithine and arginine (Orn/Arg), ratio between citrulline and arginine (Cit/Arg), ratio between ammonium and arginine (NH_4/Arg), the percentage of arginine degradation (Arg%) and the pH final (pHf).

3. Results

Cells used for resting cells experiments were grown previously in MRS medium, as stated, and were harvested at OD 1.0. Direct cell counts showed numbers *circa* 10^9 per ml.

Global results obtained of total arginine degradation were analyzed by PCA and represented grouping them by the different conditions, but keeping in the same group the results for the different strains (**Fig. 1**). The results of not all conditions are shown in order to reduce their complexity and to an easy visual analysis. As can be seen, arginine (0.5 g/l) was almost fully degraded (70 to 100%) in most experiments with different strains and conditions.

A slight higher consumption was observed for all the strains at increasing pH. At the contrary, a lower consumption is observed in the presence of ethanol. The presence of glucose also caused lower arginine degradation. The single condition where arginine has not been practically consumed has been in the presence of L-malic acid. When 0.5 or 2 g/l L-malic have been added to the resting cells, the degradation of initial 0.5 g/l arginine has been very low, nearly zero, in comparison with control without malic acid (signalled as pH 3.6).

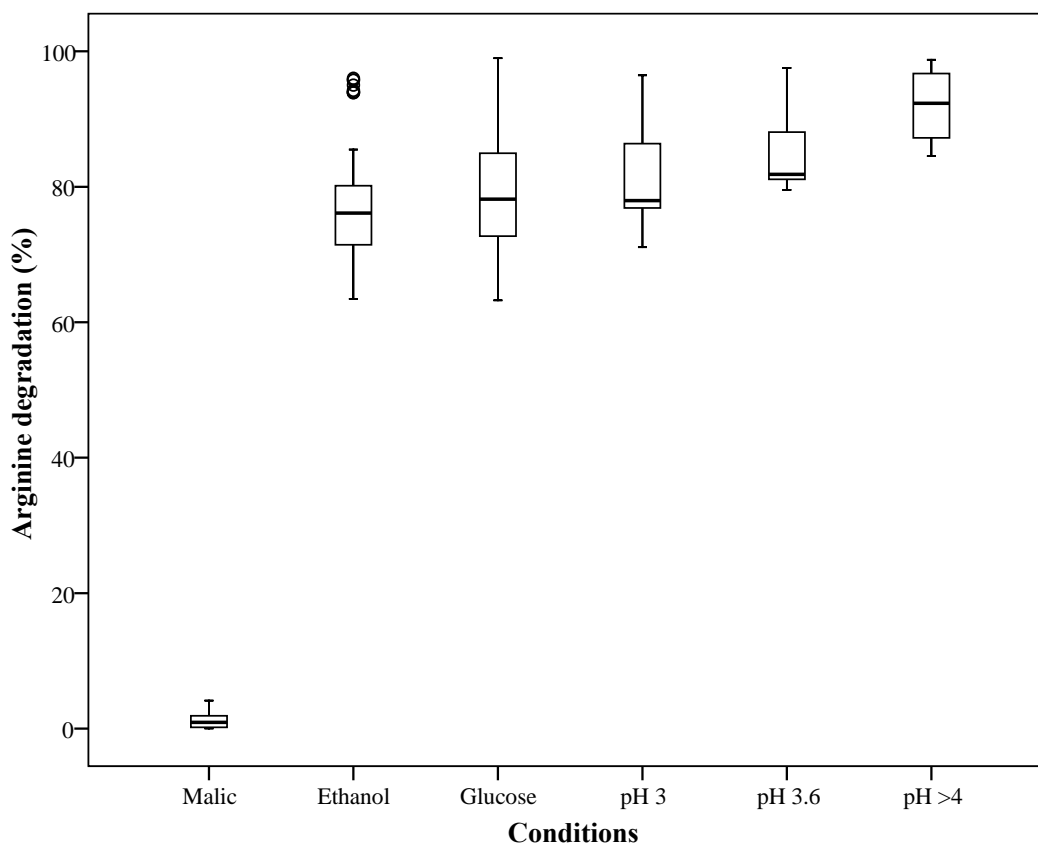


Fig. 1. Box –and–whiskers plot of the effect of experimental conditions on the degradation of arginine for all species. Malic: presence of malic acid (0.5; 2.0 g/l) in the assay; Ethanol: presence of ethanol (5%; 10%; 12%) in the assay; Glucose: presence of glucose (0.5; 3.0; 5.0 g/l) in the assay; pH 3: without ethanol nor glucose nor malic acid; arginine 0.5 g/l, at pH 3; pH >4: without ethanol nor glucose nor malic acid; arginine 0.5 g/l, at pH 4 and 4.5; pH 3.6: control assay, without ethanol nor glucose nor malic acid; arginine 0.5 g/l, at pH 3.6. Line in the box is the median; the inferior whisker is the minimal value found; the superior whisker is the maximal value; circles are the outliers which have values greater than 1.5 times the spread outside.

The strain which higher levels of arginine consumption was, in most conditions, *L. hilgardii* 4681, with values higher than 95%.

When initial arginine concentration has been raised from 0.5 to 1.5, 3 or 5 g/l (results not shown in figures), a good ability of consuming it has been observed for all the tested strains, with some lower degradation values, going down progressively until 60% for higher arginine level, but with a higher total quantity of arginine consumed. Degradation ratios were some higher than the controls.

To construct the PCA analysis (**Fig. 2**), results of citrulline, ornithine and ammonium produced have been referred in relation to arginine consumed. Also the percentage of arginine degradation and the pH final obtained in experimental conditions were used to carry out the factorial analysis. Factor 1 explained 40.7% of the variation and was marked by high positive loadings for Orn/Arg (0.930), Arg% (0.730) and pH_f (0.719), which could be interpreted as the highest ornithine production was, the highest pH final was found.

On the other hand, factor 2, which still explained 22.4% of the variation, was marked by a high positive loading for Cit/Arg (0.710), which could be related to a high citrulline production by the species. In relation to the third component (not shown), factor 3 explained 20.4% of the total variation and was marked by a high positive loading for NH₄/Arg (0.900).

On the other hand, factor 2, which still explained 22.4% of the variation, was marked by a high positive loading for Cit/Arg (0.710), which could be related to a high citrulline production by the species. In relation to the third component (not shown), factor 3 explained 20.4% of the total variation and was marked by a high positive loading for NH₄/Arg (0.900).

To facilitate the interpretation of these results, the obtained scores were plotted by selecting the first two factors as axes (Fig. 2). As can be seen, samples were basically clustered in two groups. The first one represented by the no-degradation of arginine in presence of malic acid in the assays whatever the species used and the second cluster showed a clear tendency of some species to alkalize the medium if ornithine but no citrulline, was produced from arginine. According to the experimental conditions (ethanol, glucose, pH or increasing amounts of arginine), the species used in this study have a different arginine metabolism.

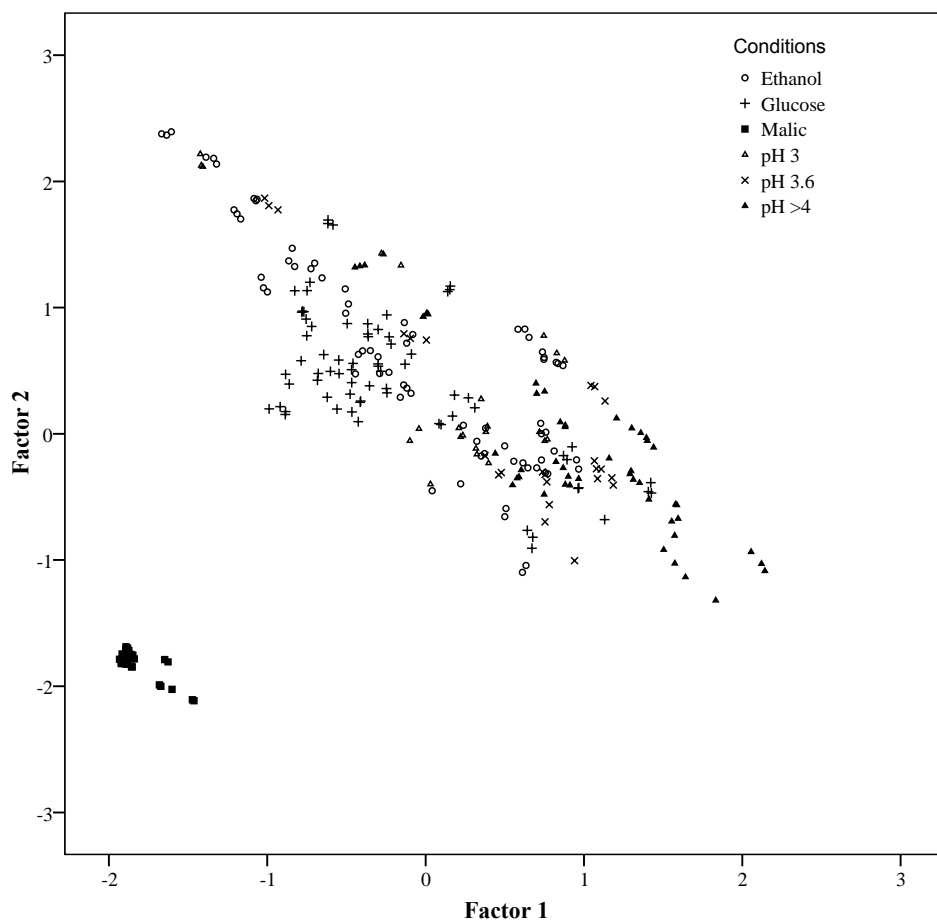


Fig. 2. Plots values of the first two factors (Factor 1 and Factor 2) of the PCA analysis according to the experimental conditions for the 408 samples. Kaiser-Meyer-Olkin (KMO): 0.803; Variance of Factor 1: 40.7%; Variance of Factor 2: 22.4%. Factor 1 positively correlated with Orn/Arg (0.930), Arg% (0.733) and pH final (0.719); Factor 2 positively correlated with Cit/Arg (0.710).

Obtained ratios citrulline/arginine have been from 10% since a maximum of 50%. When pH has been increased, less citrulline has been excreted and more ornithine and ammonium has been obtained. The ratio ammonium/arginine has been expressed as 2 mols NH_4^+ per mol arginine in order to visualize graphs easily, and because if arginine is all degraded, 1 mol of it would give 2 mols NH_4^+ , such as said in Introduction.

As shown in **Fig. 3** for the strain *L. hilgardii* 4786^T, there is observed a higher production of citrulline when ethanol is increased, and consequently, lower ratios of ornithine/arginine and ammonium/arginine are observed. The maximum ratio of

citrulline/arginine appears for 12% ethanol. The rising of glucose does not have a so clear effect as the other conditions, although there is a slight tendency to lower ratios ornithine/arginine and ammonium/arginine, and so theoretically it should happen a higher relative production of citrulline when glucose is rised.

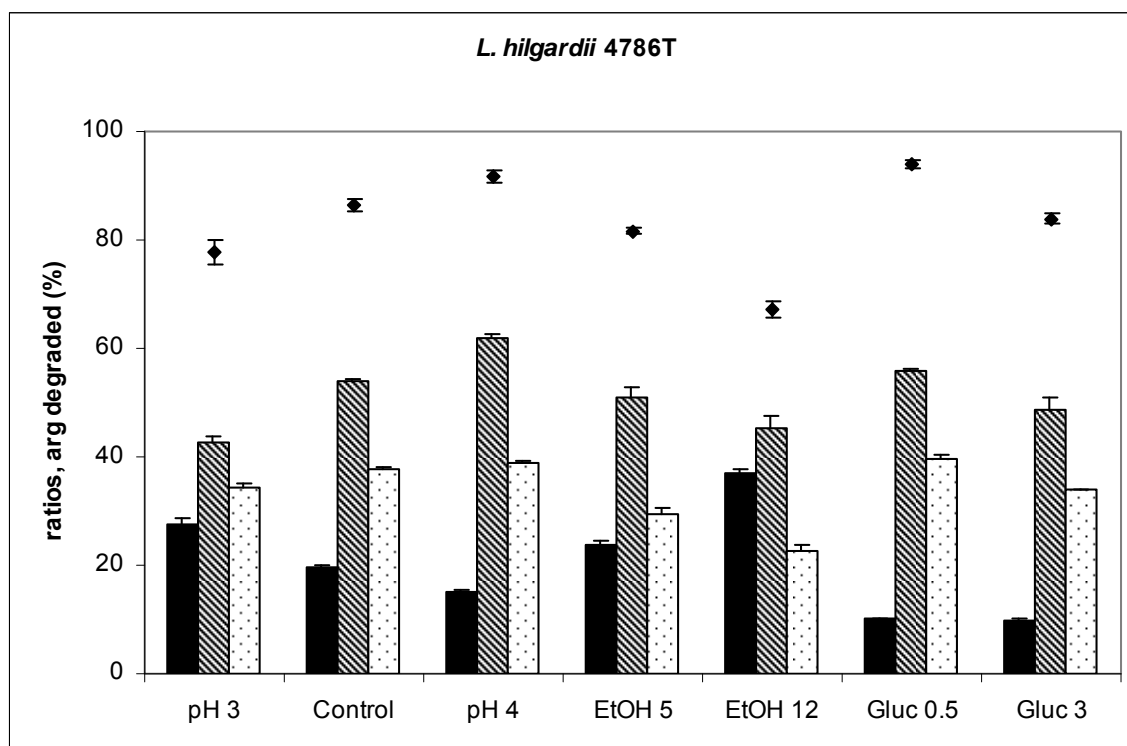


Fig. 3. Ratios of cit / arg (black), orn / arg (dashed), 2 NH₄ / arg (light), and degraded arginine (diamonds) for the highlight conditions for *L. hilgardii* 4786^T

Besides these effects of the different particular conditions of pH, ethanol, glucose and malic acid on all the tested strains, the ratio citrulline/arginine has been represented for all 8 strains together (**Fig. 4**), in the conditions that have more effect, *id est*, low pH and high ethanol, in order to compare all the strains. As can be seen, strains *L. brevis* 3824 and *L. buchneri* 4674 are those with a higher production of citrulline in relation to arginine consumed. For all the strains, there is a higher production of citrulline at pH 3 than at pH 3.6 (control), and in presence of 12% ethanol than in its absence.

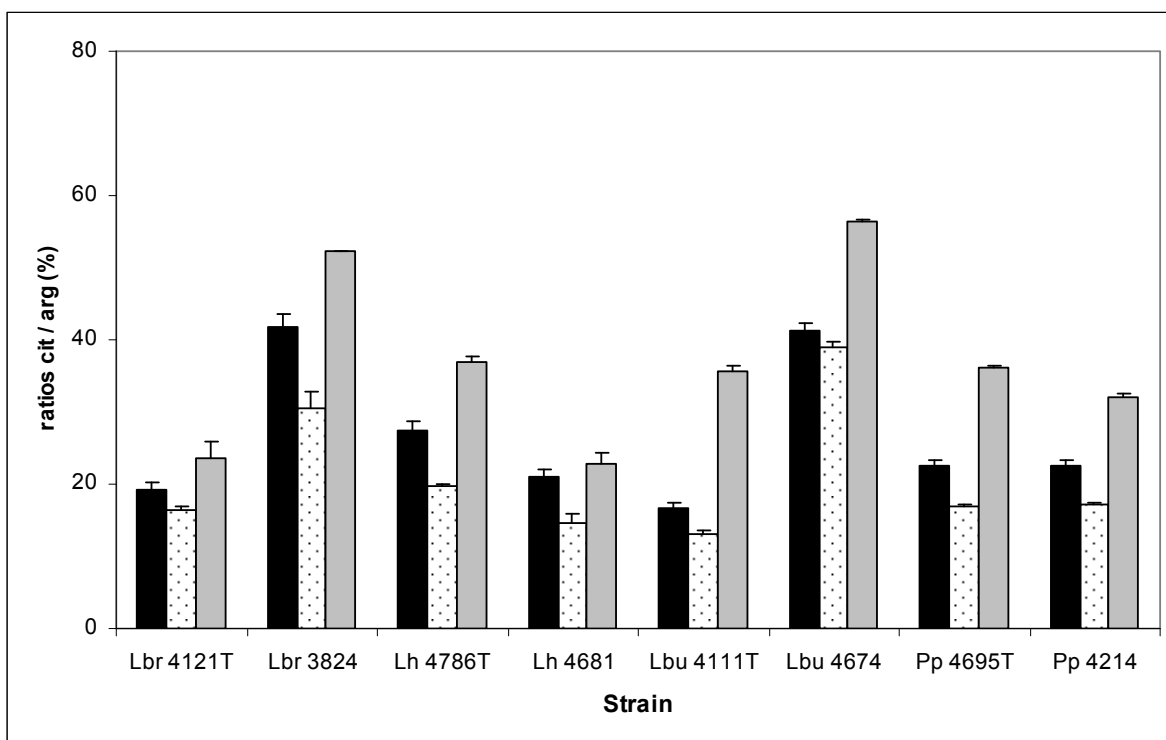


Fig. 4. Molar ratios cit/arg in stress conditions: pH 3 (black), control (light), EtOH 12% (gray) for different lactic acid bacteria.

The final pH obtained at different assays is also represented by means of PCA (**Fig. 5**). There was a clear and logical relationship for all the strains between higher initial and higher final pH. When ethanol is higher, a lower final pH is observed, which is correlated with higher production of citrulline and lower of ammonium. When glucose is higher, also final pH is lower, which is correlated with the lower production of ammonium in these assays. Generally, a higher final pH is observed for all the strains of *L. hilgardii* and *L. buchneri*.

Besides the data shown above, corresponding to 2h of resting cells experiments, analyses were also conducted at 1 h, in addition to the initial values, in order to study the kinetics of the different compounds. The kinetics in all cases was a linear decrease of arginine and increases of citrulline, ornithine and ammonium, quantitatively less important for the two amino acids. As examples, we show the cases in the presence of 12% ethanol for four strains, one of each species (**Fig. 6**). In some cases, as seen above for *L. buchneri* 4674, an initial increase of citrulline was showed, with a subsequent decline in the last hour.

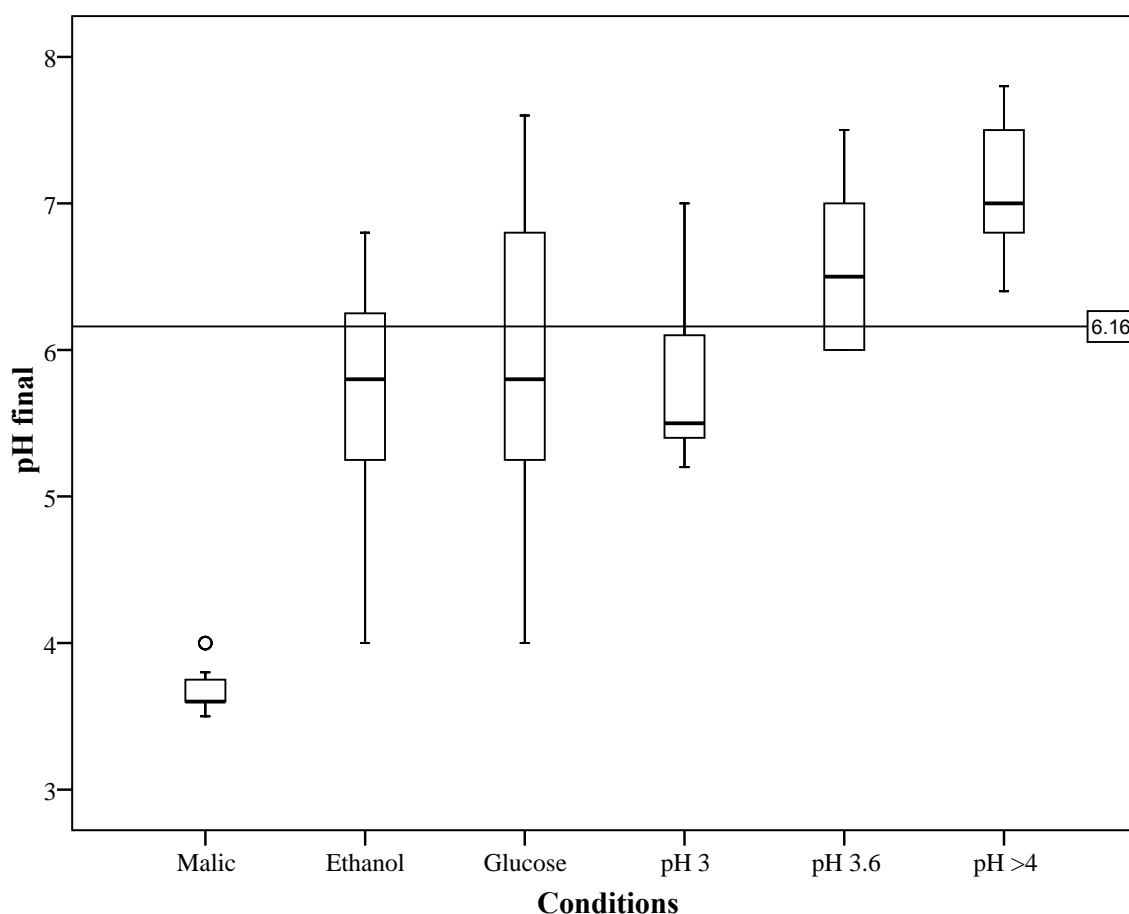


Fig. 5. Box –and–whiskers plot of the effect of experimental conditions on the pH final for all species. Malic: presence of malic acid (0.5; 2.0 g/l) in the assay; Ethanol: presence of ethanol (5%; 10%; 12%) in the assay; Glucose: presence of glucose (0.5; 3.0; 5.0 g/l) in the assay; pH 3: without ethanol nor glucose nor malic acid; arginine 0.5 g/l, at pH 3; pH >4: without ethanol nor glucose nor malic acid; arginine 0.5 g/l, at pH 4 and 4.5; pH 3.6: control assay, without ethanol nor glucose nor malic acid; arginine 0.5 g/l, at pH 3.6. Line in the box is the median; the inferior whisker is the minimal value found; the superior whisker is the maximal value; circles are the outliers which have values greater than 1.5 times the spread outside.

Based on the data obtained at 0 and 2 h, degradation rates for arginine were calculated. In the control assays, we found values from 19.96 μM of arginine degraded per min for *L. brevis* T, to a maximum value of 25.19 μM per min for *L. hilgardii* 4681. The degradation rates were higher in the isolated strains than in type strains. The rates were slightly lower than those of controls under conditions of lower pH or more ethanol, for all strains. Thus, in presence of ethanol 12%, rate

of arginine degradation was 18.54 μM per min for *L. brevis* T, and 20.89 μM per min for *L. hilgardii* 4681.

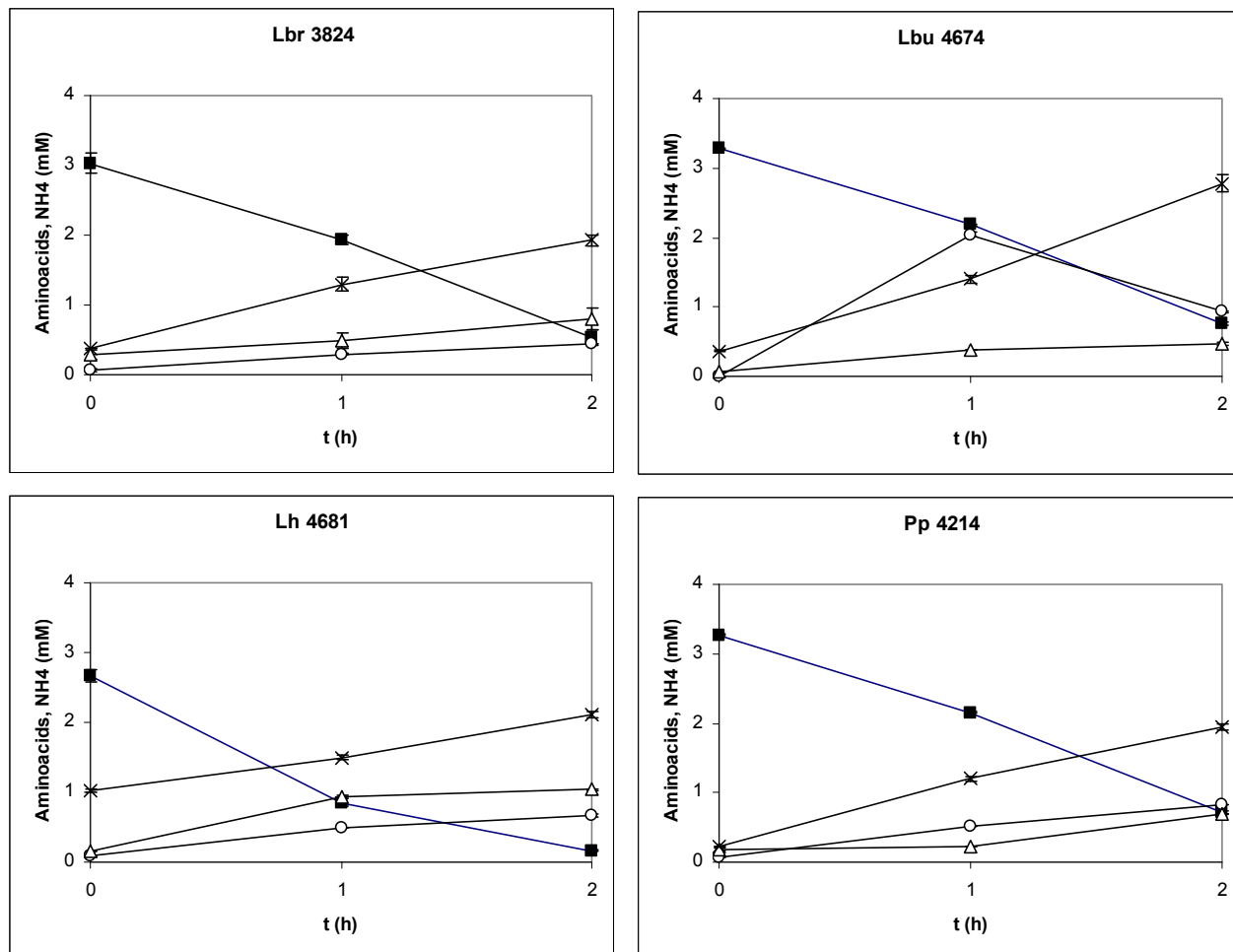


Fig. 6. Time schedule of kinetics for amino acids (arginine, black square; citrulline, white circles; ornithine, triangles) and ammonia (x) by resting cells with EtOH 12%. Assays were made by triplicate.

4. Discussion

In this work resting cells experiments have been carried out, in order to avoid other interfering compounds and allow to follow kinetics of arginine degradation in short times. Previous culture of MRS supplemented with 5 g/l L-arginine for inducing the ADI pathway enzymes have been used. The strains used in this work had been shown to degrade arginine when growing in MRS in a previous work

(Araque et al., 2009). These strains were able to degrade a 60-90% of 5 g/l arginine in less than two days.

In this work with resting cells, all strains of heterofermentative lactobacilli (*L. brevis*, *L. hilgardii* and *L. buchneri*) have degraded almost all arginine, as expected. The degradative ability of *P. pentosaceus* has also been demonstrated, confirming the results seen in growth media (Araque et al., 2009). Some *Pediococcus* from other fermented foods were found previously to degrade arginine (Liu & Pilone, 1998) but those isolated from the wine or beer environments until now did not seem to do so.

The only assays where arginine has not been degraded have been those in the presence of malic acid. Clearly, it inhibited the consumption of arginine. As it has been shown in other works (Mira de Orduña et al., 2001; Terrade & Mira de Orduña, 2006), using malic acid seems priority for LAB than consuming arginine. It can be suggested that the fact of being the malolactic fermentation just one reaction, the consequent capture of protons, and the quick production of ATP seem more advantageous than the more complex and inducible arginine utilization in ADI pathway. For a technological point of view, carrying out the malolactic fermentation should control the possible appearance of citrulline from arginine, as stated by Terrade & Mira de Orduña (2006). That would imply to inhibit cell metabolism by technical means after malic acid depletion.

It has been shown here that these bacteria can consume arginine at relatively low pH (3.0), in spite of some preliminar works that showed no degradation by wine malolactic bacterium *O. oeni* at pH 3.2 (Liu, Davis, & Brooks, 1995), the same as in streptococci (Poolman, Driessen, & Konings, 1987). In spite of the low initial pH, it increased during the assays, with final pHs since 5 to 7 (**Fig. 5**), due to the ammonia production from the arginine degraded. The increases of pH were similar for the assays at different initial pH from 3.0 to 4.0, around 2.5 units, consequent with the similar quantity of ammonia produced.

Regarding the produced citrulline and ornithine from arginine for the different assays, there is a good inverse correlation between the ratio citrulline/arginine and ornithine/arginine (**Fig. 3** for *L. hilgardii* 4786^T), in the sense that first ratio is higher when the second is some lower, according to the conversion of citrulline to ornithine. The molar ratio ammonium per arginine is usually higher (expressed as

2x in Figures) due to the apparition of an ammonium for each arginine converted to citrulline, and another one from the final reaction of carbamate kinase.

We have found ratios of citrulline produced versus arginine consumed among 10% and 50%, in function of the strain and the condition. Other previous works with resting cells found values around 5% (Mira de Orduña et al., 2000), and in recent works with wine the maximum ratios have been around 4-5% (Terrade & Mira de Orduña, 2006). However, other works obtained ratios near 40% for strains of *L. hilgardii* (Tonon & Lonvaud-Funel, 2002), and around 30-40% for strains of *O. oeni* (Romero, Reguant, Bordons, & Masqué, 2009). Briefly, it seems to be a great variability depending on species and the different conditions.

These ratios can be used to estimate the contribution of citrulline to the EC precursor pool from a given amount of initial arginine, as suggested by Mira de Orduña et al. (2001). On the other hand, the quantity of citrulline obtained can be used as base for calculating the potential ethyl carbamate, foreseeing the maximum EC that could be formed, such as done previously (Arena & Manca de Nadra, 2005; Romero et al., 2009).

Among the different conditions assayed with resting cells, those that have given clearly a higher production of citrulline with respect to the consumption of arginine in all the strains (**Fig. 4**) have been the presence of ethanol and also, in part, the lower pH. The ratio citrulline/arginine has increased significantly when ethanol has passed from nul (control) to 5, 10 and 12%. With 12% ethanol, the average increase of all the strains has been ca. 85%, with values since 44% (*L. brevis* 4214^T or *L. buchneri* 4674), until a 173% in *L. buchneri* 4111^T. Regarding the lower pH, when comparing the control (pH 3.6) with the assays at pH 3.0, an average increase of the ratio citrulline/arginine of 29% is observed, going from a 6% (*L. buchneri* 4674) till the 43% for *L. hilgardii* 4681.

The influence of low pH in the production of citrulline had been observed previously in *L. hilgardii*, and on the contrary, not in *O. oeni* (Arena & Manca de Nadra, 2005). These authors saw an increased consumption of arginine at pH 3.8 in respect to 6.5. Nevertheless, they did not observed any effect of ethanol. On the other hand, they observed a consumption of citrulline in presence of ethanol.

In our results regarding the effect of ethanol, the higher ratio citrulline/arginine observed agrees with the decreased ratio ornithine/arginine, and also with a lower degradation of arginine. It seems to be a lower reaction of citrulline to ornithine,

that is accompanied by a decreased incorporation of arginine. This surely is due to the ethanol toxicity, because it is known that it interacts with membranes, resulting in a perturbed structure and function (Weber & Bont, 1996). The exposure of cells to ethanol usually results in an increase in the permeability and the concomitant loss of intracellular material (Da Silveira, San Romão, Loureiro-Dias, Rombouts, & Abee, 2002). So this, the cells should be also less efficient in the retention of the citrulline inside, allowing it to escape more easily.

Regarding the higher ratio citrulline/arginine found at low pH (3.0), it agrees also with a lower degradation of arginine. It can be suggested that release of ammonium from the arginine-deiminase reaction, giving citrulline, would be useful for cells, to compensate the external acidity. Nevertheless, if citrulline was completely degraded by OTC and CK, more ammonium could be released, having more benefit for the cells. Recently an activation of ADI pathway and consumption of citrulline have been suggested under suboptimal growth conditions such as lower pH, for *Lactobacillus fermentum* (Vrancken, Rimaux, Weckx, De Vuyst, & Leroy, 2009). Nevertheless, the behaviour of growing cells could be different than the resting cells used here. Anyway, being the involved mechanisms very complex, this subject must be more studied.

The presence of glucose also caused a lower arginine degradation. The increase of glucose does not have a so clear effect as the other conditions, although there is a slight tendency to lower ratios ornithine/arginine and ammonium/arginine, and so theoretically it should happen a higher relative production of citrulline when glucose is raised.

Comparing the obtained results for the different tested species and strains (**Fig. 4**), it can be seen that strains of *L. brevis* and *L. buchneri* isolated from wine and beer respectively have shown to be those with a higher production of citrulline in relation to arginine consumed, more than the type culture strains, originally isolated from other environments. These data also agree with the higher rates of arginine degradation for these strains. Therefore, a higher ability of citrulline production can be suggested in strains genetically used to ethanol environments.

Kinetics of arginine degradation and citrulline and ornithine production along the 2 h of resting cells experiments have been linear for most assays. Slopes have been similar from 0 to 1 h and from 1 h to 2 h. So, it can be supposed that

induction of synthesis of ADI enzymes is very quick in the presence of arginine, in spite of not being constitutive enzymes (Liu et al., 1996).

Citrulline is produced lineary in most cases, although in some strains, particularly in *L. buchneri* 4674 an increasing phase is observed, followed by a decline. This can be interpreted as an excretion of citrulline which is then reabsorbed by the cells and transformed to ornithine and ammonia, as other authors have also postulated (Mira de Orduña et al., 2000; Liu et al., 1994).

In most of the assays a good balance between degraded arginine and the sum of products citrulline, ornithine and ammonia has been found. Nevertheless this has not been the case of *L. hilgardii* 4681, where the sum of these products is lower than the consumed arginine. In this case, it could be explained by the possibility of ornithine being transformed to putrescine by the ornithine decarboxylase, such as that observed in *O. oeni* (Mangani et al., 2005) and in other LAB (Pereira, San Romão, Lolkema, & Barreto Crespo, 2009).

As conclusion, in this work we have been able to demonstrate by the first time both effects of ethanol and the low pH on a higher relative production of citrulline respect to consumed arginine in some species of LAB related with wine and beer. Being these species mainly present when these beverages are spoiled, possible contaminations must be prevented with well controlled aseptic processes and using starters that ensure a correct alcoholic fermentation, and malolactic fermentation in wines if required. In this way, appearance of citrulline that could be a source of EC, can be avoided. Anyway, knowledge of cellular mechanisms of the found effects of ethanol and low pH requires further research.

Acknowledgements

This work was supported by grants AGL-2000-0827-C02-02 and AGL2006-3070ALI from the Spanish Ministerio de Ciencia y Tecnología. Isabel Araque was the recipient of a predoctoral fellowship from the Universidad de Pamplona (Colombia).

References

- Araque, I., Gil, J., Carreté, R., Bordons, A., & Reguant, C. (2009). Detection of *arc* genes related with the ethyl carbamate precursors in wine lactic acid bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *57*, 1841-1847.
- Arena, M.E., Saguir, F.M., & Manca de Nadra, M.C. (1999). Arginine, citrulline and ornithine metabolism by lactic acid bacteria from wine. *International Journal of Food Microbiology*, *52*, 155-161.
- Arena M.E., Manca de Nadra, M.C., & Muñoz, R. (2002). The arginine deiminase pathway in the wine lactic acid bacterium *Lactobacillus hilgardii* X1B: structural and functional study of the *arcABC* genes. *Gene*, *301*, 61-66.
- Arena, M.E., & Manca de Nadra, M.C. (2005). Influence of ethanol and low pH on arginine and citrulline metabolism in lactic acid bacteria from wine. *Research in Microbiology*, *156*, 858-864.
- Da Silveira, M.G., San Romao, M.V., Loureiro-Dias, M.C., Rombouts, F.M., & Abee, T. (2002). Flow cytometric assessment of membrane integrity of ethanol-stressed *Oenococcus oeni* cells. *Applied and Environmental Microbiology*, *68*, 6087-6093.
- De Man, J.C., Rogosa, M., & Sharpe, M.E. (1960). A medium for the cultivation of lactobacilli. *Journal of Applied Bacteriology*, *23*, 130-135.
- Edwards, C.G., Powers, J.R., Jensen, K.A., Weller, K.M., & Peterson, J.C. (1993). *Lactobacillus* spp. from Washington State wines: isolation and characterization. *Journal of Food Science*, *58*, 453-458.
- Gratzfeld-Huesgen, A. (1998). Sensitive and Reliable Amino Acid Analysis in Protein Hydrolysates using the Agilent 1100 series HPLC. *Technical Note*. Agilent Technologies. Publication number 5968-5658E.
- Henick-Kling, T. (1993). Malolactic fermentation. In: Fleet, G.H. (Ed.), *Wine microbiology and biotechnology*. Harwood Academic, Chur, Switzerland, pp. 289-326.
- Lehtonen, P. (1996). Determination of amines and amino acids in wine – a review. *American Journal of Enology and Viticulture*, *47*, 127-133.
- Liu, S.Q., Pritchard, G.G., Hardman, M.J., & Pilone, G.J. (1994). Citrulline production and ethyl carbamate (urethane) precursor formation from arginine

- degradation by wine lactic acid bacteria *Leuconostoc oenos* and *Lactobacillus buchneri*. *American Journal of Enology and Viticulture*, *45*, 235-242.
- Liu, S.Q., Davis, C.R., & Brooks, J.D. (1995). Growth and metabolism of selected lactic acid bacteria in synthetic wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, *46*, 166-174.
- Liu, S.Q., Pritchard, G.G., Hardman, M.J., & Pilone, G.J. (1995). Occurrence of arginine deiminase pathway enzymes in arginine catabolism by wine lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, *61*, 310-316.
- Liu, S.Q., Pritchard, G.G., Hardman, M.J., & Pilone, G.J. (1996). Arginine catabolism in wine lactic acid bacteria: is it via the arginine deiminase pathway or the arginase-urease pathway? *Journal of Applied Bacteriology*, *81*, 486-492.
- Liu, S.Q., & Pilone, G.J. (1998). A Review: Arginine metabolism in wine lactic acid bacteria and its practical significance. *Journal of Applied Microbiology*, *84*, 315-327.
- Lonvaud-Funel, A. (1999). Lactic acid bacteria in the quality improvement and depreciation of wine. *Antonie van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology*, *76*, 317-331.
- Mangani, S., Guerrini, S., Granchi, L., & Vincenzini, M. (2005). Putrescine accumulation in wine: Role of *Oenococcus oeni*. *Current Microbiology*, *51*, 6-10.
- Mira de Orduña, R., Liu, S.Q., Patchett, M.L., & Pilone, G.J. (2000). Ethyl carbamate precursor citrulline formation from arginine degradation by malolactic wine lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, *183*, 31-35.
- Mira de Orduña, R., Patchett, M.L., Liu, S.Q., & Pilone, G.J. (2001). Growth and arginine metabolism of the wine lactic acid bacteria *Lactobacillus buchneri* and *Oenococcus oeni* at different pH values and arginine concentrations. *Applied and Environmental Microbiology*, *67*, 1657-1662.
- Ough, C.S. (1976). Ethyl carbamate in fermented beverages and foods. I. Naturally occurring ethyl carbamate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *24*, 323-328.
- Ough, C.S.; Crowell, E.A.; & Gutlove, B.R. (1988). Carbamyl compound reactions with ethanol. *American Journal of Enology and Viticulture*, *39*, 239-242.

- Pereira, C.I., San Romão, M.V., Lolkema, J.S., & Barreto Crespo, M.T. (2009). *Weissella halotolerans* W22 combines arginine deiminase and ornithine decarboxylation pathways and converts arginine to putrescine. *Journal of Applied Microbiology*, doi:10.1111/j.1365-2672.2009.04371.x.
- Poolman, B., Driessen, A.J.M., & Konings, W.N. (1987). Regulation of arginine-ornithine exchange and the arginine deiminase pathway in *Streptococcus lactis*. *Journal of Bacteriology*, 169, 5597-5604.
- Romero, S.V., Reguant, C., Bordons, A., & Masqué, M.C. (2009). Potential formation of ethyl carbamate in simulated wine inoculated with *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus plantarum*. *International Journal of Food Science and Technology*, 44, 1206-1213.
- Sakamoto, K., & Konings, W.N. (2003). Beer spoilage bacteria and hop resistance. *International Journal of Food Microbiology*, 89, 105-124.
- Schlatter, J., & Lutz, W.K. (1990). The carcinogenic potential of ethyl carbamate (urethane): risk assessment at human dietary exposure levels. *Food Chemistry and Toxicology*, 28, 205-211.
- Soufleros, E., & Bertrand, A. (1998). Evaluation d'une méthode CLHP adaptée au dosage des acides amines du vin. *Vitis* 37, 43-53.
- Spano, G., Chieppa, G., Beneducce, L., & Massa, S. (2004). Expression analysis of putative *arcA*, *arcB* and *arcC* genes partially cloned from *Lactobacillus plantarum* isolated from wine. *Journal of Applied Microbiology*, 96, 185-193.
- Stevens, D.F. & Ough, C.S. (1993). Ethyl carbamate formation: reaction of urea and citrulline with ethanol in wine under low to normal temperature conditions. *American Journal of Enology and Viticulture*, 44, 309-312.
- Terrade, N., & Mira de Orduña, R. (2006). Impact of winemaking practices on arginine and citrulline metabolism during and after malolactic fermentation. *Journal of Applied Microbiology*, 101, 406-411.
- Terrade, N., & Mira de Orduña, R. (2009). Arginine and citrulline do not stimulate growth of two *Oenococcus oeni* strains in wine. *FEMS Microbiology Letters*, 290, 98-104.
- Tonon, T., & Lonvaud-Funel, A. (2000). Metabolism of arginine and its positive effect on growth and revival of *Oenococcus oeni*. *Journal of Applied Microbiology*, 89, 526-531.

- Tonon, T., Bourdineaud, J.P., & Lonvaud-Funel, A. (2001). Catabolisme de l'arginine par *Oenococcus oeni*: aspects energetiques et genetiques. *Lait*, 81, 139-159.
- Tonon, T., & Lonvaud-Funel, A. (2002). Arginine metabolism by wine *Lactobacilli* isolated from wine. *Food Microbiology*, 19, 451-461.
- Uthurry, C.A., Varela, F., Colomo, B., Suárez Lepe, J.A., Lombardero, J., & García del Hierro, J.R. (2004). Ethyl carbamate concentrations of typical Spanish red wines. *Food Chemistry*, 88, 329-336.
- Uthurry, C.A., Suárez Lepe, J.A., Lombardero, J., & García del Hierro, J.R. (2006). Ethyl carbamate production by selected yeasts and lactic acid bacteria in red wine. *Food Chemistry*, 94, 262-270.
- Vahl, M. (1993). A survey of ethyl carbamate in beverages, bread and acidified milks sold in Denmark. *Food Additives and Contaminants*, 10, 585-592.
- Vrancken, G., Rimaux, T., Weckx, S., De Vuyst, L., & Leroy, F. (2009). Environmental pH determines citrulline and ornithine release through the arginine deiminase pathway in *Lactobacillus fermentum* IMDO 130101. *International Journal of Food Microbiology*, 135, 216-222.
- Weber, F.J., & Bont, J.A.M. (1996). Adaptation mechanisms of microorganisms to the toxic effects of organic solvents on membranes. *Biochimica Biophysica Acta*, 1286, 225-245.
- Weber, J.V., & Sharypow, V.I., (2009). Ethyl carbamate in food and beverages: a review. *Environmental Chemistry Letters*, 7, 233-247.
- Wibowo, D., Eschenbruch, R., Davis, C. R., Fleet, G.H., & Lee, T.H. (1985). Occurrence and growth of lactic acid bacteria in wine: a Review. *American Journal of Enology and Viticulture*, 36, 302-313.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
ESTUDIO BIOQUÍMICO Y MOLECULAR DE LA PRODUCCIÓN DE PRECURSORES DE CARBAMATO DE ETILO POR BACTERIAS LÁCTICA
ASOCIADAS AL PROCESO DE VINIFICACIÓN
ISBN:978-84-693-6429-1/DL:T-1631-2010

III. 5.

**EFFECTO DEL ETANOL Y pH EN LA EXPRESIÓN DE LOS GENES
arc Y EN LA ACUMULACIÓN/ EXCRECIÓN DE CITRULINA Y
ORNITINA POR *LACTOBACILLUS BREVIS* Y *PEDIOCOCCUS
PENTOSACEUS***

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
ESTUDIO BIOQUÍMICO Y MOLECULAR DE LA PRODUCCIÓN DE PRECURSORES DE CARBAMATO DE ETILO POR BACTERIAS LÁCTICA
ASOCIADAS AL PROCESO DE VINIFICACIÓN
ISBN:978-84-693-6429-1/DL:T-1631-2010

***Efecto del etanol y pH en la expresión de los
genes arc y en la acumulación/ excreción de
citrulina y ornitina por Lactobacillus brevis
y Pediococcus pentosaceus***

***Effect of ethanol and pH on arc genes expression
and on citrulline and ornithine accumulation/excretion
by Lactobacillus brevis and Pediococcus pentosaceus***

Artículo en preparación

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
ESTUDIO BIOQUÍMICO Y MOLECULAR DE LA PRODUCCIÓN DE PRECURSORES DE CARBAMATO DE ETILO POR BACTERIAS LÁCTICA
ASOCIADAS AL PROCESO DE VINIFICACIÓN
ISBN:978-84-693-6429-1/DL:T-1631-2010

**Effect of ethanol and pH on *arc* genes expression and on
citrulline and ornithine accumulation/excretion by
Lactobacillus brevis and *Pediococcus pentosaceus***

Isabel Araque, Albert Bordons, Cristina Reguant

Departament de Bioquímica i Biotecnologia, Facultat d'Enologia, Universitat
Rovira i Virgili, Campus Sescelades, c/ Marcel·lí Domingo, s/n, Tarragona 43007,
Catalonia, Spain.

Cristina Reguant* (Corresponding author):

Dept. Bioquímica i Biotecnologia, Universitat Rovira i Virgili

Carrer Marcel·lí Domingo s/n, 43007 Tarragona, Catalonia, Spain

Email: cristina.reguant@urv.net

Phone: +34 977558280

Fax: +34 977558232

Abstract

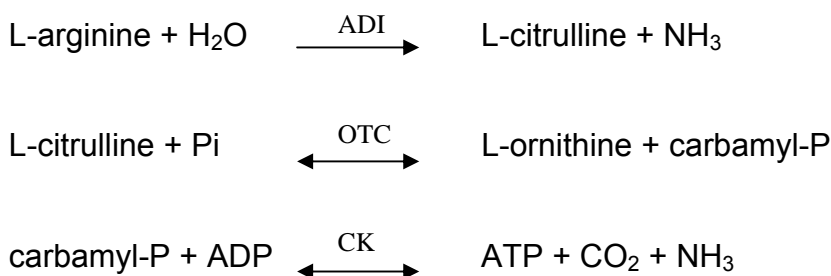
The accumulation of citrulline and ornithine in wine or beer from the arginine catabolism of some lactic acid bacteria (LAB) species increases the risk of formation of ethyl carbamate and putrescine, respectively. Several LAB species, found as spoilage bacteria in alcoholic beverages, have been reported as arginine degrading. This work evaluated the effect of ethanol content and low pH on the accumulation of citrulline and ornithine by two strains belonging to the potential contaminant species *Lactobacillus brevis* and *Pediococcus pentosaceus*. *P. pentosaceus* showed a higher tolerance to ethanol at pH 4.5 than *L. brevis*. In the conditions affecting more cell viability, it was observed a noticeably increase of arginine consumption per cell, indicating the possible role of arginine utilisation as a stress responsive mechanism. *L. brevis* strain showed differences in the transcriptional response of carbamate kinase gene (*arcC*) and in the specific consumption of arginine that led to a higher accumulation of ornithine and citrulline in the media. The work presents new information about the cellular mechanisms affecting the arginine metabolism in two LAB spoilage species occurring in wine and beer.

Key words: lactic acid bacteria, arginine, ethyl carbamate, putrescine, *arc* genes, wine, beer

1. Introduction

Lactobacillus brevis and *Pediococcus pentosaceus* have been described as spoilage lactic acid bacteria (LAB) species in the production of alcoholic beverages such as wine and beer (Vahl et al 1993; Lonvaud-Funel 1999; Sakamoto et al. 2001; Gao et al. 2002). In the vinification process, LAB development is desired to conduct malolactic fermentation (MLF). In most of the cases, *Oenococcus oeni* is the predominant species responsible for MLF due to its better adaptation to wine harsh conditions. However, other LAB species of *Lactobacillus* and *Pediococcus* can develop causing wine spoilage (Lonvaud-Funel 1999). *Lactobacillus* and *Pediococcus* are also the most commonly reported beer spoilage genera (Simpson and Fernández 1992). Nevertheless, certain *Pediococcus pentosaceus* strains may be used as starter cultures in malting, offering interesting possibilities to ensure balanced enzyme activities and to avoid harmful *Fusarium* contaminations (Linko et al. 1998).

Although L-malate is the most important substrate for LAB species in wine and sugars in beer, other compounds can be metabolised affecting organoleptic qualities of the product. Both *L. brevis* and *P. pentosaceus* have been reported to have the ability to catabolize arginine by the arginine deiminase (ADI) pathway (Araque et al. 2009):



In this catabolic pathway, the arginine deiminase (ADI) is the enzyme responsible for arginine conversion into citrulline and ammonia. Citrulline can be further metabolised by ornithine transcarbamylase (OTC) into carbamyl-P, which can be utilised by carbamate kinase (CK) to produce CO₂ and ammonia, with the production of ATP. When arginine is not completely catabolised, intermediary products of the pathway can be accumulated in the medium. Both citrulline and carbamyl-P are known precursors of ethyl carbamate, a carcinogen compound, when reacting spontaneously with ethanol (Uthurry et al. 2006). Ethanol reaction is favoured by temperature and acid pH, and can also occur with urea produced by yeast (Stevens and Ough 1993). From arginine LAB consumption, citrulline has been described as the main ethyl carbamate precursor produced by several *Lactobacillus* species (Azevedo et al. 2002; Mira de Orduña et al. 2000). On the other hand, ornithine is a putrescine precursor. However, levels of free ornithine are usually low in grape must and do not account for the high levels of putrescine found in some wines (Soufleros et al. 1998). Indeed, ornithine available for putrescine production may also be produced by some LAB species from the arginine deiminase pathway (Mangani et al. 2005). Also in beer it has been detected the increase of biogenic amines, including putrescine, during bottle storage associated to the development of lactobacilli and pediococci strains (Kalac et al. 2002). Therefore, the accumulation of ornithine by LAB should be considered as a risk for the formation of putrescine, either by the arginine consuming strain itself, if it has the metabolic capability, or by other LAB strains present in the environment.

Little information is available about the ability to accumulate citrulline and/or ornithine from arginine catabolism in the media of the species *L. brevis* and *P.*

pentosaceus, although being recognised as spoilage species of wine and beer. The aim of this work was to evaluate the potential of production and extracellular accumulation of citrulline and ornithine of two LAB strains belonging to species which have been described as common contaminants in the elaboration of alcoholic beverages, such as wine and beer. The experimental design was focused on the effect of two stress factors, pH and alcohol content, as an approach to understand the behaviour of this LAB species under harsh conditions in which commonly develop as contaminants.

2. Materials and methods

2.1 Bacterial strains and culture conditions

The strains *Lactobacillus brevis* 3824, and *Pediococcus pentosaceus* 4214, were originally isolated from wine (Enolab, Universitat de Valencia, Spain) and tested for their arginine degradation ability (Araque et al. 2009).

The assays were carried out in a modified MRS medium (Tonon et al., 2001) adjusted to different pH values, 3.6 o 4.5, and ethanol concentrations 0%, 5%, 10% of ethanol (vol/vol). The base medium composition was: 4 g yeast extract, 8 g beef extract, 10 g bactopectone, 5 g glucose, 2 g KH₂PO₄, 0.2 g MgSO₄·7H₂O, 0.1 g MnSO₄·H₂O, 1 ml Tween 80. Assays were started by the addition of 5 g/l of arginine to a previously grown culture in the described conditions at a 600 nm absorbance between 0.4 – 0.5. For assays with 10% ethanol, cells were previously adapted in MRSm at pH 3,6 or pH 4,5 with 5% ethanol, and then inoculated into MRSm at the same pH in presence of 10% I (vol/vol) ethanol.

Cultures were then monitored for 24 hours, sampling at 6 and 24 hours. Cells from culture samples were harvested for mRNA purification by centrifugation at 12000 rpm/ 5 min at 4°C, and washed with Tris-HCl, cell pellets frozen immediately in liquid nitrogen, they were kept at -80°C until they were analysed. The supernatant of these samples was stored at -20°C for extracellular amino acids content analyses. Viability of these cultures was analysed by plate counting on MRS (Difco) agar supplemented with 4 g/l DL- malic acid and 5g/l D(-) – fructose after incubation anaerobically at 27°C. The pH value of each sample was measured with a pH-meter Crison GLP 21.

2.2 Analysis of arginine, citrulline and ornithine by HPLC

The arginine consumed, and the production of citrulline and ornithine in supernatants were quantified by analytical HPLC, this was carried on an Agilent HPLC 1100 (Agilent Technologies, Wilmington, DE, USA) provided with an automatic sampler system. This HPLC method was based on previously described methods (Soufleros & Bertrand, 1998; Gratzfeld-Huesgen, 1998) and adapted to improve the resolution of the three peaks of these amino acids. Two microliters of sample were mixed with 1 µl of L-norvaline (internal standard), and 1,0 µl of each of the derivatisation agents: OPA (o-phthalaldehyde-3-mercaptopropionic acid) and FMOC (9-fluorenylmethyl - Chloroformate), 1 µl of mix was injected into a 4,0 x 250 mm hypersil ODS (Agilent Technology, USA) , with a 4 mm x 5 µm guard-column packed with the same phase. .The separation of three amino acids under study lasted 30 minutes using a flow rate of 1.5 ml/min and temperature of 40°C. The mobile phase was composed of two different solvents.. Solvent A: This was a mixture by litre of 2.2 g of sodium acetate (Sigma), 220 µl triethalonamine

(Sigma) and 6 ml tetrahydrofurane (Merck), after mixing the pH was adjusted to 7,2 with 1% acetic acid (Panreac) . Solvent B: This was a mixture by litre of 1,8 g of sodium acetate (Sigma), 320 ml of ethanol (Merck), 400 ml of acetonitrile (Panreac), the pH was adjusted to 7 with 1% acetic acid. The concentration of each amino acid was calculated based on the area under the peak established for a given amino acid of known concentration and normalized by internal standard.

2.3 RNA Extraction and cDNA synthesis

Total RNA was isolated from bacteria as described previously by Chomczynski et al (1987), adapted, briefly, pellet cell was lysed with 1 ml of lysis solution (25% sucrose solution containing 30 mg/ml of lysozyme), leave it incubate for 15 minutes at 37° C, was added after 1 ml of 2% SDS and mix and heat at 65°C during 30 sec, then be added solution D2x (8 M guanidine thiocyanate, 50 mM sodium nitrate pH 7, 1% N-lauroyl sarcosine, 0.2 M 2-mercaptoethanol fresh every day), following then was added 2M sodium acetate pH 4, phenol and 49:1 Chloroform-Isoamyl alcohol. After incubation on ice for 15 sec, it was centrifuged 20 min at 10000 rpm at 4 °C, the aqueous phase was then transferred to a new eppendorf tube, then the RNA was precipitated to overnight after the addition of 1 volume of isopropanol. After centrifugation, the pellet was washed with 75% ethanol, and then was dried and dissolved in 60 µl of DEPC-treated water. After isolation, the RNA was purified using Roche RNeasy kit according to the manufacturer's instructions (Mannheim). RNA concentrations were determined by measurement on ThermoSpectronic Genesys 10 UV Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific). The quality of RNA was verified electrophoretically on 0.8% agarose gels.

Total RNA was reverse-transcribed with TaqMan Reverse Transcription Reagents (Applied Biosystems Technology) in a GenAmp PCR System 2400 (Applied Biosystems), 1.0 μ l of Random Hexamers were used with 10 ng/ μ l of total RNA as template in a reaction volume of 20 μ l. Following the protocol provided by the manufacturer, after denaturation at 25°C for 10 min, cDNA was synthesized at 48°C for 30 min. Finally, the reaction was inactivated at 95°C for 5 min. The samples were stored at -20°C until they were analysed.

2.4 Real time quantitative PCR

The primers used for this study are described in Table 1. Sequences of *arc* genes of *L. brevis* 3824 and *Pediococcus pentosaceus* 4214 were obtained and published previously (Araque et al. 2009). The nucleotide sequence references of the genes from *L. brevis* 4246 are the following: *arcA* EF054853, *arcB* EF054854, *arcC* EF054855; and from *P. pentosaceus* 4214 are the following: *arcA* EF054850, *arcB* EF054851, and *arcC* EF054852. The sequences of 16S genes were obtained from complete genome sequence of *Pediococcus pentosaceus* 25745 (PEPE_r0108), and from *Lactobacillus brevis* 367 (LVIS_r0526, LVIS_r0425, LVIS_r1545, LVIS_r0082, LVIS_r1172). All primers were designed in order to accomplish standards of quality for quantitative PCR assay in terms of efficiency and specificity. The quantitative PCR analysis were performed in an Applied Biosystems 7300 Fast Real-Time PCR Systems thermocycler using SYBR green staining and quantification based on the $\Delta\Delta C_t$ method as previously described (Olguín et al. 2009).

Table 1. Primers designed in this work.

Target gene	Description	Forward primer (5' → 3')	Reverse primer (5' → 3')
<i>L. brevis</i>			
<i>arcA</i>	Arginine deiminase	GACACGGTCTTCACGATGATTAA C	CGATATGACCACCTTCACCTAAGAT
<i>arcB</i>	Ornithine transcarbamylase	CGAAGTCTTCACCAGCAAGTATG	ATTGAGTGCATCCGGTTTTC
<i>arcC</i>	Carbamate kinase	CAACAAGCGGCTGGTAGTACG	GCCGATACTACTACCTTGGGTCATC
<i>16S</i>	Ribosomal subunit 16S	CCAGAAAGCCACGGCTAACT	GGACAACGGCTTGCCACCTA
<i>P. pentosaceus</i>			
<i>arcA</i>	Arginine deiminase	CGAACAAATTGGGCAGGACAT	TGGTCCATGAGGTTCCGTTCA
<i>arcB</i>	Ornithine transcarbamylase	CAACGATTTTACC GGCTGTT	GGTGCTGCTGTAA TGGGAAT
<i>arcC</i>	Carbamate kinase	CTTGCAAAAACGAAACA TGGGA	AATTTGTGGGGCTTGTCTTT
<i>16S</i>	Ribosomal subunit 16S	CCGACCTGAGAGGGTAATCG	TACTGCTGCCTCCCGTAGGA

3. Results

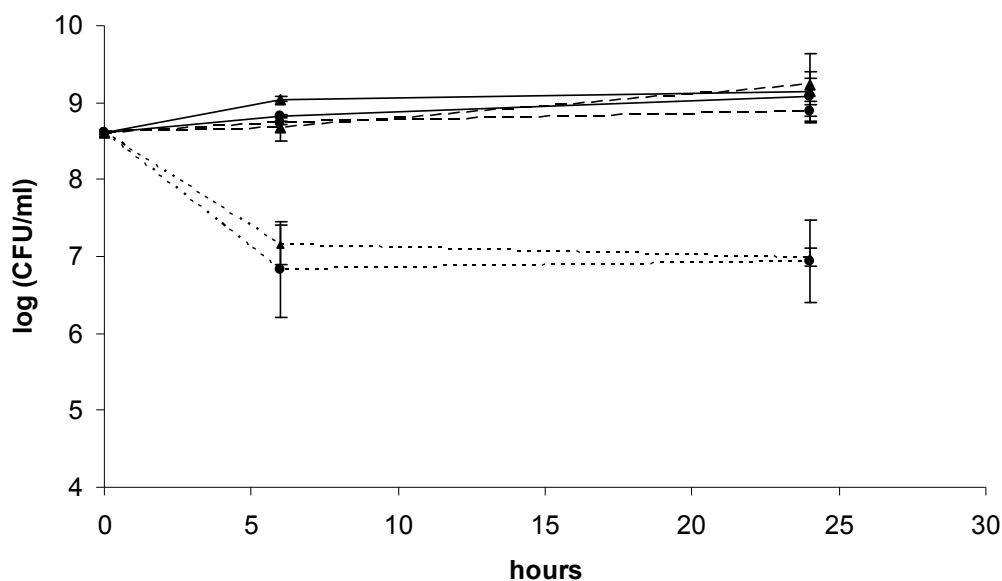
3.1. Effect of ethanol and pH on viability

In general terms, the evolution of viability along time showed a similar behaviour both for *L. brevis* 3824 and *P. pentosaceus* 4214 in all the studied conditions of pH and ethanol concentration (Fig. 1). Control cultures and those with 5% of ethanol did not show relevant changes in viability during 24 hours and cell populations were maintained, or slightly increased, showing values of around $5 \cdot 10^8$ - $1 \cdot 10^9$ CFU/ml. However, in cultures with 10 % of ethanol viability decreased over 1.5 log-units after 6 hours for *L. brevis* both at pH 4.5 and 3.6. *P. pentosaceus* showed a higher tolerance to ethanol at pH 4.5, where populations were 1 log-unit higher than those of *L. brevis* in the same conditions. At pH 3.6 with 10% ethanol *P. pediococcus* showed a similar decrease in population to the observed in *L. brevis*.

3.2. Arginine consumption

As can be seen in Table 2, most of the arginine was consumed in media without ethanol after 24 hours of growth by both *L. brevis* and *P. pentosaceus*. Nevertheless, some differences between the two studied LAB strains were observed in the presence of ethanol. *L. brevis* showed a decrease in the arginine consumption only with 10% of ethanol, especially at pH 3.6. In the case of *P. pentosaceus*, a clear decrease in arginine consumption was observed already in the presence of 5% ethanol, quite similar to the observed with 10% of ethanol. The evolution of the specific arginine consumption followed an inverse relation to the percentage of total arginine consumed (Table 2).

A. *Lactobacillus brevis*



B. *Pediococcus pentosaceus*

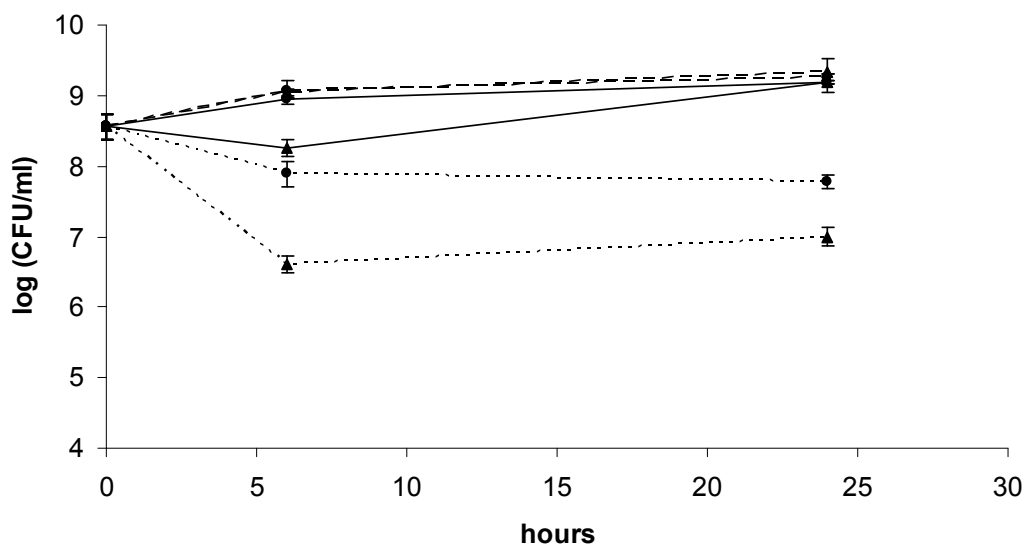


Figure 1. Viability of the LAB strains along time at pH 4.5 (circles) or pH 3.6 (triangles) with no ethanol (solid line), 5% ethanol (dashed line) and 10% ethanol (dotted line).

Table 2. Mean values of % of arginine consumed, specific arginine consumption (mmol arg/g dry weight) and final pH after 24 hours of culture

pH	ethanol	% arginine consumed		Specific arginine consumption		Final pH	
		<i>L. brevis</i>	<i>P. pentosaceus</i>	<i>L. brevis</i>	<i>P. pentosaceus</i>	<i>L. brevis</i>	<i>P. pentosaceus</i>
4.5	0 %	90.82 ± 0.20	93.02 ± 2.40	67.71 ± 0.23	40.36 ± 0.39	7,12 ± 0.04	6,65 ± 0.14
	5 %	94.78 ± 0.22	69.31 ± 2.12	107.10 ± 0.43	42.38 ± 0.16	6,28 ± 0.06	4,58 ± 0.20
3.6	10 %	67.43 ± 3.54	66.15 ± 1.33	721.65 ± 1.34	354.82 ± 1.65	5,20 ± 0.21	4,60 ± 0.08
	0 %	94.65 ± 0.31	86.19 ± 1.88	60.71 ± 0.15	55.88 ± 0.34	6,79 ± 0.09	6,73 ± 0.02
	5 %	92.62 ± 0.02	60.75 ± 1.72	49.39 ± 0.18	27.54 ± 0.23	6,53 ± 0.16	3,67 ± 0.09
	10 %	58.90 ± 0.06	52.33 ± 2.53	623.94 ± 0.97	640.76 ± 5.23	3,97 ± 0.11	3,87 ± 0.06

That is, in the presence of 10% of ethanol, this ratio was around ten times higher than without ethanol for both *L. brevis* and *P. pentosaceus*, whatever the pH. However, in the presence of 5% of ethanol, the trend of the ratio arginine consumed per biomass was different depending on the pH. At pH 4.5, an increase, compared to the control (no ethanol), was detected with *L. brevis*. Similar results were observed for *P. pentosaceus* although the increment was very slight. On the contrary, at pH 3.6, the specific consumption of arginine decreased with both LAB strains, but more noticeably with *P. pentosaceus*. In general terms, *P. pentosaceus* showed lower molar ratios of arginine consumed per g of biomass than *L. brevis*, being observed main differences at pH 4.5. Final pH increased around 3 units in cases which there was an arginine consumption of more than 90%. When arginine utilisation was below 70%, the pH increased between 0.07 and 0.8. These results were in accordance with the detected increment of ammonia, produced from the ADI pathway, and lactic acid, produced from sugars (data not shown).

3.3 Excretion of citrulline and ornithine

Considering that citrulline is a potential ethyl carbamate precursor once released to the medium and ornithine can be metabolised to putrescine, the extracellular content of the two aminoacids was monitored by HPLC in order to evaluate the differences in the excretion of these compounds depending on ethanol and pH conditions. The molar ratio of citrulline excreted per arginine consumed after 24 hours by *L. brevis* (Figure 2) increased noticeably in the presence of 10% of ethanol and was also slightly favoured, in all cases, by low pH. The maximum value was detected with 10% ethanol at pH 3.6 where an 8% of

molar arginine consumed was excreted in the form of citrulline at pH 3.6, while at lower concentrations of ethanol this value ranged between 2 and 4 %. On the contrary, *P. pentosaceus* did not show relevant differences in citrulline excretion in any of the conditions assayed (Figure 3). Only a slight effect of acidity was detected in cultures at pH 3.6, where the amount of citrulline per arginine consumed increased a little.

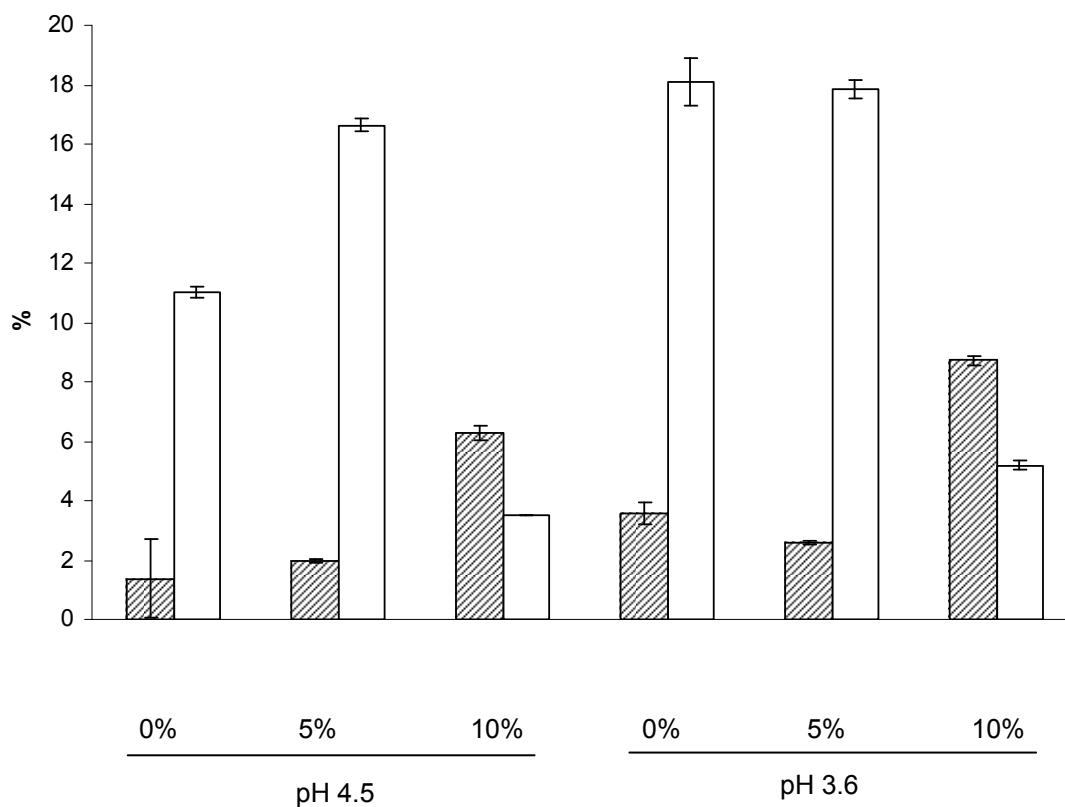


Figure 2. Percentage of the molar ratio of citrulline excreted/arginine consumed (dashed) and ornithine/arginine consumed (plain) by *L. brevis*

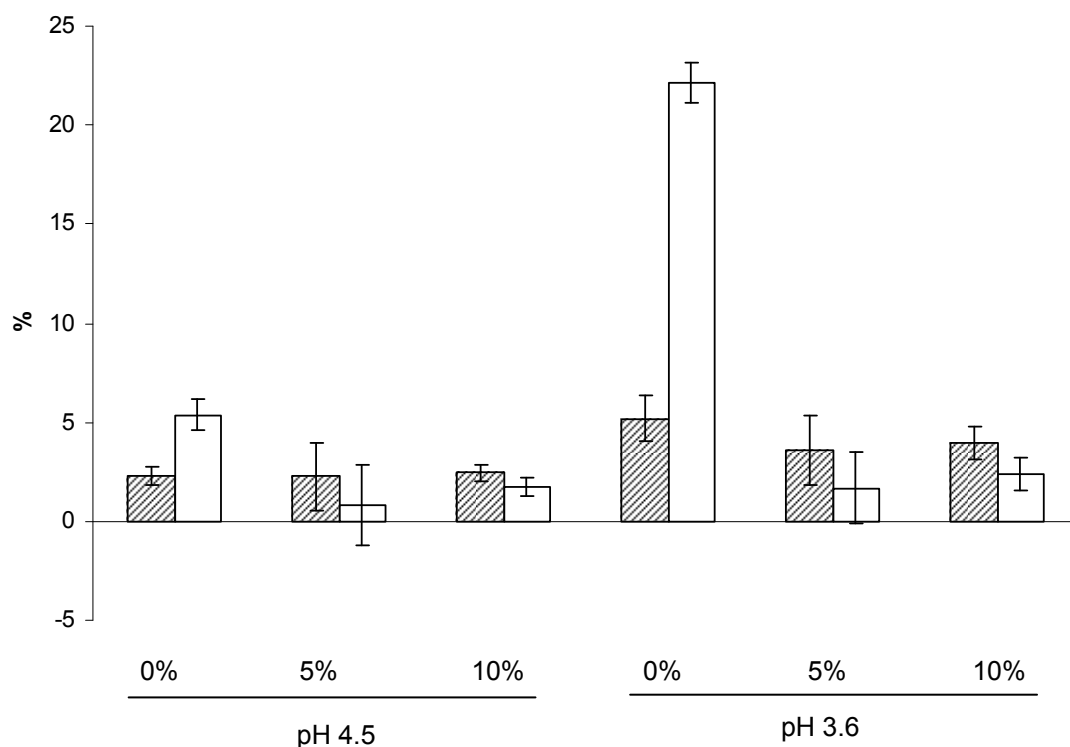


Figure 3. Percentage of the molar ratio of citrulline excreted/arginine consumed (dashed) and ornithine/arginine consumed (plain) by *P. pentosaceus*

Regarding the ornithine excretion, *L. brevis* released to the medium between 11 and 18 % of arginine consumed in the form of ornithine in the cultures without ethanol or 5% of ethanol (Figure 2). However, in the presence of 10 % of ethanol, a decrease in the accumulation of ornithine in the medium was observed. Low pH (3.6) promoted the ornithine release whatever the ethanol content. In the case of *P. pentosaceus* (Figure 3), the ornithine excreted was only comparable to *L. brevis* in the culture without ethanol at pH 3.6, where 20 % of arginine consumed was accumulated in the medium in the form of ornithine. In the other assayed conditions, the accumulation of this aminoacid did not reach 6% of the consumed arginine.

3.4. Expression of ADI pathway genes

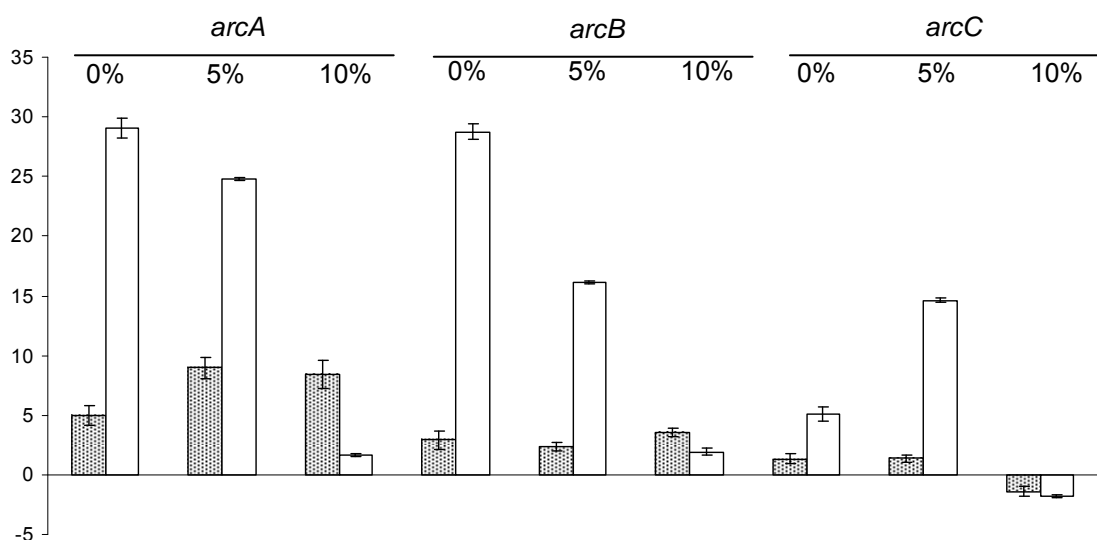
In *L. brevis*, the expression of *arcA* and *arcB* genes was increased significantly, compared to the control (0 h), at pH 4.5 in the absence of ethanol already after 6 hours of arginine addition, increasing up to 29-fold in both cases after 24 hours (Figure 4A). Likewise, the expression of the gene *arcC* showed a smaller increment of 5-fold in the same conditions but only after 24 hours of arginine supply. The presence of 5% of ethanol at pH 4.5 resulted also in a relevant over-expression of *arc* genes after 24 hours. A 10% of ethanol content resulted in an initial activation of the transcription of *arcA* and *arcB* genes, which expression decreased after 24 hours. However, *arcC* transcription was inhibited under these conditions.

At pH 3.6 (Figure 4B), *arcABC* gene expression in *L. brevis* was inhibited in all conditions containing ethanol. In the absence of ethanol, *arcC* was slightly over-expressed after 6 hours of arginine addition, decreasing afterwards. In these conditions, the time course of the relative expression of *arcC* evolved from 10-fold at 6 hours to 3-fold after 24 hours of growth. At this low pH, both 5% and 10% of ethanol content resulted in a clear inhibition of *arc* genes transcription. The strongest inactivation was observed for *arcC* in the presence of 10% of ethanol after 6 hours, showing a relative expression decrease of 70-fold with respect to time zero (no arginine in the medium).

P. pentosaceus showed some similarities with *L. brevis* in *arc* genes expression at pH 4.5. A general over-expression of the three genes was observed without ethanol and in the presence of 5% ethanol (Figure 5A). However, *P. pentosaceus* showed a faster transcriptional response in the absence of ethanol,

where all genes were strongly over-expressed already after 6 hours of growth, especially *arcA* (45-fold). No significant changes of expression were detected for any of the analysed genes by effect of 10 % of ethanol.

A) pH 4.5



B) pH 3.6

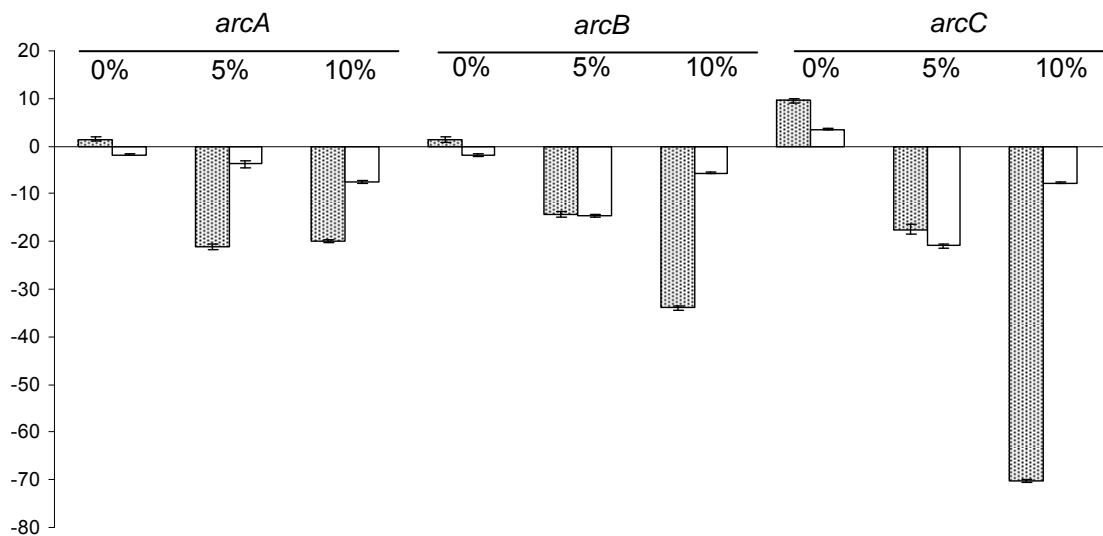
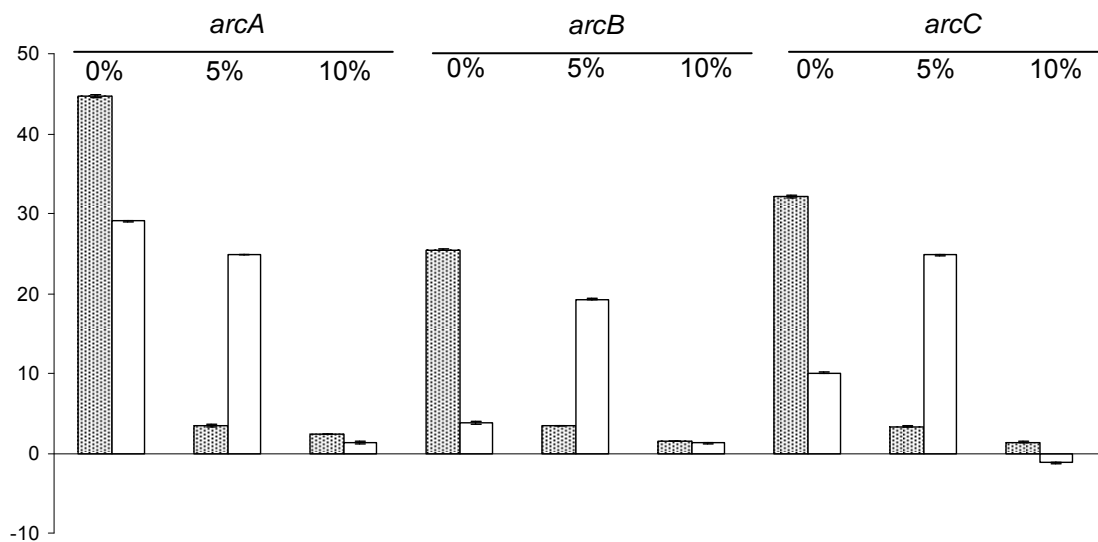


Figure 4. Relative expression of *arcA*, *arcB* and *arcC* genes under different conditions after 6 hours (dotted) and 24 hours (plain) of arginine additions in *L. brevis*. The percentages below gene names indicate ethanol content.

A) pH 4.5



B) pH 3.6

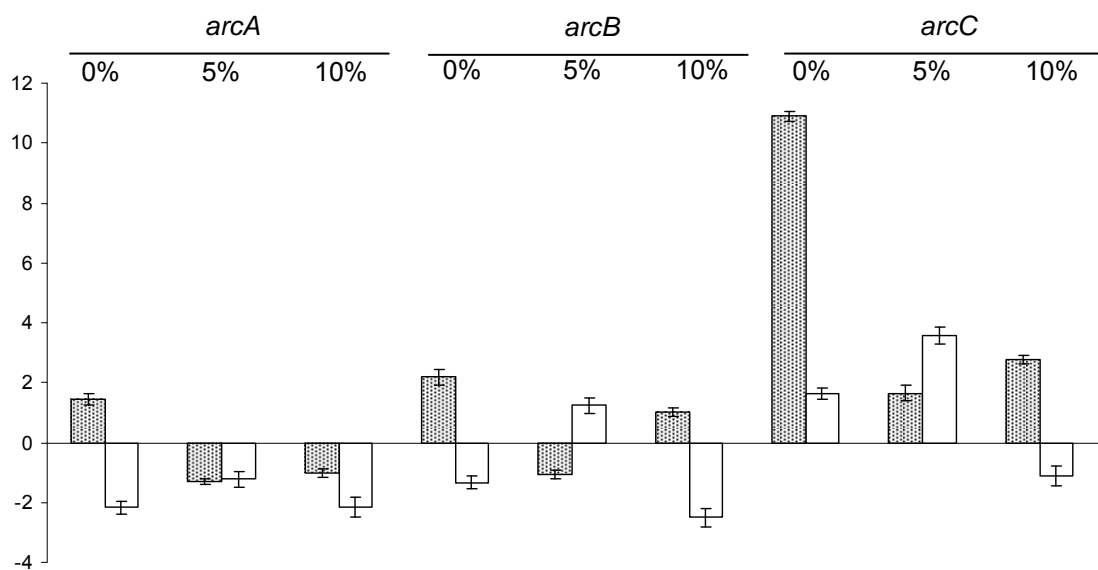


Figure 5. Relative expression of *arcA*, *arcB* and *arcC* genes under different conditions after 6 hours (dotted) and 24 hours (plain) of arginine additions in *P. pentosaceus*. The percentages below gene names indicate ethanol content.

At initial pH 3.6, the expression of *arcA* and *arcB* genes of *P. pentosaceus* was inhibited in the presence of ethanol after 24 hours of culture, with the exception of *arcB* with 5% ethanol that did not change significantly after this time (Figure 5B). Similarly to *L. brevis*, an 11-fold over-expression was observed for *arcC* in the absence of ethanol after 6 hours of culture. This gene was also over-expressed with 5 and 10% of ethanol after 24 and 6 hours of culture, respectively. This behaviour was not observed in *L. brevis*, where *arcC* was strongly inhibited in the presence of ethanol (Figure 4B).

Discussion

This work evaluates the capacity of two strains belonging to potential contaminant LAB species of wine and beer to produce ethyl carbamate and putrescine precursors under conditions of moderate and high alcohol content and acidity, likewise in beer and wine, respectively. These strains were selected for their ability to degrade high levels of arginine in a screening of multiple strains of each species (Araque et al., 2009).

Both strains studied were able to maintain viability in the presence of 5% of ethanol at both pH 4.5 and 3.6. Nevertheless, a decrease of populations was observed with 10% ethanol in both strains. Under these conditions, *P. pentosaceus* showed a higher tolerance to ethanol at pH 4.5 than *L. brevis*. Even though the higher populations of *P. pentosaceus* with 10% ethanol at pH 4.5, the ratio of arginine consumed per biomass was much lower than the observed with *L. brevis*. Accordingly, at pH 3.6 with 10% ethanol, where viability was decreased in

both strains, specific arginine consumption was also higher than the observed in the other conditions showing higher viability. These results indicate that arginine degradation may have contributed in the response to stress, since it was triggered under conditions threatening cell survival. Similar results were reported for a *Lactobacillus hilgardii* strain that consumed more arginine per cell at pH 3.8 than at 6.5 (Arena and Manca de Nadra, 2005). Several authors have described the relationship between arginolysis and bacterial survival in different LAB species (Champomier Vergès et al., 1999; Marquis et al., 1987; Rallu et al., 1996; Tonon and Lonvaud-Funel, 2000). The protective effect of arginine degradation is related to the production of additional energy for growth or survival (Tonon and Lonvaud-Funel, 2000; Arena and Manca de Nadra, 2005). Moreover, in acidic environments, arginine consumption reduces the inhibitory effect of low pH because of the production of ammonia through the ADI pathway. However, studies in some LAB species, such as *Oenococcus oeni*, have shown that arginine stimulates stress resistance independently of pH due to the over-expression of several stress responsive genes in the presence of arginine and sugars (Bourdineaud, 2006). In this work, either initial or final pH did not show a relevant effect on specific arginine consumption in *P. pentosaceus* strain. This strain, under conditions in which final pH was different, such as 0% ethanol and 5% ethanol, maintained similar specific arginine consumption. Notwithstanding, a stimulating effect of higher ethanol concentrations (10%) on arginine utilisation was observed. This reinforces the idea that arginine is involved in stress response since these conditions are those in which cell viability was more affected and, probably, surviving cells were more stressed. Likewise, *L. brevis* specific consumption of arginine was also triggered in the most stressful conditions for population survival

(10% ethanol), disregarding pH. It is worth to note that *L. brevis* showed, in the presence of 5% ethanol at pH 4.5, the total and specific arginine consumption higher than *P. pentosaceus*. Being demonstrated that *L. brevis* 3824 is more sensitive to 10% ethanol at pH 4.5 than *P. pentosaceus* CECT 4214, the higher use of arginine observed in *L. brevis* with 5% ethanol at the same pH may already account for a stress responsive mechanism.

Regarding the accumulation of citrulline and ornithine in the medium, *L. brevis* excreted more ornithine than citrulline per arginine consumed, except in the presence of 10% ethanol. Citrulline accumulation increased with higher concentrations of ethanol. The behaviour observed for *L. brevis* is in accordance with data reported for other species of the same genus. The higher excretion of ornithine vs citrulline has been described for *Lactobacillus hilgardii* (Tonon and Lonvaud Funel, 2002). Other authors have reported, also for *L. hilgardii*, the increase of citrulline excreted per arginine consumed at higher ethanol content and the decrease of ornithine excretion in the presence of 10% ethanol compared to the absence of this compound (Arena and Manca de Nadra, 2005). The strain of *P. pentosaceus* studied in this work showed a different behaviour, producing a low accumulation of citrulline and ornithine in the media, except at pH 3.6 without ethanol. Since *P. pentosaceus* has been traditionally considered as non arginine degrading, there's not information available to compare with the data obtained in this work. According to our results, *P. pentosaceus* would not accumulate elevate levels of citrulline, either ornithine, in the presence of ethanol at low pH. Therefore, even though *P. pentosaceus* presents a higher tolerance to ethanol than *L. brevis*, the later species would have a stronger contaminant character, in environments such as beer or wine, in terms of citrulline and ornithine accumulation that could

led to ethyl carbamate and putrescine production, respectively. For both *L. brevis* and *P. pentosaceus*, the relative expression of the *arc* genes either decreased or barely changed, compared to time zero, at pH 3.6. The only exception was *arcC* of *P. pentosaceus* which was over-expressed in all ethanol conditions, although maximal over-expression was detected without alcohol. This gene is also more transcribed at pH 4.5 in *P. pentosaceus* than in *L. brevis*. The lower transcriptional levels of the gene of carbamate kinase in *L. brevis* could explain in part the higher accumulation of ornithine observed by this strain. Even though the conditions of higher accumulation of ornithine (0 and 5% ethanol) are not coincident with those where *arcC* showed the strongest inhibition (10%), it should be noticed that with 10% ethanol the specific arginine consumption was much higher and, therefore, also the production of ornithine per cell. The transcriptional behaviour of *arcA* and *arcB* was similar for *L. brevis* and *P. pentosaceus* in all the assayed conditions. According to this, the ascendant accumulation of citrulline in relation to ethanol concentration with *L. brevis* would have been caused mainly by the higher rate of transformation of arginine into citrulline per cell. Therefore, under these conditions not a transcriptional but an enzymatic activation may have accounted for the increased arginine consumption per cell. This could have led to a higher citrulline excretion, especially in the presence of ethanol where both specific arginine consumption and citrulline accumulation are higher in *L. brevis* than in *P. pentosaceus*.

In conclusion, the reported data points the relevance of arginine specific consumption in the presence of ethanol and the transcriptional regulation of some *arc* genes, such as *arcC*, in the production of ethyl carbamate and putrescine precursors. These parameters demonstrated differences between LAB species, as

shown here. Further work would be needed in order to evaluate these, and others contaminant species, in an environment closer to real wine or beer elaboration conditions. The study presented provide new information about barely studied species on this subject, such as *P. pentosaceus*, and parameters, such as *arc* genes transcriptional response, that will support future research in this field.

Acknowledgements

This work was supported by grants AGL-2000-0827-C02-02 and AGL2006-3070ALI from the Spanish Ministerio de Ciencia y Tecnología. I. Araque was the recipient of predoctoral fellowships from the Universidad de Pamplona (Colombia).

References

- Araque I., Gil J., Carreté R., Bordons A., Reguant C., 2009. Detection of *arc* genes related with the ethyl carbamate precursors in wine lactic acid bacteria. *J. Food Agric. Chem.* 57, 1841-1847.
- Arena, M.E., Manca de Nadra, M.C., 2005. Influence of ethanol and low pH on arginine and citrulline metabolism in lactic acid bacteria from wine. *Res. Microbiol.* 156, 858–864.
- Azevedo, Z., Couto, J.A., Hogg, T., 2002. Citrulline as the main precursor of ethyl carbamate in model fortified wines inoculated with *Lactobacillus hilgardii*: a marker of the levels in a spoiled fortified wine. *Lett. Appl. Microbiol.* 34, 32-36.
- Bartowsky, E.J., 2009. Bacterial spoilage of wine and approaches to minimize it. *Lett. in Appl. Microbiol.* 48, 149-156.

- Champomier-Verge`s, M.C., Zuñiga, M., Morel-Deville, F., Pérez-Martínez, G., Zagorec, M., Ehrlich, S.D., 1999. Relationships between arginine degradation, pH and survival in *Lactobacillus sakei*. FEMS Microbiol. Lett. 180, 297–304.
- Chomczynski, P., Sacchi, N., 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal. Biochem. 162, 156–159.
- Gao, Y.C., Zhang, G., Krentz, S., Darius, S., Power, J., Lagarde, G., 2002. Inhibition of spoilage lactic acid bacteria by lysozyme during wine alcoholic fermentation. Aust. J. Grape Wine Res. 8, 76-83.
- Gratzfeld-Huesgen, A. (1998). Sensitive and Reliable Amino Acid Analysis in Protein Hydrolysates using the Agilent 1100 series HPLC. *Technical Note*. Agilent Technologies. Publication number 5968-5658E.
- Linko, M., Haikara, A., Ritala, A., Penttila, M., 1998. Recent advances in the malting and brewing industry. *J. Biotechnol.* 65, 85–98.
- Lonvaud-Funel, A., 1999. Lactic acid bacteria in the quality improvement and depreciation of wine. *Antonie van Leeuwenhoek* 76, 317-331.
- Mangani, S., Guerrini, S., Granchi, L. Vincenzini, M., 2005. Putrescine accumulation in wine: role of *Oenococcus oeni*. *Current Microbiol.* 51, 6–10.
- Marquis, R.E., Bender, G.R., Murray, D.R., Wong, A., 1987. Arginine deiminase system and bacterial adaptation to acid environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 53, 198–200.
- Mira de Orduña, R., Liu, S.-Q., Patchett, M.L., Pilone, G.J., 2000. Kinetics of the arginine metabolism of malolactic wine lactic acid bacteria *Lactobacillus buchneri* CUC-3 and *Oenococcus oeni* Lo111. *J. Appl. Microbiol.* 89, 547-552.

- Olguín, N.T., Bordons, A., Reguant, C., 2009. Influence of ethanol and pH on the gene expression of the citrate pathway in *Oenococcus oeni*. *Food Microbiol.* 26, 193-207.
- Rallu, F., Gruss, A., Maguin, E., 1996. *Lactococcus lactis* and stress. *Antonie van Leeuwenhoek* 70, 243– 251.
- Sakamoto, K., Margolles, A., van Veen, H.W., Konings, W.N., 2001. Hop resistance in the beer spoilage bacterium *Lactobacillus brevis* Is Mediated by the ATP-Binding cassette multidrug transporter HorA *J.Bacteriol.* 183, 5371-5375.
- Simpson, W.J., Fernández, J.L., 1992. Selection of beer-spoilage lactic acid bacteria and induction of their ability to grow in beer. *Lett. Appl. Microbiol.* 14, 13-16.
- Soufleros, E., Barrios, M.-L., Bertrand, A., 1998. Correlation between the content of biogenic amines and other wine compounds. *Am. J. Enol. Vitic.* 49, 266–278.
- Soufleros, E., & Bertrand, A. (1998). Evaluation d'une méthode CLHP adaptée au dosage des acides amines du vin. *Vitis* 37, 43-53.
- Stevens, D.F.; Ough, C.S. Ethyl carbamate formation: reaction of urea and citrulline with ethanol in wine under low to normal temperature conditions. *Amer. J. Enol. Vitic.* 1993, 44, 309-312.
- Tonon, T., Lonvaud-Funel, A., 2000. Metabolism of arginine and its positive effect on growth and revival of *Oenococcus oeni*. *J. Appl. Microbiol.* 89, 526– 531.
- Tonon, T., Bourdineaud, J.P., Lonvaud-Funel, A. 2001. The *arcABC* gene cluster encoding the arginine deiminase pathway of *Oenococcus oeni*, and arginine induction of a CRP-like gene. *Res. Microbiol.* 152, 653-661
- Tonon, T., Lonvaud Funel, A., 2002. Arginine catabolism by wine *Lactobacilli* isolated from wine 2002 *Food. Microbiol.* 19, 451-461.

Vahl M. 1993. A survey of ethyl carbamate in beverages, bread and acidified milks sold in Denmark. Food Add. and Contaminants, 5 (10). 585-592

IV.

DISCUSIÓN GENERAL

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
ESTUDIO BIOQUÍMICO Y MOLECULAR DE LA PRODUCCIÓN DE PRECURSORES DE CARBAMATO DE ETILO POR BACTERIAS LÁCTICA
ASOCIADAS AL PROCESO DE VINIFICACIÓN
ISBN:978-84-693-6429-1/DL:T-1631-2010

DISCUSIÓN GENERAL

El metabolismo de los aminoácidos (aa) durante la fermentación maloláctica (FML) tiene implicaciones tanto en el desarrollo de las características organolépticas del vino como de compuestos tóxicos como el carbamato de etilo y las aminas biógenas. Es preciso e interesante estudiar la ruta de la arginina deiminasa (ADI), tanto a nivel bioquímico como molecular, porque es la ruta de degradación de arginina comúnmente utilizada por las bacterias lácticas (BL) relacionadas con alimentos y bebidas alcohólicas tales como queso, yogurt, cerveza, pan, embutidos, cerveza, sidra y especialmente el vino donde se han reportado trazas de carbamato de etilo (CE) (Vahl, 1993).

La mayoría de las especies estudiadas en este trabajo son potencialmente contaminantes pero no son las que habitualmente llevan a cabo la FML, como *Oenococcus oeni*, por lo que están pobremente caracterizadas. Su frecuencia en vinos no es tan alta pero degradan la arginina alrededor del 100% (capítulo 2 y capítulo 3), por lo cual era importante conocer su papel en la formación de precursores de CE. Se hizo precisa la **identificación** de las cepas a estudiar que fueron aislados de vino. Se han utilizado para *L. plantarum*, los métodos como el ARDRA-16s y PCR específica ya publicados (Rodas y col, 2003; Torriani y col. 2001). En menor proporción fueron identificadas cepas de *L. brevis*, *L. plantarum*, *L. mali* y *P. pentosaceus*, entre otras.

Dado que entre los aislados se obtuvieron muchas cepas de *Oenococcus oeni*, se procedió también a su identificación y tipificación. Para ello, en el transcurso de este trabajo se desarrolló la optimización de una técnica de PCR que permitiese la identificación y tipificación simultánea de cepas *O. oeni* en una sola reacción. Este método se basa en la reacción múltiple de 3 cebadores que permite en una sola reacción obtener un resultado con poca complejidad gracias a un bajo perfil de bandas. La PCR múltiplex reduce el tiempo de análisis y es útil para monitorizar por ejemplo la imposición de una cepa segura no productora de precursores de CE de *O. oeni*, siendo un garante de calidad.

El estudio de la vía de la arginina deiminasa (ADI) en las BL del vino requirió del desarrollo de una serie de métodos bioquímicos y moleculares, teniendo en

cuenta que los trabajos sobre ellas se basaban en su mayoría en una o dos especies, y especialmente en *O. oeni*.

Una de las técnicas bioquímicas fue la modificación del medio de cultivo Thornley (Thornley, 1960) que permite diferenciar las cepas degradadoras de arginina. La incorporación de un indicador de pH proporciona un resultado fiable en pocas horas de incubación. Con él se obtuvieron resultados a nivel cualitativo que fueron fácilmente contrastables con los obtenidos mediante el método colorimétrico cuantitativo de Sakaguchi. Este medio permitió detectar cepas poco degradadoras alargando el tiempo de incubación. El resultado obtenido es solo a nivel cualitativo, pero permite dar un primer paso para descartar cepas potencialmente peligrosas y tiene ventajas como menor manipulación de las muestras, pudiéndose preparar en placas de 96 pozos, lo que permite un análisis de una amplia cantidad de muestras en un solo cultivo. Además, no requiere equipos complejos ni personal especialmente entrenado, lo que hace de este medio un método atractivo para un primer estudio de cepas aisladas en bodegas y o laboratorios con poca infraestructura.

Se hizo un **screening** por el método colorimétrico de Sakaguchi en cepas aisladas de diferentes fuentes (capítulo 2), lo que permitió caracterizarlas en cuanto a su perfil degradador. Se estudió un gran número de especies y de cepas mientras que en trabajos previos se habían revisado pocas cepas y del mismo origen (Ribéreau-Gayon y col., 2000; Kandler, 1986; Schleifer, 1986). Una cantidad importante de cepas degradadoras de arginina con alta actividad pertenecen a las especies de *Lactobacillus hilgardii*, *L. brevis*, *L. buchnerii* y *P. pentosaceus*. Las cepas degradadoras fueron el 100% en las especies de *L. brevis*, *L. hilgardii*, *L. buchnerii* y *P. pentosaceus* mientras que había un 80% en *L. plantarum* y un 50% en *Leuconostoc mesenteroides*. Estas tres últimas especies habían sido tradicionalmente descritas como no degradadoras de arginina.

En una misma especie la degradación de arginina varía de una cepa a otra, como ya se había reportado previamente en *O. oeni* (Pilone y col, 1991), y no se ha encontrado relación de la capacidad de mayor o menor degradación de arginina con la velocidad de crecimiento ni la biomasa en el momento del análisis. Las diferencias entre aislados, según su origen, podrían ser debidas a diferencias en la regulación de la vía ADI y por lo tanto de su actividad enzimática.

La **actividad enzimática** de cada una de las enzimas que conforman la vía ADI fue evaluada en algunas cepas pertenecientes a las especies de interés por su alta degradación de la arginina. Se encontraron diferencias para una misma enzima en cepas de la misma especie. La enzima OTC resulta ser más activa que ADI y CK en todos los casos. Los resultados coinciden con trabajos previos de Liu y col, 1995; 1996; Tonon y col, 2002. En cepas de *P. pentosaceus*, que tienen altos porcentajes de degradación de arginina, entre el 81 y el 99%, las actividades de las tres enzimas son relativamente bajas al compararlas con el resto de especies evaluadas. Estas diferencias se hicieron evidentes en los posteriores estudios en resting cells (capítulo 4) y a nivel de expresión (capítulo 5).

Se **detectaron los genes** de la ruta ADI en las cepas en estudio (capítulo 3) mediante una técnica por PCR desarrollada en este trabajo. Se diseñaron cebadores degenerados a partir del alineamiento de las secuencias de los genes de la vía ADI descritos en ese momento en el GenBank pertenecientes a *L. hilgardii*, *O. oeni*, *Lactococcus lactis*, y *L. sakei*. Los cebadores se probaron en una cantidad considerable de cepas de diferentes especies, obteniéndose la detección de los genes pertenecientes a la ruta ADI (*arcA*, *arcB*, *arcC*) en todos los casos con un 100% de correlación entre la presencia de gen y la actividad degradadora de la arginina. Como previamente ha sido descrito también para *O. oeni* (Tonon y col, 2001), la correlación entre presencia de genes y la degradación de la arginina es positiva aunque ésta sea en un porcentaje bajo.

La detección de estos genes aporta datos a nivel del genoma pero no de su metabolismo puesto que hay cepas donde la actividad de las enzimas codificadas es menor o la excreción de citrulina al someterse a una condición determinada es mayor, por lo cual la evaluación de la peligrosidad de una cepa portadora requiere un estudio complementario de actividades enzimáticas (capítulo 2) o de expresión génica (capítulo 5). Las diferencias entre la expresión y la actividad de una misma enzima en cepas de la misma especie fueron evidentes.

En cepas de *L. plantarum* los cebadores para la detección de los genes de la OTC catabólica son capaces de reconocer parte de la secuencia de la OTC anabólica siendo normal debido a que estos dos genes tienen un origen común y a lo largo de la evolución seguramente se especializaron para ir en una dirección o en otra (Zúñiga y col., 2002). En *Leuconostoc mesenteroides* la vía ADI no está codificada en un operón, hecho que se constató al encontrar un gen *ribD* (5-

amino-6-(5-phosphoribosylamino) uracil-reductasa junto al *arcA*. Los genes presentes en esta especie tienen una frecuencia irregular en cada cepa, pudiendo estar el gen para la enzima ADI (*arcA*) o el gen para la OTC (*arcB*). No se ha encontrado en estas cepas de *L. mesenteroides* ni en las descritas en el GenBank el gen para la CK (*arcC*). Esto podría ser explicado por el hecho de que las BL han evolucionando con una pérdida progresiva de genes innecesarios debido a la adaptación a un específico hábitat. Con la evolución del genoma hacia la acumulación de DNA degenerado (Bringel y col, 2003), las BL han adquirido y/o conservado la habilidad de usar un amplio espectro de sustratos energéticos (Tonon y col, 2002). La peligrosidad de estas cepas radica en aquellas que solo presentan el gen *arcA* (capítulo 3) ya que al no poseer el gen *arcB*, la citrulina producida es excretada al medio sin reutilizar, hecho que se constató en los análisis posteriores por HPLC.

Esta disposición en el ensamblaje de los genes de la vía ADI en las BL hace pensar que su empaquetamiento en operón es un mecanismo adaptativo a las condiciones ambientales en que estas especies se desarrollan, ya que una vía completa y funcional indica menor acidez circundante al generar amonio y una recompensa energética (un mol de ATP por cada mol de arginina consumida).

Se estudió con células en reposo metabólico (**Resting Cells**) el efecto de etanol, glucosa, pH, y la presencia de ácido málico en la cinética de la degradación de la arginina y excreción de citrulina, ornitina y amonio. La técnica de *resting cells* permite hacer análisis sobre soluciones acuosas definidas, evitando las interferencias que pueden ocasionar los medios complejos. Las especies elegidas por su alto porcentaje de degradación de la arginina fueron *L.hilgardii*, *L. brevis*, *L. buchnerii* y *P. pentosaceus*. Estas 4 especies están involucradas en los procesos fermentativos del vino y de la cerveza, deteriorando su aspecto y calidad organoléptica.

Según los resultados obtenidos, las especies involucradas en la producción de precursores de CE en mayor cantidad son *L. brevis* y *P. pentosaceus* ya que excretan una gran cantidad de citrulina al medio que en estas cepas no es reutilizada. *L. buchnerii* y *L.hilgardii* en todas las condiciones evaluadas mantienen un buen porcentaje de degradación y de reutilización de la citrulina por lo que se denota una vía lo suficientemente activa bajo condiciones de estrés, resultados que concuerdan con trabajos anteriores como los de Mira de Orduña y

col, 2000b; Arenas y col., 2002. De acuerdo al análisis de multivariantes por componentes principales (CP) realizado por SPSS (vs. 15) se pudo definir un grupo de variables formadas por la combinación de las condiciones estudiadas, sintetizando datos y relacionando entre sí sin tener que explicar el efecto de cada factor inicial con lo cual se identificaron los factores que podían ser considerados más importantes con respecto a la posible generación del CE. Éstos fueron la presencia de etanol en concentraciones altas, seguido de la glucosa y un pH 3.

El análisis de ANOVA en cada una de las cepas, indica que hay diferencias significativas en condiciones como una alta cantidad de etanol, un ambiente extremadamente ácido (pH >3,0) o la presencia de glucosa y ácido málico. El comportamiento de cada especie es distinto teniendo un comportamiento similar aquellas cepas provenientes de vino, por lo que los mecanismos de regulación de la vía serían similares.

El pH final obtenido se define por la producción final de amonio, por lo que pH altos (>pH 3,6) seguido de la presencia de bajas concentraciones de glucosa favorecen la degradación. El ácido málico se encontró como un potente inhibidor de la degradación de la arginina, incluso a concentraciones de 0,5 g/l.

La citrulina es fácilmente excretada al medio y difícilmente reutilizable bajo la mayoría de las condiciones estudiadas en todas las cepas. A pHs bajos se lograron cuantificar niveles del rango de 40 mM de citrulina, mientras que con el etanol al 5 y 10% las ratios cuantificadas de citrulina respecto a arginina consumida se encuentran entre el 10 al 50%, que estarían de acuerdo con los trabajos de Tonon y col., 2002 y Romero y col., 2009 que reportan una relación del 30 al 40%. En *O. oeni*, el ratio de la citrulina reportada es sólo del 5% en muestras analizadas de *resting cells* o en vinos (Mira de Orduña y col., 2000; Terrade y col., 2006). La no reutilización de la citrulina, aparte de su preocupante papel como precursora de CE, también estaría involucrada a nivel celular ya que entonces no se genera ATP ni amonio para la regulación del pH interno, por lo que el porcentaje de supervivencia de células sensibles es bastante menor que otras con una vía ADI activa como *L. hilgardii*. (Arenas y col., 2002).

La actividad basal de la vía fue detectada en todas las condiciones empleadas, ya que la degradación se vió reducida pero no inhibida. La inducción de la síntesis de las enzimas de la vía ADI es bastante rápida en presencia de arginina pese al hecho de no ser constitutivas (Liu y col, 1996). Esto se explica

porque las cepas utilizadas habían sido previamente cultivadas en un medio complejo (MRSm), en presencia de una concentración alta de arginina, lo que permite tener ya activada la vía.

También podría estar involucrado el intercambiador de membrana arginina-citrulina o ornitina-citrulina, impidiendo su reutilización. Debido a que la conversión de citrulina a ornitina es un paso energéticamente desfavorable, la citrulina se almacena intracelularmente en espera de mejores condiciones para reutilizarla, lo que conlleva el peligro de que pueda ser excretada al medio posteriormente aumentando su concentración en él.

La influencia de la presencia de glucosa en la degradación de arginina fue estudiada en el capítulo 2. La cinética de degradación de la arginina mediante células en reposo metabólico permitió calcular la velocidad de degradación, obteniéndose que en algunos casos era mayor, en otra menor y en otra no había ningún efecto sobre el perfil de degradación. Este estudio sirvió de base para el estudio que se presenta en el capítulo 4, esta vez probando diferentes concentraciones de glucosa, resultando que a mayor cantidad de azúcar había menos degradación de la arginina y por lo tanto del resto de metabolitos producidos en la vía ADI. A menor concentración de la glucosa su degradación era rápida lo que activaba la vía ADI y esto se ve en la rápida reutilización de la citrulina.

En células activas en medio rico (MRS) la glucosa junto a la arginina proporciona un rápido crecimiento. Se logra mantener las células viables en fase estacionaria ya que la energía obtenida de la arginina después del agotamiento de la glucosa incrementa la tasa metabólica sobre la energía obtenida de cada una de las fuentes por separado. La toma de la arginina generalmente depende de la presencia de un azúcar fermentable para activar la vía (Manca de Nadra y col, 1986; Liu y col, 1995; Tonon y col, 2002). En la mayoría de las cepas evaluadas la presencia de la glucosa incide en un consumo parcial de la arginina, excepto en *Lc. mesenteroides* L17.

Las principales condiciones que afectaron la vía ADI fueron el etanol y el pH por lo que se consideraron relevantes para estudiar su influencia en la **expresión** relativa de los genes *arc* (*arcA*, *arcB*, *arcC*) (capítulo 5). Los resultados fueron cuantificados mediante el método de comparación del ciclo umbral de una muestra control frente a la muestra problema ($2^{(-\Delta\Delta Ct)}$). Las cepas estudiadas

fueron *L. brevis* 3824 y *P. pentosaceus* 4214, aisladas de vino y que en los estudios anteriores degradaban una alta cantidad de arginina.

Prácticamente en todas las condiciones se puede encontrar una expresión basal de los genes de la vía ADI y ésta se vió aumentada en presencia de arginina en el medio. La expresión de la vía ADI esta involucrada en los mecanismos de respuesta al estrés y más cuando la viabilidad celular puede estar comprometida. El consumo específico de la arginina se vió estimulado bajo las mismas condiciones. La regulación de la vía en las dos cepas estudiadas *L. brevis* 3824 y *P. pentosaceus* 4214, ambas aisladas de vino, es diferente.

Al observar los efectos conjuntos de las condiciones más extremas de pH y etanol probadas sobre la velocidad de degradación, ésta se ve disminuida y ello se refleja en la expresión de los genes que sigue siendo basal pero no se inhibe del todo. El gen más inhibido es el de la *arcC*. El *arcA* siempre sigue siendo transcrito y en algunos casos logra su recuperación después de las 24 horas de la adición de arginina. La vía está menos inhibida en todos los casos en *P. pentosaceus*, coincidiendo con la tolerancia al etanol que tiene esta especie.

El pH influye sobre la degradación de la arginina y la consiguiente activación de la vía. Estudios anteriores de Mira de Orduña y col, 2001 habían demostrado como en *O. oeni*, diferentes valores de pH eran capaces de inhibir la degradación de la arginina, y esto a nivel molecular supone una represión del gen parcial o completa. Ya en el capítulo 3 se veía que a mayores pH la degradación de la arginina era mayor y que la vía era completamente activa con la obtención de amonio y la consecuente subida de pH. A pH bajo, la actividad específica de cada una de las enzimas se mantiene a niveles bajos pero en el mismo rango como se había visto en condiciones estándar, es decir que la OTC de *L. brevis* 3824 tiene una actividad enzimática del 71,5% superior a la misma enzima en *P. pentosaceus* 4214, (capítulo 2). Aunque como se vio el pH no juega un papel relevante en la degradación de la arginina ni en la viabilidad celular.

El etanol influye en la degradación de la arginina disminuyendo a medida que el porcentaje de etanol era mayor, como ya se había visto en el trabajo de Arena y col., al 2005. La exposición de las células al etanol generalmente resulta en un aumento de permeabilidad y la concomitancia de la pérdida del material intracelular (Da Silveira, 2003). La citrulina generada por lo tanto es excretada al medio y pobremente reutilizada. Al ser un agente estresante activa la vía ADI, con

lo cual la arginina se consume para generar ATP para sobrevivir, como se ha revisado en el trabajo de Bourdineaud (2006) donde el gen regulador de la vía es coexpresado con genes comunes en situaciones de estrés.

La evaluación de la potencial producción y acumulación extracelular de citrulina y ornitina de estas dos cepas (*L. brevis* 3824 y *P. pentosaceus* 4214) fueron analizadas, encontrándose que la velocidad de degradación estaba disminuida. En condiciones estándar ya se habían encontrado diferencias en las actividades enzimáticas de estas dos mismas cepas especialmente en la actividad enzimática de la enzima OTC. La excreción de citrulina está más relacionada con condiciones altamente estresantes como pH 3,6 y alcohol 10%. La ornitina está inversamente relacionada con la presencia de citrulina en el medio, lo cual fue visible con las condiciones menos estresantes. La acumulación en el medio de la ornitina se vio relacionada con porcentajes altos de etanol que interfiere en todo el metabolismo general de la célula siendo más visible en *L. brevis*. La producción de ornitina a partir de la degradación de la arginina por parte de las BL podría verse implicado como precursor de la putrescina, a través de la ornitina transcarbamilasa como se ha visto en *O. oeni* (Mangani, 2005) y en otras BL (Pereira, 2009). La putrescina es una amina biogena que está involucrada en daños a nivel organoléptico y potencia los efectos negativos de otras aminas como la histamina. (Arena y col, 2001; Guerrini y col., 2002; Marcobal y col, 2004; Landete 2005).

La presencia de más de 0,5 g/l de ácido málico impide la degradación de la arginina, confirmando que la degradación de la arginina sucede después de la FML y una vez agotadas el resto de fuentes energéticas (Mira de Orduña y col, 2001; Terrade y col, 2006). La descarboxilación de aminoácidos tiene como objetivo la obtención de energía y regular el pH interno de la célula (Molenaar y col., 1993), mejorando la tolerancia a la acidez lo que a la célula le da una ventaja metabólica bajo condiciones de estrés ácido. Esto conlleva a su vez el riesgo de proliferación de microorganismos indeseables como *Lactobacillus* y *Pediococcus* (Wibowo y col., 1985) que están relacionados con la presencia de alto contenido de carbamato de etilo o aminas biógenas en vinos (Landete y col, 2005).

La actividad ADI por las BL en vinos es considerada indeseable, debido a la potencial formación de carbamato de etilo. Como ya sugirieron Terrade y Mira de Orduña (2006), la realización de la FML controlada evitaría la aparición de

citrulina desde la arginina realizando una inhibición del metabolismo celular después de la FML. Cabe recordar que 20 mg/l de citrulina pueden reaccionar y generar una media de de 30 µg/l de CE después de 3 años de almacenamiento a 15°C y a esta temperatura la citrulina iguala el potencial de formación de CE por la urea (Mira de Orduña, 2001)..

La puesta en marcha de pautas de control y elaboración de los vinos han permitido reducir los niveles de CE en vinos en los últimos 10 años (Codex Alimentarius, 2008). Dichos controles han estado focalizados en su finalización y sus cuidados postfermentativos dado que el potencial tóxico del vino depende de los compuestos que contiene y del grado de toxicidad de éstos, así como del grado de biodisponibilidad y la interacción sobre tejidos diana.

Como en toda investigación, este trabajo abre nuevas posibilidades en este campo. Entre otras **perspectivas**, la más inmediata es aplicar los cebadores degenerados aquí diseñados para averiguar la presencia de los genes *arc* en diversas especies de BL oportunistas y contaminantes en vinos, cervezas y otros alimentos.

Desde un punto de vista de conocimiento más básico, es preciso ampliar el estudio de la estructura del operón *arc* en las diversas especies de BL, sobretodo en lo relativo al gen del transportador de arginina.

El estudio de expresión de los genes *arc* iniciado en las especies *L. brevis* y *P. pentosaceus* se deberá ampliar en función de otras variables y condiciones del vino, como SO₂, compuestos fenólicos, etc. También es preciso trabajar para ver la expresión de estos genes en condiciones reales del mismo vino. Ello conllevará una puesta a punto del análisis de RNA en el vino.

En esta línea, también es preciso profundizar en el conocimiento de la expresión de los genes *arc* en cepas de otras especies, y sobretodo en *O. oeni*, vista la presencia de los genes en todas las cepas estudiadas de esta especie y la variabilidad de degradación de arginina en ellas. Los estudios de degradación de arginina y de la aparición de los precursores de CE en esta especie son necesarios además para tener un criterio adicional en la selección de cepas estándar para la FML, con una mayor seguridad alimentaria.

BIBLIOGRAFÍA

- Arena M.E., Manca de Nadra MC. **2001**. Biogenic amine production by *Lactobacillus*. J. Applied Microbiol. vol. 90 p.158-162
- Arena M.E., Manca de Nadra M.C., Muñoz R. **2002**. The arginine deiminase pathway in the wine lactic acid bacterium *Lactobacillus hilgardii* X1B: structural and functional study of the arcABC genes. Gene, 301. 1-2. 61-66
- Arena M.E., Manca de Nadra M.C. **2005**. Influence of ethanol and low pH on arginine and citrulline metabolism in lactic acid bacteria from wine. Research in Microbiol. 156 (8). 858-864.
- Bourdineaud J.P. **2006**. Both arginine and fructose stimulate pH-independent resistance in the wine bacteria *Oenococcus oeni*. Int. J. Food Microbiol. 107. 274 - 280.
- Bringel F., Hubert J.C. **2003**. Extent of genetic lesion of the arginine and pyrimidine biosynthetic pathway in *Lactobacillus plantarum*, *L. paraplantarum*, *L. pentosus*, and *L. casei*: prevalence of CO₂-dependent auxotrophs and characterization of deficient *arg* genes in *L. plantarum*. App. Environ. Microb. 69(5). 2674 – 2683.
- Codex Alimentarius **2008**. Informe de la segunda reunión del Codex sobre contaminantes de alimentos. La Haya, Países Bajos, (ALINORM 08/31/41. párrafo 190-191). www.codexalimentarius.net
- Da Silveira M.G., Golovina E.A., Hoekstra F.A., Rombouts F.M., Abee. T. **2003**. Membrane fluidity adjustments in ethanol-stressed *Oenococcus oeni* cells. Appl. Environ. Microbiol. 69, 5826-5832.
- Guerrini S. Mangani S., Grnachi L., Vincenzini M. **2002**. Biogenic amine production by *Oenococcus oeni*. Current Microbiol. 44, 5, 374-378.
- Kandler O., Weiss N. **1986** Genus *Lactobacillus* in: P.H.A. Sneath. N.S. Mair. M.E. Sharpe and J.G. Holt (editor). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. 2. Williams and Wilkins. Baltimore MD. pp. 1209 -1234.
- Labedan B., Boyen A., Baetens M., Charlier D., Chen P., Cunin R, Durbeco V., Glansdorff N., Herve G., Legrain C., Liang Z., Purcarea C., Roovers M., Sanchez R., Toong T., Van de Castele M., Van Vliet F., Xu Y., Zhang Y.

- 1999** The Evolutionary History of Carbamoyltransferases: A Complex Set of Paralogous Genes Was Already Present in the Last Universal Common Ancestor. *J Mol Evol*49:461–473
- Landete J. M., Ferrer S. Polo L. Pardo I. **2005**. Biogenic amines in wines from three spanish regions. *J. Agric. Food Chem.* 53, 1119-1124.
 - Landete Irazo, J.M. **2005**. Estudio y Caracterización molecular de la producción de aminas biógenas por parte de bacterias lácticas de origen enologico. Tesis Doctoral. Valencia, España
 - Liu S.-Q., Pritchard G.G., Hardman M.J., Pilone G.J.**1995**. Occurrence of arginine deiminase pathway enzymes in arginine catabolism in wine lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 61 (1). 310-316.
 - Liu S.Q., Pritchard G.G., Hardman M.J. Pilone G.J.**1996**. Arginine catabolism in wine lactic acid bacteria: is it via arginina deiminase pathway or the arginina –urease pathway?. *J. of Applied Microbiol.* 81, 486-492.
 - Manca de Nadra M. C., Nadra C. A., Ruiz Holgado A. P., Oliver G.**1986**. Synthesis of the arginine dihydrolase pathway enzymes in *Lactobacillus buchnerii*. *Current Microbiol.* 13 (5). 261-264.
 - Mangani, S.; Guerrini, S.; Granchi, L.; Vincenzini, M. Putrescine accumulation in wine: Role of *Oenococcus oeni*. *Current Microbiol.* **2005**, 51, 6-10.
 - Marcobal, A., Rivas, B. de las, Moreno-Arribas, M. V., Muñoz, R.(2004). Identification of the ornithine decarboxylase gene in the putrescine-producer *Oenococcus oeni* BIFI-83. *FEMS Microbiology Letters*, 239, 2 213-220
 - Mira De Orduña, R., Liu, S.Q., Patchett, M.L., Pilone, G.J. **2000a**. Ethyl carbamate precursor citrulline formation from arginine degradation by malolactic wine lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 183, 31-35.
 - Mira de Orduña R. Liu S.Q., Patchett M.L., Pilone G.J. **2000b**. Kinetics of the arginine metabolism of malolactic wine lactic acid bacteria *Lactobacillus buchnerii* CUC-3 and *Oenococcus oeni* Lo111. *J. App. Microbiol.* 89. 547 – 552.
 - Mira de Orduña R., Patchett M.L., Liu S.Q., Pilone G.J. **2001**. Growth and arginine metabolism of the wine lactic acid bacteria *Lactobacillus buchnerii*

and *Oenococcus oeni* at different pH values and arginine concentrations. *App. And Enviromental Microbiol* 67, 4. 1657 -1662

- Molenaar D., Bosscher J. S., Ten Brink B, Driessen J.M., Konings W.N. **1993**. Generation of a proton motive force by histidine descarboxylation and electrogenic histidine/histamine antiport in *Lactobacillus buchneri*. *J. Bacteriol.* 175, 2864 – 2870
- Pereira C.I., San Romão M.V., Lolkema J.S., Barreto Crespo M.T. **2009**. *Weissella halotolerans* W22 combines arginine deiminase and ornithine decarboxylation pathways and converts arginine to putrescine. *Journal of Applied Microbiology* 107 .1894–1902
- Pilone G. J., Miranda G.C., Van Duivenboden J. **1991**. Characterization of wine lactic acid bacteria: Single broth cultura for tests of heterofermentation, manitol from fructose, and ammonia from arginine. *Am. J. Enol. Vitic.* 42(2). 153-157.
- Ribéreau-Gayon P., Dubordieu D., Donèche B., Lonvaud A. **2000a**. *Handbook of Enology Vol. 1: The microbiology of wine and vinifications*, John Wiley & Sons Ltd.
- Rodas A.M., Ferrer S., Pardo I. **2003**. 16S- ARDRA, a tool for identification of lactic acid bacteria isolated from grape must and wine. *Systematic and Applied Microbiology.* 26: 412 - 422
- Romero S.V., Reguant C., Bordons, A., Masqué M. C. **2009**. Potential formation of ethyl carbamate in simulated wine inoculated with *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus plantarum*. *Int. Journal of Food Science and Tech.* 44 (6): 1206 – 1213.
- Schleifer K.H. **1986**. 2da ed. Family I. Micrococcaceae. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.* Vol 2. Baltimore, USA. Williams and Wilkins. 1104 – 1139.
- Terrade N., Mira de Orduña R. **2006** Impact of winemaking practices on arginine and citrulline metabolism during and after malolactic fermentation *Journal of Applied Microbiology* 101 (2) , 406–411
- Thornley M.J. **1960**. The differentiation of *Pseudomonas* from other gram-negative bacteria on the basis of arginina metabolism. *J. Appl. Bacteriol.* 23. 27 – 52.

- Tonon T., Bourdineaud J. P., Lonvaud-Funel A. **2001**. The *arcABC* cluster encoding the arginine deiminase pathway of *Oenococcus oeni*, and arginine induction of a CRP-like gene. *Res. Microbiol.* 152, 653–661.
- Tonon, T.; Lonvaud-Funel, A. **2002**. Arginine metabolism by wine *Lactobacilli* isolated from wine. *Food Microbiol.*, 19, 451-461
- Torriani S., Felis G.E., Dellaglio F. **2001**. Differentiation of *Lactobacillus plantarum*, *L. pentosus*, and *L. paraplantarum* by *recA* gene sequence analysis and Multiplex PCR assay with *recA* gene-derived primers. *Applied and Environmental Microbiology.* 67 (8):3450 – 3454.
- Vahl M. **1993**. A survey of ethyl carbamate in beverages, bread and acidified milks sold in Denmark. *Food Add. and Contaminants*, 5 (10). 585-592
- Wibowo, D.; Eschenbruch, R.; Davis, C. R.; Fleet, G.H.; Lee, T.H. **1985**. Occurrence and growth of lactic acid bacteria in wine: a Reviews. *Amer. J. Enol. Vitic.*, 36, 302-313
- Zúñiga M., Pérez G., González-candelas F. **2002**. Evolution of arginine deiminase (ADI) pathway genes. *Mol. Phyl. and Evol.* 25, 3: 429-444.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
ESTUDIO BIOQUÍMICO Y MOLECULAR DE LA PRODUCCIÓN DE PRECURSORES DE CARBAMATO DE ETILO POR BACTERIAS LÁCTICA
ASOCIADAS AL PROCESO DE VINIFICACIÓN
ISBN:978-84-693-6429-1/DL:T-1631-2010

V.

CONCLUSIONES

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
ESTUDIO BIOQUÍMICO Y MOLECULAR DE LA PRODUCCIÓN DE PRECURSORES DE CARBAMATO DE ETILO POR BACTERIAS LÁCTICA
ASOCIADAS AL PROCESO DE VINIFICACIÓN
ISBN:978-84-693-6429-1/DL:T-1631-2010

CONCLUSIONES

1. La identificación de aislados de vinos de fermentación espontánea ha permitido encontrar especies de bacterias lácticas como *Pediococcus pentosaceus* y *Leuconostoc mesenteroides*, que son capaces de degradar arginina, lo cual no era conocido hasta ahora.
2. Se ha puesto a punto un método de PCR mutiplex para la simultánea identificación de especie y tipificación de cepas de *Oenococcus oeni*, principal responsable de la fermentación maloláctica.
3. Se ha estudiado la capacidad degradadora de arginina de 109 cepas de bacterias lácticas de diversos orígenes, comprobándose la diversidad de degradación entre cepas dentro de cada una de las especies probadas.
4. Se ha puesto a punto un medio de cultivo semilíquido para la detección rápida de la degradación de la arginina por el cambio de color debido al aumento de pH por el amonio producido.
5. En situación de células en reposo metabólico, en condiciones similares a las del vino, algunas de las cepas son más susceptibles de generar precursores de carbamato de etilo al ralentizarse la degradación de arginina en presencia de etanol, glucosa, y bajos pH.
6. La excreción de citrulina y su reutilización están condicionados al medio, por lo que los factores estresantes son desfavorables.
7. La presencia de solamente 0,5 g/l de ácido L-malico inhibe la degradación de la arginina, con lo que se demuestra que ésta es posterior a la fermentación maloláctica.
8. Se ha estudiado la actividad específica de las enzimas de la ruta arginina-deiminasa en las cepas que degradaban arginina, resultando una diferencia marcada en la misma enzima entre especies y entre cepas, especialmente en la ornitina-transcarbamilasa.
9. Se ha puesto a punto un método de detección de los genes *arc* de la ruta arginina-deiminasa con cebadores degenerados basados en la secuencia de bacterias lácticas conocidas, y se ha comprobado su eficacia mediante secuenciación de los amplificadores.

Conclusiones

10. Se ha verificado la homología de las secuencias de los amplificados mediante la comparación contra secuencias ya descritas, y las secuencias obtenidas se han incorporado al GenBank.
11. Se ha estudiado la expresión de los genes *arc* mediante RT-qPCR de *Lactobacillus brevis* y *Pediococcus pentosaceus* aislados de vino en condiciones de etanol y pH similares a las de vino y cerveza.
12. La expresión de los genes *arc* de *L. brevis* 3824 es inhibida por la presencia de etanol en mayor grado que los de *P. pentosaceus* 4214. En esta cepa se ha observado una recuperación de la expresión tras una larga exposición al etanol.
13. Algunas de las condiciones estudiadas no son exclusivas del vino, por lo que se ha demostrado que en otros alimentos fermentados por bacterias lácticas se podrían generar precursores de carbamato de etilo.

VI.

ANEXOS

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
ESTUDIO BIOQUÍMICO Y MOLECULAR DE LA PRODUCCIÓN DE PRECURSORES DE CARBAMATO DE ETILO POR BACTERIAS LÁCTICA
ASOCIADAS AL PROCESO DE VINIFICACIÓN
ISBN:978-84-693-6429-1/DL:T-1631-2010

INDICE DE ANEXOS

1. Medios de cultivo
 - 1.1. MRSmf (MRS malico-fructosa)
 - 1.2. MRS Modificado (MRSm)
 - 1.3. MRSmf-Nys
 - 1.4. Medio Thornley
 - 1.5. Medio TJAG
2. Aislamiento de cepas desde vinos
3. Determinación del crecimiento
4. Determinación cuantitativa de la capacidad de hidrolizar arginina. Método Sakaguchi
5. Cinética de degradación de la arginina por medio de células en reposo metabólico (Resting Cells)
 - 5.1. Obtención de células no proliferantes
 - 5.2. Método de Staron Allard
6. Medida de la actividad de las enzimas de la ruta ADI
 - 6.1. Técnica
 - 6.2. Obtención de extractos celulares
 - 6.3. Análisis de proteína
 - 6.4. Recolección de muestras
 - 6.5. Cuantificación de citrulina. Método colorimétrico de Archibald
 - 6.6. Medida de la actividad lactato deshidrogenasa (LDH)
7. Determinación de aminoácidos por HPLC
 - 7.1. Objetivo
 - 7.2. Materiales, reactivos y equipos
 - 7.3. Técnica
 - 7.3.1. Preparación de patrones
 - 7.3.2. Preparación de solventes o fases móviles
 - 7.3.3. Preparación de la muestra
 - 7.3.4. Método
 - 7.3.5. Análisis de datos
8. Detección de genes de la ruta ADI. PCR degenerada
 - 8.1. Diseño de los cebadores degenerados
 - 8.2. Alineamientos utilizados
 - 8.3. Definición de las condiciones de PCR
 - 8.4. Programa de amplificación
 - 8.5. Secuencias
9. Extracción de DNA adaptado para bacterias lácticas
 - 9.1. Soluciones
 - 9.2. Lisis
 - 9.3. Eliminación de proteínas
 - 9.4. Precipitación del DNA
10. Extracción de RNA
 - 10.1. Reactivos
 - 10.2. Lisis
 - 10.3. Desnaturalización de proteínas
 - 10.4. Precipitación del RNA

- 10.5. Cuantificación del RNA total
- 10.6. Gel de RNA
- 10.7. RT-PCR (cADN)
- 10.8. PCRQ
 - 10.8.1. Equipo
 - 10.8.2. Diseño de primers
 - 10.8.3. Diseño de placa de muestras
 - 10.8.4. Condiciones de termociclación
 - 10.8.5. Reactivos
 - 10.8.6. Recta patrón (estándar)

1. Medios de cultivo

1.1 MRS-Malico Fructosa (MRSmf) (Reguant C, 2001, Carretè R, 2002):

Es el medio de elección para el trabajo con bacterias lácticas, es un medio rico en nutrientes y formulado para favorecer las bacterias lácticas. Es un medio que usado en sólido o líquido se utiliza para el mantenimiento, siembra, inoculación y recuento de viables de las diferentes cepas. *Es el medio de uso general en prácticamente todo el desarrollo de esta tesis.* MRSmf presenta la misma composición que el medio MRS (descrito por De Man y col, 1960) y al cual se le ha añadido fructosa y ácido D/L-málico:

MRS		55 g/l	DIFCO®
<i>Bactopepetona</i>	10g/l		
<i>Extracto de carne</i>	10g/l		
<i>Extracto de levadura</i>	5 g/l		
<i>Glucosa</i>	20 g/l		
<i>Tween 80</i>	1 g/L		
<i>Citrato de amonio</i>	2 g/l		
<i>Acetato de sodio</i>	5 g/l		
<i>MgSO₄.7H₂O</i>	0,1 g/l		
<i>MnSO₄.H₂O</i>	0,05 g/l		
<i>K₂HPO₄</i>	2 g/l		
Ácido D, L- málico		4 g/l	
Fructosa		5 g/l	
Agar		20 g/l (opcional)	
PH		5 (Ajustado con NaOH 10N).	

Autoclavar 121°C por 10min

1.2 MRS modificado (MRSm) (Tonon y col., 2001):

Es parecido al medio MRS anteriormente descrito, es mas básico que el medio anterior pero igualmente rico en nutrientes, además se le ha añadido la arginina y glucosa en concentración a 5 g/l y a pH de 4,5. Esto permite activar la vía de degradación de la arginina. Este medio se uso para todos los apartados del presente trabajo, por el buen desarrollo que tenían las cepas bajo estudio.

Extracto de levadura	4 g/l
Extracto de carne	8 g/l
Bactopeptona	10 g/l
.KH ₂ PO ₄	2g/l
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2g/l
MnSO ₄ .H ₂ O	0,1g/l
Tween 80	1 ml
Arginina	5 g/l
Glucosa	5 g/l
PH	4,5 (ajustado con HCl 1 N)

La arginina y glucosa, se añaden después de autoclavar, disolviendo la concentración en agua estéril y pro filtración se incorpora al medio, así se trabaja concentración de arginina deseada y se evita la caramelización de la glucosa.

1.3 MRSmf – nys: (Carreté, 2002)

Sólido para aislamiento de cepas desde fuentes naturales como el vino.

Empleando como medio base MRSmf sólido se añade:

- Nystatina, en una concentración de 100 mg/l, actúa como antifungico para evitar el crecimiento de levaduras; se agrega al medio estéril antes de ser repartido en placas. Se disuelve en agua esteril caliente que ayuda a su completa disolución.
- Ázida sódica, en una concentración efectiva de 25 mg/L evita el desarrollo de las bacterias acéticas. Se prepara una solución stock de 1 g/100 ml, Se disuelve en agua destilada estéril y se adiciona 50 ul al momento que se coloca el inculo en el medio.
- El ácido D/L málico se coloca en una concentración de 6 g/L, para favorecer el aislamiento desde el vino.

1.4 Medio Thornley:

Este medio, esta basado en el medio para la determinación de la degradacion de arginina para *Pseudomonas sp* (Thornley, 1960). Los ingredientes son de Sigma. EL pH fue ajustado a pH 5 con HCl, 0,1 M. Es un medio semisólido, se distribuye en tubos de cultivo de 16 x150 mm después de ser esterilizado a 121°C/15 min. Lleva un indicador de pH que es el rojo de fenol, el cual al aumento del pH cambia de amarillo a lila. Se desarrollan muy bien todas las bacterias lácticas, que en otros medios diseñados para tal fin, crecían pobremente como el caso de *O. oeni*.

Peptona	1g/l
Cloruro de sodio	5g/L
K ₂ HPO ₄	0,3 g/L
Rojo de fenol	0,01 g/L
L-Arginina-HCl	10g /L
Agar	3g/L
pH	5

1.5 Medio TJAG (Tonon et al., 1995):

Este medio se utilizo en la primera fase de estudio de la cinética de degradación de la arginina, es un medio complejo, rico en nutrientes.

Triptona	5 g/l
Peptona	5g/l
Extracto de levadura	5 g/l
Tween 80	1 ml/l
MgSO4.7H2O	0,2 g/l
MnSO4.4H2O	0,05 g/l
Zumo de tomate filtrado	200 ml
Arginina	5 g/l
Glucosa	2 g/l
PH	5 (ajustado con NaOH 10N)

2. Aislamiento de cepas desde vinos

Placas de medio MRSmf – nys crecidas de los vinos, con un número de colonias entre 30-300 una vez contadas, se aislaban 30 al azar por cada muestra de vino procesado y se incuban en 1 ml de MRSmf líquido. Los cultivos se analizan mediante su morfología, tincion de gram o de KOH 3% y la prueba de catalasa, (Gerhardt, 1984), de forma que las colonias catalasa negativa y grampositivas eran consideras como bacterias lácticas. Una vez crecidas, eran reinoculadas en 5 ml del mismo medio para obtener suficiente biomasa celular para la extracción del DNA total, para realizar la identificación molecular, que se trata en el capitulo 1 de esta tesis

3. Determinación del Crecimiento

Se realizo un control con 2 microorganismos al azar para determinar por la absorbancia a 600 nm, (espectrofotómetro Hitachi U-2000) el punto de recogida optimo de muestras, siendo final de exponencial, inicio de estacionaria, donde hay máxima activación de la ruta y se determino que entre las 36 horas a 48 horas de crecimiento, el cultivo empezaba su declive a fase estacionaria.

4. Determinación cuantitativa de la capacidad de hidrolizar Arginina. Método de Sakaguchi

La capacidad de degradación de la arginina se estudio a través de una técnica colorimétrica, denominada reacción de sakaguchi, descrita por Gilboe y Williams, 1956. Es una reacción colorimétrica basado en la hidrólisis de la argina con la 8-hidroxyquinolina y la unión a los grupo amino de la arginina con el ion bromo, proveniente del hypobromito de sodio, lo cual da una reacción coloreada rojiza, que se lee a 506 nm.

Tabla 1. Reactivos reacción de Sakaguchi

Reactivo	Concentración	Volumen (μ l)
Muestra diluida		500
8-hidroxiquinolina	0,02%	100
NaOH	10%	100
Hipobromito de sodio	1%	20
Urea	40%	100
H2O milliq estéril y fría		500

Se toma 1 ml de muestra en eppendorf estériles, se centrifugan a 3500 r.p.m/ 5 min, para eliminar células y otros restos que puedan interferir en el ensayo. El sobrenadante se pasa a un nuevo tubo esteril. Las muestras a analizar se diluyen convenientemente en agua fría para conseguir que los resultados obtenidos se puedan estimar dentro de una recta patrón preparada con una solución de L-Arginina de 20 μ g/ml, por lo general se hace un estimativo de esta en 5 concentraciones consecutivas: 0, 5, 10, 15, 20 μ g/ml.

Las muestras iniciales requieren diluciones altas (1: 500) y para las muestras tomadas al final, las diluciones entre 1:10 ó 1:50.

En un eppendorf, se agregan los reactivos en el orden que se presentan en la tabla 1. Después del hidróxido se incuba en hielo por 2 minutos y continuar con el hipobromito sódico al 1%, se incuba nuevamente en hielo por 15 segundos y se añade la urea al 40%. La reacción se completa con el agua MilliQ fría y se hace lectura a 506 nm. Se observa el desarrollo de color ocre.

Para el ensayo los reactivos se mantienen en frío antes y durante el desarrollo del método.

5. Cinética de degradación de la arginina por medio de células en reposo metabólico (Resting cells). (Mira de Orduña y col, 2000)

El método de resting cells, en las cuales las células son crecidas en un medio complejo, luego son concentradas por centrifugación y examinadas en un buffer en el cual se puede variar las diferentes condiciones de exposición, como el pH, etanol, glucosa, ácido malico y arginina entre otros, reproduciendo las condiciones que se pueden presentar en el vino o en cualquier otro alimento fermentado. En estas condiciones se deja un tiempo de contacto células/sustrato de 2 horas y se toman muestras cada hora para seguir la cinética de degradación.

5.1 Obtención de células no proliferantes:

Las cepas de estudio se cultivan primero en medio MRSmf, para el inicio del ensayo se espera que la densidad óptica (D_{600nm}), alcance por encima de 0,8 a 1. Se inocula 0,4% (V/V) en 5 ml en un medio de trabajo MRSm, ó TJAG, los cultivos se incuban a 27°C, con 10% CO₂ y se les hace seguimiento hasta alcanzar la fase tardía logarítmica, temprana estacionaria ($DO \sim 2$). Los cultivos se centrifugan a 5000 x g por 10 min, se descarta el sobrenadante y se hacen 2 lavados con tampón de lavado, y posterior se prepara el inóculo en 2,5 – 3 ml de

tampón de resting cells (RC). Las células resuspendidas que equivalen en peso seco de 2-10 g/l (10^9 - 10^{10} células/ml), se inocula 1 ml sobre 4 ml de la solución acuosa en viales, se incuban a 25°C con agitación constante y se toman muestras en el tiempo 0, 1 hora y 2 horas. Las muestras se centrifugan a 10000 x g durante 10 min, el sobrenadante se guarda a -20°C hasta el análisis de Arginina por el método de Staron – Allard (Micklus et al, 1973) .

Tabla 2. Soluciones para obtener células no proliferantes

Soluciones	Composición	Cantidad
Tampón de lavado	Ácido tartarico	7,5 g/l
	Solución mineral pH	5 ml/l 3,6 (NaOH 10%)
Tampón de RC	Ácido tartarico	7,5 g/l
	Solución mineral pH	1 ml 3,6 (NaOH 10%)
Sln mineral	MgSO ₄ .7H ₂ O	200 g
	MnSO ₄ .4H ₂ O	50
	Agua milliq	1 L
Slnes de Ensayo	Arginina	400 mg/l
	Arginina-glucosa	400 mg/l
	Agua milliq	1 L

5.2 Método de Staron – Allard (Micklus and Stein, 1973)

En esta técnica colorimétrica, la muestra se prepara diluyendo en agua fría convenientemente para conseguir que los resultados obtenidos se puedan estimar dentro de una recta patrón, preparada con una solución de L-Arginina stock 1mg/ml, y diluida hasta 20 ug/ml, por lo general se hace un estimativo de esta en 5 concentraciones consecutivas: 0, 5, 10, 15, 20.

Para el ensayo se preparan las soluciones señaladas en la tabla 3, se mantienen en frío antes y durante el desarrollo del método. En un tubo eppendorf, se agregan las soluciones en el orden sugerido en la tabla y se observa el desarrollo de una coloración amarilla. La lectura se hace a una DO 440 nm en espectrofotómetro (Hitachi 2000U).

Tabla 3. Reactivos Método de Staron – Allard para determinar la Arginina

Reactivo	Concentración	Volumen (ml)
Muestra diluida		1
NaOH	2N	1
4-Cloro-3-metilfenol	2,5 % en etanol al 50%	1
Hipoclorito de sodio	1%	1

Para el cálculo de los resultados, se traza la curva patrón, y con la fórmula de la pendiente se calcula la cantidad de arginina por muestra analizada vs el tiempo. La curva permite hacer un seguimiento de la cinética de degradación.

6. Medida de la actividad enzimática de las enzimas de la ruta ADI

Los ensayos enzimáticos de las tres enzimas de la vía Arginina-deiminasa (ADI): la Arginina-deiminasa (ADI), Ornitina transcarbamilasa (OTC) y la carbamato quinasa (CK), están basados en los estudios presentados por Liu, et al 1995, y Crow and Thomas, 1982.

6.1 Técnica

Tabla 4. Actividades Enzimáticas, reactivos y volúmenes empleados

Enzima	Reactivos empleados	Volumen (µl)
ADI	Tampón fosfato Na 0,2 M pH 5,8 (130 mM) Arginina-HCl 300 mM pH 5,8 (52,5 mM) Agua milliQ estéril Extracto	1,625 ml 375 500 – µl de muestra 100 ug/ml
OTC	Tris – HCl 400 mM pH 8,2 (200 mM) L- Ornitina – HCl 50 mM pH 8,2 (5mM) Carbamil fosfato 100mM pH 8,2 (10mM) Agua milliQ Extracto.	1,25 ml 250 250 750 – µl muestra 10 ug/ml
CK	En una cubeta se hace la mezcla Tris HCl pH 7, 9 1M (100mM) MgCl ₂ 50 mM (5mM) Glucosa 100 mM (10mM) NADP + 5mM (0,5 mM) ADP 50 mM (5mM) Hexoquinasa 12,5 U Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa Carbamil fosfato 100 mM (10mM) Extracto Agua milliQ estéril	100 100 100 100 100 100 5U 100 10 ug/ml hasta 1 ml

Para los ensayos enzimáticos ADI y OTC, se hace una preincubación 10 minutos a 37°C. El inicio de los ensayos se agrega la cantidad de proteína necesaria.

6.2 Obtención de Extractos celulares: La lisis celular se realiza con perlas de vidrio de 0,3 mm de diámetro, vortexando e intercalando tiempo de incubación en hielo, la presencia de las perlas hace que se rompa la pared celular, separando el contenido citoplasmático con posterior centrifugación.

6.3 Análisis de proteína: El análisis se realiza según el microensayo del método propuesto por Bradford (1976) El principio se basa en la observación modificación del color de la solución Coomassie Brilliant Blue G-250 que disuelto en ácido fosfórico y etanol se modifica al ligarse a proteínas en medio ácido, para formar un complejo estable. Las muestras se cuantifican a 595 nm, y frente a una recta patrón de 0 a 25 µg/ml de proteína de BSA (Albúmina de Suero Bovino). Se utiliza la solución preparada y comercializada bajo nombre de BIORAD

6.4 Recolección de muestras: Se toman 475 ul, en tubos eppendorf, sobre 50 ul de ácido perclórico al 65% para detener la reacción y se centrifuga a 13000 rpm/5 min, y el sobrenadante se reserva congelado hasta su análisis.

Para ADI: se hace recolección cada 10 minutos, pasado el tiempo de incubación: 0, 10, 20, 30 y 40 minutos.

Para OTC: se hace recolección cada 3 minutos, pasado el tiempo de incubación: 0, 3, 6, 9 y 12 minutos.

Para CK: Para iniciar la reacción se adiciona el extracto y se hace la lectura durante 3 o 4 minutos a 340 nm

6.5 Cuantificación de la citrulina. Metodo colorimétrico de Archibald(Archibald, 1944, con modificaciones según Ramón mira de Orduña 2000)

Tabla 5. Reactivos y volúmenes empleados técnica de Archibald

Reactivo	Volumen (µl)
Muestra diluida	400
mezcla 18M H ₂ SO ₄ + 14M H ₃ PO ₄	560
Diacetilmonoxima 3%	200

En esta técnica colorimétrica, la muestra se prepara diluyendo en agua fría convenientemente para conseguir que los resultados obtenidos se puedan estimar dentro de una recta patrón. Se agregan secuencialmente como se indica en la tabla 5. Hervir en la oscuridad, durante 20 – 30 minutos. Dejarlo enfriar 15 minutos en oscuridad y hacer lectura a 490 nm.

Calculo de la Citrulina:

Actividad Enzimática especifica = U (µmol/min)*ml * (proteína (mg/ml))

6.6 Medida de la actividad Lactato Deshidrogenasa (LDH).

La medida se hace a 25° C , con extracto no congelados, pero mantenidos en frío hasta el momento del ensayo. La lectura se hace a 340 nm

Reactivos

En una cubeta,

- 600 ul Tampón fosfato pH 7, 300 mM
- 200 ul NADH 1mM
- 100 ul Muestra diluida
- 100 ul Piruvato 10mM

El piruvato se coloca al momento de hacer la lectura, cuando la señal del espectro se ha estabilizado, se monitoriza la disminución de la absorbancia correspondiente a la desaparición de NADH a 340 nm, durante 4 minutos a intervalos de 30 segundos.

La pendiente mide la actividad LDH y se expresa en umol de sustrato utilizado por minuto a 25°C (=1 U). La actividad específica: U/mg de proteína

Cálculos:

Actividad: la pendiente medida * V / (v * ε* d)(μmol NADH/1(EB).min)

Donde la pendiente en U: DO / seg

V= Volumen de la cubeta (1 ml)

v= Volumen de extracto bruto (100 * 10⁻⁶)

ε = Coeficiente de extinción molar de NADH= 6,3 l/mmol

d= Longitud de la cubeta = 1 cm

Proteínas: mg/l

Actividad específica: U (μmol sustrato*min) /proteína (mg o ml)

7. Determinación de aminoácidos por HPLC

7.1 Objetivo:

Determinación de aminoácidos de muestras de soluciones tampón o de vinos

7.2 Materiales, reactivos y equipos

materiales

- Viales ámbar, agilent part N°5182-0716
- Tapones verdes de rosca con septum de PTFE/silicona de agilent part N° 5185-5864

- Insertos cónicos de vidrio: Agilent part N° 5181-1270
- Filtros de jeringa Millipore de 0,45µm y 4 mm. (Millex-HV SLHV R04NL)
- Filtros de membrana Millipore de 0,22 µm y 47 mm (GPWP04700)
- Portafiltros Millipore para discos de 47 mm de 500 ml.
- Matraz aforado de 1000 ml
- Probetas
- Micropipetas de 1000 µl y 5 ml
- Puntas de micropipetas
- Vasos de precipitados

Reactivos

- Fmoc reagent (conc:9-fluorenylmethylchloroformate en acetonitrilo. Agilent part N° 5061-3337
- OPA: o-phthaldehyde y 3-mercaptopropionic acid en tampón Borato. Agilent part N° 5061-3335
- Tampón Borato: 0,4N en agua, pH 10,2. Agilent part N°. 5061-3339.
- Acetato Sódico: ACS Reagent (sigma S-9513)
- Trietilamina (sigma T-0886)
- Tetrahidrofurano (Aldrich N° 24288-8)
- Metanol: Panreac 221091.1612
- Acetonitrilo. Panreac 221881.1612
- HCl 0,1N: HCl Panreac 131020.1611. Preparar y filtrar
- Ácido Acético 1%: ácido acético glacial (Sigma A-6283)
- L-Arginina-HCl: Sigma A-5131
- L-Citrulina: Sigma C-7629
- L-Ornitina: Sigma O-2375
- L- Norvalina: Sigma L-7627
- Thiaprolina: Sigma T-0631
- Aminoácidos Estándar 25pmol/µl en 0,1 M HCl. Agilent Part N° 5061-3333

Equipos

- HPLC 1100 series de Agilent
- Columna A: hypersil ODS de tipo fase reversa, 4,0 x 250 mm; tamaño de diámetro de partículas 5 µM, el diámetro interno o del poro 120 Å.
- Precolumna: Guard columns OB 233777 Hypersil ODS (5 µM) 4x4mm Part N° 7992618-504
- Columna B(segunda opción):TRACER Analítica, TR016057R, R23351, Tracer Extrasil ODS2, 5µm, 15 * 0,46
- Desgasificador: G1322A degasser JP05032625
- Bomba cuaternaria: G1311A Quat Pump DE14917646
- Inyector automático: G1329A ALS DE14908330
- Termostato del inyector G1330B ALS Therm DE13201483
- Compartimiento termostaticado de columna G1316A Collom DE14925927
- Detector fluorescencia G1321A (FLD) DE04302547

- Detector de λ múltiple G1365B MWD DE14901467
- Balanza analítica
- pHmetro
- Agitador magnético



Fig 1. HPLC 1100 series de Agilent

7.3 Técnica

7.3.1 Preparación de patrones:

Elegir reactivos de grado HPLC, preparar stock iniciales de 100 mM de cada aminoácido y de los patrones internos, disueltos en 0,1 N HCl filtrado, excepto Cys-Cys, congelar en alicuotas de 1 ml. Se hacen diluciones directamente en los viales ambar de cromatografía. Se hacen diluciones orientativas para diseñar una recta patrón de 0-1000 μ M, una recta de mayores concentraciones pierde linealidad en la lectura del equipo.

Los patrones internos se utilizan norvalina y Thioprolina; la norvalina se utiliza habitualmente pues detecta bien todos los aminoácidos y la Thioprolina para detectar los iminoácidos, prolina e hidroxiprolina, los patrones Internos se preparan juntos, se hace dilución 1:400 desde el stock (100mM) y se obtiene 250 μ M (deben dar menos señal cromatográfica, por esto se añaden a concentración superior de 100 μ M). Se hace una dilución 1:10 (100 μ l de N-Val y 100 μ l de tio-Pro en 800 μ l de HCl 0,1 M. y luego una de 1:40. (300 μ l de la dilución anterior en 11,7 ml de HCl 0,1 M).

Arginina, citrulina y ornitina a 100 mM, se hace una dilución 1:10 y se obtiene 10 mM, luego una más de 1:10, y se obtiene 1 mM (1000 μ M). Se hacen las diluciones con el mismo solvente HCL 0.1 N, todo esto va filtrado y se hacen las diluciones orientativas

Al obtener los datos se podrá trazar una curva de: área de aminoácido/área de Patrón Interno vs concentración de aminoácido/ concentración de Patrón Interno. Recta patrón de una mezcla de aminoácidos: se prepara un stock de 1mM de una mezcla de aminoácidos de dilución de 1:100 respecto al stock inicial que de cada aminoácido de 100 mM. Para ello 10 μ l de cada aminoácido del stock y se enrasamos con HCl 0,1 N a 1 ml. El mix de aminoácidos tiene un pH alrededor de 2.

7.3.2 Preparación de Solventes o Fases Móviles:

Solvente A:

REACTIVO	CANTIDAD
Agua milliq	1000 ml
Acetato de sodio	2,2 g
Trietanolamina (TEA)	220 μ l
Tetrahidrofurano	6 ml
pH	7,2

Este tampón se prepara primero disolviendo el acetato de sodio en agua, y se añade el TEA, da un pH sobre los 11, ajustar el pH a 7,2 con el ácido acético glacial 1% y luego si se agrega el tetrahidrofurano, se nivela al litro y se filtra al vacío con filtros millipore de 0,22 μ m

Solvente B:

REACTIVO	CANTIDAD
Acetato de sodio	1,8 g
Agua	280 ml milliq
Metanol	320 ml
Acetonitrilo	400 ml
pH	7

Este tampón se prepara disolviendo el acetato de sodio en 200 ml de agua y ajustar el pH con ácido acético glacial al 1%, luego se añade el metanol, el resto del agua y el acetonitrilo. No filtrar ya que el acetonitrilo deshace el filtro.

Las fases solventes se pueden modificar en concentración de reactivos, de manera que varia su polaridad y así el arrastre que se desee del analito. En pruebas anteriores se ha visto que a menor concentración de acetato sódico en la solución A, se alcanza una mejor separación del pico de arginina y alanina. Se puede probar diferentes concentraciones de fases móviles con el fin de tener mejor resolución en el cromatograma.

7.3.3 Preparación de la muestra:

Las muestras se deben filtrar por filtros Millex-HV de 0,45µm de poro, si las muestras están congeladas se descongelan en nevera, se filtran y luego se cargan al equipo. Las muestras se colocan en viales ambar tapadas. Intentar mantener siempre la línea de frío para evitar que se estropee la muestra. Si las muestras presentan pozo, antes de filtrar se puede sonicar para tenerlas bien disueltas.

7.3.4 Método:

Gradiente de elución:

Tabla 6. Gradientes de elución de cada uno de los solventes durante método de análisis.

	Tiempo	%B	%C	%D	Flujo	Max.presión
1	0	0	0	0	1,5	350
2	7,5	15	0	0	1,5	350
3	17	60	0	0	1,5	350
4	18	100	0	0	1,5	350
5	18,5	100	0	0	1,5	350
6	20	100	0	0	1,5	350
7	25	0	0	0	1,5	350

Parámetros:

Flujo: 1,5 ml/min.

Tiempo de medida 25 min y 2 de postrun.

Temperatura de la columna para el análisis 40°C.

Se realiza una derivatización interna en la precolumna antes de la inyección, los derivatizantes utilizados son OPA, Derivatiza todos los aminoácidos excepto la prolina. FMOC, Derivatiza todos aminoácidos y la prolina. Estos difieren según la lampara y ayudan a la detección del aminoácido de la muestra.

Programa de inyección de la muestra:

Se inyectará 1 µl de la mezcla. Siempre se inyectará lo mismo de PI si varía de una muestra a otra es que la composición de ésta influye, o que hay problemas con la inyección, se puede comprobar haciendo diluciones de la muestra

1. draw 5,0 µl de vial tampon borato
2. draw 1 µl de vial OPA
3. draw 0,0 de vial Agua
4. draw 2, 0 µl de muestra
5. draw 1,0 µl de vial patrones internos (PI)
6. draw 0,0 de vial Agua
7. mix 10 µl en aire max velocidad 6 times
8. draw 1 µl de vial FMOC
9. draw 0,0 de vial Agua

10. mix 11 µl en aire, speed 3 times
11. inject
12. needle washing in vial 9, 5 times.

Detectores:

MWD, FLD (340 nm excitacion y a 450 nm emision)

Tabla 7. Programación de los Detectores

Time	Excitacion	Emission	PMT - Gain
0	340	450	12
15	266	305	11
25	340	450	12

7.3.5 Análisis de datos:

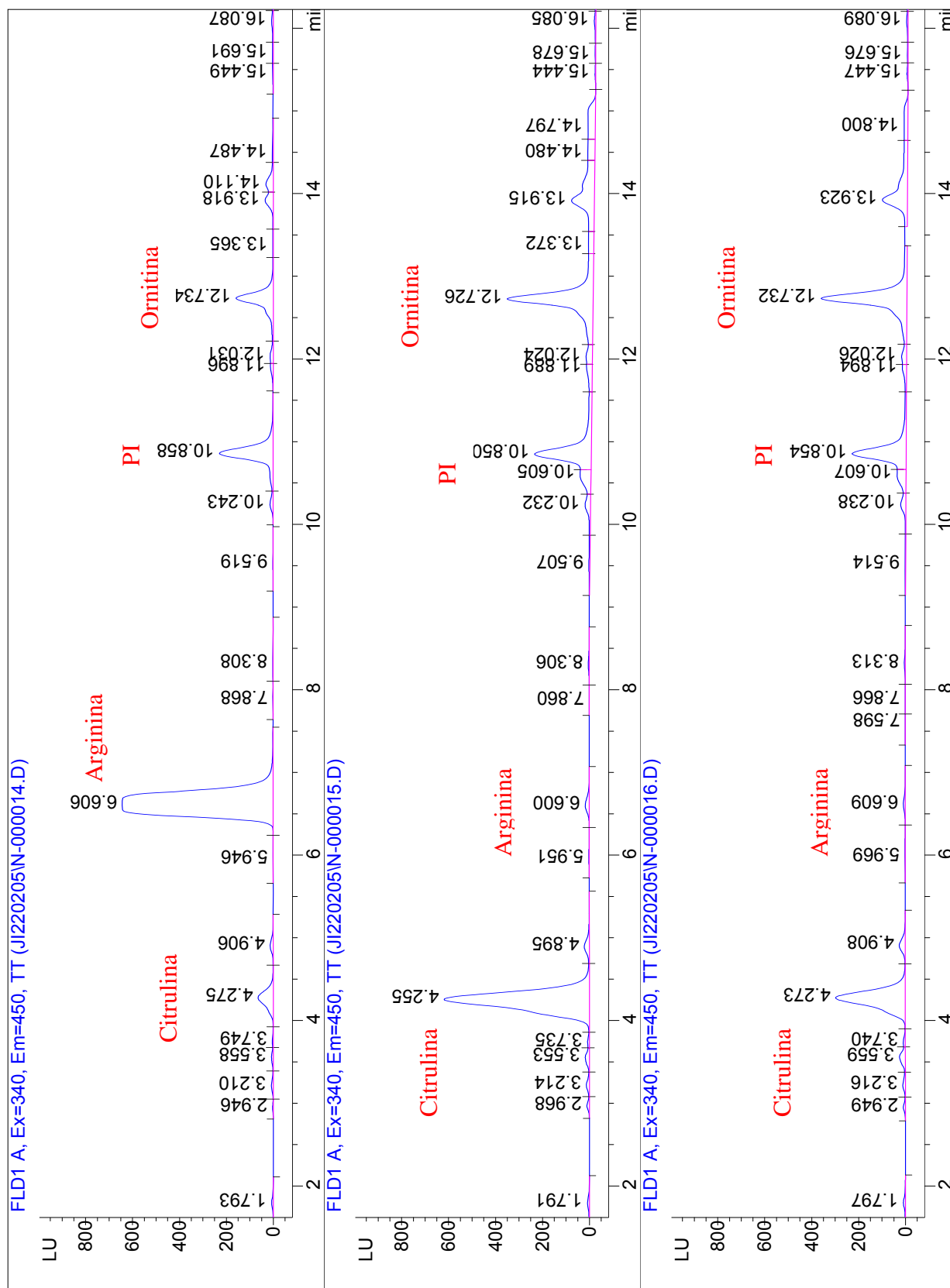
El área del pico indica la concentración de la sustancia. Para su identificación se observa el tiempo de retención. Los patrones internos (PI), tiene un tiempo de retención 11.25 min con lámpara UV-sensible-OPA y de 19.33 min, FMOC con FLD. La arginina tiene un tiempo de retención de 7.38 min, ornitina a 13 min y citrulina a 6 min.

Se construye una recta de calibrado con los patrones de aminoácidos de concentración conocida. Frente a estas se hacen los cálculos respectivos, normalizando la muestra con el área y la concentración del PI.

$$\text{Área normalizada: } \frac{\text{arginina} \quad \text{ornitina} \quad \text{citrulina}}{\text{N-val}}$$

$$\text{Concentración: } Y(\text{área normalizada}) = ax + b$$

Fig 2. *L. hilgardii* 4786T 12% etanol (0, 1, 2 horas). Grafica obtenida del equipo de HPLC 1100 series de Agilent. Se puede seguir la cinetica con que se van degradando o produciendo los aminoácido según el tiempo de retención esperado.



8. Detección de genes de la ruta ADI. PCR degenerada

La detección de los genes de la ruta ADI de especies no secuenciadas de bacterias lácticas se estudio con cebadores degenerados diseñados a partir del alineamiento de las bacterias disponibles en la GenBank: *Lactobacillus sake*, *Lactococcus lactis*, *L. plantarum* y *L. hilgardii* y *Oenococcus oeni*. Ver capítulo 3.

PCR Degenerada

8.1 Diseñado de los cebadores degenerados:

Este tipo de cebador, tiene un número de opciones a diferentes posiciones en la secuencia así como la asignación de alineamiento y amplificación de una variedad de secuencias relacionadas.

Las secuencias de aminoácidos similares o de proteínas homologas pueden ser recuperadas de una base de datos como la GenBank (www.ebi.ac.uk).

Los bloques de alineamiento al menos han de existir 2 bloques de aminoácidos conservados, de las especies más cercanas. Los bloques han de tener al menos de 8 – 9 aminoácidos para generar cebadores de 24-27 bp. Los bloques pueden tener algún aminoácido no conservado en las secuencias, si no es posible encontrar bloques conservados al 100%, se trata de que el amplificado generado, tenga entre 250-400 bp que permitan luego una fácil secuenciación.

Se hace la traducción de los aminoácidos elegidos a bases según el código degenerado universal (tabla 8).

Tabla 8. Código genético degenerado

LETRA DE ABREVIACIÓN	NUCLEOTIDO REPRESENTADO
A	A
C	C
G	G
T	T
R	AG
Y	CT
M	AC
K	GT
W	AT
S	CG
B	CGT
D	AGT
H	ACT
V	ACG
N	ACGT

La secuencia de cebador debe incluir menos degeneración y que cumpla dentro de lo posible los criterios de diseño generales. Como se señala en la tabla 9 y para ella se suma que estos se prefieren que tengan una buena concentración de

inositol que reduce la degeneración y que el extremo 3' tenga más degeneración que el 5'.

Cuando ya se ha definido los cebadores de uso se prueban por herramientas informáticas. En la red existen un programa para el diseño de cebadores degenerados (CODEHOP), que generan primer con el extremo 5' con poca degeneración ("clamp") y el extremo 3' con más degeneración. Los cebadores generados dan demasiados puntos de hibridación inespecífica.

Tabla 9. Criterios generales de diseño de primers:

1. T^o m se considera 5^o por debajo de la que viene del fabricante, por encima de 50^o
2. Longitud entre 24-27 bp
3. Diferencia de T^om de los dos cebadores inferior a 2^oC, que asegure eficiencias similares
4. No mas de tres bases iguales juntas
5. No más de 2 G juntas para evitar dímeros de cebadores
6. Más porcentaje de A/T que C/G a las ultimas 5 bases al extremo 3'
7. El contenido de G/C entre 40 – 60% y similar entre los cebadores, 5'-3 F y el 3'- 5' R.
8. Mejor G o C al extremo 3' para favorecer una unión fuerte al lugar de inicio de la polimerización, buscado que el extremo 5' sea mas "pegajoso".
9. Ausencia de palíndromos en un cebador y de dímeros
10. Distribución equilibrada de G/C

Se puede utilizar el PrimerExpress 1,5 (ABI PRISM) para obtener una orientación de la bondad de los primers, asi como la Tm de los cebadores elegidos y de la estabilidad de los cebadores. Pero al ser cebadores degenerados, su uso es restringido, es preferible el empleo de otros programas disponibles en la red y creados para el diseño de cebadores degenerados.

8.2 Alineamientos utilizados:

En el apartado 8.5 están alineadas en formato clustal las secuencias de los genes que conforma la ruta ADI asi como proteínas que codifican. Arginina deiminasa (ADI), Ornitina transcarbamilasa (OTC), Carbamato quinasa (CK). Aparece resaltado el fragmento de la secuencia empleada para el diseño de los cebadores degenerados utilizados en este estudio.

8.3 Definición de las condiciones de PCR:

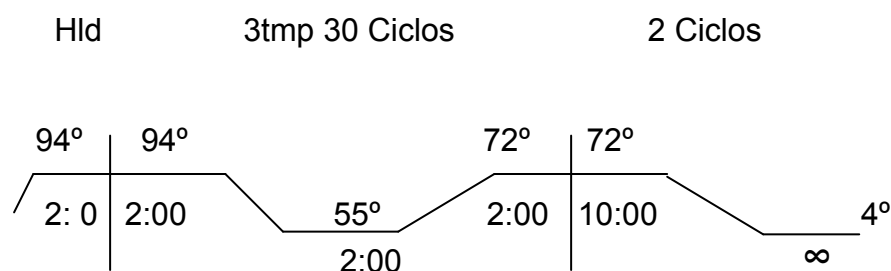
Para definir las condiciones de PCR degenerada se debe tener en cuenta que los cebadores que se utilizan tienen múltiples opciones de generar determinados aminoácidos pero también depende de las condiciones de PCR. Se coloca una concentración mayor de cebador que un cebador normal o específico. La cantidad de $MgCl_2$, se pone en baja cantidad para hacer la reacción menos astringente. La concentración de dNTPs se define por la concentración del $MgCl_2$, siendo por norma general esta última mayor. Para este ensayo la mezcla de reacción se ha utilizado como se ve en la tabla 10 en un volumen de reacción de 20 μ l.

Tabla 10. Reactivos y concentraciones utilizados en la PCR degenerada

Reactivo	Concentración
Tampón 10X (Ecogen)	1X
dNTPs (Roche)	200 μ M
$MgCl_2$ (Ecogen)	1,5 mM
Primer Degenerados F	2,0 μ M
Primer Degenerados R	2,0 μ M
Taq Polimerasa 500 U (ecogen)	0,5 U
ADN	2 μ l
Agua Bidestilada estéril	Hasta 20 μ l

8.4 Programa de amplificación:

El programa definido para la reacción de la PCR para el termociclador Gene Amp PCR System, Perkin Elmer, 24 pozos de capacidad; ha sido el siguiente, definiendo la T_m 55° C, por consenso entre las T_m de los cebadores y además resulta ser menos restrictiva para el tipo de reacción.



Los productos de la PCR se han estudiado por análisis de las bandas electroforéticas en gel de agarosa al 1%.

8.5 Secuencias:

Secuencia proteica para el gen ADI

Oenococcus	MMDKKVPIHVYSEIGKLETVILHRPGHEIENITPDSMRRLLFDDIPYLPVAQHEHDVFAE	60	
Lactobacillus	---MTSPIHVNSEIGKLTVLLKRPKEVENITPDIMYRLLFDDIPYLPYTIQKEHQDQFAQ	57	
Lactococcus	--MNGINVNSEIGKLSVLLHRPGAIVENITPDTMKQLLFDDIPYLKIAQKEHDFFAQ	57	
	. * : * * * * * : * : * : * * * * * : * : * * * * * * * : * : * * * * * * * * : * : * * * * * * :		
Oenococcus	TLKKNGAEVLYLEDLVVKALDTGGSEIKDQFVKQMLTESGYASGIVHDALKEYLLDFDTK	120	
Lactobacillus	TLRDNGVEVLYLENLAAEAIDAG--DVKEAFLDKMLNESHKSPQVQAALKDYLI SMATL	115	
Lactococcus	TLRDNGAETVYIENLATEVFEKS-SETKKEEFLSHLLHEAGYRPGRTYDGLTEYLTSMSTK	116	
	* : * : * * . * : * : * * . * : : : . : : : * : * : * : * : * * : . . . * : * * * : * :		
Oenococcus	SMVNKIIIEGVQKKEVNFVQKGLVSL-EEKNYQFFLDPMPNLYFTRDPQASIGEGLSINR	179	
Lactobacillus	DMVEKIMAGVRTNEIDIKSKALIDVS-ADDDYPFYMDPMPNLYFTRDPAASMGDGLTINK	174	
Lactococcus	DMVEKIYAGVRKNELDIKRTALSDMAGSDAENYFYNLPLNAYFTRDPQASMGVGMTINK	176	
	. * : * * * * * * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :		
Oenococcus	MTFQARQRESLFMQTIINYHPRFANKKLHVWRDRNHSTHIEGGDELILNDHVLAIGISQR	239	
Lactobacillus	MTFEARQRESMFMEVIMQHHPRFANQGAQVWRDRDHIDRMEGGDELILSDKVLVAIGISQR	234	
Lactococcus	MTFPARQPESLITEYVMANHPRFKDT--PIWRDRNHTTRIEGGDELILNKTVAIGVSR	234	
	* * * * * * * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :		F1
Oenococcus	TQADAIEDIAHKLFK--DSNYDTIITVL IPHNHAMMHLDTVFTMI NLNQFTVHPGIMGAG	297	
Lactobacillus	TSAQSIIEELAKVLFAN-HSGFEKILAIK IPKHAMMHLDTVFTMI DYDKFTIHPGIQGGAG	293	
Lactococcus	TSSKTIQNLAKELFANPLSTFDTVLAVE IPHNHAMMHLDTVFTMI NHDQFTVFPIMDGA	294	
	* : : * : * : * : * * * * * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :		R1
Oenococcus	GNIPFVLHKDKDNQIRIENYHNLEAVLKDQLNLSELDLIPTGNGDPIVSARE QWNDGSN	357	
Lactobacillus	GMVDTYILEPGNNDIEKITHQTDLEKVLRDALVEPELTLIPCGGDVAVAPRE QWNDGSN	353	
Lactococcus	GNINVFILRPGKDDEVEIEHLTDLKAALKKVLNLSELDLIECGAGDPIAAPRE QWNDGSN	354	
	* : : * : * . * : : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :		
Oenococcus	TLAIAPG VVVVYDRNYVSNATLKKHGIKVLEVPSELSRGRGGPRCMTMPIYRDDIKK	415	
Lactobacillus	TLAIAPG VVVVYDRNYVSNENLRQYGIKVIKLEVPSELSRGRGGPRCMTMPLVRRKT--	409	
Lactococcus	TLAIAPG EIVTYDRNYVTVELLKEHGIKVHEILSSELGRGRGGARCMSQPLWREDL--	410	
	* * * * * * : * * * * * * : * : * : * * * * : * * * * * * * * * * : * : * * * * * :		

Secuencias nucleotídica para el gen ADI

Lactococcus	AGAAAGGATACTTCAAATGAACAATGGAATTAATGTTAACTCAGAAATGGGAAATTAA	60
Oenococcus	-----ATGATGGATAA-GAAAGTTCCAATTCATGTGATCTGAAATGGAAAATTAG	52
Lactobacillus	--GGAGGTAGTTTTAAATGACAAGTCCAATTCATGTAAATCCGAAATCGGAAAACCTTA	57
	* :	
Lactococcus	AATCAGTCTTCTCCACCGCCAGGTGCAGAGGTAGAGAATATTACCCAGACACAATGA	120
Oenococcus	AAACTGTAATCTCCATCGTCCAGGACATGAAATGAGAATATAACACCAGATAGTATGC	112
Lactobacillus	AGACGGTCTTACTAAAACGGCCAGTAAAGAAGTCGAAAACATTAACCTGACATATATGT	117
	* :	
Lactococcus	AACAGCTTTTATTTGATGATATTCATATCTCAAATGCTCAAAAAGAGCATGATTTCT	180
Oenococcus	GACGTTTGTATTTGATGATATTCATATCTCAAATGCTCAAAAAGAGCATGATTTCT	172
Lactobacillus	ATCGTTTATTTGATGATATTCCTTATTTACCAACAATCCAAAAGAACACGATCAAT	177
	* :	
Lactococcus	TTGCTCAAACATTGCGTGACAATGGTGCTGAAACTGTTTATATCGAAAATCTTGCAACAG	240
Oenococcus	TTGCTGAAACATTGAAAAAATGGTGCAAGTTTTATACCTAGAAGATCTTGATAGTAA	232
Lactobacillus	TTGCACAAACATTACGTGACAATGGTGTTGAAGTCTTTACTTAGAAAACCTCGCTGCCG	237
	* :	
Lactococcus	AAGTTTTTGAAA--AATCATC-TGAAACAAAAGAAGAGTTTTTAAGCCATTTGTTGCATG	297
Oenococcus	AAGCGCTTGATACCGGTGGCAGTGAGATCAAAGATCAATTTGTAACAAATGTTAACAG	292
Lactobacillus	AAGCAATCGATGCTGGTGACG-----TTAAGGAAGCTTTCCTTGATAAGATGTTGAACG	291
	* :	
Lactococcus	AAGCAGGTTACCGTCCAGGACGTACTTATGATGGATTGACTGAATATTTAACTTCAATGC	357
Oenococcus	AATCTGGGTATGCTTCAGGCATAGTTCATGACGCTTTAAA-GAATATTTG-CTAGATTTG	350
Lactobacillus	AATCACACATCAAATCACCACAAGTTCAAGCAGCCTTAAAAGACTACTTAATGATATGG	351
	* :	
Lactococcus	CA-ACAAAAGATATGGTTGAAAAAGTCTATGCCGGTGTTCGTAAAAATGAATTGGATATC	416
Oenococcus	GATACCAAATCTATGGTTAATAAAAATTATTGAGGGTGTTCAAAAAAGAGTTAATTTT	410

Lactobacillus	CA-ACGTTAGACATGGTTGAAAAATCATGGCTGGGGTTCGGACCAACGAAATCGATATT 410 * * * * *
Lactococcus	AAACGCACAGCACTTAGTGACATGGCAGGTTCTGATGCAGAAAATTAT--TTCTACCTC 473
Oenococcus	GTACAAAAAG-GCTTAGTTAGTCT-----TTCTGAAGAAAAGAATTATCAGTTCTTTTTG 464
Lactobacillus	AAATCAAAGGCATTGATTGACGTTA--GTGCTGATG--ATGACTATCCATTCTATATG 464 * * * * *
Lactococcus	AACCCATTACCAAATGCTTACTTCCACAGTGACCCACAAGCTTCAATGGGTGTCGGAATG 533
Oenococcus	GACCCGATGCCGAATCTTTATTTTACACGTGATCCTCAGGCGTCAATTGGCGAAGGGCTT 524
Lactobacillus	GATCCAATGCCTAACCTATACTTACACGCGATCCTGCCGCATCAATGGGGATGGCTTA 524 * * * * *
Lactococcus	ACTATTAATAAAAATGACTTTCCAGCAGCTCAACCTGAAAGCTTGATTACCGAATATGTG 593
Oenococcus	AGTATTAATCGCATGACATTTTCAAGCTCGTCCAGCGTGAATCATTGTTTATGCAAAACAATT 584
Lactobacillus	ACAATTAATAAAAATGACTTTTGAAGCTGCCAAAGAGAATCAATGTTTCATGGAAGTCATC 584 * * * * *
Lactococcus	ATGGCTAACCATCCACGTTTCAAAGACA----CTCCA-ATCTGGCGTGATCGTAATCAT 647
Oenococcus	ATTAATTATCATCCGCGTTTTGCAACAAAAAGTTGCATGTGTGGCGCGACCGAAATCAC 644
Lactobacillus	ATGCAACATCATCCTCGTTTTGCCAACCAAGCGCACAAAGTTTGGCGCGACCGCGATCAC 644 ** * * * * *
Lactococcus	ACTACTCGTATTGAAGGTGGTGATGAATTAATCTTAATAAGACAACCTGTAGCAATCGGG 707
Oenococcus	TCTACTCACATGGAAGGTGGAGACGAACTTATTTAAATGATCATGTAATTGCTATTGGA 704
Lactobacillus	ATTGACCGCATGGAAGCGCGACGAATTAATCTTGAGCGATAAAGTGCTTGCAATTGGG 704 * * * * *
Lactococcus	GTTTCAGAACGTACTTTCATCTAAAACAATTCAAAATCTTGCTAAAGAATTATTGCAAAAT 767
Oenococcus	ATTTCTCAAAGAACTCAGGCTGATGCTATTGAAGATATTGCACATAAGTTATTTAAAGAT 764
Lactobacillus	ATTTCAACGGAATCCGCACAATCAATTGAAGAACTTGCCAAGGTATTATTTCGCTAAC 764 **** * * * * *
Lactococcus	CCACTTCTACATTTGATACAGTGCTTGCGGTTGAAATCCCTCATAACCATGCAATGATG 827
Oenococcus	AG-----CAATTATGACACGATTACTGTCTAATACCTCATAATCAGCTATGATG 818
Lactobacillus	CA---CAGTGGCTTTGAAAAAATCTTAGCAATTAAGATTCCACATAAGCATGCCATGATG 821 * * * * *
Lactococcus	CACTTGACACAGTATTTACAATGATTAACCATGATCAATTTACAGTTTTCCAGGAATT 887
Oenococcus	CATTTGGATACTGTTTTTACAATGATTAATTTAAACCAGTTTACAGTTCATCCAGGAATC 878
Lactobacillus	CATTTAGATACAGTCTTCACCATGATTGATTATGATAAGTTCACCATTCATCCAGGCATC 881 ** * * * * *
Lactococcus	ATGGATGGTGCAGGTAACATCAACGCTCTTCAATCTTCGTCCTGGTCAAGATGGTGAAGTT 947
Oenococcus	ATGGGAGCTGGTGGAAATATCCAATTTTGTGTTTGCACAAGGATAAAGATAATCAAATA 938
Lactobacillus	CAAGGTGCTGGCGCATGGTTGACACTTATATCTTAGAACCAAGGCAATAACCATGAAATC 941 * * * * *
Lactococcus	GAAATTGAACATTTGACAGATCTTAAAGCAGCCCTTAAGAAAGTCTTGAACCTTTTCAGAA 1007
Oenococcus	AGAATTGAAAAATTATCATAATCTTGAAGCAGTTTAAAGACCAATTAATCTTAGCGAA 998
Lactobacillus	AAGATTACACATCAACAGATCTTGAAGAAAGTTCTCCGCGATGCTTTGGAAGTGCCTGAA 1001 *** * * * *
Lactococcus	CTTGACTTGATTGAATGTGGTGCAGGTGACCAATTTGCCGCACCTCGTGAACAATGGAAT 1067
Oenococcus	CTCGATTTAATTTCCACCGGAAACCGGAGATCCAATTTGCTCTGCTAGGAGCAGTGGAAAT 1058
Lactobacillus	TTAACCTTAATCCCATGTGGTGGCGGCGATGCAGTTGTTGCCCTCGTGAACAATGGAAT 1061 * * * * *
Lactococcus	GATGGTTCAAATACCCTTGCTATTGCTCCAGGAGAAATCGTTACTTATGACCGTAACTAT 1127
Oenococcus	GATGGATCTAATACTTTAGCTATTGCGCCAGGTGTTGTTGTAACCTTATGACAGGAACAT 1118
Lactobacillus	GACGGTTCTAACACATTAGCAATCGCACCTGGCGTTGTTGTCACTTATGATCGCAACTAT 1121 ** * * * * *
Lactococcus	GTAACCTGTTGAACTTTTGAAGAAACATGGTATTAAAGTTCATGAAATCTTTTCAAGTGAA 1187
Oenococcus	GTTTCGAATGCCACTTTAAAAAACACGGGATAAAGGTTTTGGAAGTTCCTTCAAGTGAG 1178
Lactobacillus	GTTTCAAACGAAAACCTTACGTCAATATGGCATTAAAGTGATCGAAGTCCCATCAAGTGAA 1181 ** * * * * *
Lactococcus	CTTGGTCTGGTGGTGGTGGAGCGGTTGTATGTCACAACCCTTTGGCGTGAAGATTTG 1247
Oenococcus	TTGTCTCGTGGCCGTGGTGGCCCGGTTGTATGACTATGCCAATTTATCGTGATGATATT 1238
Lactobacillus	TTATCACGCGGTGCTGGGGTCCACGTTGTATGAGTATGCCACTTGTAGAAAGAAAGACT 1241 * * * * *
Lactococcus	TAA----- 1250
Oenococcus	AAAAAATAG 1247

Lactobacillus TAA----- 1244
 **

Secuencia proteica para el gen OTC

LHI421514_8_L.hilgardii_OTC	-----MTKDFRQNVFQGRSVLAEKDFSAEELEYLIDFGLHLKALKKA	42	
AF124851_3_O.oenosOTC	MEQKLGNLVKKNVVSVFQGRSLLAEKDFTPMELEYLIDFALHLKALKKL	50	
AF282249_6_L.Lactis_OTC	---MTSPLITKAEVNSVFQGRSLLAEKDFTPAEINYLVDLFLHLKALKKQ	47	
LSAJ1330_6_L.sakei_OTC	-----MTNSVFQGRSLLAEKDFTKSELEYLIDFSLHLKDLKKK	38	
LPARGCL_25_L.plantarum_OTC	-----MNNQFEGRSFLKEIDYTPTELAYLIDFASHLKTLLKAH	37	
	: . * : * * * . * * * : : * : * * : * * . * * * * *		← F1
LHI421514_8_L.hilgardii_OTC	GIPHHYLEGKNIALLEFKSSSTRTRS AFTTASIDLGAHPE YLGQNDIQLGK	92	
AF124851_3_O.oenosOTC	GISHRYLEGKNIALLEFKTSTRTRS AFTTASIDLGAHPE FLGNSNDIQLGK	100	
AF282249_6_L.Lactis_OTC	NIPHHYLEGKNIALLEFAKTSTRTRA AFTTAAIDLGAHPE YLGANDIQLGI	97	
LSAJ1330_6_L.sakei_OTC	GIPHHYLEGKNIALLEFKNSTRTRA AFTTAAIDLGAHPE FLGKNDIQLGK	88	
LPARGCL_25_L.plantarum_OTC	HIPHPYLOQKNIALLEFKTSTRTRS AFTVAANDLGANPE FLGKDDIQFGT	87	
	* . * * * : * * * * * * * * . * * * * * : * * * * * : * * * * * :		← R1
LHI421514_8_L.hilgardii_OTC	KESTSDTAKVLGSMFDGIEFRGFKQSDAEILAR DSGVPVWNGLT DEWHPT	142	
AF124851_3_O.oenosOTC	KESVEDTARVLGSMFDGIEFRGFKQSVVDDLAR YSGVPVWNGLT DEWHPT	150	
AF282249_6_L.Lactis_OTC	KESTEDTARVLGSMFDAIERRGFSQKEVEDLAK YSGVPVWNGLT DWHPT	147	
LSAJ1330_6_L.sakei_OTC	KESVEDTAKVLGSMFDGIEFRALAK-VVEDLAK YSGVPVWNGLT DEWHPT	137	
LPARGCL_25_L.plantarum_OTC	KESVVDTAKVLGSMYDIEFRGFKQSTVEDLAT YSGVPVWNGLT DEWHPT	137	
	* * * . * * * : * * * * * : * * * * * : . : * * * * * * * * * * * * :		
LHI421514_8_L.hilgardii_OTC	QMLADFMTVKENFGKLGQLTLTFMGDGRNNVANSLLVTGAILGVNIHIVA	192	
AF124851_3_O.oenosOTC	QMLADFMTIKENFGHIKNINLSYMGDGRNNNTANSLITGSMGLGANIRIVS	200	
AF282249_6_L.Lactis_OTC	QMIADFMTVKENFGYLGKGLTLVYVGDGRNNMANSLLIVTGSMGLGVNIHIVA	197	
LSAJ1330_6_L.sakei_OTC	QMIADFMTVKENFGKLGKGLVTLTYVGDGRNNMANSLLIVTGSMGLGVNIHIVA	187	
LPARGCL_25_L.plantarum_OTC	QILADFLTLKEHFGHLKGLTLAYVGDGRNNMANSLLVAGAMLGINIAIGA	187	
	* : * * * * : * * * * * * : . : * * * * * * * * * * * * * * * * :		
LHI421514_8_L.hilgardii_OTC	PKALFPTEETQNIAGFAEKSGAKLVIITDDLDEGLKGSNVVYTDVWVSMG	242	
AF124851_3_O.oenosOTC	PKELQPSEKTTTELAKKFAEKSGSRFLITDNDIDEGVSKTNVLYTDVWVSMG	250	
AF282249_6_L.Lactis_OTC	PDSLHPSKEVMDIANKFAEKSGAKPLATSNIIEGVKGANIYSDVWVSMG	247	
LSAJ1330_6_L.sakei_OTC	PDSLQPTQEVVDLAEQYAKETGSKNMITSDVDAGVKGSVDVLYTDVWVSMG	237	
LPARGCL_25_L.plantarum_OTC	PVALQPAPAVRALAQYQAAGSTVITADPQQAVTQADALYTDVWVSMG	237	
	* * * * : . * * * * : * * * * : * * * * : . : . * * * * * * * * * * * * :		
LHI421514_8_L.hilgardii_OTC	ESN-WEERVKELTPYQVNMEAMKKTGTPDD-QLIFMHCLPAFHNTDTQYG	290	
AF124851_3_O.oenosOTC	ESD-WEDRVKLLKPYQVNMETIRKTSPTDD-QLIFMHCLPAFHDINTDYG	298	
AF282249_6_L.Lactis_OTC	ESN-WEERVKLLTPYRITMDMLKMTGNADNGKLIFMHCLPAFHDTETEYG	296	
LSAJ1330_6_L.sakei_OTC	EEDKFEERVNLLKPYQINMDMVKKTG---NENMIIMHCLPAFHDIETEYG	284	
LPARGCL_25_L.plantarum_OTC	EQVDYGERIKQLLPFQINTLLAATG---KSSTIVMHCLPALHDLKTLQLG	284	
	* . : * * * : * * * : . : * . . . * * * * * * * * : * * * * :		
LHI421514_8_L.hilgardii_OTC	KEIKEKYGITEMEVTDEVFTSKYARQFEEAENRMHSIKAMMAATLGNLFI	340	
AF124851_3_O.oenosOTC	HEIFEKYGIKEMEVTDEVFRSIYARQFEEAENRMHSIKAIMAATLGNLFI	348	
AF282249_6_L.Lactis_OTC	KEIKEKYGLTEMEVTDVAFRSKYARQFEEAENRMHSIKAIMAATLGNLFI	346	
LSAJ1330_6_L.sakei_OTC	KKIDEQFGIQEMEITDEAFRSKYARQFEEAENRMHSIKAIMAATLGNLFI	334	
LPARGCL_25_L.plantarum_OTC	AKLGEQYGMTAFEITDDVFSKQAVVFEEAGNRMPAIAKAVMAATLGNLFI	334	
	: : * * * * : * :		
LHI421514_8_L.hilgardii_OTC	PRV-----	343	
AF124851_3_O.oenosOTC	PHV-----	351	
AF282249_6_L.Lactis_OTC	PAVPEDFK	354	
LSAJ1330_6_L.sakei_OTC	PQA-----	337	
LPARGCL_25_L.plantarum_OTC	PTSIFN--	340	
	*		

Secuencia nucleotidica del gen OTC

AF282249_6_L.lactis	ATGACATCACCCTTATTACAAAAGCAGAAGTAAACTCAGTATTCCAAGG	50
LHI421514_8_L.hilgardiiOTC	-----ATGACAAAAGATTTTAGACAAAACGTATTTCGAAG	35
AL935253_134_L.plantarumOTC	-----ATGAATAATCAATTGAAG	20
	* * * * *	
AF282249_6_L.lactis	TCGTAGCTTGCTTGCTGAAAAAGATTTTACACCAGCTGAAATTAACCTACC	100
LHI421514_8_L.hilgardiiOTC	CCGCAGCGTCTTGCTGAAAAAGATTTTCCGCTGCAGCAATTTGGAATATT	85
AL935253_134_L.plantarumOTC	TCGGTCACTTCTTGAAGGAAATCGACTATACACCAACAGAATTAGCTTACT	70

```

**      * *      **** * * * * * * * * * *      **

AF282249_6_L.lactis      TTGTTGATTTTGGTCTTCATTTGAAAGCATTGAAACAACAAAATATTCCT 150
LHI421514_8_L.hilgardiiOTC  TAATTGATTTTCGGTTTACACTTGAAAGCTTTGAAAAAGCAGGCATTCCT 135
AL935253_134_L.plantarumOTC  TAATTGACTTTGCTAGTCACTTGAAGACCCTTAAAGCACACCATATCCCA 120
*      **** * * * *      ** * * * * * * * * * *      ** * *

AF282249_6_L.lactis      CACCCTATCTTGAAGGTAAGAATATTGCCTTGTATTGCAAAAACCTTC 200
LHI421514_8_L.hilgardiiOTC  CACCATTATTTGGAAGGAAAAACATTGCCCTATTGTTGAAAAAGTCATC 185
AL935253_134_L.plantarumOTC  CACCCTTATTTACAAGGAAAAAATATTGCGTTGCTGTTTAAAAAACGTC 170
**** * * * *      **** * * * *      **** * * * *      ** *

AF282249_6_L.lactis      AACTCGTACACGTGCCGCATTTACAACCTGCTGCAATTGACCTTGGGGCTC 250
LHI421514_8_L.hilgardiiOTC  AACTCGAAGCTCGTTCCGGCATTCACTACTGCTTCTATTGATTTAGGTGCTC 235
AL935253_134_L.plantarumOTC  GACACGGACACGTTCTGCGTTTACTGTGGCGGCTAATGATCTGGGCGCGA 220
* * * * * * * * * *      ** * * * * * * * * * *

AF282249_6_L.lactis      ATCCTGAATATCTTGGTGCAAATGATATCCAACCTCGGAATCAAGAATCA 300
LHI421514_8_L.hilgardiiOTC  ATCCAGAGTATTTGGGTCAAAAACGATATCCAACCTGGGTAAAAAGGAAAGT 285
AL935253_134_L.plantarumOTC  ATCCAGAGTTTTTGTGTAAGACGACATCCAATTCGGGACGAAGGAGTCA 270
**** * * * * * * * * * *      ** * * * * * * * * * *

AF282249_6_L.lactis      ACAGAAGATACAGCACGTGTTCTTGGTTCAATGTTGATGCTATTGAACG 350
LHI421514_8_L.hilgardiiOTC  ACATCAGACACTGCTAAAGTACTTGGCAGCATGTTGATGGAATTGAATT 335
AL935253_134_L.plantarumOTC  GTTGTGATACGGCGAAAGTACTGGGGTCCATGTATGATGGCATTGAATT 320
* * * * * * * * * *      ** * * * *      **** * * * *      **** *

AF282249_6_L.lactis      TCGTGGATTTTCTCAAAAAGAAGTTGAAGATTTGGCAAAAATACTCTGGTG 400
LHI421514_8_L.hilgardiiOTC  CCGTGGATTCGAAGCAAGCGATGCTGAAATCTTAGCTAGAGATAGTGGTG 385
AL935253_134_L.plantarumOTC  TCGGGCTTTAAACAAAGCACGGTCAAGACTTAGCGACCTATAGTGGTG 370
* * * * * * * * * *      **** * * * *      ** * * * *      *      **** *

AF282249_6_L.lactis      TTCCAGTTTGAATGGTTTGACAGATGATTGGCATCCAACACAAATGATT 450
LHI421514_8_L.hilgardiiOTC  TTCTGTTTGAACCGTTTAAACCGATGAATGGCATCCAACCTCAAAATGTTG 435
AL935253_134_L.plantarumOTC  TGCCAGTCTGGAACGGTTGACCGATGAGTGGCACCCGACCGATTTTA 420
* * * * * * * * * *      ** * * * *      **** * * * *      ** * * * *      *

AF282249_6_L.lactis      GCTGACTTTATGACAGTAAAAGAAAACCTTTGGTTACCTTAAAGGGTTGAC 500
LHI421514_8_L.hilgardiiOTC  GCTGACTTCATGACTGTTAAGGAAAACCTTTGGCAAACCTCAAGGCTTGAC 485
AL935253_134_L.plantarumOTC  GCGGATTTTTTAACATTAAGGAACATTTGGTCATTTAAAGGGTTGAC 470
** * * * * * * * * * *      ** * * * *      ** * * * *      ** * * * *      **** *

AF282249_6_L.lactis      ATTAGTTTACGTTGGTGATGGTTCGTAACAACATGGCAAATTCACCTCATTG 550
LHI421514_8_L.hilgardiiOTC  CTTAACATTTTATGGGTGACGGCCGTAATAACGTTGCTAACTCATTGTTAG 535
AL935253_134_L.plantarumOTC  GTTAGCGTACGTTGGTGATGGTTCGCAATAATATGGCTAACAGTTTACTTG 520
***      *      * * * * * * * * * *      * * * * *      * * * *

AF282249_6_L.lactis      TAACTGGTTCTATGCTTGGCGTGAATGTTTCATATGTTGCTCCTGATTCA 600
LHI421514_8_L.hilgardiiOTC  TTACCGGTGCTATCTTGGGTGTTAACATTCATATGTTGCACCAAAGGCC 585
AL935253_134_L.plantarumOTC  TGGCGGGAGCGATGCTCGGCATCAATATCGCTATCGGGTCCCGGTAGCG 570
* * * * * * * * * *      ** * * * *      ** * * * *      ** * * * *      *

AF282249_6_L.lactis      CTTCATCCTTCTAAAGAAGTTATGGATATTGCAAATAAATTTGCTGAAAA 650
LHI421514_8_L.hilgardiiOTC  TTATTCCAAACAGAGGAAACTCAAAACATTTGCTAAGGGCTTCGCTGAAAA 635
AL935253_134_L.plantarumOTC  TTACAGCCAGCTCCAGCAGTGGTTCGCGTTGGCCCAACAGTATGCGCAGCG 620
*      ** *      * * * * *      ** * * * *      ** * * * *

AF282249_6_L.lactis      ATCAGGTGCTAAACCTCTTGAACCTTCAAATATTGAAGAAGGTGTTAAAG 700
LHI421514_8_L.hilgardiiOTC  ATCAGGTGCCAAACTTGTGATTACCGATGACCTTGATGAAGGACTTAAGG 685
AL935253_134_L.plantarumOTC  AGCTGGGAGCACGGTTCGTGATTACGGCTGATCCGCAACAAGCCGTTACTC 670
* * * * *      *      * * * *      *      * * * *      ** * * * *

AF282249_6_L.lactis      GCGCAAACATTATTTACTCAGATGTTTGGGTATCAATGGGAGAATC---T 747
LHI421514_8_L.hilgardiiOTC  GATCCAACGTTGTTTACACCGATGTGTGGGTATCTATGGGCGAAAG---T 732
AL935253_134_L.plantarumOTC  AGGCTGATGCGCTTTATACGGATGTCTGGGTCTCAATGGGCGCAGGTC 720
*      *      **** * * * * * * * * * *      ** * * * *      **

AF282249_6_L.lactis      AACTGGGAAGAACGTGTTAAACTTTTGACACCATATCGCATCAAAATGGA 797
LHI421514_8_L.hilgardiiOTC  AACTGGGAAGAACGTGTTAAGGAATTGACACCTTACCAAGTTAACAATGGA 782
AL935253_134_L.plantarumOTC  GACTATGGTGAGCGAATCAAGCAACTATTGCCGTTTCAAATTAATACTGC 770
*** * * * * * * * * *      *      ** * * * *      ** * * * *

AF282249_6_L.lactis      TATGTTGAAAATGACAGGAAATGCTGACAACGGTAAACTTATCTTTATGC 847
LHI421514_8_L.hilgardiiOTC  AGCTATGAAGAAGACAGGTACGGCTGACGAC---CAATTAATTTTCATGC 829
    
```


Lactobacillus	TCAACTGATGCCTCAGCAAACGCTCAAATCAAAGCCGTTAAGGAAACGGTTAAACAATTA	113
Oenococcus	TCCAAAGATGCCTCAGCTGAAGCTCAACAGGCAGCTTTACGTGAAACAGCAAAATCGTTA	108
Lactococcus	ACAGATGACCCAACAGCAAAAAGCGCAAGAAAAAGCACTTGAAACAACAGCAGAACAATTA	120
	* ** * **** * ** ** * * * * * * * * * * * * *	
Lactobacillus	GTTGCATTTCGTA AAAACAAGGCGA--CCAAC TCAATTTTCGCATGGTAATGGGCCTCAA	170
Oenococcus	GTCAGTCTGGTAAAAGAAAAATGA--AAAA TTAATTTACTCATGGAAATGGTCCCTCAA	165
Lactococcus	ATTCCCTTATTAGAAATAATGATGTGGAAATGGTTGCTACTCATGGTAACGGACCACAA	180
	* *	
Lactobacillus	GTCGGTAAC TTTGTTGATTCAACAAGCTGCTAGCGATTCTGAAAAGACACCAGCAATGCCA	230
Oenococcus	GTCGGTAATTTGCTATTGCAACAAATGATTGGTAGCACAAAAAGTAATCCTGCAATGCCG	225
Lactococcus	GTCGGAATCTTTTATTGCAACAATTAGCGGCGGATAGTCCTAAAAATCCAGCTATGCCA	240
	***** ** * * * ***** * * * * * * * * *	
Lactobacillus	TTAGATACGGTCGGTGCATGTCACAAGGCGAAATGGTTACTGGATGCAAAATGCTTTT	290
Oenococcus	ATTGATACAGCTGTATCAATGACTGAAGGAAGTATAGGCTACTGGATGCAAAATGCCATG	285
Lactococcus	ATTGATACAGCTGTTGCAATGACTCAAGGACAAATGGATTTTGGATGGGGCAAGCTTTT	300
	* ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * *	
Lactobacillus	AACGAAGTTTTAGCAGAAGAAGGCTTGGCTTTAGAT--GTTGCCACAATCGTAACTCAA	347
Oenococcus	GATGACGTATTGGAAGACGAAGGAATTGATAAAAAGT--GCTGCAACCGTTGTCACACAA	342
Lactococcus	ACAAGAGCTTTGATAAAAAAATAAGATGGAGCGGTTCCAGTTATCTCTGTAGTGAATCGT	360
	* ** *	
Lactobacillus	ACGATTGTTGATGCTAAAAGATGAAGCTTTCCAAAACCCAACGAAACCAATCGGACCTTTC	407
Oenococcus	GTTGAGTGGATGCAAAATGATTTCTGCTTTTCCAAAATCCAAGTAAACCAATTTGGTCCCTTC	402
Lactococcus	ACAGTTGTTGACAAAGATGACTCGGCTTTTGAAAAACCACTAAACCAATCGGTCCATTC	420
	* *	
Lactobacillus	TATAGCGAAGCAGAAGCTAA-GAAACAACAAAGTATCAACCCAGAAGCACACTTTGTGTA	466
Oenococcus	TACGAAAAGGAAGATATTAATAAAAATAAGGGAATTACATCCCGAATATAT-CTACGTGTA	461
Lactococcus	TACGACGAAAAGGGCTTAGCAGAGATGAAAGCTCAGTATCCTGACTGGAC-TTTTGTGTA	479
	** *	
Lactobacillus	AGATGCCGGACGTGGCTGGCGGCGAGTAGTCCCTTCACCACGGCCAATGGTATTCAAGA	526
Oenococcus	GGATGCAGGTCGAGGTTACCGTAGAGTTGTTCCCTTCACCTAACCAAGTTAATGTTAGAGA	521
Lactococcus	AGACTCAGGTCGTGGCTATCGTCGAGTAGTACCAAGTCCTAAACCAACACGTATCGTTGA	539
	** *	
Lactobacillus	AGCACCCGTTATTCAAAAATTAGTTGAAGGTAACGTGATCACGATTTTCAGCCGGCGGCGG	586
Oenococcus	ATATCAAGTCATTAATAGCTTAGTAGACAATAACGTGATTCCAATCTCTGTTGGTGGAGG	581
Lactococcus	AGCCGAAGCAATTAACCAATTGATTTTCATCAAGCGTTTGGTGACTGTATCTGGTGGTGG	599
	* *	
Lactobacillus	TGGTGTGCCAGTTGCGAAAGAAGGCAACAAGCTCCGCGGGGTTGAAGCCGTAATCGATAA	646
Oenococcus	AGGCGTTCCGTCGTTAGAGAAGGAAATCATTGATTGGGTGCGAAGCTGTAATTGATAA	641
Lactococcus	TGGTATTCCTGTCATTGAAACTCAAGAGGGTTATGAAGGAGTTGAAGCTGTTATTGATAA	659
	** *	
Lactobacillus	AGATTTTCGCTTCAGAAAAATTAGCGGAATTAGTGGGTGCAGACATGTTAATTTATTTAAC	706
Oenococcus	AGACTTTGCTTCTGAAAAATTGGCAGAACTTATTAAGCTGATTTATTAATTATTTAAC	701
Lactococcus	AGACTTTTCAGCAGCAAAAGTTGCTGAACCTGTTGAAGCAGATAATCTTTTGTATTTAAC	719
	*** ** *	
Lactobacillus	AGCTGTGGATAACGTCTACGTTAACTTCAACAAGCCAGATCAAAGAAATTAACCAACGT	766
Oenococcus	TGCTGTGATAATGTTTATATTAATTTAATAAGCCGATCAAAGAAATGGAAAAATGT	761
Lactococcus	TGCGGTAGATAATGTTTGTGTTAACTTCAATAAACCTAACCCAGAAAAAACTTGAACAGT	779
	** *	
Lactobacillus	CTCAGTCGCTGAATTAGAAGATTACATCAAAGACGATCAATTCGCTAAAGGCAGCATGTT	826
Oenococcus	AACCGTTGAAGAACTCGAAAATTATATTAATGAAAACCAATTCGCAAAGGGCAGCATGCT	821
Lactococcus	AACAATGGCAGAAATGAAAGCTTATATTAAGAAGGGCAATTTGCCGAGGTTCAATGTT	839
	* *	
Lactobacillus	ACCTAAGATTCAAACCGCAATCGAATACGTTAATAATCGTCTGATAGTAAGGCCATCAT	886
Oenococcus	ACCGAAAGTTCAAGCTGCAATTAATTTTGTGAATAATGGTTGTG--GAGAGGCTGTGGT	878
Lactococcus	ACCAAAAGTAGAAGCAGCAATGGAATTTGT--TACTCGACTGGTCTGCTGCAACAAT	896
	*** ** *	
Lactobacillus	TACTTCCCTTGATAACGTGAAGAATTTATTGGCACATGATGCCGGGACAATTATTACGAA	946
Oenococcus	AACTTCGCTTAAAAATATTAATAACTTTTGGCAAAAAGGTTTCAGGAACGATTATCACAAA	938
Lactococcus	TACCTCTTTGAAAAATCTTGAAGACTTCCTCAACAATGATTCTGGAACAAAGATTATCC	956
	** *	

9. Extracción de DNA adaptado para bacterias lácticas (basado en un protocolo para Listeria)

9.1 Soluciones:

Solucion de lisis: Añadir 2,5 mg de lisozima por ml de solucion (Na₂HPO₄ 0,01 M; sacarosa 20% pH 7) conservar a temperatura ambiente.

CTAB/NaCl (10% CTAB en NaCl 0,7 M): disolver 4,1 g de NaCl en 80 ml de agua y añadir lentamente 10 g de CTAB (hexadecyltrimethyl ammonium bromide) calentando a 65°C con agitacion. La disolucion es larga (aprox. 1 hora). Ajustar el volumen a 100 ml. Conservar la solución a temperatura ambiente. El CTAB precipita los polisacaridos.

SSC (sodium chloride / sodium citrate):

3 M NaCl (175 g/l)

0,3 M Na citrato. 2 H₂O (88 g/l)

ajustar el pH a 7 con 1 M HCl.

9.2 Lisis:

- Centrifugar 5 minutos a 12000 rpm un cultivo de 5 – 10 ml. Descartar el sobrenadante.
- Resuspender el pellet en 500 µl de 0,1x SSC y centrifugar 5 minutos a 12000 rpm. Descartar el sobrenadante y resuspender el pellet en 60 µl de solucion de lisis. Con algunos vortex suaves
- Incubar 1 hora a 37°C.

9.3 Eliminacion de proteínas:

- añadir 567 µl de TE pH 7,5, 30 µl de SDS 10% y 3 µl de una solución acuosa de proteinasa K de 20 mg/ml (conservada a – 20°C). Vortexar e incubar 1 hora a 37°C. La solución se ha de ver viscosa.
- Añadir 100 µl de NaCl 5M y vortexar.
- Añadir 80 µl de CTAB/NaCl . Vortexar (la solución se convierte en blanquecina), incubar 10 minutos a 65°C dentro de un baño seco. La solución se ha de poner mas clara.
- Añadir 750 µl de una mezcla de cloroformo/ alcohol isoamilico (24:1 v/v). Mezclar vigorosamente. Centrifugar 5 minutos a 12000 rpm. Recoger la fase superior y trasvasar a un tubo limpio. Evitar arrastras impuresas de la interfase.
- Repetir el paso anterior con fenol/cloroformo/alcohol isoamilico (25:24:1 v/v)

9.4 Precipitación del DNA:

- Añadir un volumen (0,7 volumen minimo) de isopropanol. Mezclar por inversion hasta la aparición de un precipitado blanco.
- Centrifugar 15 minutos a 12000 rpm, eliminar el sobrenadante.
- Añadir 1 ml de etanol al 70% frio. Centrifugar 5 minutos a 12000 rpm. descartar el sobrenadante.
- Añadir 100 µl de TE con RNasa (50 µg/ml) y dejar incubar toda la noche a 4°C.

- resuspender vortexando suavemente o pipeteando la solución.

10. Extracción de RNA a partir de células de bacterias lácticas (adaptado de Chomczynski, P and Sacchi, N., Analytical Biochem. 162:156-159, 1987. Información añadida de Katze Lab Protocols (<http://depts.washington.edu/katzelab/>))

Todas las soluciones y materiales tiene que ser RNAsa free (tratamiento con DEPC/ lavado con SDS)

10.1 Reactivos:

- **Solución 2DX**

Guanidina tiocianato 8M
Citrato de sodio pH 7, 50 mM
Sarcosyl (N-lauroyl sarcosine) 1%
2-mercaptoetanol 0,2M
Acetato de sodio 2M
Ajustar a pH 4 con ácido acético, y autoclave

- **Otros reactivos requeridos:**

2% sodio dodecyl sulfato , pH 8 y autoclave
2M acetato de sodio (filtrar) pH 4
fenol saturado con agua (fischer scientific, pH4)
Cloroformo-alcohol isoamilico (49:1)
99% isopropanol
75% etanol
0,5% SDS (hacer dilución previa del stock al 2%)
agua DEPC (1 litro)

10.2 Lisis

- Centrifugar 10 ml de suspensión bacteriana, 10 minutos a 7000 rpm a 4°C,
- Congelar inmediatamente el pellet con nitrógeno líquido.
- Mantener el pellet en hielo y añadir 1 ml de una solución de lisis (sacarosa al 25% conteniendo 30 mg/ml de Lizosima). Usar una solución fresca.
- Incubar a 37°C por 15 minutos.
- añadir 1 ml de 2% SDS y mezclar. La solución debe estar clara, si no calentar a 65°C durante 30 segundos o 1 minuto.

10.3 Desnaturalización de proteínas

- añadir 2 ml de solución D 2x. (Se verá la solución turbulenta) y mezclar apropiadamente.
- añadir secuencialmente:
 - 0.2 ml de acetato de sodio 2M pH4
 - 2 ml fenol
 - 0.4 ml cloroformo alcohol isoamilico (49:1)

- agitar por 10 segundos
- Incubar en hielo por 15 minutos
- Centrifugar (10000 rpm, 4°C por 20 minutos)
- Transvasar la fase acuosa a un nuevo tubo

10.4 Precipitación del RNA

- añadir 1 volumen de isopropanol y mezclar
- incubar a -20°C por 1 hora la menos (o toda la noche) para precipitar el RNA
- centrifugar (10000 rpm, 4°C por 20 minutos)
- resuspender el pellet en 75% de etanol frio
- centrifugar (10000 rpm, 4°C por 20 minutos)
- remover el etanol y dejar el pellet secar a temperatura ambiente por no mas de 10 min
- disolver el RNA en 100 microlitros de agua o formamida (ud puede coonsiuderar usando un inhibidor de Rnasa)

10.5 Cuantificación de RNA total:

Hacer dilucion 1:50 o 1:100 en agua DEPC, de la muestra de RNA en un volumen final de 300 ul. En una cubeta de cuarzo medir la concentración de la muestra

En el espectro:

- Cargar protocolo de escaneo de 3 absorbacias
- Protocolo DNA/RNA
- Hacer Blanco con agua DEPC
- Hacer lectura
- Hacer la relacion de la absorbancia entre 260/280, 260/240, 260/220.
- Calcular la concertación de RNA: $260 * 40 \text{ ug/ml} * \text{Factor dilución (50 ó 100)}$

10.6 Gel de RNA

- Limpiar la cubeta de electroforesis con SDS al 1%, lavar con agua destilada, llenar con agua oxigenada dejarla 10 min, y lavar con agua destilada y dejarla secar
- Preparar un gel de 0,8% agarosa disuelto en TBE 1X (dilución desde el stock de 10X con agua DEPC), calentar hasta dilución en el microondas y luego dejar enfriar a temperatura de 45° C y añadir 5 ul del stock de Bromuro de Etidio que hay en la campana (conctración de 0,5 ug/ml de bromuro de etidio) y servir en la cubeta.
- Para cargar el gel se necesitan cerca de 1 a 2 ug/ul por carril o cargar directamente 5 ul de la mestra en el carril con tampón de carga.

1800 ug/ul = 1,8 ug/ul cargar mas o menos 2 ul

550 ug/ul = 0,55 ug/ul cargar 4 ul

10.7 RT-PCR (cADN)

El RNA total es retrotranscrito con el kit TaqMan Reverse Transcription Reagents (Applied Biosystems Technology, USA). Se sigue el protocolo dado por la casa comercial y tal como esta descrito en la tabla 11. Se usa 10 ng/ μ l del RNA total como template en un volumen de reacción de 20 μ l.

Tabla 11. Kit Taqman reverse transcription reagent (Appleid Biosystems technology, usa).

Reactivos	Cantidades
Agua DEPC	7,7 – μ l de RNA *
Taqman RT buffer	2
MgCl ₂ 25 mM	4,4
dNTP's	4,0
Hexameros inespecificos	1,0
Inhibidor RNAsa	0,4
Transcriptor multiescribe Tm reversa	0,5
Volumen total	20 μ l

- Mezclar en un eppendorf todos los reactivos menos las enzimas (Transcriptasa inversa, inhibidor RNAsa)
- Mezclar con vortex
- Añadir las enzimas
- Mezclar por inversion
- De esta mezcla colocar 12,3 menos la cantidad en RNA
- Colocar la muestra de RNA
- Hacer un pulso en la centrifuga
- Transferir los tubos al termociclario y se hace la RT

Condiciones de la RT: GenAmp PCR System 2400

- Incubación, 25° C, / 10 min,
- Trancripcion 48° C/ 30 min,
- Inactivacion de transcripasa inversa: 95°C / 5 min
- * Volumen de RNA , diluir en agua DEPC, hasta 10 ng/ μ l de RNA.

Las muestras de cDNA resultantes se pueden conservar entre -20°C y 4°C

10.8 PCRQ:

10.8.1 Equipo: PCRq 7300

10.8.2 Diseño de primers:

Generalmente se diseñan con programas como primerExpress™ (versión 3, ABI PRISM™, Applied Biosystems), ó primo3 que incorpora una serie de parámetros y normas que han de cumplir los primers compatibles con la PCR cuantitativa,

aparte de los señalados en la tabla 9, los parámetros que han de cumplir los primer son:

1. Tm entre 58 i 60°C
2. Longitud óptima: 20 pb
3. Diferencia de Tm de los dos primers inferior a 2°C.
4. No más de 3 bases iguales juntas.
5. o mas de 2 G juntas para evitar dímero de primers. Si hay dímeros que impliquen A y T no hay problema, porque se disocian a 60°C.
6. Más A/T que C/G a las últimas cinco bases del extremo 3'

10.8.3 Diseño de la placa de muestras:

Hay una serie de muestra a cargar en la placa definidas como:

- UNKN (*Unknown*) = muestra con cDNA a determinar.
- NTC (*No Template Control*): tiene agua en vez de cDNA.
- STD (*Standard*): tiene una cantidad conocida de copias de cDNA o ng de RNA total.
- NAC (*No Amplification Control*): no tiene cDNA pero sí DNA genómico (muestra sin RT).

10.8.4 Condiciones de termociclación:

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

10.8.5 Reactivos:

SYBR-Green I master mix

Tabla 12. Mix de reaccion para la PCRq

Reactivos	Cantidades (µl)
SYBR-Green I (2x)	12,5
Primer F (0,3 uM)	1
Primer R (0,3 uM)	1
Muestra cDNA (2 ng/ul)*	5,0
Agua MilliQ	5,5
Volumen final	25

- Se prepara el mix de primers con el agua, suficiente para analizar las muestras por triplicado.
- Primero en la placa se sirve el sybr-green, los 12,5 ul en cada pozo de la placa, el SYBR-Green es muy espeso y requiere pipetearlo de manera positiva.
- Después se colocan la mezcla de los primers
- Se coloca el agua en los pozos de NTC

- Se colocan el resto de las muestras.
- Los triplicados se colocan al lado uno del otro para asegurar la repetición

El cDNA* obtenido en la RT, 10ng/ul, se diluye en el mismo eppendorf de PCR hasta una concentración de 2 ng/ul.

El DNA que se espera amplificado se cuantifica simultáneamente con el aumento de señal fluorescente emitido por el SYBR-green I, que se intercala específicamente al DNA de doble cadena

10.8.6 Recta patrón (estándar):

DNA o cDNA de microorganismo en estudio, a concentraciones conocidas.

Concentraciones orientativas: 40 - 4 - 0,4 – 0,04-0,004 ng/ul

$$C_1 * 5 \text{ ul} = C_2 * 25 \text{ ul}$$

Tabla 13. concentración de los estándares para la curva de calibrado

C₁ ng/ul	C₂ ng/ul	Ng totales
200	40	1000
20	4	100
2	0,4	10
0,2	0,04	1
0,02	0,004	0,1

Se debe definir una recta patrón sobre la que se evaluara la expresión del gen que se busca, generalmente se hace contra un gen constitutivo. Lo ideal es que cada concentración de la curva salga cada tres ciclos de la anterior.

Condiciones a tener en cuenta:

- Concentración del gen constitutivo
- Concentración de los genes de estudio: amplicon sea constante en la misma muestra a diferentes concentraciones.
- Concentraciones de primer, entre mas baja se reduce ruido de fondo
- Concentración de cDNA, ideal que caiga dentro de la recta patrón
- La pendiente de recta estándar, debería dar $-3,23$
- Las concentraciones de primer entre mas bajas menos interferencias en señal, y mejor CT. Concentración estándar general es de de $0,3\mu\text{M}$.
- Tm: $58-60^\circ$
- Volumen final: 25 ul

Tabla 14. Plantilla para llenar la placa

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	16s 40	16s 40	16s 40									
B	16s 4	16s 4	16s 4									
C	16s 0,4	16s 0,4	16s0,4									
D	16s0,04	16s0,04	16s0,04									
E	16s0,00 4	16s0,00 4	16s0,00 4									
F	16s NAC	16s1 NAC	16s1 NAC									
G	16s NTC	16s NTC	16s NTC									
H												

10.8.7 Cuantificación: expresión relativa método comparación de ciclo umbral. $2^{-\Delta\Delta C_T}$

La cantidad de gen problema, normalizado al gen endogeno y relativo a una muestra calibrador esta dado por la formula $2^{-\Delta\Delta C_T}$

$$\text{Donde } \Delta\Delta C_T = \Delta C_T \text{ muestra problema} - \Delta C_T \text{ muestra calibradora}$$

$$\Delta C_T \text{ muestra} = C_T \text{ gen problema} - C_T \text{ gen endogeno}$$

Para que la $\Delta\Delta C_T$ sea valida, la eficiencia del amplificado problema y la eficiencia del amplificado de referencia deberia ser aproximadamente igual. El metodo sensible para asegurar que dos amplicones tiene la misma eficiencia es a través de la variación del ΔC_T en diferentes diluciones, en una curva estandar. La grafica logaritmica de cantidades de RNA vrs ΔC_T deberia tener una pendiente aproximada a cero si la eficiencia de los dos amplicones son aproximadamente iguales.

Muestras tomadas		Definición
0h	3,6 0% alcohol	Calibradora
6h	3,6 0% alcohol	Problema
24h	3,6 0% alcohol	Problema
0h	3,6 5% alcohol	Problema
6h	3,6 5% alcohol	Problema
24h	3,6 5% alcohol	Problema
0h	3,6 10% alcohol	Problema
6h	3,6 10% alcohol	Problema
24h	3,6 10% alcohol	Problema
0h	4,5 0% alcohol	Calibradora
6h	4,5 0% alcohol	Problema
24h	4,5 0% alcohol	Problema
0h	4,5 5% alcohol	Problema
6h	4,5 5% alcohol	Problema
24h	4,5 5% alcohol	Problema
0h	4,5 10% alcohol	Problema
6h	4,5 10% alcohol	Problema
24h	4,5 10% alcohol	Problema

Estas muestras fueron tomadas tanto para *L.brevis* 3824 y para *P.pentosaceus* 4214.

10.8.7.1 Validación del método:

Cebadores para *L. brevis*:

c DNA	<i>arcA</i>			media CT	DCT	log cantidad
1000	9,37682	9,38997	9,40245	9,38974667	1,51417	3,206868313
100	13,0262	13,0971	15,8296	13,9843	2,44213333	
10	16,3955	16,7398	16,4297	16,5216667	1,32116667	1,005658436
1	19,807	19,8886	20	19,8985333	1,2696	-0,036584362
0,1	23,1317	23,1527	23,2854	23,1899333	1,26293333	-1,05244856
NTC	35,5656	36,4614	33,7984	35,2751333	0,27933333	-4,78244856

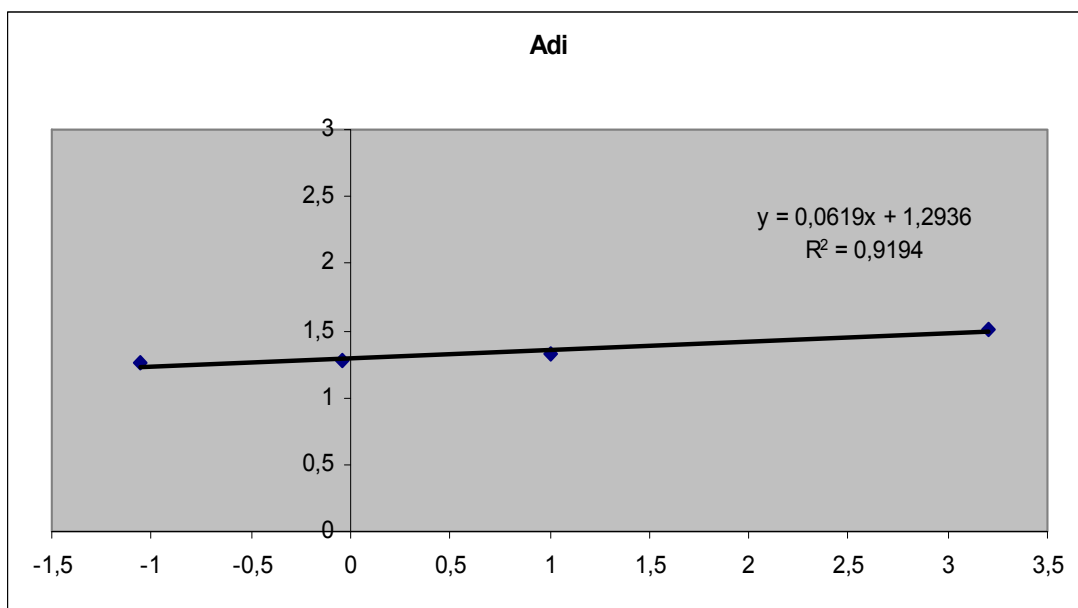
Anexos

arcB				CT	DCT	log cantid
c DNA						
1000	8,82165	8,82375	8,85254	8,83264667	0,95707	3,412049462
100	12,3664	12,5426	12,3997	12,4362333	0,89406667	2,249602151
10	15,8648	16,0575	16	15,9741	0,7736	1,108354839
1	19,4933	19,6374	19,5021	19,5442667	0,91533333	-0,043311828
0,1	22,7947	22,5578	23,0041	22,7855333	0,85853333	-1,08888172
NTC	36,0557	Undetermined	Undetermined			

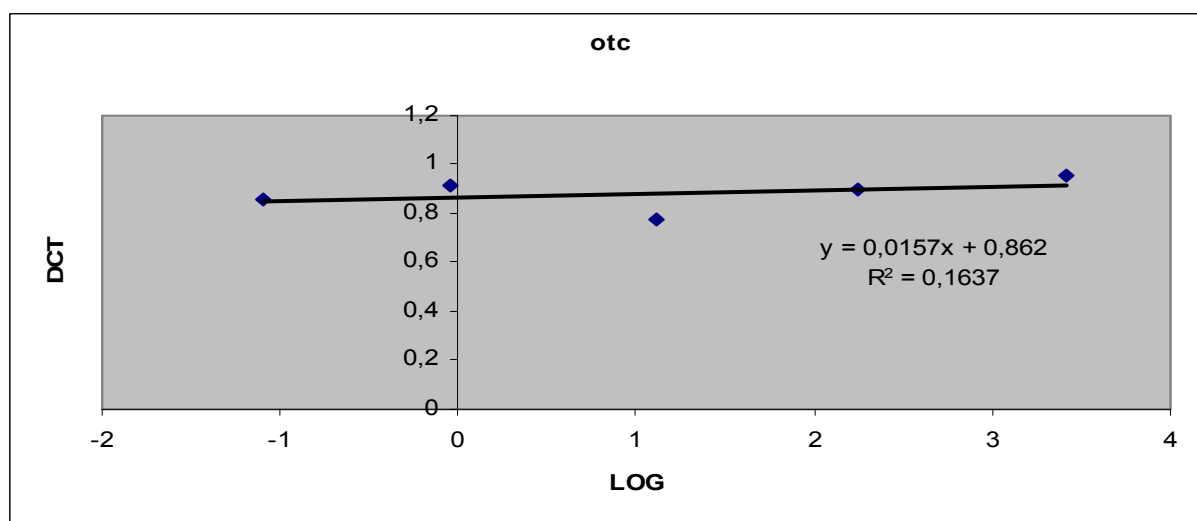
arcC				CT	DCT	log canti
c DNA						
1000	11	9,40134	10,2258	10,2090467	2,33347	
100	12,6835	12,8434	13,1406	12,8891667	1,347	2,128302846
10	16,0687	16,233	16,3939	16,2318667	1,03136667	1,109186992
1	19,6536	19,759	20,4969	19,9698333	1,3409	-0,030436992
0,1	23,2875	23,7501	23,0673	23,3683	1,4413	-1,066554878
NTC	36,1849	35,7287	34,0477			

16s				CT	DCT	log cantid
c DNA						
1000	8,01946	7,83764	7,76963	7,87557667		3,366297725
100	11,6176	11,6956	11,3133	11,5421667		2,278288823
10	15,3272	15,169	15,1053	15,2005		1,19272997
1	18,6357	18,6733	18,5778	18,6289333		0,175390702
0,1	22	21,9072	21,8738	21,927		-0,803264095
NTC	35,7168	34,005	35,2656	34,9958		-4,681246291

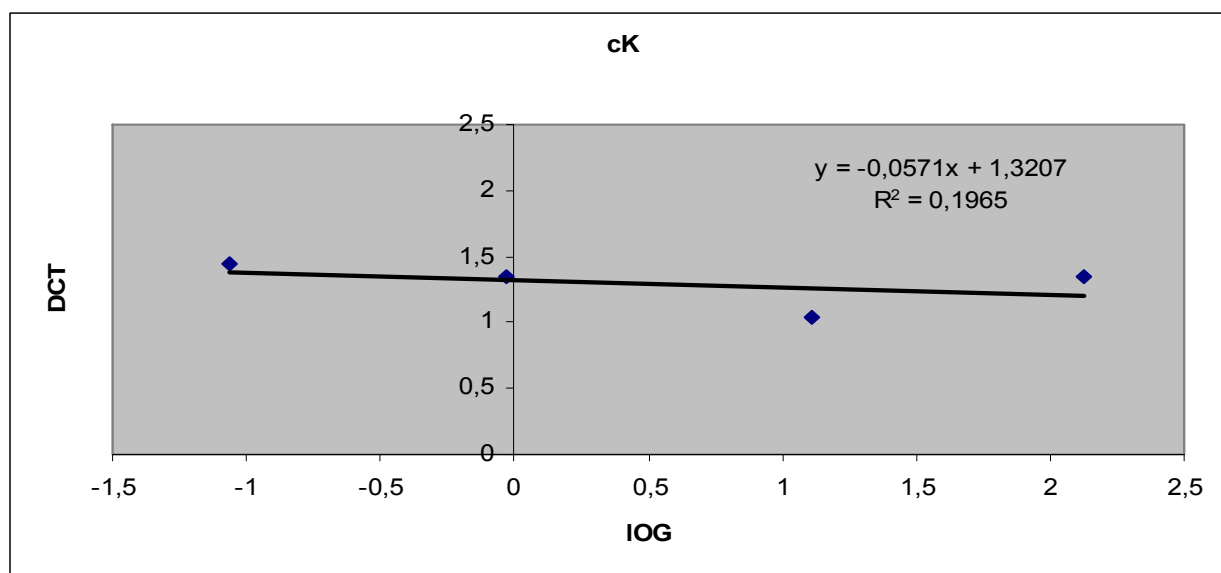
Gráfica para ADI:



Gráfica para OTC:



Gráfica para CK:



Cebadores para *P. pentosaceus*

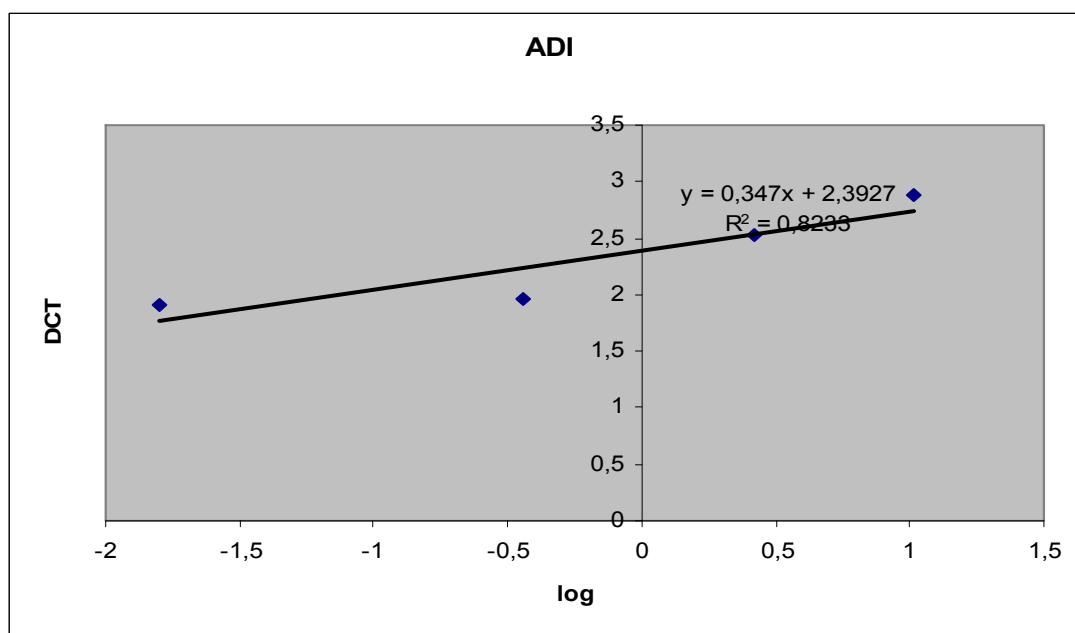
		arcA			media CT	DCT	log cantidad
c DNA							
1000	17,5442	18	18,6994	18,0812	2,88453333	1,018148148	
100	20,1254	19,9253	20,0486	20,0331	2,5291	0,415709877	
10	22,7046	22,888	22,8323	22,8083	1,9651	-0,440833333	
1	27,1588	27,414	27,0224	27,1984	1,91366667	-1,795802469	
					-		
0,1	32,5918	33,261	33,0288	32,9605333	0,12756667	-3,574238683	
NTC							

		arcB			CT	DCT	log cantid
c DNA							
1000	18,1399	18,1424	18	18,0941	2,89743333	1,753516129	
100	19,4748	19,7539	19,8131	19,6806	2,1766	1,241741935	
10	22,6558	22,7739	22,6232	22,6843	1,8411	0,272806452	
1	27,1588	27,8357	27,2498	27,4147667	2,13003333	-1,253150538	
0,1	37,4792	Undetermined	34,8676	36,1734	3,0853	-4,078516129	
NTC							

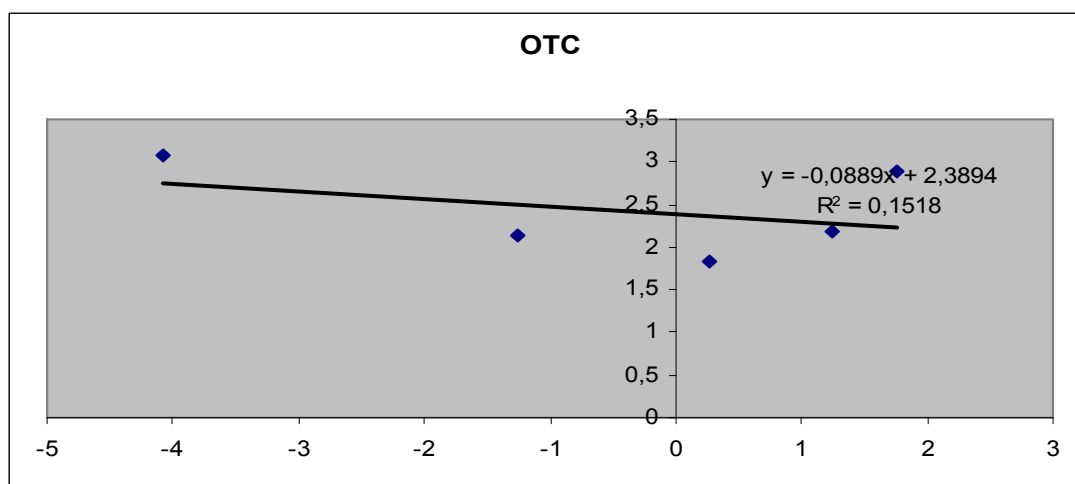
		arcC			CT	DCT	log canti
c DNA							
1000	21,1009			21,1009	5,90423333	0,734481707	
100	21,3303	22	22,2175	21,8492667	4,34526667	0,506321138	
10	24,8076	24,1506	24,415	24,4577333	3,61453333	-0,288943089	
1	29,133	29,306	28,5432	28,9940667	3,70933333	-1,671971545	
0,1	38,855	37,2168	Undetermined	38,0359	4,9478	-4,428628049	
NTC							

		16s			CT	DCT	log cantid
c DNA							
1000	15,1825	15,3602	15,0473	15,1966667		1,193867458	
100	17,6288	17,4391	17,4441	17,504		0,509198813	
10	20,6898	20,8398	21	20,8432		-0,481661721	
1	25,2529	25,205	25,3963	25,2847333		-1,799624135	
0,1	32,4083	33,0806	33,7754	33,0881		-4,115163205	
NTC							

Gráfica para ADI:



Gráfica para OTC:



Gráfica para CK:

