

TRABAJO FIN DE GRADO

BIOLOGÍA

**Caracterización genética y fenotípica de cepas *Oenococcus oeni*
aisladas de sidras asturianas**



Belén García Fernández

Área de Microbiología

S.E.R.I.D.A.

Julio 2013



**UNIVERSIDAD DE OVIEDO
FACULTAD DE BIOLOGÍA**



Resumen

Durante la elaboración de la sidra ocurren dos procesos bioquímicos de manera simultánea: la fermentación alcohólica y la fermentación maloláctica.

En la fermentación alcohólica se produce la transformación de los azúcares presentes en el mosto, en un gran número de componentes bioquímicos (etanol y gas carbónico, principalmente). Por otro lado, la fermentación maloláctica consiste en la conversión de ácido L-málico en ácido L-láctico y dióxido de carbono, como consecuencia del metabolismo de las bacterias lácticas. En este sentido, dentro del grupo de bacterias lácticas, la especie *Oenococcus oeni* ha sido descrita como la principal responsable de esta última transformación.

La utilización de cultivos iniciadores *O. oeni* autóctonos, es una buena estrategia a la hora de controlar la transformación del ácido málico, si bien, se debe considerar que dentro de esta especie hay características cepa-dependientes que pueden influir negativamente en la calidad del producto final. Entre estas características cabe destacar la producción de exopolisacáridos, que provocan el conocido “ahilado o filado” de la sidra, y la producción de aminas biógenas, compuestos tóxicos para la salud.

Las actividades experimentales realizadas en un total de 124 cepas *O. oeni*, pretenden hacer una selección de posibles inóculos iniciadores de la fermentación maloláctica. La producción de exopolisacáridos y de aminas biógenas fue evaluada con el fin de descartar cepas productoras de dichos compuestos. De las 124 cepas analizadas, el 23,4% fueron descartadas como posibles iniciadores de la fermentación maloláctica. Principalmente se detectaron cepas productoras de exopolisacáridos, siendo descartada de la selección una única cepa por la producción de aminas biógenas.

Abstract

During the production of cider two biochemical processes take place at the same time: alcoholic fermentation and malolactic fermentation.

In the alcoholic fermentation the sugar present in the juice is transformed into a great number of biochemical components (ethanol and carbonic gas, mainly). On the other hand, malolactic fermentation consists in the conversion of L-malic acid into L-lactic acid and carbon dioxide as a consequence of the metabolism of lactic bacteria. In this sense, within the group of lactic bacteria, the *Oenococcus oeni* species has been described as the main responsible one for this last transformation.

The use of autochthonous *O. oeni* starters is a good strategy to control the transformation of the malic acid, although it has to be taken into account that within this species, there are strain-dependent characteristics that can negatively influence the quality of the final product. Among these characteristics we can point out: the production of exopolysaccharide, that cause the phenomenon known as “filado” in cider and the production of biogenic amine, which are toxic compounds for our health.

The experimental activities carried out on the total amount of 124 isolated *O. oeni*, try to select the possible starters of malolactic fermentation. The production of exopolysaccharide and biogenic amine was evaluated with the aim of eliminating strains that produce such compounds. Of the 124 isolated *O. oeni* that were analysed, 23.4% were eliminated as possible malolactic fermentation starters. Mainly isolated *O. oeni* that produce exopolysaccharide were detected whereas, only one strain was eliminated from the selection for producing biogenic amine.

Índice

1) Introducción.....	4
1.1) Microbiota responsable de la transformación del mosto en zumo de manzana.....	4
1.2) Bacterias lácticas, protagonistas en la elaboración de la sidra.....	5
1.3) Cultivos iniciadores de bacterias lácticas.....	6
1.4) Compuestos tóxicos para la salud humana asociados con la presencia de bacterias lácticas.....	7
1.5) Aminas biógenas en bebidas fermentadas.....	8
1.6) Métodos de detección de bacterias lácticas productoras de aminas biógenas.....	9
1.7) Alteraciones de la sidra asociadas con la presencia de bacterias lácticas.....	11
1.8) Producción de exopolisacáridos por parte de bacterias lácticas.....	12
1.9) Métodos de detección de bacterias lácticas productoras de exopolisacáridos.....	13
1.10) Objetivos.....	14
2) Materiales y métodos.....	15
2.1) Microorganismos.....	15
2.2) Medios de cultivo.....	15
2.2.1) MRS-suplementado.....	15
2.2.2) Actividad ornitina, histidina, arginina, lisina, tirosina y fenilalanina descarboxilasa.....	15
2.2.3) Producción de exopolisacáridos.....	16
2.3) Obtención de cultivos celulares y conservación de muestras.....	16
2.4) Detección de bacterias lácticas productoras de aminas biógenas.....	16
2.5) Confirmación de la autenticidad de las cepas productoras de aminas biógenas..	16
2.6) Detección de exopolisacáridos.....	17
3) Resultados y discusión.....	19
3.1) Bacterias lácticas productoras de aminas biógenas.....	19
3.2) Bacterias lácticas productoras de exopolisacáridos.....	22
4) Conclusiones.....	24
5) Bibliografía.....	25

1) Introducción

1.1) Microbiota responsable de la transformación del mosto de manzana en sidra.

La elaboración de sidra en Asturias continúa siendo un proceso espontáneo en el que distintos grupos microbianos (levaduras, bacterias lácticas y acéticas) compiten entre sí. Durante dicha transformación se pueden distinguir dos etapas: fermentación y maduración.

Fermentación: En esta primera fase se producen una sucesión de transformaciones bioquímicas, de los componentes del mosto, en las que participan tanto levaduras como bacterias. Estos microorganismos realizan dos procesos fundamentales:

- *La fermentación alcohólica:* Proceso bioquímico que transforma los azúcares presentes en el mosto de manzana (fructosa, glucosa y sacarosa) en un gran número de componentes bioquímicos entre los que destacan, por su importancia cuantitativa, el etanol y el gas carbónico. El grupo de microorganismos responsable de esta fermentación son levaduras principalmente del género *Saccharomyces*.

El seguimiento de la fermentación alcohólica se puede realizar mediante el control de la densidad. A través de este registro se evalúa la velocidad fermentativa (g/l de azúcar consumido/día) y se detecta el final de la fermentación que, en el caso de la sidra, se produce cuando la densidad es inferior a 1.000 g/l.

- *La fermentación maloláctica (FML):* Proceso bioquímico consistente en la conversión del ácido L-málico, mayoritario en el mosto de manzana, en ácido L-láctico y dióxido de carbono. Generalmente la transformación maloláctica transcurre de manera simultánea a la fermentación alcohólica como consecuencia del metabolismo de las bacterias lácticas (BAL) (Cabranes y col., 1991; Dueñas y col., 1994). Como resultado se producen importantes cambios sensoriales en la sidra, se reduce la acidez fija generando un ligero incremento del pH y se promueve un aumento de determinados componentes volátiles, principalmente: ácidos, ésteres y alcoholes. Además, este proceso contribuye a estabilizar biológicamente la sidra.

El seguimiento de esta etapa se puede realizar, de forma semi-cuantitativa, mediante cromatografía de papel de los ácidos málico y láctico.

A lo largo del proceso fermentativo se debe proceder al rellenado de los toneles y al final del proceso puede ser conveniente efectuar un trasiego. Este proceso tiene por objeto separar las borras de fermentación de la sidra, a fin de garantizar una adecuada estabilidad físico-química y microbiológica de ésta.

Maduración: En esta etapa la sidra permanece almacenada en el tonel experimentando una notable evolución sensorial. Los microorganismos mejor adaptados a las condiciones post-fermentativas son las BAL y determinadas levaduras no-*Saccharomyces*, mientras que, las bacterias acéticas al ser microorganismos aerófilos tienen mayor dificultad para desarrollarse. Con carácter general, en esta etapa se observa un incremento del contenido de la acidez volátil.

Como consecuencia, es necesario efectuar registros periódicos de dicha acidez con el objeto de conocer el grado de acetificación de la sidra; de este modo, se podrán realizar las correcciones oportunas en caso de detectar alteraciones microbianas importantes que puedan limitar la calidad del producto.

Finalmente, cuando las cualidades aromático-gustativas y de turbidez del producto así lo aconsejen, se procede al embotellado de la sidra para su posterior consumo. Para tal fin, se aconseja que la densidad sea inferior a 1.000 g/l y la acidez volátil próxima a 1,5g/l.

1.2) Bacterias lácticas, protagonistas en la elaboración de sidra

El nombre de bacterias lácticas engloba un conjunto de microorganismos de una gran diversidad morfológica y fisiológica. Son bacterias Gram-positivas, en forma de cocos, bacilos o coco-bacilos, inmóviles, no esporuladas, anaerobias aerotolerantes, catalasa negativas y desprovistas de citocromos. Las BAL presentan un metabolismo estrictamente fermentativo, sintetizando ácido láctico como principal producto de la fermentación de los carbohidratos (Axelsson, 2004).

Para la identificación de las BAL se pueden utilizar métodos clásicos (basados en características fenotípicas) y/o técnicas de biología molecular (basadas en características genotípicas).

Los métodos basados en características fenotípicas incluyen en primer lugar la observación microscópica de la morfología celular de las bacterias y la producción de gas a partir de la fermentación de la glucosa (carácter homo o heterofermentativo). También se realizan pruebas como: producción de amonio a partir de arginina, determinación de la naturaleza del isómero del ácido láctico obtenido a partir de la glucosa y del patrón de fermentación de los carbohidratos, así como diversos ensayos fisiológicos (crecimiento a diferentes pH y temperaturas, tolerancia al etanol).

Por otra parte, en los últimos años se han desarrollado una gran variedad de técnicas de caracterización genotípica de bacterias. Entre las técnicas más utilizadas para la identificación de BAL en sidra y vino destacan: la secuenciación de genes ribosomales (Werning y col., 2006; Ibarburu y col., 2007), el análisis de restricción de los productos de amplificación del ADNr 16S (Rodas y col., 2003) y del gen *rpoB* (Claisse y col.,

2007), y PCR específicas de especie (Zapparoli y col., 1998; Pfannebecker y Fröhlich, 2008; Torriani y col., 2001; Suzuki y col., 2004; Berthier y Erlich, 1998; Guarneri y col. 2001).

Las investigaciones realizadas en Asturias han evidenciado que las BAL presentes en sidras son mayoritariamente heterofermentativas (Salih y col., 1990; Cabranes, 1994), siendo la especie más abundante *Leuconostoc oenos*, actualmente denominada *Oenococcus oeni* (Dicks y col., 1995). Además, se ha detectado la presencia de otras BAL como *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus plantarum*, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum*, *Leuconostoc paramesenteroides* (actualmente *Weissella paramesenteroides*) y especies del género *Pediococcus*. Recientemente, la identificación mediante secuenciación del ADN 16S de una cepa de origen sidrero, clasificada mediante métodos clásicos como *O. oeni*, ha puesto de manifiesto la presencia de cepas *Lactobacillus hilgardii* en sidras (Herrero y col., 2006).

La importancia de las bacterias lácticas en la elaboración de la sidra y otras bebidas alcohólicas es doble (Irastorza-Iribas y Dueñas-Chasco, 2010). Por una parte, ejercen un efecto beneficioso puesto que son las responsables de la fermentación maloláctica y, por otro lado, pueden tener consecuencias negativas debido a su capacidad para ocasionar alteraciones y producir metabolitos que disminuyen la calidad de la bebida, tales como la acetificación (Dueñas y col., 1994), la producción de amargor (Garai-lbabe y col., 2008), de aminos biógenos y/o de exopolisacáridos (Dueñas y col., 1995). Si bien es una técnica habitual que la fermentación maloláctica se produzca por la actividad de la microbiota indígena, se han realizado experiencias con el fin de desarrollar cultivos iniciadores malolácticos, constituidos fundamentalmente por cepas *O. oeni*. Esta tecnología permite controlar y seleccionar la cepa responsable de la fermentación maloláctica con el fin de asegurar y mejorar la calidad del producto final, reduciendo la producción de compuestos tóxicos para la salud humana y el riesgo de alteraciones organolépticas (Cabranes y col., 1998; Herrero y col., 1999).

1.3) Cultivos iniciadores de bacterias lácticas

Se definen como preparaciones que contienen una o varias cepas de microorganismos seleccionados que se utilizan con el objetivo de iniciar una fermentación (González y col., 2005).

La mejor alternativa para conseguir un cultivo iniciador que lleve a cabo el proceso de fermentación, sin perder características, es la utilización de cepas indígenas que participen en la elaboración de los productos tradicionales de forma espontánea (Leroy y De Vuyst, 2004). Para dicho fin, en el vino se han definido algunos criterios de

selección (Buckenhüskes, 1993). En general no hay una metodología universal, cada grupo de investigación define sus propias estrategias entre las que suelen incluirse:

- 1) Aislar microorganismos del producto que se quiere elaborar.
- 2) Realizar una identificación taxonómica de los microorganismos.
- 3) Evaluar la capacidad de las cepas a adaptarse a los diferentes factores de estrés que se producen durante la elaboración del producto (resistencia a pH bajo, resistencia al etanol, tolerancia a temperaturas bajas, etc).
- 4) Evaluar el comportamiento metabólico de las cepas una vez inoculadas tanto en medios sintéticos como en el propio medio de fermentación. Determinando la influencia que las diferentes cepas ejercen sobre la calidad organoléptica del producto final (cinética de degradación del ácido málico, viabilidad de los cultivos, formación de aminas, producción de alteraciones, resistencia a dióxido de azufre, etc).
- 5) Tipificar molecularmente las cepas a utilizar como inóculos de forma que puedan ser diferenciadas, inequívocamente, de las cepas autóctonas presentes en el medio.
- 6) Realizar ensayos en condiciones semi-industriales y evaluar tanto la calidad organoléptica de los productos como el grado de implantación de la cepa inoculada.

1.4) Compuestos tóxicos para la salud humana asociados con la presencia de bacterias lácticas

La seguridad de un alimento o bebida depende de que se apliquen las medidas necesarias para garantizar su inocuidad desde el origen de la materia prima hasta su consumo. Durante la elaboración de sidra, por la actividad de las BAL, pueden generarse sustancias nocivas para la salud humana entre las que cabe destacar el carbamato de etilo (CE) y las aminas biógenas (BA).

El CE o uretano es un éster del ácido carbámico resultante de la reacción de esterificación de éste con el alcohol etílico, descrito como cancerígeno por Mirvish y col. en 1698. El CE se sintetiza de manera espontánea en alimentos y bebidas fermentados como pan, yogurt, vino, cerveza y, especialmente, en aquellos que se han sometido a un calentamiento como las bebidas destiladas. La formación de CE depende de la presencia de sus precursores entre los que se encuentran la urea formada por la vía arginasa de las levaduras, y los metabolitos producidos durante la degradación de la arginina vía arginina-deiminasa (ADI) por acción de las BAL. En este sentido, se ha observado una gran variabilidad en la capacidad de degradación de la arginina por cepas *O. oeni* y de otras especies como *Lactobacillus*, *Pediococcus*

y *Leuconostoc*, siendo dicha actividad cepa-dependiente (Mira de Orduña y col., 2000; 2001).

Las BA son compuestos orgánicos de bajo peso molecular producidos por la descarboxilación de los correspondientes aminoácidos precursores. Pueden ocasionar intoxicaciones generalmente asociadas al consumo de alimentos fermentados en los que intervienen BAL como el queso, el vino, la sidra, los embutidos, etc (Shalaby, 1996; Silla, 1996). En las bebidas alcohólicas han recibido una mayor atención, debido a que el etanol puede aumentar el efecto sobre la salud inhibiendo indirecta o directamente las enzimas encargadas de la detoxificación de estos compuestos. El organismo humano tolera fácilmente concentraciones bajas de BA, ya que éstas son eficientemente degradadas por las enzimas mono- y diaminoxidasas en el tracto intestinal. Aunque existen diferentes susceptibilidades individuales a la intoxicación por aminas, se considera que tras la ingestión de cantidades excesivas de las mismas, se pueden iniciar varias reacciones farmacológicas. En este sentido, se han descrito los siguientes síntomas: sarpullido, edema, dolores de cabeza, hipo e hipertensión, vómitos, palpitaciones, diarrea y trastornos del corazón.

Las BAL son capaces de producir BA debido a la presencia de enzimas que descarboxilan los correspondientes aminoácidos precursores. Se ha descrito que las aminoácidos descarboxilasas son enzimas inducibles, es decir se producen como respuesta adaptativa a la presencia en el medio de los aminoácidos (Marcobal y col., 2006a). Además, la capacidad de formación de BA parece ser cepa-dependiente más que especie-específica (Moreno-Arribas y col., 2003; Marcobal y col. 2007).

1.5) Aminas biógenas en bebidas fermentadas

En el vino, en la cerveza y en la sidra las principales aminas biógenas descritas son la histamina, tiramina, putrescina, cadaverina y feniletilamina, procedentes de la descarboxilación enzimática de los aminoácidos histidina, tirosina, ornitina, arginina y fenilalanina. Varios factores afectan al contenido de BA en las bebidas, tales como: la materia prima, las prácticas enológicas, las levaduras y su autólisis y las BAL conductoras de la fermentación maloláctica (Torrea-Goñi y Ancin Azpilicueta, 2001; Moreno-Arribas y col., 2003; Martín-Alvarez y col., 2006).

Sobre el contenido de BA en sidras existen muy pocos estudios en la bibliografía (Zee y col., 1983; Vidal-Carou y col., 1989), a pesar de que se trata de un producto sensible a sufrir este problema. Garai y col. (2007) determinaron el contenido en aminas biógenas de 24 sidras naturales adquiridas en establecimientos comerciales del País Vasco. Las aminas mayoritarias resultaron ser putrescina, tiramina e histamina detectadas en el 50, 33,3 y 37,5 % de las sidras, respectivamente. A pesar de ello, es

de destacar la baja concentración de BA detectada en sidra natural, especialmente si se compara con la descrita en otros alimentos y bebidas. Este hecho puede ser debido a la baja concentración de los correspondientes aminoácidos precursores. Por otro lado, en este mismo trabajo se establecieron las principales especies bacterianas implicadas en la producción de BA en sidras. Para ello, se determinó la existencia de actividad ornitina, histidina y tirosina descarboxilasa en 54 cepas de BAL aisladas de sidras naturales. Entre las especies analizadas *L. diolivorans* resultó ser la mayor productora de histamina (3 cepas), aunque también se detectó una cepa de *L. collinoides* capaz de sintetizarla. Por otro lado, se describieron dos cepas productoras de tiramina, una *L. diolivorans* y una *O. oeni*, mientras que ninguna fue capaz de descarboxilar ornitina.

Para el control de la formación de BA se han descrito dos estrategias (Moreno-Arribas y col., 2007). Por un lado, controlar la flora bacteriana durante el proceso de elaboración mediante la utilización de inóculos de la FML. En este sentido, estos autores han realizado estudios en donde se ha comprobado que cultivos iniciadores comerciales de *O. oeni*, que no contienen los genes que codifican enzimas implicadas en la producción de BA, son una opción real y viable para el control de la formación de aminas en condiciones industriales. La segunda estrategia se basa en utilizar un agente antimicrobiano (dióxido de azufre) una vez finalizada la FML para eliminar levaduras y bacterias, inhibiendo de esta manera las bacterias indígenas descarboxilasa-positivas y otros microorganismos responsables de esta alteración.

1.6) Métodos de detección de bacterias lácticas productoras de aminas biógenas

Se han descrito varias metodologías para detectar y cuantificar la capacidad de producir aminas por BAL aisladas de alimentos fermentados. Entre las técnicas de detección se encuentran:

- 1) Métodos basados en técnicas moleculares: Consistentes en el diseño de cebadores específicos para las secuencias de los genes que codifican las descarboxilasas responsables de la formación de aminas. Hasta el momento por esta metodología se pueden detectar la presencia de los genes de la histidina (Le Jeune y col., 1995), tirosina (Lucas y Lonvaud-Funel, 2002; Coton y col., 2004) y ornitina descarboxilasa (Marcobal y col., 2004). En este sentido, Coton y Coton (2005) han descrito una PCR múltiple que permite la detección de BAL productoras de histamina y tiramina.
- 2) Métodos de detección en placa. Basados en ensayos de tipo bioquímico, implican el uso de un medio sólido que contiene el precursor de la amina a investigar y un indicador de pH. La actividad descarboxilasa queda reflejada por un cambio de

color del indicador, ya que, la formación de aminas a partir de aminoácidos supone un aumento del pH. Este tipo de determinaciones permiten hacer *screening* de forma rápida y económica cuando se trabaja con un número alto de cepas.

Usualmente, los medios utilizados están formados por componentes basales como: peptona, extracto de levadura o carne, sales y/o glucosa y el aminoácido precursor. A lo largo de los años se han descrito varias modificaciones en sus formulaciones (Moeller, 1954; Niven y col., 1981; Choudhury y col., 1990; Joosten y Northold, 1989; Maijala, 1993; Bover-Cid y Holzapfel, 1999). En este sentido Maijala (1993) aconseja no añadir glucosa para evitar falsos-negativos. La fermentación de la glucosa por las BAL, con la consiguiente producción de ácido láctico, produce una bajada de pH en el medio que puede contrarrestar la alcalinización que se produce durante la descarboxilación de los aminoácidos enmascarando, por tanto, la reacción. Por su parte, la utilización del piridoxal como cofactor de la expresión de las aminoácido descarboxilasas, descrita ya por Moeller en 1954, se ha vuelto a considerar, convirtiéndose el piridoxal-5-fosfato en un constituyente fundamental en los medios (Bover-Cid y Holzapfel, 1999; Moreno-Arribas y col., 2003).

Para determinar la actividad tirosina descarboxilasa en placa, la baja solubilidad de la tirosina (0,45g/l a 25°C) hace que, en las concentraciones utilizadas para el *screening*, éstas no sean translúcidas. Por tanto, los cambios de color no pueden utilizarse para detectar la producción de tiramina. En este caso la actividad descarboxilasa se observa por la presencia de halos transparentes en el medio, como consecuencia de la degradación de los precipitados de tirosina (Landete y col., 2007).

Por su parte la mayoría de los métodos de cuantificación de BA se han centrado en la histamina, porque se ha considerado la amina más perjudicial para la salud humana, siendo la única para la que se han establecido límites de concentración máximos. Las principales técnicas empleadas son: cromatografía en capa fina (Guraya y Koehler, 1991), métodos enzimáticos (Rodríguez-Jerez, 1994), espectrofluorometría (Rivas-Gonzalo y col., 1979) y cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (Marcobal y col., 2006b). Aunque la técnica de HPLC es la más utilizada y la que ofrece mayores niveles de sensibilidad y de precisión, debemos considerar que se trata de una técnica que no permite analizar simultáneamente un amplio número de muestras en cortos periodos de tiempo, requiere personal especializado y una elevada inversión para la adquisición del equipo.

1.7) Alteraciones de la sidra asociadas con la presencia de bacterias lácticas

Durante el proceso de elaboración de la sidra pueden aparecer alteraciones organolépticas del producto que lo hagan inaceptable para el consumidor. El origen de las alteraciones es variable, si bien los microorganismos, y en concreto las BAL, juegan un papel de relevancia. A continuación se describen las alteraciones más importantes producidas por BAL en sidras y, en su caso las recomendaciones para corregirlas:

- 1) Degradación de la glicerina: amargor y picado alílico/acroleínico. Las sidras se caracterizan por poseer un olor muy desagradable que imposibilita la venta y el consumo. Como consecuencia de la metabolización de la glicerina, las BAL sintetizan acroleína que, al interactuar con los polifenoles, produce aductos amargos.

Para corregir este defecto se recomienda realizar una re-fermentación de la sidra alterada y, una vez que ésta finaliza, es conveniente sulfitar y corregir la acidez (si es necesario) y consumirla rápidamente.

- 2) Framboisé/Aframbuesado. Esta alteración se pone de manifiesto por la presencia de un sabor y olor muy desagradable que recuerda a la piel de plátano/frambuesa. Las sidras se caracterizan por poseer elevadas concentraciones de acetaldehído y una fuerte turbidez debido a la combinación del acetaldehído y los polifenoles. La incidencia de la alteración se limita con una baja concentración de nitrógeno asimilable y un pH ácido. Añadir anhídrido sulfuroso no es recomendable, ya que se combina fácilmente con el acetaldehído viéndose mermado su efecto antimicrobiano (Bauduin y col., 2006).

- 3) Picado láctico. Consiste en un incremento excesivo de la acidez fija y volátil de la sidra. Se produce como consecuencia de la fermentación de azúcares por BAL con metabolismo heterofermentativo que producen elevadas concentraciones de ácido acético y D-láctico y en ocasiones de manitol.

Entre las recomendaciones para corregir dicha alteración se encuentra la utilización de una materia prima sana y limpia y el mantenimiento de los utensilios de elaboración en buenas condiciones higiénicas. También se aconseja el uso de anhídrido sulfuroso y realizar trasiegos para eliminar los nutrientes existentes en las borras y así limitar el desarrollo de las BAL.

- 4) “Off-flavors”. Las sidras que presentan este tipo de alteración se caracterizan por poseer el defecto olfativo denominado “fenolado”, que engloba un conjunto de aromas entre los que cabe señalar “farmacia”, “especiado”, “cuadra”, “caballo”, etc. Estos olores se producen como consecuencia de concentraciones significativas de fenoles volátiles. Dichos compuestos son sintetizados principalmente por levaduras

del género *Brettanomyces/Dekkera*, si bien las BAL también poseen capacidad para sintetizarlos. Para limitar la incidencia de este tipo de defecto organoléptico se aconseja cuidar las condiciones higiénico-sanitarias de la materia prima, del “llagar” y en particular de los toneles de madera, y el uso de anhídrido sulfuroso.

- 5) Ahilado/Filado. Se caracteriza fundamentalmente por el aspecto aceitoso o filante que presenta la sidra al ser transvasada. Este aspecto se debe a un aumento de la viscosidad producida por la formación de un polisacárido, no nitrogenado, estructurado a partir de unidades de galactosa, glucosa, manosa, arabinosa y ácido galacturónico.

Para su corrección, si la acidez de la sidra es baja, se recomienda la adición de anhídrido sulfuroso, tanino enológico y un ácido orgánico autorizado (cítrico, tartárico). Si la alteración es muy importante, se debe realizar previamente un trasiego con aireación y posteriormente proceder al tratamiento señalado. Además, una vez que la sidra esté embotellada es necesario proceder al batido de la misma y consumirla rápidamente, ya que existe el riesgo de que la alteración pueda desarrollarse de nuevo.

1.8) Producción de exopolisacáridos por las bacterias lácticas

Los polisacáridos extracelulares o exopolisacáridos (EPS) son polímeros de monosacáridos unidos mediante enlaces glucosídicos que rodean la membrana externa en las BAL. Pueden estar organizados estructuralmente de forma compacta, contituyendo una cápsula y permanecer unidos a la superficie celular, o pueden poseer una organización que les hace mantenerse unidos a la célula de forma débil o formar una matriz de EPS tras ser liberados al medio extracelular (Ruas-Madiedo y Reyes-Gavilán, 2005).

La producción de EPS es una característica inestable en las BAL, ya que está codificada a nivel plasmídico, siendo habitual que las bacterias pierdan dicha propiedad con el paso de las generaciones. Además, se ha de tener en cuenta que es una característica cepa-dependiente, y que está influenciada tanto por el tipo de carbohidrato presente en el medio como por su concentración (Cerning y col., 1994).

El interés de la investigación y caracterización de los numerosos EPS en las BAL se debe a su relación con la modificación, bien sea positiva o negativa, de las propiedades sensoriales (principalmente viscosidad, textura y estructura) de los alimentos y bebidas fermentados en los que se encuentran estas bacterias productoras. Si bien la presencia de bacterias productoras de EPS en la elaboración de sidras, tiene un efecto negativo al provocar una alteración organoléptica de la misma, también conviene señalar que los EPS producidos por algunas BAL pueden

ejercer efectos beneficiosos para la salud humana tales como: protección contra úlceras estomacales y colitis, efecto prebiótico, capacidad de reducir los niveles de colesterol, así como de modular la respuesta inmunitaria y, en consecuencia, presentar actividad anticarcinogénica (Ruas-Madiedo y col., 2008).

Atendiendo a la composición química de los EPS y a su modo de síntesis, podemos hablar de:

Homopolisacáridos (HoPS) Compuestos por un único tipo de monosacárido e interviniendo en su síntesis una única enzima. A su vez, éstos se subdividen, según el tipo de monosacárido presente, en fructanos (compuestos por fructosa) o glucanos (compuestos por glucosa). Según el tipo de enlace (α o β) y la posición que ocupa el carbono del enlace principal, existe una gran variedad de polímeros que reciben nombres diferentes (dextrano, mutano, aternano, reuterano, etc) y son producidos por distintos miembros del grupo de las BAL.

Heteropolisacáridos (HePS) Constituidos por dos o más tipos de monosacáridos, pueden llevar unidas otras moléculas, y en su síntesis y polimerización están implicados varios enzimas. Cada HePS está constituido por unidades repetitivas formadas por distintas combinaciones de monosacáridos (glucosa, galactosa, ramnosa, N-acetil-glucosamina, N-acetil-galactosamina, etc).

La producción de ambos tipos de EPS ha sido descrita en sidras. Una gran parte de las cepas productoras de HoPS aisladas de sidra producen β -glucanos, los cuales presentan siempre un trisacárido como unidad repetitiva con enlaces β -(1 \rightarrow 3). Su síntesis ha sido observada en cepas de especies habitualmente presentes en sidra: *O. oeni*, *L. suebicus*, *L. diolivorans*, *L. collinoides* y *P. parvulus* (Dueñas-Chasco y col., 1997,1998; Ibarburu y col., 2007; Ibarburu, 2009). Con respecto a la síntesis de HePS, únicamente se ha descrito la producción por *O. oeni* I4 y *L. suebicus* CUPV225 y CUPV226, aisladas de sidras del País Vasco (Ibarburu y col., 2007; Ibarburu, 2009).

1.9) Métodos de detección de bacterias lácticas productoras de exopolisacáridos

La nomenclatura utilizada para describir los diferentes fenotipos de las BAL productoras de EPS es confusa, y términos como “slime”, “ropy”, o “mucoso” son utilizados indistintamente. Científicamente, las BAL que presentan un fenotipo “ropy” se caracterizan por formar un filamento de más de 5 mm cuando se recogen colonias, por ejemplo, con un asa de siembra. Mientras que, las BAL con fenotipo “slime” o “mucoso”, presentan un aspecto brillante y mucoso y no forman filamento.

Para el estudio de los EPS se ha utilizado una gran variedad de técnicas. La elección del tipo de método empleado en la detección, aislamiento y cuantificación del EPS depende de varios factores, entre los que se incluye el tipo de muestra, de

microorganismo, de medio de cultivo y el grado de purificación que se desee. Entre las técnicas de detección de cepas productoras de EPS podemos distinguir:

- 1) Métodos basados en técnicas moleculares. Consistentes en detectar la presencia del gen glicosiltransferasa (*gtf*) en el genoma bacteriano mediante PCR, utilizando los cebadores específicos GTFF y GTFR diseñados por Werning y col. (2006).
- 2) Métodos basados en aspectos morfológicos.
 - *Tinción de colonias con rojo de rutenio*. Esta determinación diferencia las colonias no productoras que aparecen de color rosa al penetrar en su interior el colorante, de las productoras, que al poseer EPS no son teñidas y permanecen de color blanco (Stingele y col. 1996).
 - *Evaluación de la viscosidad*. Los medios líquidos en los que se desarrollan bacterias productoras de EPS, presentan mayor resistencia a fluir a través de pipetas graduadas o embudos que las no productoras (Vedamuthu y Neville, 1986).
 - *Observación de células con microscopio confocal láser de barrido*. Esta técnica ha sido empleada para distinguir las microestructuras de los EPS (Ruas-Madiedo y col., 2008) mediante la utilización de distintos colorantes (rodamina B, naranja de acridina, concanavalina, etc).
 - *Observación microscópica de células con tinción negativa*. Los cultivos celulares se mezclan con tinta china que tiñe el fondo de la preparación, y las cápsulas de EPS se detectan como zonas claras que rodean a la célula sobre fondo oscuro (Ruas-Madiedo y col., 2008).
 - *Aspecto de las colonias en medio sólido*. El ensayo se realiza en medios sólidos, que contienen distintas fuentes de carbono, evaluando el aspecto mucoso de las colonias y la formación de filamento. Suele ser la técnica empleada en procesos de *screening* (Smitinont y col., 1999).

1.10) Objetivos

A partir de cepas identificadas como *Oenococcus oeni* se pretende hacer una selección de inóculos iniciadores de la transformación maloláctica, descartando las cepas productoras de aminas biógenas y exopolisacáridos como inóculos iniciadores.

En este sentido, los objetivos que se plantean son dos:

- La detección de cepas productoras de exopolisacáridos, responsables de la alteración conocida como “filado” de la sidra.
- La detección de cepas que entrañen un potencial riesgo para la salud humana por su capacidad de producir aminas biógenas.

2) Materiales y métodos

2.1) Microorganismos

Las pruebas relacionadas con la selección de inóculos iniciadores se han realizado a un total de 124 cepas autóctonas identificadas como *O. oeni*.

Dichas cepas son integrantes de una colección de BAL constituida por 415 aislados. Todos, a excepción de 16 muestras suministradas por la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), han sido obtenidos a partir de diferentes muestras de derivados de manzana (sidra, sidra natural y vinagre), de origen asturiano. El 55% de los aislados procedían de muestras que no presentaban ninguna alteración, y el resto fueron aislados a partir de sidras “filadas” o con “picado alílico”

Las actividades llevadas a cabo por el S.E.R.I.D.A se basaron, en un primer momento, en asegurar la condición de BAL de los aislados, realizar una clasificación morfológica y una evaluación del carácter homo y heterofermentativo de los aislados con morfología de tipo coco. Posteriormente, fue realizada la identificación a nivel de género y especie por técnicas de Biología Molecular mediante la secuenciación de la región ribosómica 16S, lo que permitió la clasificación de todos los aislados en 12 especies diferentes.

2.2) Medios de cultivo.

2.2.1) MRS-suplementado: MRS (55g/l) y concentrado de manzana (21g/l). Se ajusta el pH a 5,3 con HCL fumante y se esteriliza a 121°C durante 15 min. Este medio se utiliza como caldo o como medio sólido, mediante la suplementación con agar (20g/l).

2.2.2) Actividad ornitina, histidina, arginina y lisina descarboxilasa: Triptona (5g/l), extracto de levadura (4g/l), extracto de carne (5g/l), tween 80 (0,5g/l), MgSO₄ (0,2g/l), MnSO₄ (0,05g/l), FeSO₄ (0,04g/l), CaCO₃ (0,1g/l), púrpura de bromocresol (0,06g/l), piridoxal 5-fosfato (0,05g/l), en función de la actividad a determinar, se añade 5g/l del aminoácido precursor. El pH se ajusta a 5,3 con HCL fumante y, por último, se añade agar (20g/l) y se esteriliza a 121°C durante 10 min. En el caso de la **actividad fenilalanina descarboxilasa**, la concentración del aminoácido precursor y piridoxal 5-fosfato es 10g/l y 0,25g/l respectivamente (pH=5,3). En cuanto a la **actividad tirosina descarboxilasa**, la concentración de piridoxal 5-fosfato es 0,25g/l, no se utiliza púrpura de bromocresol y el pH se ajusta a 5,5. El resto de componentes, concentraciones y la metodología de preparación es la descrita, anteriormente, en este apartado.

2.2.3) Producción de exopolisacáridos: Peptona (10g/l), extracto de carne (10g/l), extracto de levadura (5g/l), polisorbato 80 (1g/l), citrato de amonio (2g/l), acetato de sodio (5g/l), MgSO₄ (0,1g/l), MnSO₄ (0,05g/l), K₂HPO₄ (2g/l) y azúcar (fructosa, glucosa o sacarosa) (20g/l). Se ajusta el pH a 5,4 con ácido acético glacial, se añade agar (20g/l) y se esteriliza a 121°C durante 15 min.

2.3) Obtención de cultivos celulares y conservación de muestras.

Las 124 cepas de *O. oeni* permanecían conservadas a -80°C. Para trabajar con los aislados, en primer lugar se hizo un pase rejuvenecedor al 2% en 1ml de MRS-suplementado, realizando la incubación a 30°C en atmósfera de CO₂ (5%). Como precaución ante una posible contaminación o pérdida, a partir de cada muestra se obtuvieron dos copias, una de trabajo y otra que fue conservada mediante congelación a -80°C.

-Método de conservación: Centrifugar el cultivo celular a 4000rpm durante 5 min, decantar el sobrenadante y añadir 1ml de solución crioprotectora en condiciones estériles. Mantener las muestras a temperatura ambiente durante 30 minutos y congelar a -80°C.

Solución crioprotectora: Glutámico 0,067M y glicerol al 0,217M.

2.4) Detección de bacterias lácticas productoras de aminas biógenas.

Los aislados a evaluar se inocularon en forma de gota (5µl), por duplicado, sobre la superficie de las placas (apartado 2.2.2.) y éstas se incubaron durante 7 días en atmósfera de CO₂ (5%) a 30°C.

Diariamente se comprobó la descarboxilación de los aminoácidos precursores. Los aislados fueron considerados productores de BA cuando producían un viraje de color del indicador del medio (amarillo a púrpura), o cuando en las placas de tirosina se producían halos transparentes de degradación.

2.5) Confirmación de autenticidad de las cepas productoras de aminas biógenas.

A las cepas clasificadas como productoras de BA se les realizó, en primer lugar, una comprobación de la morfología celular y un test de la catalasa. Ambas pruebas se realizaron a partir de la biomasa crecida en las placas de detección de aminas.

-Método de visualización de la morfología celular: Hacer una preparación en fresco de las células y observar su forma a 1000X en un microscopio óptico (NIKON ECLIPSE 50i).

-Método de la catalasa: Recoger una pequeña porción de células, depositarla en un portaobjetos que contiene peróxido de hidrógeno (3%) y observar si hay burbujeo de oxígeno.

Combinando ambas pruebas se pueden observar las siguientes situaciones:

Morfología de tipo bacilo y test de la catalasa negativo: Presencia de contaminación. Se realizó un aislamiento a partir de la copia de trabajo en medio MRS-suplementado sólido. Se seleccionó una colonia con morfología de tipo coco, a partir de la cual se obtuvo un cultivo celular puro, al que se le realizaron de nuevo las pruebas de detección de aminos.

Morfología de tipo coco y test de la catalasa negativo: Se descarta una posible contaminación. Se realizaron a partir del mismo cultivo celular de nuevo las pruebas de detección de aminos.

Test de la catalasa positivo: Presencia de contaminación. Fue imposible aislar de la copia de trabajo colonias catalasa negativas decidiendo eliminar el aislado.

Finalmente, todos los aislados que se sometieron a confirmación de resultados, se identificaron a nivel de especie mediante secuenciación.

-Secuenciación: Se realizó una PCR utilizando como ADN molde 5 µl de extracto celular y los oligonucleótidos PA y UP1-R (Werning y col. 2006). Los amplificados se visualizaron en geles de agarosa al 0,8%. Se purificó el amplificado con el Kit GenElute™ PCR-Clean-Up Kit (Sigma). Posteriormente, la concentración de ADN fue cuantificada en el NanoDrop 1000 (Thermo Scientific) y se ajustó dicha concentración a la exigida por la empresa que ofrece el servicio de secuenciación. Por último, la secuencia nucleotídica se alineó con el programa informático BLAST y comparada con las secuencias depositadas en las bases de datos.

2.6) Detección de exopolisacáridos

Los aislados a testar se inocularon en forma de estría (5µl) en los tres medios de cultivo descritos (apartado 2.2.3) y las placas se incubaron a 30°C en atmósfera de CO₂ (5%) hasta observar crecimiento celular.

Tras comprobar para cada medio de cultivo la homogeneidad de las colonias, observando la morfología macroscópica de las mismas, se determinó: el fenotipo “ropy” de al menos dos colonias y la producción de EPS.

-Fenotipo “ropy”. Observar la presencia de un filamento cuando las colonias se recogen con un asa de siembra. Se considera que las BAL tienen este fenotipo si forman un filamento mayor de 5 mm.

-Producción de EPS. Depositar en un portaobjetos que contiene 6µl de agua estéril y 2µl de tinta china una pequeña porción de colonia. Visualizar la preparación a 1000X en el microscopio óptico (NIKON ECLIPSE 50i). Si las BAL producen EPS, se detecta

la presencia de zonas refringentes que rodean a la bacteria sobre un campo de fondo oscuro.

La detección de posibles contaminaciones y de falsos positivos, se realizó de forma análoga a la descrita en el caso de BA. A la par que se comprobó la producción de EPS, se comprobó microscópicamente la morfología de tipo coco de la muestra. Además, por otro lado, se llevó a cabo un test de la catalasa sobre las colonias elegidas para la realización de ambas pruebas. Si la comprobación de la morfología o el test de la catalasa no se corresponde con lo esperado, se siguen los procedimientos descritos anteriormente (apartado 2.5).

3) Resultados y discusión

Las 124 cepas *O. oeni* son integrantes de una colección de 415 BAL procedentes de muestras de distinto origen (Tabla 1). La mayoría de los aislados (47%) proceden de muestras que estaban realizando la FML y un 20% de sidras que presentaban alteraciones organolépticas.

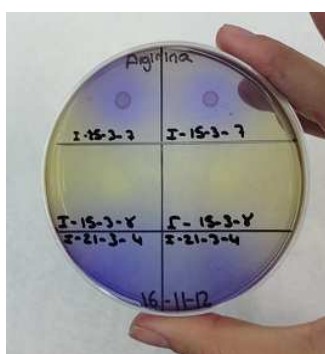
Tabla 1: Procedencia de los aislados *O. oeni*

	Cepas CECT	Colección Serida	Bodegas asturianas	Vinagre Artificial	Sidras de Nueva Expresión	Picado alílico
Nº aislados	4	8	58	10	20	24

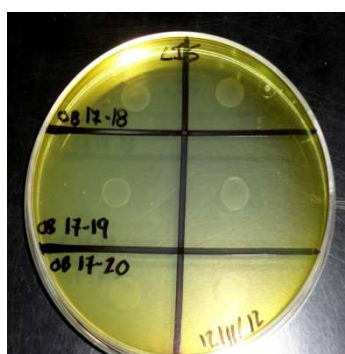
3.1) Bacterias lácticas productoras de aminas biógenas

La detección de la producción de BA se realizó de forma cualitativa en medios sólidos, utilizando como controles positivos la cepa ATCC 33322 (ornitina e histidina descarboxilasa positiva) y la cepa CECT 216 (tirosina, fenilalanina, ornitina, arginina y lisina descarboxilasa positiva).

El revelado de todas las actividades descarboxilasas, excepto para la tirosina, se detecta por el viraje del color del medio (amarillo a púrpura), debido a la presencia de un indicador de pH (Figura 1). En el caso de la tirosina, la actividad se observa por la presencia de halos transparentes como consecuencia de la degradación de dicho aminoácido. Conforme se iban realizando las pruebas, se comprobó que la interpretación de los resultados resultaba más clara cuando se incrementaba la concentración de tirosina. Para solventar este problema, se aumentó la cantidad de este aminoácido en el medio de 5 a 15g/l (Figura 2).



1A



1B

Figura 1. 1A Viraje del medio-producción positiva de BA; 1B Ausencia de viraje-producción negativa de BA.

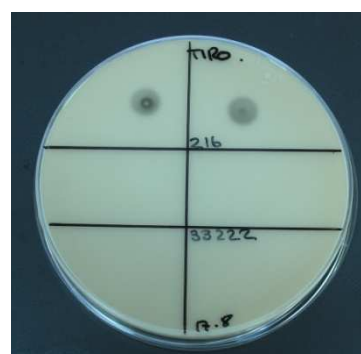


Figura 2: Presencia de halo-producción positiva de tiramina.

Después de siete días de incubación, sólo el 4% de los aislados mostraron capacidad para producir aminas (Tabla 2).

Tabla 2. Actividades descarboxilasas de los aislados.

Actividad descarboxilasa	Nº de referencia de los aislados
Sin actividad	56, 57, 58, 59, 3, 263, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 174, 175, 176, 177, 81, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 308, 312, 313, 314, 315, 316, 324, 325, 328, 329, 331, 333, 334, 335, 339, 340, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350, 353, 375, 379, 356, 357, 358, 359, 360, 361, 364, 193, 194, 195, 196, 197, 200, 201, 202, 232, 233, 259, 260, 262, 370, 388, 389, 390, 391, 397, 168, 150, 151, 152, 169, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 162, 163, 164, 165, 281, 301, 311, 60, 65, 148, 149, 178, 179, 1, 337, 338, 376, 377, 198, 199, 392, 393, 160, 161, 180
Ornitina	317, 355
Phe, Orn, His, Lys, Arg	374, 381
Arginina	261

Phe: Fenilalanina; Orn:Ornitina; His: Histidina; Lys: Lisina; Arg: Arginina

Como la producción de BA se considera un criterio discriminante a la hora de realizar la selección de cepas *O. oeni*, antes de eliminar los aislados capaces de descarboxilar los aminoácidos se les realizaron pruebas complementarias.

En este sentido, al determinar la morfología y el test de la catalasa de los cinco aislados se obtuvieron los resultados descritos en la Tabla 3.

Tabla 3. Morfología y test de la catalasa.

	Nº referencia de los aislados				
	261	317	355	374	381
Morfología celular	bacilo	Bacilo	coco	coco	bacilo
Test de la catalasa	negativa	Negativa	negativa	positiva	negativa

En aquellos aislados en los que se detectó contaminación (261, 317 y 381), se realizó un proceso de aislamiento. A partir de una colonia con morfología de coco y catalasa negativa, se obtuvo un cultivo celular al que se le repitieron las pruebas de descarboxilación para los seis aminoácidos ensayados. Los resultados obtenidos fueron que ninguna de las tres cepas poseía actividades descarboxilasas.

En el caso de la cepa 355, en la que no se detectó ningún tipo de anomalía, se repitieron las determinaciones de descarboxilación, resultando ser dicho aislado capaz de producir putrescina a partir de ornitina.

Finalmente, a partir de la muestra de trabajo de la cepa 374, solo se observaron colonias catalasa positivas.

Para confirmar que estos nuevos aislamientos eran *O. oeni*, se identificaron los cinco aislados a nivel de especie mediante secuenciación del ADNr 16S. Para ello, la secuencia nucleotídica facilitada por la empresa que ofrece el servicio de secuenciación, fue alineada con el programa informático BLAST y comparada con las bases de datos (Figura 3). Los datos obtenidos se recogen en la Tabla 4.

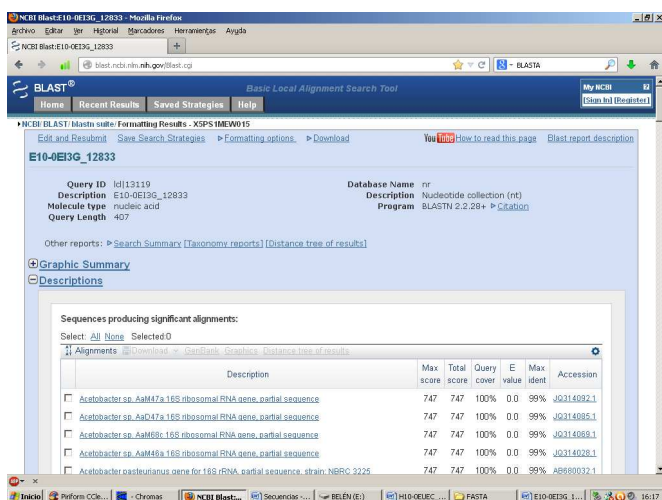


Figura 3: Identificación obtenida a partir de la alineación de la secuencia obtenida con la base de

Tabla 4. Identificación por secuenciación

Identificación	
261	<i>O. oeni</i>
317	<i>O. oeni</i>
355	<i>O. oeni</i>
374	<i>Acetobacter sp</i>
381	<i>O. oeni</i>

Una vez realizadas las pruebas confirmatorias, se concluyó que el 99% de las cepas no son productoras de BA, detectando sólo una cepa (355) capaz de descarboxilar la ornitina.

Los resultados obtenidos coinciden con investigaciones previas. En este sentido, Landete y col. (2007), describen que el 100% de las cepas *O. oeni* con las que trabajan no producen ni tiramina ni feniletilamina. Del mismo modo, Garai y col. (2007), no detectan ninguna cepa *O. oeni* productora de histamina, mientras que, la producción de tiramina es observada tan sólo en un 1% de las cepas evaluadas. Sin embargo, estos datos difieren con los recogidos por del Campo y col., (2000), que describen un alto número de cepas *O. oeni* productoras de tiramina y con los descritos por Coton y col. (1998), que describen la habilidad de cepas *O. oeni* vínicas para producir histamina. La discrepancia de resultados entre los diferentes autores se ha justificado en base a que la formación de BA es una característica cepa-dependiente (Garai y col., 2007).

3.2) Bacterias lácticas productoras de exopolisacáridos

Los 124 aislados se crecieron en presencia de los tres azúcares principales presentes en los mostos de manzana (sacarosa, glucosa y fructosa). Una vez comprobada la homogeneidad de colonias, se consideró que los aislados poseían un fenotipo “ropy” si formaban un filamento de más de 5 mm al ser recogidos del medio sólido (Figura 4). Por su parte, la producción de EPS se asignó como positiva cuando al microscopio óptico, y realizando tinciones negativas, se observaban zonas refringentes rodeando a las bacterias (Figura 5).

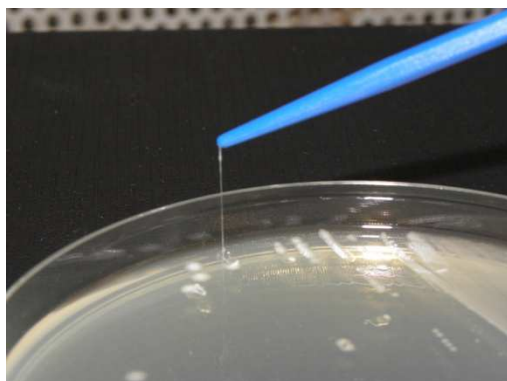


Figura 4. Fenotipo “ropy” en BAL.

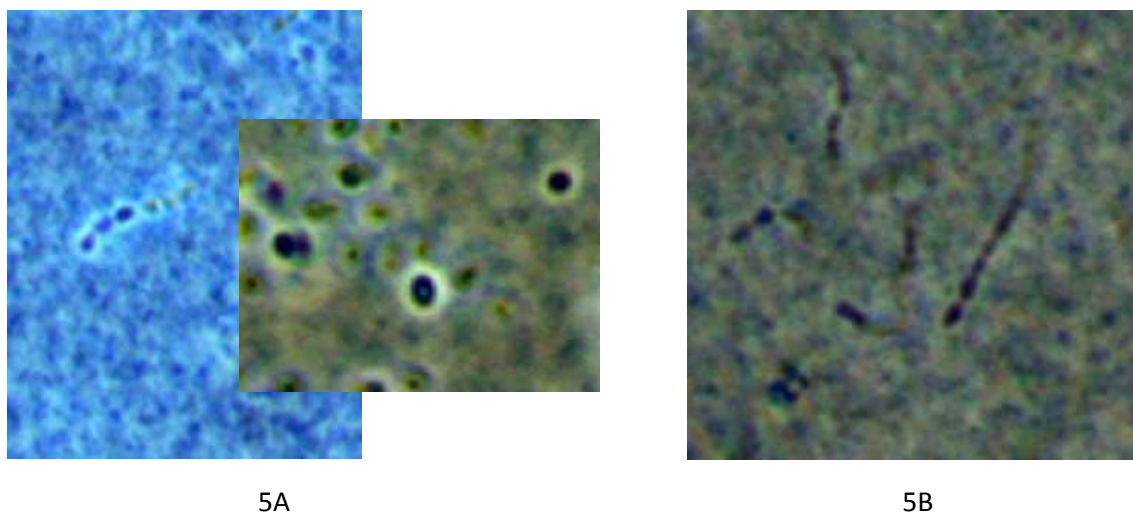


Figura 5. 5A Zonas refringentes rodeando las células-producción positiva de EPS; 5B Ausencia de zonas refringentes-producción negativa de EPS.

Después de evaluar la producción de filamento, sólo se detectaron dos cepas (260 y 374) que presentaron fenotipo “ropy” en los tres azúcares ensayados.

La producción de EPS se observó en un 21,7% de las cepas. Los datos obtenidos se recogen en la Tabla 5.

Tabla 5. Producción de EPS en presencia de distintas fuentes de carbono.

Fuente de Carbono	Nº de referencia de los aislados
Negativo en glucosa, fructosa y sacarosa	393, 60, 65, 148, 149, 168, 150, 151, 152, 169, 153
	349, 350, 353, 355, 356, 358, 194, 195, 196, 197, 348
	188, 189, 190, 191, 192, 308, 311, 314, 315, 316, 345
	56, 57, 58, 59, 3, 263, 67, 68, 69, 71, 72, 174, 175
	159, 160, 162, 161, 163, 164, 165, 301, 259, 370, 376
	154, 155, 156, 157, 158, 199, 200, 201, 232, 233, 346
	317, 328, 329, 331, 333, 334, 339, 340, 342, 343, 344
176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186	
	377, 388, 389, 390, 391, 392, 260
Positivo en glucosa	197, 261, 379, 381
Positivo en fructosa	347, 357, 361, 364, 397
Positivo en sacarosa	4, 193, 335, 375
Positivo en glucosa y fructosa	337
Positivo en glucosa y sacarosa	187, 202, 262
Positivo en fructosa y sacarosa	1, 324, 338, 359, 360
Positivo en todo	312, 313, 325, 374, 281

Al igual que en el caso de las BA, se realizaron pruebas confirmatorias en los aislados clasificados como “ropy” y EPS positivos. En este sentido, a la par que se evaluó la producción de EPS, se comprobó la morfología de las bacterias. Con el mismo objetivo, se realizó el test de la catalasa sobre las colonias elegidas para las determinaciones. En el 100% de las colonias analizadas se observó morfología de tipo coco y test de la catalasa negativo.

La producción de EPS ha sido descrita en otros género de BAL, como es el caso de *Pediococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* y *Streptococcus* sp. En el caso de *Oenococcus*, la producción y la caracterización estructural de EPS fue descrita en *O. oeni* 14 por Ibarburu y col. (2007).

4) Conclusiones

Una vez finalizadas las pruebas, el 23,4% de las 124 cepas analizadas fueron descartadas como inóculos iniciadores de la fermentación maloláctica.

Producción de BA: La cepa 355 fue la única que presentó actividad descarboxilasa, por lo tanto se descartó como posible inóculo.

Producción de EPS: Un total de 26 cepas fueron descartadas al visualizarse zonas refringentes mediante tinción negativa. La cepa 260 presentó fenotipo “ropy”, por lo tanto también fue descartada como posible inóculo iniciador.

La cepa 374, identificada como *Acetobacter sp* fue desechada y no se tuvo en cuenta a la hora de analizar los resultados.

5) Bibliografía

- Axelsson, L.T. (2004). Lactic Acid Bacteria: Classification y Physiology. En: Lactic Acid Bacteria. Microbiological and functional aspects, 1-66. Salminen, S. von Wright, A, Ouwehand, A. (Eds.). Marce IDekker, New York.
- Berthier, F.E. y Erhlich, S.D. (1998). Rapid species identification within two groups of closely related lactobacilli using PCR primers that target the 16S/23S rRNA spacer region. FEMS Microbiol. Lett. 161: 97-106.
- Bauduin, R., Le Quéré, J.M., Coton, E., Primault, J. (2006). Factors leading to the expression of "framboisé" in French ciders. Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie 39: 966-971.
- Bover-Cid, S. y Holzappel, W.H. (1999). Improved screening procedure for biogenic amine production by lactic acid bacteria. Int. J. Food. Microbiol. 53: 33-41.
- Buckenhüskes, H.J. (1993). Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as started cultures for various food commodities. FEMS Microbiol. Rev. 12: 253-272.
- Cabranes, C., Blanco, D. y Mangas, J. (1998). Characterisation of fermented apple products using data obtained from GC. Analyst, 123: 2175-2179.
- Cabranes, C. (1994). Fermentaciones espontáneas e inducidas en sidra natural asturiana. Tesis Doctoral. Universidad de Oviedo.
- Cabranes, C., Moreno, J. y Mangas, J. J. (1991). Aspectos microbiológicos y bioquímicos de la elaboración de sidra natural en lagares asturianos. Alimentaria 221: 63-69.
- Cerning, J. C., Renard, M. G. C., Thibault, J. F., Bouillanne, C., Landon, M., Desmazeaud, M. y Topisirovic L. (1994). Carbon source requirements for exopolysaccharide production by *Lactobacillus case* CG11 and partial structure analysis of the polymer. Appl. Environ. Microbiol. 60: 3914-3919.
- Choudhury, N., Hansen, W., Engesser, D., Hammest, W.P. y Holzappel, W.H. (1990). Formation of histamine and tyramine by lactic acid bacteria in decarboxylase assay medium. Lett. Appl. Microbiol. 11: 278-281.
- Claisse, O., Renouf, V. y Lonvaud-Funel, A. (2007). Differentiation of wine lactic acid bacteria species based on RFLP analysis of a partial sequence of *rpoB* gene. J. Microbiol. Meth. 69: 387-390.
- Coton, E. y Coton, M., (2005). Multiplex PCR for colony direct detection of Gram-positive histamine and tyramine-producing bacteria. J. Microbiol. Meth. 63: 296-304.

- Coton, M., Coton, E., Lucas, P. y Lonvaud, A. (2004). Identification of the gene encoding a putative tyrosine decarboxylase of *Carnobacterium divergens* 508. Development of molecular tools for the detection of tyramine-producing bacteria. *Food Microbiol.* 21: 125-130.
- del Campo, G., Lavado, I., Dueñas, M., y Irastorza, A. (2000). Histamine production by some lactic acid bacteria isolated from ciders. *Food Sci. Technol. Int.* 6: 117-121.
- Dicks, L. M. T., Dellaglio, F. y Collins, M. D. (1995). Proposal to reclassify *Leuconostoc oenos* as *Oenococcus oeni* (corríg.) gen. nov., comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45: 395-397.
- Dueñas-Chasco, M. T., Rodríguez-Carvajal, M. A., Tejero, P., Espartero, J. L., Irastorza-Iribas, A. y Gil-Serrano, A. M. (1998). Structural analysis of the exopolysaccharides produced by *Lactobacillus spp.* G77. *Carbohydrate Research.* 307: 125-133.
- Dueñas-Chasco, M. T., Rodríguez-Carvajal, M. A., Tejero, P., Franco Rodríguez, G., Espartero, J. L., Irastorza-Iribas, A. y Gil-Serrano, A. M. (1997). Structural analysis of the exopolysaccharide produced by *Pediococcus damnosus* 2.6. *Carbohydrate Research.* 303: 453-458.
- Dueñas, M., Irastorza, A., Fernández, K. y Bilbao, A. (1995). Heterofermentative *Lactobacilli* causing ropiness in Basque Country ciders. *J. Food Protection* 58: 76-80.
- Dueñas, M., Irastorza, A., Fernández, K., Bilbao, A. y Huerta A. (1994). Microbial Populations and Malolactic Fermentation of Apple Cider using Traditional and Modified Methods. *J. Food Scienc.* 59: 1060-1065.
- Garai, G., Dueñas, M.T., Irastoza, A. y Moreno-Arribas, M.V. (2007). Biogenic amine production by lactic acid bacteria isolated from cider. *Lett. Appl. Microbiol.* 45: 473-478.
- Garai-Ibabe, G., Ibarburu, I., Berregi, I., Claisse, O., Lonvaud-Funel, A., Irastorza, A. y Dueñas, M.T. (2008). Glycerol metabolism and bitterness producing lactic acid bacteria in cidermaking. *Int. J. Food Microbiol.* 121: 253-261.
- González, R., Muñoz, R. y Carrascosa, A.V. (2005). Producción de cultivos iniciadores para elaborar vino. En: *Microbiología del vino*, 318-341. Carrascosa, A.V., Muñoz, R., y González, R. (Eds). Alfonso Madrid Vicente Ediciones. Madrid.
- Guarneri, T., Rossetti, L. y Giraffa, G. (2001). Rapid identification of *Lactobacillus brevis* using the polymerase chain reaction. *Lett. Appl. Microbiol.* 33: 377-381.

- Guraya, H. S. y Koehler, P. E. (1991). Histamine in cats foods: survey and comparison of methodologies. *Vet. Hum. Toxicol.* 33: 124-128.
- Herrero, M., Quirós, C., García, L.A. y Díaz, M. (2006). Use of flow cytometry to follow the physiological status of microorganisms in cider fermentation processes. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 6725-33.
- Herrero, M., García, L.A. y Díaz, M. (1999). Organic acids in cider with simultaneous inoculation of yeast and lactic acid bacteria: effects of fermentation temperature. *J. Inst. Brew.* 4: 229-232.
- Ibarburu, I. (2009). Bacterias lácticas productoras de exopolisacaridos: análisis estructural de polisacaridos y detección molecular de estirpes que sintetizan b-(1-3)(1-2)-d-glucanos. Tesis doctoral. Universidad del País Vasco.
- Ibarburu, I., Soria-Día, M. E., Rodríguez-Carvajal, M-A., Velasco, S., Tejero-Mateo, P., Gil-Serrano, A., Irastorza, A. y Dueñas, M. T. (2007). Growth and exopolysaccharide production by *Oenococcus oeni* I4 and structural characterization of their EPSs. *J. Appl. Microbiol.* 103: 477-486.
- Irastorza-Iribas, A. y Dueñas-Chasco. (2010). Microbiología de la sidra. En: La manzana y la sidra: bioprocesos, tecnologías de elaboración y control, 105-130. Blanco-Gomis, D., Mangas-Alonso, J.J. (Eds). Asturgraf. Asturias.
- Joosten, H. M. L. J. y Northolt, M.D. (1989). Detection, growth, and and amine capacity of lactobacilli in cheese. *Appl. Environ. Bacteriol.* 55: 2356-2359.
- Landete, J.M., Pardo, I. y Ferrer, S., (2007). Tyramine and phenylethilamina production among lactic acid bacteria isolated from wine. *Int. J. Food Microbiol.* 115: 364-368.
- Le Jeune, C., Lonvaud-Funel, A., Ten Brink., Hofstra, H. y van der Vossen. J. M. B. M. (1995). Development of a detection system for histidine decarboxylating lactic acid bacteria on DNA probes, PCR and activity test. *J. Appl. Bacteriol.* 78: 316-326.
- Leroy, F. y De Vuyst, L. (2004). Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science and Technology.* 15: 67-78.
- Lucas, P. y Lonvaud-Funel, A. (2002). Purification and partial gene sequence of the tyrosine decarboxylase of *Lactobacillus brevis* IOEB 9809. *FEMS Microbiol. Lett.* 211: 85-89.
- Maijala, R. L. (1993). Formation of histamine and tyramine by some lactic acid bacteria in MRS-broth and modified decarboxylation agar. *Lett. Appl. Microbiol.* 17: 40-43.

- Marcobal, A., de las Rivas, B. y Muñoz, R. (2007). Aminas biógenas en alimentos: Métodos de detección de bacterias productoras. Alimentaria, Diciembre 06/Enero 07, 66-72.
- Marcobal, A., de las Rivas, B. y Muñoz, R. (2006b). Methods for the detection of bacteria producing biogenic amines on foods a survey. Journal fur Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit. 1: 187-196.
- Marcobal, A., Martín-Álvarez, P. J., Moreno-Arribas, M. V. y Muñoz, R. (2006a). A multifactorial design for studying factors influencing growth and tyramine production of the lactic acid bacteria *Lactobacillus brevis* CECT 4669 and *Enterococcus faecium* BIFI-58. Res. Microbiol. 157: 417-424.
- Marcobal, A., de las Rivas B., Moreno-Arribas, M.V. y Muñoz, R. (2004). Identification of the ornithine decarboxylase gene in the putrescine-producer *Oenococcus oeni* BIFI-83. FEMS Microbiol. Lett. 239: 213-20.
- Martín-Alvarez, P.J., Marcobal, A., Polo, C. y Moreno-Arribas V. (2006). Influence of technological practices on biogenic amine contents in red wines. Eur. Food Res. Technol. 222: 420-424.
- Mira De Orduña, R., Patchett, M.L., Liu, S.Q. y Pilone, G.J. (2001). Growth and arginine metabolism of wine lactic acid bacteria *Lactobacillus buchnerii* and *Oenococcus oeni* at different pH values and arginine concentrations. Appl. Environ. Microbiol. 64(4): 1657-1662.
- Mira De Orduña, R., Liu, S.Q., Patchett, M.L. y Pilone, G.J. (2000). Ethyl carbamate precursor citrulline formation from arginine degradation by malolactic wine lactic acid bacteria. FEMS Microbiol. Lett. 183: 31-35.
- Mirvish, S.S. (1968). The carcinogenic and metabolism of urethane and N-hydroxy urethane. Adv. Cancer. Res. 11: 1-42.
- Moeller, M. (1954). Distribution of amino acid decarboxylase in *Enterobacteriaceae*. Acta Pathol. Microbiol. Scand. 35: 259-271.
- Moreno-Arribas, M.V. (2007). Control de la formación de aminas biógenas durante la elaboración y crianza del vino. International Symposium Microbiology and Food Safety of wine "Microsafetywine" 20-21 Noviembre.
- Moreno-Arribas, M.V., Polo, M.C., Joganes, F. y Muñoz R. (2003). Screening of biogenic amine production by lactic acid bacteria isolated from grape must and wine. Int. J. Food Microbiol. 84: 117-123.
- Niven, C.F., Jeffrey, M.R. y Corlett, D.A. (1981). Differential plating medium for quantitative detection of histamine producing bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 41: 321-322.

- Pfannebecker, J. y Fröhlich, J. (2008). Use of a species-specific multiplex PCR for the identification of *Pediococci*. *Int. J. Food Microbiol.* 128: 288-296.
- Rivas-Gonzalo, J. C., Garcia Moreno, C., Gomez-Cerro, A. y Marine-Font, A. (1979). Spectrofluorometric determination on thin layer chromatographic identification of tyramine in wines. *J. Assoc. Office. Analyt. Chem.* 62(2):272-5.
- Rodas, A. M., Ferrer, S. y Pardo, I. (2003). 16S-ARDRA, a tool for identification of lactic acid bacteria isolated from grape must and wine. *Syst. Appl. Microbiol.* 26: 412-422.
- Rodríguez-Jerez, J.J., Gras, M.A. y Civera, T. (1994). A modification of Lerke enzymic test for histamine quantification. *J. Food Protec.* 57: 1019- 1021.
- Ruas-Madiedo, P., Abraham, A., Mozzi, F. y de los Reyes-Gavilán, C. G. (2008). Functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria, pp. 137-166. B. Mayo, P.López y G. Pérez-Martín (ed.), En: *Molecular aspects of lactic acid bacteria for traditional and new applications*. Research Signpost, Kerala, India.
- Ruas-Madiedo P. y de los Reyes-Gavilán C. G. (2005). Methods for the screening, isolation and characterization of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *J. Dairy Sci.* 88: 843-856.
- Salih, A. G., le Queré, J. M., Drilleau, J. F. y Moreno, J. (1990). Lactic bacteria and malolactic fermentation in the manufacture of Spanish cider. *J. Ins. Brew.* 96: 369-372.
- Shalaby, A. R. (1996). Significance of biogenic amines in food safety and human health. *Food Res. Int.* 29: 675-690.
- Silla, M. H. (1996). Biogenic amines: their importance in foods. *Int. J. Food Microbiol.* 29: 213-231.
- Smitinont, T., Tansakul, C., Tanasupawat, S., Keeratipibul, S., Navarini, L., Bosco, M. y Cescutti, P. (1999). Exopolysaccharide-producing lactic acid bacteria strains from traditional thai fermented foods: isolation, identification and exopolysaccharide characterization. *Int. J. Food Microbiol.* 51: 105-111.
- Stingle, F., Nesser, J. R. y Mollet, B. (1996). Identification and characterization of the eps (exopolysaccharide) gene cluster from *Streptococcus thermophilus* Sfi6. *J. Bacteriol.* 178: 1680-1690.
- Suzuki, K., Ozaki, K. y Yamashita, H. (2004). Genetic marker for differentiating beer-spoilage ability of *Lactobacillus paracollinoides* strains. *J. Appl. Microbiol.* 97: 712-718.

- Torrea- Goñi y Ancin Azpilicueta (2001). Influence of yeast strain on biogenic amines content in wines relationship with the utilization of amino acids during fermentacion. *Am. J. Enol. Vitic.* 52: 185-190.
- Torriani, S., Felis, G.E. y Dellaglio, F. (2001). Differentiation of *Lactobacillus plantarum*, *L. pentosus*, and *L. paraplantorum* by *recA* Gene Sequence Analysis and Multiplex PCR Assay with *recA* Gene-Derived Primers. *Appl. Environ. Microbiol.* 67(8): 3450-3454.
- Vedamuthu, E. R. y Neville, J. M. (1986). Involvement of a plasmid production of ropiness (muccidness) in milk cultures by *Streptococcus cremoris* MS. *Appl. Environ. Microbiol.* 51: 667-682.
- Vidal-Carou, M.C., Isla-Gavin, M.J. y Codony-Salcedo, R. (1989). Histamine and tyramine in natural sparkling wine, vermouth, cider and vinegar. *J. Food Compos Anal.* 2: 210-218.
- Werning, M.L., Ibarburu, I., Dueñas, M.T., Irastorza, A., Navas, J. y Lopéz, P. (2006). *Pediococcus parvulus* *gtf* Gene Encoding the GTF Glycosyltransferase and Its Application for Specific PCR Detection of β -D-Glucan-Producing Bacteria in Foods and Beverages. *J. Food Protect.* 69 (1): 161-169.
- Zapparoli, G., Torriani, S., Pesente, F. y Dellaglio, F. (1998). Desing and evaluation of malolactic enzyme gene targeted primers for rapid identification and detection of *Oenococcus oeni* strain isolated from Valpolicella wine. *Lett. Appl. Microbiol.* 39: 48-54.
- Zee J.A., Simard, R.E., L'Heureux, L. y Tremblay J. (1983). Biogenic amines in wines. *Am. J. Enol. Vitic.*, 34: 6-9.