



VNIVERSITAT
ID VALÈNCIA

Tesis Doctoral

Programa de doctorado en Biotecnología

**ESTUDIO DE LA DIVERSIDAD Y EVALUACIÓN DE LAS RELACIONES
FENOTIPO-GENOTIPO PARA LA BÚSQUEDA DE CEPAS MALOLÁCTICAS
DE *Oenococcus oeni***

LIZ ERIKA CRUZ PIO

Bajo la dirección de:

La Dra. Isabel Pardo Cubillos y el Dr. Sergi Ferrer Soler



VNIVERSITAT
E VALÈNCIA



ENOLAB – Laboratori de Microbiologia Enològica
ERI/ISIC BIOTECMED
MCI IViSoCa
Departament Microbiologia i Ecologia
Facultat de Ciències Biològiques
Universitat de València
Edifici d'Investigació 3.83
c/Doctor Moliner, 50
E46100 Burjassot-València, Spain

La Dra. ISABEL PARDO CUBILLOS y el Dr. SERGI FERRER SOLER, catedráticos de Microbiología de la Universitat de València

INFORMAN:

Que la tesis titulada “Estudio de la diversidad y evaluación de las relaciones fenotipo-genotipo para la búsqueda de cepas malolácticas de *Oenococcus oeni*”, que presenta Doña Liz Erika Cruz Pio, para optar al grado de Doctor, se ha realizado bajo su dirección y asesoramiento en el Departament de Microbiologia i Ecologia de la Universitat de València y que hallándose concluido el trabajo experimental y bibliográfico, autorizamos la presentación de esta Tesis Doctoral a fin de que pueda ser juzgada por el tribunal correspondiente.

Y para que así conste, en cumplimiento de la legislación, firmamos el presente informe en:

Valencia, Enero de 2015

Fdo: Isabel Pardo Cubillos

Fdo: Sergi Ferrer Soler

La realización de este trabajo ha sido posible gracias a una beca predoctoral del Programa Santiago Grisolia que me fue concedida por la Generalitat Valenciana (Grisolia/2011/001) y a la financiación recibida del Ministerio de Economía y Competitividad a través del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) y del Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) para llevar a cabo el proyecto de investigación RM2010-00001-00-00 titulado “Caracterización de la biodiversidad existente en los aislados de *Oenococcus oeni* de la colección ENOLAB: bases para la búsqueda racional de cepas eficaces y seguras para su utilización en vinificación”

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, a mis directores de Tesis Doctoral, la Dra. Isabel Pardo y el Dr. Sergi Ferrer. Muchas gracias por acogerme y permitirme realizar esta Tesis en el laboratorio ENOLAB, por haber creído y por depositado su confianza en mí. Agradecerles también por todo el tiempo invertido en la dirección y la corrección de esta Tesis, por su constante interés, su permanente disponibilidad y sus acertados consejos desde el inicio hasta el final de mi doctorado.

A los profesores Gerardo López y Guillermo Ayala, por el apoyo técnico y estadístico, respectivamente.

A mis compañeros y profesores del Departamento de Microbiología y Ecología, a la Dra. Carmen Amaro, a Amparo, Celia, Paco, David, Miguel y Eva, integrantes del “Despachazo”. A mis compañeras de laboratorio muy especialmente a Yaiza por su invaluable apoyo, a Carmen, Lucia, Olga, Noelia, Sara y Vero, por sus consejos y compañerismo demostrado durante mi estancia en el laboratorio.

Y por otra parte a Ángela, Corina, Hassan, Keila, Lili y Maylin por hacer mi estancia este país más placentera, personas geniales que tuve la suerte de conocer y porque esta amistad perdure siempre, porque amigos de verdad se encuentran pocos, muchas gracias por estar ahí cuando los necesité.

Y de manera especial, a mi madre, porque a ella le debo todo lo que soy y siempre será mi referencia en la vida, eres la persona a la que más admiro, te quiero infinitamente.

A mis padres

ÍNDICE GENERAL

| | |
|--|-----|
| ABREVIATURAS | III |
| RESUMEN | 1 |
| 1. INTRODUCCIÓN | 3 |
| 1.1 Composición química del mosto y procesos de vinificación | 5 |
| 1.2 Las bacterias lácticas: características generales y especies asociadas a la vinificación | 7 |
| 1.2.1 Metabolismo de los compuestos del mosto por las BL | 8 |
| 1.2.2 Actividades beneficiosas y perjudiciales de las BL en vinificación | 11 |
| 1.2.3 Factores que influyen en el crecimiento de BL en vino | 13 |
| 1.2.4 Ecología de las BL durante la vinificación | 15 |
| 1.2.5 La fermentación maloláctica: consecuencias prácticas | 16 |
| 1.3 La especie <i>O. oeni</i> | 17 |
| 1.3.1 Posición taxonómica | 17 |
| 1.3.2 Características del genoma de <i>O. oeni</i> y evolución del mismo | 19 |
| 1.3.3 Diversidad fenotípica y genómica | 21 |
| 1.3.4 Factores de estrés y relación del estrés con la capacidad de supervivencia y de realización de la FML | 28 |
| 1.3.5 Criterios para la selección de cultivos iniciadores | 33 |
| 1.3.6 Técnicas de identificación y tipificación | 35 |
| 2. OBJETIVOS | 41 |
| 3. MATERIAL Y MÉTODOS | 45 |
| 3.1. Microorganismos utilizados y condiciones de cultivo generales | 47 |
| 3.2 Conservación de los aislados microbianos | 47 |
| 3.3 Técnicas para estimar el crecimiento | 49 |
| 3.4 Aislamiento de nuevos especímenes de <i>O. oeni</i> | 50 |
| 3.5 Identificación de los nuevos aislados incorporados a la colección ENOLAB | 50 |
| 3.6 Caracterización fenotípica | 51 |
| 3.7 Caracterización tecnológica | 57 |
| 3.8 Caracterización genómica | 58 |
| 3.9 Cálculo de la diversidad intraespecífica (<i>D</i>) | 61 |
| 3.10 Análisis de la expresión de genes relacionados con el estrés en <i>O. oeni</i> | 63 |
| 3.11 Análisis estadísticos | 66 |

| | |
|---|-----|
| 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 67 |
| 4.1 Identificación de los nuevos aislados de <i>O. oeni</i> | 69 |
| 4.2 Caracterización fenotípica | 70 |
| 4.3 Caracterización tecnológica | 104 |
| 4.4 Caracterización genómica..... | 140 |
| 4.5 Diversidad en los aislados de <i>O. oeni</i> | 159 |
| 4.6 Relación fenotipo-genotipo, genotipo/fenotipo-propiedades tecnológicas..... | 161 |
| 4.7 Selección de cepas malolácticas de interés | 163 |
| 4.8 Niveles de expresión de genes de estrés en <i>O. oeni</i> | 164 |
| 5. CONCLUSIONES | 173 |
| 6. BIBLIOGRAFÍA | 177 |
| ANEXO | 208 |

ABREVIATURAS

| | |
|-----------------|---|
| ABC | Área Bajo la Curva |
| ACP | Análisis de Componentes Principales |
| ADI | Arginina deiminasa |
| ADN | Ácido desoxirribonucleico |
| ADNc | ADN copia |
| AFLP | <i>Amplified Fragment Length Polymorphism</i> /Amplificación de los fragmentos polimórficos |
| AMV | Virus de la Mieloblastosis Aviar |
| ANOVA | <i>Analysis of Variance</i> /Análisis de la varianza |
| ARDRA | <i>Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis</i> /Análisis de restricción del ADN ribosómico |
| ARN | Ácido ribonucleico |
| ARNr | ARN ribosomal |
| ARNm | ARN mensajero |
| ATCC | <i>American Type Culture Collection</i> / Colección Americana de Cultivos Tipo |
| ATP | Adenosin trifosfato |
| BL | Bacterias lácticas |
| °C | Grado centígrado |
| CECT | Colección Española de Cultivos Tipo |
| <i>cfa</i> | Gen que codifica el ácido cicloproprano sintasa |
| <i>clpP</i> | Gen que codifica la proteasa ClpP |
| CO ₂ | Dióxido de carbono |
| CMC | Carboximetilcelulosa |
| C _t | <i>Cycle threshold</i> /Ciclo umbral |
| <i>ctsR</i> | Gen que codifica la proteína CtsR |
| <i>D</i> | Índice de diversidad |
| DHAP | Dihidroxiacetona-P |
| dNTP | Desoxirribonucleótido trifosfato |
| D.O. | Densidad óptica |

| | |
|--|--|
| DSMZ | <i>Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen</i> /Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares |
| EMBL | <i>European Molecular Biology Laboratory</i> /Laboratorio Europeo de Biología Molecular |
| ENOLAB | Laboratorio de Microbiología Enológica |
| EPS | Exopolisacárido |
| FA | Fermentación alcohólica |
| FDP | Fructosa-1,6-diP |
| FML | Fermentación maloláctica |
| <i>g</i> | Gravedades |
| <i>g/L</i> | Gramo por litro |
| G+C | Guanina + citosina |
| GAP | Gliceraldehido-3-fosfato |
| G6PDH | Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa |
| GPYA | Medio para levaduras |
| KOH | Hidróxido de potasio |
| K ₂ O ₅ S ₂ | Metabisulfito |
| HFA | Medio para determinar la capacidad de desaminar la arginina |
| H ₂ O ₂ | Peróxido de hidrógeno |
| HPLC | <i>High Performance Liquid Chromatography</i> /Cromatografía líquida de alta resolución |
| <i>hsp18</i> | Gen que codifica la proteína Lo18 |
| IC | Intervalo de confianza |
| L | Litro |
| <i>L.</i> | <i>Leuconostoc</i> |
| <i>Lb.</i> | <i>Lactobacillus</i> |
| <i>ldhD</i> | Gen que codifica la D-lactato deshidrogenasa |
| M | Molar |
| MANOVA | <i>Multivariate Analysis of Variance</i> /Análisis multivariante de la varianza |
| MBFC | Medio para determinar la fermentación de carbohidratos |
| MDB | Medio para determinar la producción de aminas biógenas |
| min | Minuto |
| mg/L | Miligramo por litro |

| | |
|-------------------|--|
| mL | Mililitro |
| MLO | Medio MLO para <i>Oenococcus oeni</i> |
| MLST | <i>Multilocus Sequence Typing</i> /Tipificación de secuencias multilocus |
| mM | Milimolar |
| MMR | <i>Mismatch System</i> / Sistema de reparación de los apareamientos erróneos |
| MMLV | Virus de Leucemia Murina Moloney |
| MRS | Medio de cultivo Man, Rogosa y Sharpe |
| NaCl | Cloruro de sodio |
| NAD ⁺ | Dinucleótido de nicotinamida y adenina en su forma oxidada |
| NADH | Dinucleótido de nicotinamida y adenina en su forma reducida |
| NADP ⁺ | Dinucleótido de nicotinamida y adenina fosfato |
| NCBI | <i>National Center for Biotechnology Information</i> /Centro Nacional para la Información Biotecnológica |
| ND | No determinado |
| nm | Nanómetros |
| <i>O.</i> | <i>Oenococcus</i> |
| <i>P.</i> | <i>Pediococcus</i> |
| p/v | Relación de peso por volumen |
| pb | Pares de bases |
| PCR | <i>Polymerase Chain Reaction</i> /Reacción en cadena de la polimerasa |
| PFGE | <i>Pulsed Field Gel Electrophoresis</i> /Electroforesis en campo pulsante |
| PK | Fosfoctolasa |
| 6-PGD | 6-fosfogluconato deshidrogenasa |
| qPCR | <i>Quantitative Real-time PCR</i> /PCR cuantitativa en tiempo real |
| RAPD | <i>Random Amplified Polymorphic DNA</i> /Amplificación al azar de fragmentos polimórficos de ADN |
| RFLP | <i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> /Polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción |
| <i>mlb</i> | Gen que codifica la dTDT-glucosa-4,6-dehidratasa |
| <i>rpoB</i> | Gen que codifica la subunidad β de la ARN polimerasa |
| <i>rpoC</i> | Gen que codifica la subunidad β' de la ARN polimerasa |

| | |
|-----------------|--|
| RT-qPCR | <i>Quantitative Reverse Transcriptase Real-time Polymerase Chain Reaction</i> /PCR cuantitativa en tiempo real con transcripción inversa |
| s | Segundo |
| S. | <i>Saccharomyces</i> |
| SF | Suero fisiológico al 0.9 % |
| SLC | Sobrenadante libre de células |
| SO ₂ | Anhídrido sulfuroso |
| <i>trxA</i> | Gen que codifica la proteína TrxA |
| UA | Unidades arbitrarias |
| µg/mL | Microgramo por mililitro |
| ufc/mL | Unidades formadoras de colonias por mililitro |
| µL | Microlitro |
| µm | Micras |
| µmol | Micromoles |
| UPGMA | <i>Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averaging</i> /Análisis de agrupamiento de medias aritméticas por grupos no ponderados |
| UV | Ultravioleta |
| V | Voltios |
| v/v | Relación de volumen por volumen |
| VNTR | <i>Variable Number of Tandem Repeat</i> /Número variable de repeticiones en tándem |
| y col. | Y colaboradores |

RESUMEN

El vino es una bebida obtenida por fermentación del mosto de uva. Durante la fermentación participan las levaduras y las bacterias lácticas que son responsables de la fermentación alcohólica y maloláctica, respectivamente. La fermentación alcohólica consiste fundamentalmente en la transformación de los azúcares del mosto en etanol y CO₂, mientras que la fermentación maloláctica consiste en la conversión de ácido málico, propio del mosto, en ácido láctico y CO₂. De todas las especies de bacterias lácticas relacionadas con la vinificación, *Oenococcus oeni* es la responsable generalmente de la FML, ello se debe a que es la que mejor tolera las condiciones estresantes del vino. Por esta razón, es la especie que más se utiliza para la fabricación de cultivos malolácticos. Los objetivos de esta tesis han sido estimar la diversidad intraespecífica de la especie *O. oeni*, determinar si existen o no diferencias entre aislados procedentes de mosto y vino, evaluar la existencia de relaciones entre características fenotípicas/tecnológicas y genómicas, seleccionar adecuadas cepas malolácticas y determinar el comportamiento de diferentes tipos de cepas frente al estrés. Para ello, se han evaluado las capacidades de 104 aislados para fermentar diferentes carbohidratos, hidrolizar la arginina, producir exopolisacáridos, degradar ácidos orgánicos, producir aminas biógenas, y se ha determinado la existencia de enzimas como β -glucosidasas, β -glucanasas, celulasas, esterases, lipasas y tanasas en los mismos. También se han estudiado sus capacidades tecnológicas mediante la evaluación del crecimiento en vino tinto natural y en vino sintético a diferentes valores de pH, diferentes concentraciones de etanol y de SO₂. A nivel molecular se han tipificado los aislados mediante RAPD y VNTR, se han secuenciado parcialmente sus genes *rpoB* y *rpoC* y se ha investigado la presencia/ausencia de 16 marcadores moleculares en los mismos. A nivel transcriptómico se han estimado los niveles de expresión de los genes *cfa*, *clpP*, *ctsR*, *hsp18*, *rmlbB* y *txrA*, que se han descrito relacionados con la respuesta al estrés frente al pH, etanol y SO₂. Cuando se consideran las características fenotípicas, tecnológicas y genómicas conjuntamente, se observa que los 104 aislados constituyen 104 cepas diferentes y que el índice de diversidad *D* encontrado en este conjunto de cepas es de 1, el máximo posible. Se ha observado que a nivel fenotípico existen diferencias importantes entre cepas aisladas de mosto y de vino, pero sobre todo a nivel tecnológico. No se han encontrado relaciones claras entre las características fenotípicas/tecnológicas y genómicas, aunque si se observan ciertas tendencias entre la

presencia de algunas características genómicas y el origen de las cepas (mosto o vino), así como entre esto último y la presencia de ciertas actividades enzimáticas.

De un total de 104 aislados se han seleccionado las cepas 205A, 229 y 504 como las más adecuadas para ser utilizadas como cultivos malolácticos, ya que son capaces de sobrevivir y crecer en vino tinto, degradan eficaz y rápidamente el ácido málico, estas cepas son incapaces de producir aminas biógenas y presentan actividades enzimáticas de interés, tales como β -glucosidasa, β -glucanasa y celulasa; además la cepa 504 es capaz de resistir a valores bajos de (pH 2.9) y altos niveles de etanol (15 %) y SO₂ (60 mg/L), mientras que las otras dos muestran resistencias intermedias a estas últimas características. Se han observado diferentes comportamientos en la expresión de genes de estrés entre cepas aisladas de diferentes momentos de la vinificación, y entre cepas resistentes y sensibles. El único gen que se sobreexpresa significativamente, es el *hsp18* en condiciones de estrés por etanol y por bajo pH.

Palabras clave: *Oenococcus oeni*, crecimiento, resistencia, diversidad, fermentación de carbohidratos, arginina, exopolisacáridos, ácido málico, ácido cítrico, ácido tartárico, aminas biógenas, β -glucanasa, lipasa, β -glucosidasa, celulasa, tanasa, esterasa, etanol, pH, SO₂, RAPD, VNTR, *rpoB*, *rpoC*, marcadores, expresión de genes, *cfa*, *clpP*, *ctsR*, *hsp18*, *rmlbB* y *txrA*.



1. INTRODUCCIÓN

1.1 Composición química del mosto y procesos de vinificación

La vinificación es el conjunto de operaciones puestas en práctica para transformar el jugo o mosto de uva en vino. En la composición química del mosto de uva encontramos azúcares, ácidos orgánicos, aminoácidos, vitaminas, sales minerales, etc. El mosto de uva es un medio muy rico que contiene todos los nutrientes que permiten el crecimiento de muchos microorganismos.

Los azúcares se presentan en una concentración elevada, alrededor de 250 g/L (Cabanis y col., 2000), aunque esta concentración depende de la localización geográfica del viñedo. Así, las uvas recolectadas en países meridionales, con mayor grado de insolación, presentan incluso cantidades superiores, mientras que las uvas de países septentrionales donde hay menos horas de sol y menor temperatura presentan concentraciones más bajas. Los principales azúcares son la D-glucosa y la D-fructosa que constituyen prácticamente la totalidad de azúcares del mosto y los que se presentan en una proporción mucho menor son la sacarosa, la D-manosa, la D-galactosa, y las pentosas L-arabinosa y D-ribosa. En general, los vinos tintos tienen más cantidad de azúcares que los vinos blancos (Ribéreau-Gayon y col., 2000). Esto se debe fundamentalmente a que las uvas tintas se recolectan con un grado de madurez más elevado que las blancas y por ello presentan un contenido en azúcares más alto. Los ácidos orgánicos se presentan en el mosto en concentraciones variables en función de la procedencia geográfica de las uvas: mayor concentración en mostos de países fríos y menor en las de países cálidos. Los más abundantes son el ácido tartárico (3.5-7.4 g/L), el málico (0.7-8.6 g/L), y el ácido cítrico (0.1-0.9 g/L) (Cabanis y col., 2000). Otros ácidos que están presentes en el mosto, aunque a muy bajas concentraciones, son ácido α -cetoglutarico, ácido fumárico, ácido oxálico y ácido ascórbico. La cantidad de ácidos presentes en el mosto van a determinar en gran medida su valor de pH, que suele variar entre 3.2 y 3.8, aunque debido al cambio climático, en España se han encontrado valores de pH excepcionalmente altos en las últimas vendimias (pH 4). Los principales compuestos nitrogenados presentes en el mosto son los aminoácidos libres o en forma de péptidos o proteínas. El mosto contiene alrededor de 20 aminoácidos diferentes, que constituyen el 28-39 % de los componentes nitrogenados en vinos tintos y blancos, respectivamente (Rapp y Versini, 1991). Durante la maduración de las uvas, el contenido de aminoácidos se incrementa, alcanzando el 90 % del nitrógeno total en el mosto de las uvas de mesa. La prolina y la arginina son los aminoácidos más importantes en el mosto (30-65 % del contenido total de aminoácidos) (Pretorius, 2000).

Otros componentes que están presentes en el mosto son los polifenoles, responsables de propiedades tales como el color (antocianos en mostos tintos y flavonoles en mostos blancos) y el sabor (catequinas responsables de la astringencia y del amargor). Las vitaminas presentes en el mosto son la vitamina C (ácido ascórbico) que es la más abundante (30-50 mg/L), vitaminas del complejo B (B1, B2, B3, B5, B6, B7, B8, B9 y B12) y la vitamina P (flavonoides). Los minerales o elementos minerales más abundantes en el mosto son: K^+ , PO_4^{3-} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Na^+ y Si^{4+} , SO_4^{2-} y Cl^- , los menos abundantes son: Fe^{3+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Al^{3+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Li^+ , Mo^{4+} , Co^{2+} y V^{3+} , y los que están presentes en cantidades trazas son: Pb^{2+} , As^{3+} , Cd^{2+} , Se^{4+} , Hg^{2+} y Pt^{2+} , Br^- e I^- (Moreno y Peinado, 2010).

El proceso de vinificación comienza con la vendimia de las uvas. Tras la vendimia y una vez llegadas las uvas a la bodega, éstas se despallan, es decir se desproveen del raspón y se estrujan. El estrujado consiste en la ruptura del hollejo de la uva para que se libere el zumo y tiene como objetivo poner en contacto el zumo con las partes sólidas de la uva (pieles u hollejos). Ello facilita la disolución de los pigmentos y los compuestos aromáticos que hay en los hollejos y permite la colonización del zumo por las levaduras y otros microorganismos (bacterias y hongos) que hay en la superficie del grano. Tras el estrujado, el destino de la “pasta” (mezcla de mosto y partes sólidas) es diferente en función de que se elaboren vinos tintos o blancos. Los primeros requieren del contacto con los hollejos a fin de que los pigmentos rojos (antocianos) difundan al mosto durante un proceso denominado maceración, mientras que los vinos blancos no necesitan esta maceración previa, por lo que la uva se prensa inmediatamente tras el estrujado, separándose de esta manera la parte sólida de la líquida. En la vinificación en tinto, durante la fase de maceración se produce la fermentación alcohólica, llevada a cabo por las levaduras, fundamentalmente por la especie *Saccharomyces cerevisiae*. En el caso de los mostos blancos esta fermentación alcohólica empieza tras el prensado. En ambos tipos de vinos, la fermentación alcohólica acaba cuando todo el azúcar del mosto se transforma en etanol. Una vez que esto ocurre, las levaduras se van depositando por gravedad al fondo del depósito de fermentación, y son eliminadas en el proceso denominado trasiego, en el cual la fracción clara del vino se separa de la fracción turbia cargada de microorganismos y que en el argot enológico se denomina “heces”. Este trasiego se vuelve a repetir meses más tarde, ya que con el tiempo sedimentan las partículas y microorganismos menos pesados y el vino adquiere la transparencia necesaria para ser comercializado. De la composición química del mosto se deduce que

se trata de un medio rico, y contiene todos los nutrientes que permiten el crecimiento de microorganismos capaces de tolerar el bajo pH del mismo: las levaduras, bacterias lácticas y bacterias acéticas. Las levaduras son las principales protagonistas de la vinificación ya que son responsables de la fermentación alcohólica (FA), las bacterias lácticas participan en una fermentación secundaria que tiene lugar en algunos vinos y que se llama fermentación maloláctica (FML) y las bacterias acéticas dan lugar a la acetificación o avinagramiento del vino al transformar el etanol en ácido acético.

1.2 Las bacterias lácticas: características generales y especies asociadas a la vinificación

Las bacterias lácticas (BL) no constituyen un grupo con significado taxonómico propio, sino que es un término que agrupa a especies que tienen en común la producción de ácido láctico a partir de azúcares (Ercolini y col., 2001; Jay, 2000; Holzapfel y col., 2001; König y Fröhlich, 2009; Vos y col., 2011). Según Axelsson (1998) son bacterias Gram-positivas con una composición de bases G+C de ADN inferior al 50 %, no formadoras de esporas, catalasa negativas, no poseedoras de citocromos, anaerobias facultativas, tolerantes al ácido y estrictamente fermentativas, siendo el ácido láctico el principal metabolito obtenido a partir de las hexosas, a las que pueden fermentar vía homofermentativa y heterofermentativa. La morfología celular de este grupo varía entre bacilar, cocácea o formas intermedias y las células suelen agruparse en parejas, cadenas más o menos largas o tétradas. Las BL poseen una muy limitada capacidad para sintetizar aminoácidos, vitaminas del grupo B y bases purínicas y pirimídicas, por lo que requieren de su presencia en el hábitat en el que viven o en los medios de cultivo en las que se desarrollan (Axelsson, 1998; Jay, 2000). Esta incapacidad para fabricar factores de crecimiento explica el que se aíslen siempre de hábitats ricos en nutrientes, como carnes y pescados. Y otros como zumos de fruta o extractos de cereales y bebidas fermentadas, derivadas de los mismos: cerveza o vino.

De los 33 géneros reconocidos como BL, solamente 22 especies pertenecientes a los géneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus* y *Weissella* se han aislado de mostos y vinos, siendo *O. oeni* una de las más importantes por su papel tecnológico durante la FML (Tabla 1).

Tabla 1. Especies de BL presentes en mostos y vinos

| Género | Especie |
|----------------------|--|
| <i>Lactobacillus</i> | <i>Lb. brevis</i> , <i>Lb. buchneri</i> , <i>Lb. casei</i> , <i>Lb. curvatus</i> , <i>Lb. delbrueckii</i> , <i>Lb. diolivorans</i> , <i>Lb. fermentum</i> , <i>Lb. fructivorans</i> , <i>Lb. hilgardii</i> , <i>Lb. jensenii</i> , <i>Lb. kunkeei</i> , <i>Lb. mali</i> , <i>Lb. nagelii</i> , <i>Lb. paracasei</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. vini</i> |
| <i>Pediococcus</i> | <i>P. pentosaceus</i> , <i>P. parvulus</i> , <i>P. damnosus</i> |
| <i>Leuconostoc</i> | <i>L. mesenteroides</i> |
| <i>Oenococcus</i> | <i>O. oeni</i> |
| <i>Weisella</i> | <i>W. paramesenteroides</i> |

1.2.1 Metabolismo de los compuestos del mosto por las BL

Los azúcares del mosto son el principal sustrato a partir del cual las BL obtienen la energía que necesitan, siendo catabolizados por vía fermentativa (Kandler, 1983). Las BL pueden exhibir dos tipos de metabolismo respecto a las hexosas: homofermentativo y heterofermentativo.

La fermentación homofermentativa se caracteriza por la formación de fructosa-1,6-diP (FDP) a partir de las hexosas, la cual se escinde mediante la FDP aldolasa en dihidroxiacetona-P (DHAP) y en gliceraldehído-3-P (GAP) (Figura 1A). La GAP se convierte en finalmente en piruvato y éste se transforma en ácido láctico mediante una lactato deshidrogenasa que permite la reoxidación del NAD^+ que se genera en la transformación del GAP en 1,3 difosfoglicerato. El balance de esta ruta supone que por cada mol de hexosa consumida se forman dos moles de ácido láctico y 2 de ATP. Las bacterias homofermentadoras son incapaces de fermentar pentosas.

Las BL heterofermentativas estrictas carecen de los enzimas glucosa 6-P isomerasa y FDP aldolasa y por lo tanto la glucosa-6-P se oxida a 6-fosfogluconato, que sufre una reducción y una descarboxilación para transformarse en ribulosa 5-P, que posteriormente se epimeriza para producir xilulosa-5-P. Además de por la ausencia de la enzima glucosa 6-P isomerasa ésta ruta se caracteriza por la presencia de fosfocetolasa que escinde la xilulosa-5-P en GAP y acetyl-P. Por ello, la ruta heterofermentativa se conoce comúnmente como la ruta fosfocetolasa (PK) o del 6-fosfogluconato (Figura 1B).

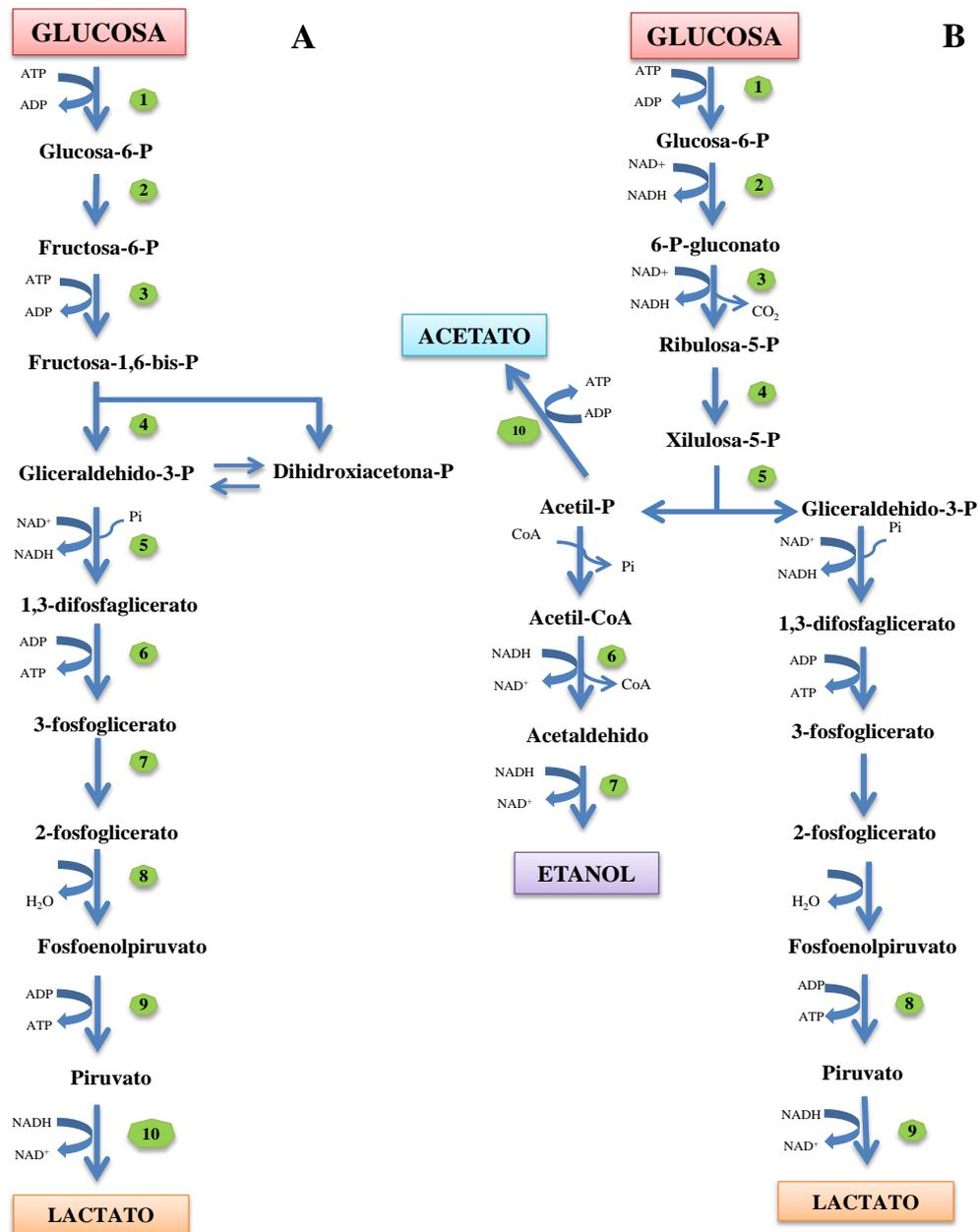


Figura 1. A: Fermentación homofermentativa de la glucosa. 1: hexoquinasa; 2: glucosa-fosfato isomerasa; 3: fosfofructoquinasa; 4: fructosa-1,6-difosfato aldolasa; 5: gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa; 6: 3-fosfato-glicerato quinasa; 7: fosfoglicerato mutasa; 8: enolasa; 9: piruvato quinasa; 10: lactato deshidrogenasa.

B: Fermentación heterofermentativa de la glucosa. 1: hexoquinasa; 2: glucosa-6-fosfato deshidrogenasa; 3: 6-fosfo-gluconato deshidrogenasa; 4: ribulosa-3-fosfato isomerasa; 5: xilulosa 5-fosfato fosfoacetolasa; 6: acetaldehído deshidrogenasa; 7: alcohol deshidrogenasa; 8: piruvato quinasa; 9: lactato deshidrogenasa; 10: acetato quinasa.

El GAP da lugar a lactato, mientras que el acetyl-P puede reducirse hasta etanol o transformarse en acetato con la consiguiente generación de ATP. El que el acetyl-P se transforme en uno u otro producto depende fundamentalmente de la relación NAD^+/NADH que exista en la célula. El balance de esta ruta es, por cada mol de hexosa consumida se forma 1 mol de lactato, 1 mol dióxido de carbono, 1 mol ATP (o dos si el Acetyl-P se transforma en acetato) y 1 mol de etanol o de acetato. Si se forma etanol la reoxidación del NADH está asegurada, mientras que si se forma acetato habría un déficit de NAD^+ , que comprometerá esta ruta, a menos que haya otros mecanismos complementarios de reoxidación del NADH. Las bacterias lácticas que presentan la vía heterofermentativa pueden fermentar tanto las hexosas como las pentosas.

Las BL también pueden transformar los ácidos orgánicos presentes en el mosto o en el vino, jugando estas transformaciones un importante papel en el metabolismo energético de estas bacterias (Radler y Bröhl, 1984). Como ya se ha comentado, los principales ácidos orgánicos presentes en mostos son el ácido tartárico, el málico, y el cítrico. De éstos los más frecuentemente metabolizados por BL son el ácido málico y cítrico. La utilización de estos ácidos por las BL provoca muchos y muy diversos cambios que pueden mejorar las propiedades organolépticas del vino. El ácido tartárico a pesar de encontrarse mayoritariamente en el vino es degradado con mucha menor frecuencia por las BL.

La composición aminoacídica del mosto y del vino tiene una importante implicación sobre la calidad y seguridad del vino resultante, además de condicionar el desarrollo de numerosas especies que son auxótrofas para algunos aminoácidos, como *Oenococcus oeni* y *Leuconostoc paramesenteroides* (syn. *Weissella paramesenteroides*) (Garvie, 1967a). El catabolismo de los aminoácidos tiene lugar a través de cinco tipos de enzimas: aminotransferasas, descarboxilasas, deshidratasas, liasas y desaminasas, que convierten los aminoácidos en un conjunto de compuestos que van a influir en las características organolépticas del vino. Además, algunos de estos enzimas como las desaminasas y alguna descarboxilasa pueden dar lugar a compuestos tóxicos, perjudiciales para la salud humana (aminas biógenas y carbamato de etilo) (Lonvaud-Funel, 1999; Ribéreau-Gayon y col., 2000; Lonvaud Funel, 2001; Suárez e Íñigo, 2004; Vincenzini y col., 2009).

1.2.2 Actividades beneficiosas y perjudiciales de las BL en vinificación

Las capacidades metabólicas de las BL que se desarrollan en un vino tienen importantes consecuencias en las características finales del mismo, como ya se ha apuntado antes. Algunas de estas consecuencias son positivas, como las que provoca la FML, la cual se hablará extensamente más adelante, y algunas negativas, como el picado láctico. La naturaleza de las transformaciones de las BL del vino va a depender de la especie que las lleve a cabo, del sustrato que se utilice y del momento de la vinificación en el que se desarrolle la bacteria.

Entre las alteraciones que las BL pueden ocasionar en el vino están el picado láctico, la vuelta manítica, el ahilado o grasa, el amargor, la vuelta tartárica y aquellas que provocan la desviación del patrón aromático propio del vino debida a la síntesis de compuestos que confieren olor a mantequilla, orina de ratón, a cuadra o caballo y a geranio.

El “picado láctico” se produce por el desarrollo de bacterias lácticas cuando todavía existe una alta cantidad de azúcares en el mosto de fermentación, como ocurre cuando tiene lugar una parada en la fermentación alcohólica. En estos casos las BL catabolizan vía homofermentativa o heterofermentativa (en función de la especie presente) los azúcares, dando lugar a elevados niveles de ácido láctico y de ácido acético (si la bacteria que se desarrolla es heterofermentativa). Supone un incremento tanto de la acidez total como de la acidez volátil del vino.

La alteración denominada “vuelta manítica” consiste en la transformación de la fructosa presente en el mosto en manitol, lo que confiere al vino un gusto agridulce. La llevan a cabo las bacterias lácticas heterofermentativas.

El “ahilado” o “grasa” del vino se produce como consecuencia del desarrollo de ciertas cepas de las especies *Pediococcus damnosus*, *P. dextrinicus*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus brevis*, *Lb. hilgardii*, *Lb. collinoides*. Algunas cepas de estas especies tienen capacidad de formar polisacáridos extracelulares, que aumentan la viscosidad del vino y le confieren un aspecto denso u oleoso (Ribéreau-Gayon y col., 2000).

La alteración denominada “amargor”, se produce a consecuencia de la transformación del glicerol, formado por las levaduras, en acroleína la cual al combinarse con los polifenoles del vino, ocasiona un intenso sabor amargo. Es común en vinos con elevados pH y con elevada carga microbiana, siendo *Lb. brevis*, *Lb. cellobiosus*, *P. parvulus* y *L. mesenteroides* las responsables (Sauvageot y col., 2000).

La “vuelta tartárica”, se produce como consecuencia del metabolismo del ácido tartárico que da lugar a ácido láctico, ácido acético y CO₂. Las principales responsables de esta alteración son algunas cepas de las especies *Lb. plantarum* y *Lb. brevis* (Henick-Kling y col., 1989). Las rutas de degradación de este ácido son diferentes según la especie de BL de la que se trate (Radler y Yannissis 1972), pero sea cual sea ésta, se produce una pérdida de acidez fija, y un incremento de la acidez volátil, haciendo que los vinos tengan un sabor avinagrado y sin carácter y tengan un aspecto turbio.

La presencia de diacetilo en los vinos puede ser beneficiosa o perjudicial en función de la concentración en la que se halle. Si está por encima del nivel de detección, los vinos presentan un excesivo aroma a mantequilla y se considera una alteración. El diacetilo proviene del metabolismo del ácido cítrico y del piruvato, que es un intermediario de muchas reacciones metabólicas. Dado que el ácido cítrico es frecuentemente degradado por las BL, se prefiere que las cepas que se utilizan para promover la FML degraden sólo parcialmente este ácido (Bartowsky y Pretorius, 2009). Normalmente esta alteración está asociada al crecimiento de *Lb. hilgardi*, *Lb. brevis*, *P. damnosus* y *O. oeni* (Fornachon y col., 1968; Saguir y col., 2009; Ruiz y col., 2012).

El “olor a ratón” es una alteración organoléptica que confiere a los vinos un desagradable olor a orina de ratón o a acetamida. Este olor es consecuencia de la formación de varios isómeros del 2-acetiltetrahidropiridina. El “olor a cuadra”, “caballo”, “animal” o “sudor” se produce por la síntesis de compuestos fenólicos volátiles, como 4-etilguayacol, 4-vinilfenol, 4-etilfenol y 4-vinilguayacol. Aunque la principal causante de estos compuestos es la levadura *Brettanomyces bruxellensis*, varios autores han descrito la producción de 4-etilguayacol y 4-etilfenol por cepas de *Lb. brevis*, *Lb. plantarum*, *Lb. cellobiosus* y *P. pentosaceus* (Cavin y col., 1993; Chatonnet y col., 1997; Couto y col., 2006).

La alteración denominada “olor a geranio” consiste en que el vino presenta un desagradable olor semejante al que se produce al cortar las hojas del geranio. Este defecto está relacionado con el metabolismo del ácido sórbico por ciertas especies de bacterias lácticas. El ácido sórbico se añade al vino como conservante y puede ser reducido a sorbinol por ciertas bacterias lácticas como *O. oeni* y algunos lactobacilos heterofermentativos. El sorbinol se condensa con el etanol para formar una sustancia que es la productora del olor a geranio (Sponholz, 1993).

Además de producir estas transformaciones que afectan directamente a la calidad del vino, algunas BL son capaces de transformar los aminoácidos en aminas biógenas y en

carbamato de etilo, que son compuestos tóxicos para el hombre (Herraiz, 1993). De todas las aminas producidas por las BL la de mayor relevancia es la histamina, ya que es la que provoca los efectos toxicológicos más graves: dolor de cabeza, hipotensión arterial, palpitaciones, picor, asma enrojecimiento facial, e incluso vómitos y diarrea (Landete y col., 2005).

1.2.3 Factores que influyen en el crecimiento de BL en vino

Los principales factores fisicoquímicos que afectan el desarrollo de las BL en vino son: el etanol, el pH, el anhídrido sulfuroso y la temperatura (Volschenk y col., 2006).

El etanol desestabiliza la membrana citoplasmática al insertarse en la parte hidrófoba de la doble capa lipídica. Además, también altera diversos procesos como la replicación del ADN, actividades enzimáticas, transporte de metabolitos y síntesis de peptidoglucanos (Guzzo y Desroche, 2009). Todo ello provoca una disminución progresiva y lineal de su tasa de crecimiento según aumenta la concentración del mismo durante la FA (Britz y Tracey 1990; Capucho y San Romão 1994; Teixeira y col., 2002; García-Alegría y col., 2004). La especie de BL del vino más resistente al etanol es *O. oeni* (Bravo-Ferrada y col., 2011), aunque también algunas cepas de otras especies, como *Lb. brevis*, *Lb. fructivorans* y *Lb. hilgardii* se han mostrado capaces de crecer en vinos fortificados de alto contenido alcohólico (Ribéreau-Gayon y col., 2006).

Otro factor limitante del crecimiento de las bacterias lácticas es el pH del vino. Aunque las bacterias lácticas del vino tienen pH óptimos de crecimiento superiores a los que se encuentran en el vino, son capaces de desarrollarse en ellos, aunque con menores tasas de crecimiento. El efecto sobre el crecimiento de las BL depende no solo del pH extracelular, sino también de la naturaleza de los ácidos presentes en el medio (McDonald y col., 1990). El límite inferior tolerado varía según las especies, lo que hace que el pH tenga un carácter selectivo sobre los microorganismos presentes en el vino (Wibowo y col., 1985).

El SO₂ reacciona con diversos constituyentes celulares de las BL provocando la inhibición del crecimiento e incluso la muerte por inhibición de la ATPasa de la membrana celular (Carreté y col., 2002), además de otros efectos. El SO₂ en encuentra en el vino tanto en forma libre como en forma combinada, hallándose ambas formas en equilibrio. La forma que presenta una actividad antimicrobiana más elevada es el libre (SO₂ molecular), mientras que el combinado muestra una actividad entre 5 y 10 veces inferior al libre (Lafon-Lafourcade y Peynaud 1974). Lafon-Lafourcade y col., 1974

encontraron que los cocos son más resistentes al SO₂ que los bacilos, aunque el nivel de resistencia es cepa dependiente (Ribéreau-Gayon y col., 2006).

La temperatura influye tanto en la velocidad de crecimiento de las bacterias como en la duración de la fase de latencia. Además de actuar por sí misma puede acentuar el efecto tóxico del SO₂ y del etanol (Bauer y Dicks, 2004). Aunque las BL aisladas del vino pueden crecer en un rango entre 15 y 45 °C, dependiendo de las especies, el rango óptimo de temperatura de crecimiento en medios de laboratorio está entre 20 y 30 °C, sin embargo el rango óptimo en el vino es más bajo. La temperatura ideal para el crecimiento de *O. oeni* en el vino y para llevar a cabo la FML está entre los 20 y 25 °C, dependiendo de la cepa estudiada (Britz y Tracey, 1990).

Además de los factores fisicoquímicos, las interacciones microbianas entre levaduras y BL y entre diversas especies/cepas de BL entre sí, afectan al crecimiento y la dinámica de las poblaciones bacterianas. Respecto al primer tipo de interacción, las levaduras inhiben el crecimiento de las BL porque compiten a nivel nutricional por los nutrientes básicos del mosto (azúcares y moléculas nitrogenadas y porque las levaduras producen metabolitos tóxicos para las BL, entre ellos, etanol, ácidos grasos de cadena media (Lonvaud-Funel y col., 1988; Fleet, 2003), péptidos y proteínas (Dick y col., 1992) y en algunos casos SO₂. Sin embargo, cuando las levaduras mueren y se lisan tras la FA liberan aminoácidos, péptidos, proteínas, vitaminas y carbohidratos, que son nutrientes que estimulan el crecimiento de las BL del vino (Fornachon, 1968; Feuillat y col., 1977; Charpentier y Feuillat, 1993; Guilloux-Benatier y Feuillat, 1993; Guilloux-Benatier y col., 1995; Alexandre y col., 2004). Respecto a las interacciones bacteria-bacteria, se ha demostrado que algunas BL del vino son capaces de producir y secretar al medio bacteriocinas (Navarro y col., 2000; Bauer y col., 2003; Strasser de Saad y Manca de Nadra, 1993; Rojo-Bezares y col., 2007) que matan a otras cepas de BL sensibles a estos compuestos. La producción de bacteriocinas constituye un mecanismo de competencia entre microorganismos que comparten el mismo hábitat (Siewwerts y col., 2008).

Otros tipos de interacciones, como las que ocurren entre BL y virus bacteriófagos, también puede dificultar el desarrollo de las primeras. Según Sozzi y col. (1976 y 1982) el ataque fágico puede destruir la población total de *O. oeni* y provocar paradas de FML. Sin embargo, otros autores no han encontrado una clara relación entre la presencia de fagos y la inhibición de la FML. En general, la inhibición de la FML por

esta causa no es muy probable, ya que los virus bacteriófagos se inactivan por el bajo pH y el SO₂ del vino cuando están libres (Davis y col., 1985; Esparcia, 2002).

1.2.4 Ecología de las BL durante la vinificación

Las BL están presentes sobre la superficie de las uvas en una concentración de 10² ufc/g uva (Barata y col., 2012), junto a ellas se encuentran también levaduras, bacterias lácticas y acéticas y hongos filamentosos. Todos ellos, se ponen en contacto con el mosto una vez que la uva se estruja. No todas las bacterias lácticas son capaces de desarrollarse durante la vinificación, ya que a lo largo de la misma se van a producir una serie de cambios que van a condicionar la evolución de las mismas. Así, factores tales como la acción selectiva del SO₂ que se añade para evitar la oxidación de los mostos, el agotamiento de nutrientes y el aumento de la concentración de etanol ocasionado por las levaduras durante la FA van a provocar la desaparición progresiva de las especies/cepas más sensibles a estos factores.

El resultado de todo ello es que se reduce notablemente la diversidad de BL que existía en el mosto. Así, durante las primeras horas de la vinificación las especies de BL presentes son *Lb. plantarum*, *Lb. casei*, *Lb. hilgardii*, *L. mesenteroides* y *P. damnosus* y en menor proporción, *O. oeni* y *Lb. brevis* (Wibowo y col., 1985), aunque la concentración de las mismas es baja (10³-10⁴ ufc/mL). Esta concentración disminuye hasta niveles de 10¹-10² ufc/mL cuando la FA está realizándose y lo mismo ocurre con la diversidad, las especies homofermentativas desaparecen dejando paso a las heterofermentativas *Lb. brevis*, *Lb. hilgardii* y *O. oeni*. En el tiempo que transcurre entre el final de la FA y el inicio de la FML, se produce un aumento excesivo de la población láctica que llega a alcanzar concentraciones de 10⁶-10⁷ ufc/mL (Wibowo y col., 1985; Lonvaud-Funel, 1999). Este espectacular aumento de la población de BL se produce como consecuencia de la muerte y lisis de las levaduras al final de la FA, que supone la liberación de nutrientes que son aprovechados por las BL para crecer. El crecimiento de las BL potencia la realización de la FML (Lafon-Lafourcade y col., 1983).

La especie de BL que lleva a cabo este proceso es, generalmente, *O. oeni*, ya que es la mejor adaptada a las difíciles condiciones impuestas por el medio (bajo pH y elevada concentración de etanol) (Davis y col., 1985; Van Vuuren y Dicks, 1993).

1.2.5 La fermentación maloláctica: consecuencias prácticas

La FML consiste en la transformación del L-málico en ácido láctico y CO₂, como ya se ha comentado. La descarboxilación de ácido málico a láctico por las BL transcurre mediante una reacción directa catalizada por la enzima maloláctica, que actúa en presencia de los cofactores Mn²⁺ y NAD⁺ (Henick-Kling, 1993). Esta enzima está presente en todas las especies de bacterias lácticas aisladas de vino (Henick-Kling, 1993).

Generalmente, la FML puede durar entre 5 días y 2 o 3 semanas, dependiendo de las condiciones fisicoquímicas del vino, de la concentración de ácido málico y de la concentración de bacterias malolácticas. El principal efecto de la FML, es la desacidificación biológica del vino. La desacidificación es más trascendente para aquellos vinos que proceden de regiones climáticas frías en los que el contenido de ácido málico es más elevado. La transformación del ácido málico en láctico, produce una disminución de la acidez total, un aumento de pH entre 0.1-0.2 unidades y un cambio organoléptico del vino. El cambio organoléptico se produce, en parte, porque el sabor herbáceo y astringente del ácido málico se transforma en el sabor lácteo propio del ácido láctico que es más suave. Pero, además las bacterias malolácticas son capaces de producir otros compuestos (alcoholes superiores, ácidos orgánicos y ésteres) como resultado del metabolismo de otros sustratos diferentes del ácido málico. Estos compuestos influyen notablemente en las características organolépticas de los vinos (Maicas y col., 1999).

Como consecuencia de la FML también aumenta la estabilidad microbiológica de los vinos, así como su calidad y complejidad organoléptica (Moreno-Arribas y Polo, 2005). Ello se debe a que *O. oeni* consume ciertos nutrientes, lo que impide el crecimiento de otras bacterias potencialmente alterantes que los requieren. Además, algunas cepas responsables de la FML pueden sintetizar ciertos compuestos antimicrobianos que ejercen un efecto bactericida sobre otras BL (Navarro y col., 2000; Knoll y col., 2008).

La FML se potencia, especialmente en vinos tintos, que van a destinarse a envejecimiento en barrica, pero también en tintos jóvenes y en blancos con altos contenidos en este ácido. La FML no siempre se produce de forma espontánea; su desarrollo es tanto más difícil cuanto más restrictivas son las condiciones del vino para el crecimiento de *O. oeni*, es decir en aquellos vinos de alto contenido en ácido málico, muy bajo pH (< 3.2), alto contenido en etanol (> de 14 %) o SO₂ (> 50 mg/L) y

vinificados a baja temperatura (< 15 °C). En estos casos, se debe recurrir a los cultivos comerciales malolácticos para inducir el desarrollo de la misma.

1.3 La especie *O. oeni*

Como ya se ha adelantado, la especie responsable de la FML en la mayoría de los casos es *O. oeni* y por ello la mayor parte de los cultivos comerciales malolácticos contienen cepas de esta especie. Se considera que es el microorganismo de mayor relevancia en vinificación, tras *S. cerevisiae* que es la levadura responsable de la FA.

Es una bacteria de morfología cocácea, con células agrupadas en cadenas más o menos largas, de metabolismo heterofermentativo estricto, acidófila y tolerante al etanol. Su hábitat preferente es el vino y la sidra (König y Fröhlich, 2009; Vos y col. 2011; Dimopoulou y col., 2014).

1.3.1 Posición taxonómica

La especie *O. oeni* fue inicialmente descrita por Garvie en 1967 (Garvie, 1967a) y la denominó con el nombre de *Leuconostoc oenos*. En los años 90 el género *Leuconostoc* contenía especies que compartían una serie de características morfológicas y bioquímicas. Sin embargo, y a pesar de estas similitudes, el estudio de las relaciones filogenéticas entre especies dejaba entrever que no se trataba de un género homogéneo, por ello ha sufrido varias remodelaciones a lo largo de la historia y una de estas remodelaciones afectó a la especie *L. oenos*. En 1995 Dicks y col. proponen la reclasificación de *L. oenos* en un nuevo género, el género *Oenococcus*, denominándola con el nuevo nombre de *Oenococcus oeni* (Dicks y col., 1995).

Esta propuesta se basó en una serie de trabajos previos en los que se pusieron de manifiesto diferencias importantes entre esta especie y el resto de las que formaban el género *Leuconostoc*. Las primeras evidencias, que indicaban las características peculiares de *L. oenos* dentro del género *Leuconostoc* fueron:

- 1.- Se trataba de microorganismos acidófilos que crecían en zumo de uva y vino. Esto les diferenciaba del resto de *Leuconostoc* que no toleraban condiciones de crecimiento tan ácidas (pH 3.5-5.0).
- 2.- Resistían concentraciones de un 10 % de etanol (v/v) mientras que el crecimiento de los otros leuconostoc se inhibía en estas condiciones.
- 3.- Requerían factores de crecimiento en su medio, como el ácido pantoténico presente en el zumo de tomate (Garvie, 1986).

- 4.- Presentaban enzimas lactato deshidrogenasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6-PGD) con movilidades electroforéticas diferentes a las de las otras especies de *Leuconostoc* (Garvie, 1969; Garvie, 1980; Irwin y col., 1983).
- 5.- La enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) requería preferentemente NADP^+ , a diferencia de las G6PDH de las otras especies del género que utilizaban indistintamente tanto NAD^+ como NADP^+ (Gasser y col., 1994).
- 6.- Las relaciones inmunológicas de la D (-) lactato deshidrogenasa y de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa indicaban el carácter divergente de las cepas de *L. oenos* respecto a las otras especies del género *Leuconostoc* (Tenreiro, 1995).
- 7.- Los estudios de hibridación del ADN-ADN entre diferentes especies del género *Leuconostoc* indicaban que eran especies genómicas diferentes (Dicks y col., 1990; Tenreiro, 1995), presentando *L. oenos* un grado de diferenciación muy alto con el resto de especies del género.
- 8.- Los valores de hibridación de ADN-ARNr (regiones más conservadas del genoma), indicaban también un reducido grado de homología entre *L. oenos* y las restantes especies del género (Garvie, 1981).
- 9.- La comparación de secuencias del ARNr 16S de las especies del género *Leuconostoc* llevada a cabo por Yang y Woese, (1989), mostraron importantes variaciones nucleotídicas en posiciones altamente conservadas ARN 16S, lo que parecía indicar una elevada tasa de evolución (taquilelia). Estos autores postulan que la gran divergencia que presenta la especie *L. oenos* de los *Leuconostoc sensu stricto*, se debe a su adaptación a un hábitat extremo (bajo pH del medio y alta concentración de etanol). Estos autores plantean que esta adaptación la ha conseguido por mutaciones que se producen a partir de errores en el sistema S.O.S. de reparación.
- 10.- La comparación de las secuencias del 16S y 23S ARNr, realizada por Martínez-Murcia y col., (1991) demostraron que *L. oenos* forma una línea evolutiva diferente de los llamados *Leuconostoc sensu stricto*, lo que fundamenta la separación de esta especie. Otros datos adicionales obtenidos con diferentes aproximaciones metodológicas (análisis de perfiles de proteínas totales, de la composición de los ácidos grasos, de perfiles de macrorrestricción y del contenido en G+C) apoyaban la necesidad de reubicar a la especie *L. oenos* (Dicks y col., 1990; Semedo, 1995; Tenreiro y col., 1994; Tracey y Britz, 1987). Sin embargo, hubo que esperar hasta el año 1995 para que Dicks y col. (1995) propusieran la creación de un nuevo género *Oenococcus*, cuya única

especie *O. oeni*, incluía las cepas clasificadas hasta ese momento como *L. oenos* (Figura 2).

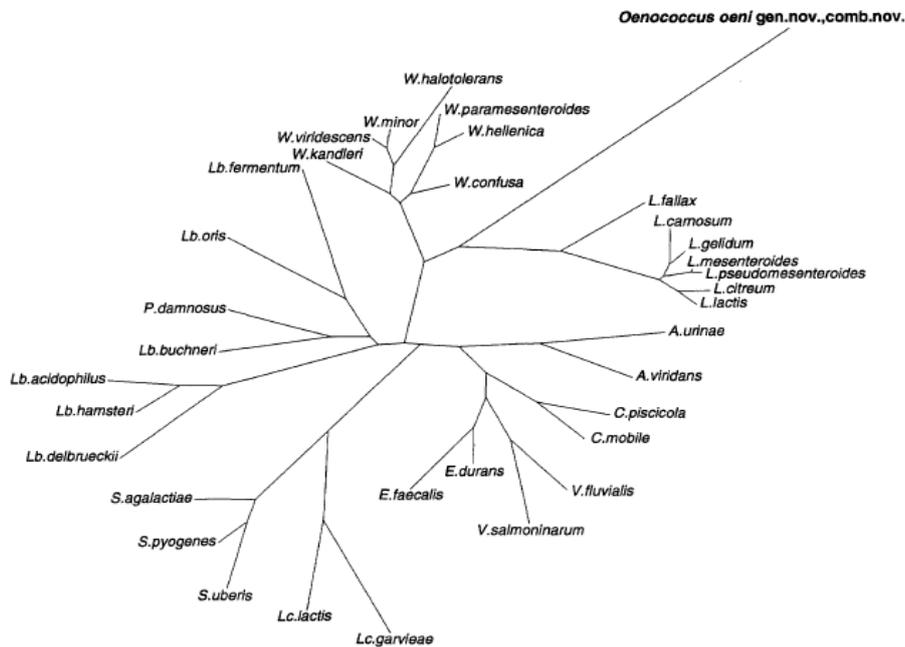


Figura 2. Árbol filogenético que relaciona la especie *Oenococcus oeni* (gen. nov. comb. nov.) y *Leuconostoc* spp. con otras bacterias lácticas, según resultados obtenidos de los análisis de secuencias del ARN 16S (Dicks y col., 1995).

Estudios posteriores apoyaron la creación de este nuevo género. Así, Zavaleta y col., (1996) comparando los perfiles de restricción (RFLP) del fragmento ISR de *L. oenos* (syn. *O. oeni*), con los de las otras especies de *Leuconostoc* y con los de dos especies de *Weissella*, encuentran relaciones filogenéticas entre las especies similares a la que se obtuvieron por secuenciación de los ARN 16S y 23S (Martínez-Murcia y col., 1991; Dicks y col., 1993). Además, actualmente se han descrito otras dos especies de este género, *Oenococcus kitaharae* (Endo y col., 2006) y *Oenococcus alcoholitolerans* (Badotti y col., 2014).

1.3.2 Características del genoma de *O. oeni* y evolución del mismo

Zé-Zé y col., (1998) a partir de los datos obtenidos por análisis de fragmentos de macrorestricción, realizaron los mapas físicos de los genomas de las cepas comerciales de *O. oeni* PSU-1 y GM. Esta técnica les permitió determinar que el tamaño de los genomas era de ~1.857 y ~1.932 Kb, respectivamente. Esto autores determinaron que ambos genomas eran estructuralmente similares y que las diferencias observadas eran el

resultado de mutaciones puntuales, deleciones e inserciones (Zé-Zé y col., 2000). Gracias a la disponibilidad de estos mapas genéticos, se facilitó la secuenciación del genoma de la cepa *O. oeni* PSU-1, que presenta un cromosoma de 1.780 Kb, con un contenido de G+C de 38 % (Mills y col., 2005). Actualmente sólo se dispone de un genoma completo de los 58 genomas ensamblados y anotados de cepas de esta especie en la base de datos pública NCBI.

Además, se ha demostrado que la divergencia evolutiva entre *O. oeni* y de su antecesor más cercano género *Leuconostoc*, radica principalmente en la pérdida de una gran cantidad de genes por parte de *O. oeni*. Estos genes están relacionados con diferentes rutas para la biosíntesis de factores de crecimiento tales como glutatión, rivo flavina o tiamina; de genes relacionados con el metabolismo de xilosa y sacarosa; de genes que codifican para los componentes del sistema de manosa fosfotransferasa y para la síntesis de aminoácidos tales como arginina, leucina, valina, triptófano, metionina, glutamato, isoleucina o histidina (Makarova y col., 2006; Marcobal y Mills, 2009). La incapacidad para sintetizar vitaminas y aminoácidos explica que sea una cepa con importantes requerimientos nutricionales como ya describió Garvie (Garvie, 1967b).

Varios autores han demostrado que el genoma de *O. oeni* evoluciona más rápidamente que el de las especies que pertenecen al grupo *Leuconostoc* (Yang y Woese 1989; Makarova y Koonin, 2007). Según Marcobal y Mills, (2009), esta alta tasa de evolución se debe a que esta especie ha perdido los genes *mutS* y *mutL*, que están implicados en la reparación de los apareamientos erróneos del ADN (*mismatch* MMR). Marcobal y col., (2008) demostraron que la tasa de mutación espontánea en *O. oeni* y *Oenococcus kitaharae* son significativamente más altas que las de especies que sí poseen los genes *mutS* y *mutL* tales como *P. pentosaceus* y *L. mesenteroides*. El sistema MMR repara de forma más efectiva las mutaciones por transición que por traversión, por ello, la ausencia de genes *mutS* y *mutL* ocasiona un incremento en las sustituciones por transición (Choy y Fowler 1985; Marcobal y Mills, 2009). El trabajo de Marcobal y col., (2008) muestra que, tras comparar los genomas de dos cepas de *O. oeni* (PSU-1 y BAA-1163) con otros de cepas del grupo *Bacillales*, la tasa de transiciones es significativamente más alta en los primeros que en los segundos (Marcobal y Mills, 2009).

A pesar de que *O. oeni* es una especie con una gran diversidad fenotípica y fisiológica esto no se correlaciona con la existencia de taxones subespecíficos como han demostrado Zavaleta y col., (1996). Otros autores tras realizar un mapeo cromosómico

determinaron que se trata de una especie filogenéticamente homogénea que presenta una elevada similitud global (Dicks y col., 1990; Zé-Zé y col., 2000; Lechiancole y col., 2006). Sin embargo, Bihère y col. (2009) tras secuenciar 8 genes “*housekeeping*” llegaron a la conclusión de que se podían evidenciar dos subpoblaciones. Estas subpoblaciones aunque se diferenciaban claramente no constituían subespecies. El hecho de que la mayor parte de las cepas provenientes de cultivos malolácticos comerciales (con capacidades óptimas para llevar a cabo la fermentación en vino) se agrupasen en una única subpoblación les llevó a insinuar la existencia de relaciones genotípicas y fenotípicas y a postular la existencia de dos subespecies tecnológicas, aunque no filogenéticas. También ahondan en esta relación genotipo/fenotipo los trabajos de Borneman y col. (2010), que demuestran que existe un 10 % de variaciones entre los genomas de varias cepas de esta especie. Sin embargo, estos autores demuestran la existencia de una importante variación genómica intraespecífica, debida a inserciones y deleciones entre las cuales destacan dos grandes deleciones en las regiones 45-65 y 1400-1450 kb. Estos cambios genéticos no parecen tener un impacto negativo sobre la capacidad de *O. oeni* en llevar a cabo la FML, aunque sí estarían relacionadas con la existencia de otras diferencias fenotípicas entre cepas, que justifican la existencia de diferentes perfiles metabólicos (Borneman y col., 2012).

Asimismo el hecho de que esta especie sea capaz de resistir condiciones extremas de crecimiento ha llevado a la búsqueda de razones a nivel metabólico, fisiológico y genético que expliquen su gran resistencia a las condiciones del vino (Bartowsky y Borneman, 2011).

1.3.3 Diversidad fenotípica y genómica

A pesar de que se trata de una especie filogenéticamente homogénea, *O. oeni* presenta una enorme diversidad fenotípica, fisiológica y genómica, como ya se ha dicho. Además, las cepas de esta especie presentan diversos requerimientos de factores de crecimiento, capacidades para fermentar azúcares y para degradar ácidos orgánicos y aminoácidos, así como para producir aminas biógenas y polisacáridos. En los últimos años también se ha demostrado que las cepas difieren en sus capacidades hidrolíticas y en sus capacidades para producir distintos compuestos organolépticos.

Fisiológicamente, también se ha encontrado diferencias importantes en la capacidad de crecer y de llevar a cabo la FML en las diferentes condiciones del vino. Ya en 1967, Garvie puso de manifiesto que existían diferencias entre las cepas de *O. oeni* respecto a

sus requerimientos de aminoácidos y de oleato. Las diferencias en cuanto a las necesidades de determinados aminoácidos fueron posteriormente corroboradas por Amoroso y col. (1993) y Remize y col. (2006).

Respecto a las capacidades para fermentar distintos azúcares Pardo y col. (1988) y Jensen y Edwards (1991) mostraron que las cepas de *L. oenos* (syn. *O. oeni*) diferían en su capacidad para fermentar carbohidratos, y que el estudio de estas capacidades estaba influenciado por el sistema de análisis utilizado. Así, cuando se evaluaba la fermentación en la Galería API 50 CHL la diversidad de perfiles fermentativos que se encontraba era mucho menor que la que se observaba en los ensayos realizados en el clásico test en tubo. Jensen y Edwards también encontraron diferencias en las capacidades fermentativas entre cepas de *O. oeni* utilizando para el estudio la Galería API 50 CHL, aunque para obtener buenos resultados debieron modificar la composición del medio basal y alargar el tiempo de incubación. Bravo-Ferrada y col. (2011) confirman la existencia de diferencias en los perfiles fermentativos de *O. oeni* al utilizar el sistema API 50 CH.

Casi todas las cepas de *O. oeni* son capaces de degradar tanto el ácido málico como el cítrico, sin embargo, no todas lo hacen con la misma eficiencia y velocidad (Henick-Kling y col., 1989; Izquierdo y col., 2004; Coucheney y col., 2005a, Capozzi y col., 2010).

La capacidad para degradar aminoácidos en *O. oeni* está mediada por la presencia/ausencia de enzimas que intervienen en el catabolismo de los mismos y que, según se ha comentado anteriormente, pertenecen a 5 clases diferentes: aminotransferasas, descarboxilasas, dehidratasas, liasas y desaminasas. La degradación de algunos aminoácidos por desaminasas y descarboxilasas puede originar productos tóxicos en el vino como el carbamato de etilo (derivado de un intermediario del catabolismo de la arginina) y las aminas biógenas (formadas por descarboxilación de determinados aminoácidos, como la arginina, histidina, tirosina o lisina. Por ello, la capacidad de formar estas sustancias tóxicas va a depender del equipo enzimático que posea cada cepa. Varios autores han mostrado que la capacidad para degradar arginina por la vía de la arginina deiminasa es bastante frecuente entre las cepas de *O. oeni* (Araque y col., 2009), aunque parece que existen cepas que no pueden degradarla porque carecen de los genes que codifican para las proteínas transportadoras de la misma al interior celular (Divol y col., 2003). Sin embargo, entre las cepas capaces de degradarla existen diferencias en la eficiencia de la degradación de la arginina por esta

vía, según demostraron Araque y col. (2009). El hecho de que algunas cepas de *O. oeni* puedan excretar al medio citrulina, que es un intermediario del catabolismo de la arginina vía ADI, supone el riesgo de que pueda formarse carbamato de etilo (sustancia potencialmente cancerígena) a partir del mismo. La arginina también puede degradarse vía arginina descarboxilasa y en este caso daría lugar a agmatina, y ésta a su vez a putrescina, dos aminas biógenas. La putrescina también puede producirse a partir de la ornitina. En los últimos años se han publicado muchos trabajos en los que se demuestra que cepas de la especie *O. oeni*, están implicadas en la producción de putrescina en los vinos y que esta capacidad es dependiente de cepa (Mangani y col., 2005). La capacidad para producirla a partir de arginina o de ornitina también depende de la cepa y ha sido estudiada por Guerrini y col. (2002).

Otros autores también han demostrado que *O. oeni*, no sólo es capaz de descarboxilar la arginina o la ornitina para producir putrescina, sino también la histidina o la lisina para producir histamina y cadaverina, respectivamente. La capacidad para producir estas dos últimas aminas es también cepa dependiente (Guerrini y col., 2002; Delfini, 1989; Lonvaud-Funel y Joyeux, 1994; Coton y col., 1998; Leitão y col., 2000; Moreno-Arribas y col., 2003; Landete y col., 2005). La producción de histamina por parte de *O. oeni* es un asunto que ha generado una importante controversia, ya que mientras que algunos autores encuentran que algunas cepas sí la producen o sí poseen los genes que codifican para la histidina descarboxilasa, otros no. García-Moruno y Muñoz (2012) han escrito una excelente revisión sobre esta controversia.

Aunque *O. oeni* nunca se ha asociado a la alteración denominada “ahilado” del vino o de la sidra, caracterizada por la formación de un polisacárido que aumenta la viscosidad de estas bebidas alcohólicas, Ibarburu y col. (2007) pusieron de manifiesto la existencia de una cepa de *O. oeni*, aislada de sidra productora de un β -glucano. En los últimos años, se han encontrado cepas de origen vínico capaces de producir cantidades variables de β -glucano (Dimopoulou y col., 2012) lo que demuestra que existe diversidad entre cepas respecto a esta característica.

En los últimos años se han llevado a cabo numerosas investigaciones encaminadas a estudiar las capacidades enzimáticas de las bacterias lácticas en general y de *O. oeni* en particular. Una de las primeras capacidades en ponerse de manifiesto fue la β -glicosidásica, que es de interés tecnológico ya que potencia la liberación de aromas terpénicos. Cuando los terpenos están conjugados (unidos covalentemente a un azúcar) son precursores que carecen de aroma pero que se transforman en sustancias aromáticas

cuando el terpeno se libera de su unión con un azúcar gracias a la acción de enzimas β -glicosidasas. Las cepas de *O. oeni* difieren en la posesión o no de este tipo de enzimas y en especificidad de sustratos que presentan este tipo de enzimas. Aunque se ha detectado que numerosas cepas de *O. oeni* presentan actividades β -glicosidásicas (Grimaldi y col., 2000), la mayor parte de ellas las ejercen sobre sustratos sintéticos (Ugliano y col., 2003; Gagné y col., 2010), mientras que muy pocas, o muy pobremente, lo hacen sobre el terpenil glicósidos, sustratos naturales en los vinos (Vivas y col., 1997; McMahon y col., 1999; Mansfield y col., 2002; Barbagallo y col., 2004; D’Incecco y col., 2004). *O. oeni* no es solamente capaz de producir polisacáridos (β -glucanos) sino también de degradarlos gracias a la posesión de enzimas β -glucanasas. Guilloux-Benatier y col. (2000) demostraron por primera vez que *O. oeni* posee una actividad extracelular β -1,3 glucanasa. Posteriormente, Matthews y col. (2006) encontraron cepas comerciales de *O. oeni* capaces de hidrolizar el β -glucano de la cebada y la carboximetilcelulosa. Estas actividades β -glucanasa no se presentaban en todas las cepas, por lo que es un carácter cepa dependiente. Otras actividades hidrolíticas que se han puesto de manifiesto en *O. oeni* son las proteolíticas, lipolíticas, y también las actividades tanasa y esterasa. Así, Manca de Nadra y col. (1997) encontraron que algunas cepas de *O. oeni* pueden liberar péptidos y aminoácidos libres durante la FML en vino blanco y en vino tinto (Manca de Nadra y col., 1999). A pesar de que Leitão y col. (2000) señalaron que la capacidad para degradar proteínas del vino no era muy común entre cepas de *O. oeni* (Marques y col., 2008), Cappello y col. (2010) observaron que algunas de sus cepas podían hacerlo aunque con diferentes eficiencias. No existe demasiada información sobre el sistema lipolítico presente en las bacterias lácticas del vino. Un estudio realizado por Davis y col., (1988) demostró que *L. oenos* (actualmente *O. oeni*) y algunas otras bacterias lácticas de vino presentaban actividad lipolítica. Sin embargo, Matthews y col., (2006) fueron incapaces de detectar esta actividad en ninguna de las cepas de *O. oeni* que ellos estudiaron. En relación a la actividad tanasa, Matthews y col. (2006) detectaron esta actividad en diversas cepas de *O. oeni* y demostraron que las cepas diferían en su capacidad para hidrolizar metilgalato. Por otro lado, Matthews y col. (2006 y 2007), Cappello y col. (2010) y Zapparoli y col. (2012) describieron que algunas cepas de *O. oeni* tienen capacidad para hidrolizar diferentes ésteres y con diferentes eficiencias. Todos estos autores determinaron que *O. oeni* tiene mayor actividad esterásica frente a ésteres de cadena

corta (C2-C8) que frente a los de cadena larga (C10-C18). Pérez-Martín y col. (2013), también demostraron que todas las cepas que ellos ensayaron hidrolizaban ésteres de C8 y que el 33 % podían hacerlo sobre ésteres de C2, C12, C14 y el 50 % sobre C10 y C18. Desde el punto de vista tecnológico las cepas de *O. oeni* también difieren en sus capacidades para resistir y crecer a bajos valores de pH, y a diversas concentraciones de etanol y de SO₂ (García-Alegría y col., 2004; Guzzon y col., 2009; Bravo-Ferrada y col., 2011).

El estudio de la variabilidad genética en *O. oeni* ha sido abordado en los últimos años con diferentes fines y herramientas. Los objetivos de estos trabajos se han centrado en la estimación de la diversidad existente entre las cepas y en la especie, la estimación de relaciones biogeográficas entre las cepas y lugares de procedencia de las mismas, el estudio de las dinámicas de poblaciones en vinificaciones naturales y la evaluación del grado de implantación de cultivos malolácticos inoculados, etc. Las herramientas que se han utilizado para llevar a cabo tales fines han sido aquéllas que permiten discriminar entre cepas que pertenecen a una misma especie, es decir, técnicas de tipificación. Entre ellas están el análisis de perfiles RAPD (*R*andom *A*mplified *P*olymorphic *D*NA), PFGE (*P*ulsed *F*ield *G*el *E*lectrophoresis), AFLP (*A*mplified *F*ragment *L*ength *P*olymorphism), VNTR (*V*ariable *N*umber of *T*andem *R*epeat) y el análisis de las secuencias *housekeeping*, conocida como MLST (*M*ulti*l*ocus *S*equences *T*yping). La base metodológica correspondiente a cada una de estas técnicas se abordará en el apartado 1.3.6.2. Respecto al primer objetivo descrito anteriormente, Izquierdo Cañas y col. (2009a), López y col. (2007) y (2008), Solieri y col. (2010) y Marques y col. (2011) y Capello y col. (2008) detectaron una alta diversidad genética entre los aislados de *O. oeni* procedentes de vinos de vinificaciones naturales, mientras Reguant y Bordons (2003) y Reguant y col. (2005) encontraron una muy baja diversidad de *O. oeni* en vinos producidos en una bodega experimental. Hay que ser cautos a la hora de realizar comparaciones sobre la diversidad encontrada en los distintos trabajos, ya que estas medidas están afectadas por el tamaño muestral y por la diversidad de vinos, de fases de vinificación y de momentos muestreados. Así, cuanto mayor es el número y tipos de vinos, mayor número de fases de fermentación se han muestreado y mayor número de bodegas y vendimias se han analizado, mayores grados de diversidad cabe esperar. Los trabajos de Capello y col. (2008), Capello y col. (2012) y Capello y col. (2014) muestran una mayor diversidad de cepas *O. oeni* en vinos italianos obtenidos de la

variedad Primitivo que en los obtenidos de las variedades Malvasian Nera y Negroamaro, utilizando todos ellos una aproximación metodológica semejante. En alguno de estos trabajos se ha puesto en manifiesto que la FML no es llevada a cabo por una única cepa sino por varias (Reguant y col., 2005; López y col., 2007).

Varios autores han estudiado si las distintas cepas están asociadas a una localización geográfica determinada. Así, Larisika y col. (2008) y Pramateftaki y col. (2012), aplicando la técnica PFGE a las cepas de *O. oeni* obtenidas de vinos de distintos lugares geográficos situados en Alemania y Grecia, respectivamente, fueron incapaces de establecer relaciones entre cepas y lugares de procedencia. Tampoco Bordas y col. (2013) encontraron este tipo de relaciones, sin embargo, Marques y col. (2011) si lograron establecer que existía una correlación entre los 49 grupos genómicos detectados por RAPD y el origen geográfico en vinos de Portugal. También, Bridier y col. (2010) fueron capaces de discriminar por análisis PFGE las cepas de *O. oeni* procedentes de vinos griegos de los procedentes de otros países como Francia, Chile, Sudáfrica, Alemania, España, Estados Unidos, Argentina, Brasil, Suiza, Australia, Austria y Portugal, aunque las de estos últimos países aparecían todas juntas en el análisis de MANOVA. Los datos derivados del análisis MLST permitían la separación de la mayor parte de las cepas en función a su lugar de origen, aunque las de Aquitania, Italia y Sudáfrica no se discriminaban entre sí.

Muchos de los autores ha evaluado al diversidad existente en el conjunto de aislados conseguidos a partir de un determinado vino o área geográfica, o han estimado a partir de esos datos la diversidad global de la especie (Capello y col., 2008; Capello y col., 2010; Capello y col., 2014; Marques y col., 2011, Zapparoli y col., 2000; Zapparoli y col., 2012). En muchos de estos casos se han empleado dos o más métodos de tipificación distintos para evaluar la diversidad en el conjunto de los aislados y se han derivado conclusiones acerca de la conveniencia de utilizar uno u otro o de hacer un análisis conjunto de los mismos. Así, Claisse y col. (2012) evaluando la diversidad de 236 cepas con tres sistemas de tipificación, VNTR, MLST y PFGE, encontraron que el primero proporcionaba valores más elevados de diversidad que el segundo y el tercero: $D=0.994$ frente a $D=0.965$ y $D=0.989$, respectivamente. Bordas y col. (2013) observaron que los MLST eran menos discriminativos que los RAPD o VNTR, mientras que de las Rivas y col. (2004) observaron todo lo contrario. Ruiz y col. (2008) y Vigentini y col. (2009) combinando los perfiles PFGE-RAPD detectaron 31 genotipos diferentes en 60 aislados de vinos españoles y 27 genotipos de 36 aislados de *O. oeni*

procedentes de vinos italianos, respectivamente. Mientras que González-Arenzana y col. (2014) utilizando MLST-PFGE, detectaron 22 perfiles diferentes en 30 cepas de *O. oeni* procedentes de vinos españoles.

En relación a los trabajos realizados para estimar el grado de implantación de las cepas inoculadas frente a poblaciones naturales y tras aplicar la técnica PFGE han observado grados de implantación entre un 50-100 % (Pozo-Bayón y col., 2005; López y col., 2007; López y col., 2009) durante la FML. Similares valores de implantación tras utilizar la técnica RAPD describieron Ruiz y col. (2010) e Izquierdo Cañas y col. (2012).

Durante los últimos años se ha tratado de establecer relaciones entre el genotipo y el fenotipo de las cepas de *O. oeni* con la doble intención de a) entender las razones que justifican la variabilidad de rasgos metabólicos y de comportamiento en condiciones adversas y b) tratar de facilitar la identificación y selección de buenos cultivos malolácticos. Renouf y col., (2008) analizaron la presencia de 16 genes en un conjunto de 28 cepas aisladas a lo largo de la vinificación de 3 vinos diferentes. La selección de estos genes estaba motivada por el hecho que se expresaban diferencialmente en cepas de alta y baja eficiencia maloláctica, según describieron Delaherche y col. (2006). Los resultados mostraron que las cepas de *O. oeni* que aparecían más tardíamente en la fermentación presentaban un mayor número de genes marcadores que aquéllas que se presentaban en etapas más tempranas. De ello dedujeron que existía una correlación entre número de estos marcadores y resistencia a condiciones fisicoquímicas del vino.

En el año 2009, Renouf y col., al analizar las secuencias de los genes *rpoB* y *rpoC* que codifican para las subunidades β y β' de la ARN polimerasa, respectivamente, detectaron que la mayor parte de las cepas que aparecían en momentos más tempranos de la vinificación presentaban el alelo L del gen *rpoB*, mientras que la mayoría de las cepas que aparecían en las etapas más tardías de la vinificación o durante el envejecimiento en barrica presentaban el alelo H. Al analizar el comportamiento fisiológico de las cepas pertenecientes a ambos grupos, observaron que las cepas que presentan el alelo L del gen *rpoB* y muestran una mayor resistencia a altas concentraciones de azúcar y mayor sensibilidad al etanol, mientras que las que presentan el alelo H presentan una mayor resistencia al etanol y al SO_2 . De ello, los autores dedujeron que las cepas con el alelo H son más resistentes a las condiciones del vino, mientras que las que presentan el tipo L están más adaptadas para crecer en las condiciones propias de las primeras etapas de la

FA: altas concentraciones de azúcares y de bajas concentraciones de etanol. Estos autores también observaron que el análisis en conjunto de las secuencias de los diferentes alelos de los genes *mleA*, *rpoC*, *gyrB*, *ctsR* y *clpL*, separaba a las cepas en dos grupos que se correspondían con los grupos L y H definidos por la secuencia de los dos alelos del gen *rpoB*. De confirmarse estas relaciones se facilitaría la búsqueda de cepas adecuadas para llevar a cabo la FML.

1.3.4 Factores de estrés y relación del estrés con la capacidad de supervivencia y de realización de la FML

1.3.4.1 El estrés en *O. oeni* y formas de mitigarlo

Las características especiales del vino tales como la presencia de etanol, el pH ácido, los escasos nutrientes y la presencia de SO₂ suponen situaciones estrés para *O. oeni*. Para superar estas situaciones, *O. oeni* presenta mecanismos de respuesta que consisten en la síntesis de proteínas de estrés y en la puesta en marcha sistemas que permiten que esta bacteria pueda seguir realizando sus funciones.

Una consecuencia del estrés ocasionado por el etanol es el incremento de la biosíntesis de polisacáridos y del peptidoglucano de la pared celular. También conlleva a un aumento de la fluidez de los lípidos de la membrana que tiene como consecuencia que ésta se vuelva más permeable, promoviendo una fuerte afluencia de protones y metabolitos esenciales (Chu-Ky y col., 2005). Esta fluidización tiene un efecto transitorio que permite que la célula incremente la rigidez de su membrana, debido a la isomerización (de cis a trans) de los ácidos grasos monosaturados de la bicapa lipídica. También se ha observado un aumento en la cantidad de ácidos grasos insaturados en la membrana y una disminución de la cantidad total de lípidos celulares (Teixeira y col., 2002; Chu-Ky y col., 2005, Grandvalet y col., 2008). Un estudio proteómico ha mostrado que durante el crecimiento de *O. oeni* en presencia del etanol, hay también una disminución de la actividad de los enzimas deshidrogenasa y gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa y un aumento de los enzimas glutatión reductasa y maloláctico (Da Silveira y col., 2002 y 2003).

Por otro lado, se ha descrito que el pH al igual que en el caso del etanol, aunque en menor proporción, puede inducir la modificación de la composición de membrana, haciendo que aumenten los ácidos grasos insaturados (Drici-Cachon y col., 1996) sin que quede afectada la fluidez de la membrana (Tourdot-Maréchal y col., 2000; Chu-Ky

y col., 2005; Grandvalet y col., 2008). Zhao y col. (2009) observaron un incremento tanto en la concentración relativa del ácido lactobacílico y del ciclopropano, así como también en la proporción de ácidos grasos insaturados y saturados en la membrana celular lipídica, tras el crecimiento de *O. oeni* en un medio de cultivo de pH ácido. El estrés ocasionado por el pH ácido, al igual que con el etanol también influye en el aumento de la rigidez de la membrana, aunque en el caso del pH tiene un efecto gradual e irreversible (Chu-Ky y col., 2005). Este efecto es débil y transitorio en células de *O. oeni* adaptadas al pH en comparación con aquellas que no lo están (Tourdot-Maréchal y col., 2000). Otro mecanismo de protección frente al pH ácido es la activación de la FML, ya que esta fermentación participa en la regulación del pH interno y en la generación una fuerza protón motriz capaz de activar la síntesis de ATP mediante el enzima ATPasa F_1F_0 (Tourdot-Maréchal y col., 1993; Salema y col., 1996; Galland y col., 2003). La fuerza protón motriz se produce por la conversión de la energía química originada por un gradiente de solutos en energía electroquímica de protones (Konings 2006; Zhao y col., 2013). Tourdot-Maréchal y col. en 1999, observaron que sus cepas mutantes de *O. oeni* carecían de una H^+ ATPasa, lo que las hacía más sensibles al pH bajo que las originales no mutantes e incapaces de realizar la FML. A partir de ahí, estos autores infirieron una relación entre las actividades ATPasa y maloláctica. Parece pues que la ATPasa y el enzima maloláctico tienen un papel importante en la regulación del pH citoplasmático y en la tolerancia al pH en *O. oeni* (Fortier y col., 2003). El metabolismo del citrato en *O. oeni* también puede generar una fuerza protón motriz (Olguín y col., 2009) que permite expulsar los H^+ del interior celular y por tanto de mantenimiento del pH intracelular. Asimismo, la decarboxilación de los aminoácidos asociados con la producción del amonio por *O. oeni* puede tener una función protectora frente a la acidificación intracelular y extracelular, mediante el incremento del pH intracelular y la generación de ATP (Lonvaud-Funel, 2001).

A pesar de que existe poca información sobre el mecanismo de respuesta frente al SO_2 , Carreté y col. (2002) dedujeron que el SO_2 reduce la actividad ATPasa produciendo un desequilibrio en el mantenimiento del pH intracelular, y también se ha observado que se sintetizan proteínas de estrés a concentraciones elevadas de SO_2 (Guzzo y col., 1998).

Se han caracterizado en *O. oeni* muchos genes que codifican para proteínas o mecanismos de estrés, uno de los más estudiados es el *hsp18* que codifica para una *heat shock protein* (HSP), denominada Lo18, y que también actúa como una chaperona molecular (Guzzo y col., 1994). El grupo de las proteínas HSP se caracterizan por tener

un tamaño que oscila entre 12 y 43 kDa, por poseer una organización estructural conservada y por tener múltiples localizaciones (Nakamoto y Vigh, 2007). La proteína Lo18 se induce fuertemente frente al estrés por calor (42 °C), por etanol (12 %), por acidez (pH 3.0) o por SO₂ (60 mg/L) (Guzzo y col., 1997 y 1998), aunque también sucede esto cuando las células están en fase estacionaria (Guzzo y col., 2000). Lo18 está implicada en el mantenimiento de la integridad celular ya que tiene doble función: 1) en la estabilización de la membrana y 2) en la protección de las proteínas citoplasmáticas con el fin de evitar la agregación de las mismas (Coucheney y col., 2005a; Maitre y col., 2014). Es decir los oligómeros de Lo18 se disocian en dímeros que tras interactuar con los fosfolípidos de membrana promueven la estabilización de la misma, mediante un mecanismo que aún permanece desconocido, en células adaptadas al etanol estas proteínas presentan baja afinidad con la membrana de modo que se liberan al citoplasma donde ejercen la función de chaperonas evitando la agregación de otras proteínas (Maitre y col., 2014). Debido a la alta expresión específica de la proteína Lo18, muchos autores la consideran como un buen marcador para determinar la tolerancia al estrés en *O. oeni* (Coucheney y col., 2005b; Olguín y col., 2010). Además de la proteína Lo18, otras proteínas se han relacionado con la respuesta de *O. oeni* frente al estrés. Las proteínas FtsH, OmrA, GroESL y DnaK incrementan su expresión a temperaturas altas y frente al estrés osmótico (Bourdineaud y col., 2003; Bourdineaud y col., 2004; Mills y col., 2005).

La familia Clp está compuesta por ATPasas (ClpX y ClpC) y por una proteasa (ClpP) (Guzzo y Desroche, 2009). La proteína ClpX, se expresa a inicio de la fase exponencial y también se induce por el calor (Olguín y col., 2010); la proteasa ClpP se asocia con otra Clp dependiente de ATP, esta interacción promueve la remodelación y repliegue de proteínas durante diferentes condiciones de estrés. La concentración de ClpLP se incrementa en células estresadas (Beltramo y col., 2004).

El gen *ctsR*, considerado como un regulador de otro grupo de genes de estrés entre ellos *dnaK* y *groESL*. Se cree que la proteína CtsR impediría la síntesis de proteínas de estrés que son innecesarias hasta que los cambios ambientales por etanol, bajo pH, carencia de nutrientes, etc., inducen una intensa transcripción de genes que codifican para estas proteínas de estrés. Ello le permitiría mejorar así su adaptación a las condiciones ambientales adversas (Grandvalet y col., 2005; Zhao y col., 2013).

El gen *trxA*, que codifica para una tioredoxina (TrxA) que participa en la biosíntesis de ácidos nucleicos y de la pared celular, se induce en *O. oeni* en condiciones de estrés oxidativo y por el calor (Jobin y col., 1999).

Se han encontrado altos niveles de transcritos del gen *cfa* (que codifica una proteína implicada en la biosíntesis de ácidos grasos) y consiguientemente un aumento en la concentración de la proteína correspondiente. El aumento de esta proteína tiene lugar en la membrana de *O. oeni* crecido en presencia de etanol o a pH bajo, aunque también en las membranas celulares de células en fase estacionaria de crecimiento (Grandvalet y col., 2008). Por otro lado, la proteína dTDT-glucosa-4,6-dehidratasa se incrementa en células adaptadas al etanol (Silveira y col., 2004). Además, Olgún y col. (2009 y 2010) observaron una elevada expresión de los genes *citE*, *hsp18*, *clpP*, *ctsR*, *trxA*, *cfa* y *rmlB* en respuesta al estrés por etanol y pH en cepas de *O. oeni* con mayor capacidad maloláctica.

1.3.4.2 Métodos para evaluar la expresión de genes relacionados con el estrés

La PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) se ha empleado en la detección, cuantificación e identificación de BL asociadas a vinos (Delaherche y col., 2004; Pinzani y col., 2004) y sidras (Ibarburu y col., 2010). Asimismo, esta técnica se ha utilizado en estudios de expresión génica de un determinado gen en una célula, cuantificando la cantidad de ARNm producido por el gen en estudio. La cuantificación de la expresión génica, inicialmente realizada por la técnica *Northern Blot*, requería de grandes cantidades de ARNm que eran difíciles de obtener. Sin embargo, el uso de la RT-qPCR (*Quantitative Reverse Transcriptase Real-time Polymerase Chain Reaction*) ha resuelto este inconveniente reduciendo en gran medida la cantidad de ARNm necesario para llevar a cabo los estudios de expresión.

La cuantificación puede ser absoluta o relativa. El método de cuantificación absoluta usa estándares de ADN de concentración conocida para construir una recta de referencia (Wong y Medrano, 2005). Para el cálculo de la expresión relativa, es necesario el empleo de un gen de control interno o referencia que se expresa de forma constitutiva, entre ellos están los genes *housekeeping*, estos genes no varían su nivel de expresión bajo ninguna condición experimental (Thellin y col., 1999; Vandecasteele y col., 2001; Desroche y col., 2005). Para el cálculo de la expresión génica se han desarrollado varios modelos matemáticos, siendo el método del $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak y Schmittgen, 2001) el más frecuentemente utilizado por los investigadores. Además la mayoría de los programas

informáticos de los equipos de qPCR incluyen este método por defecto. Este método ha sido el empleado para determinar el nivel de expresión de genes de estrés en *O. oeni* por Beltramo y col. (2004), Desroche y col. (2005), Grandvalet y col. (2008) y Olguín y col. (2010). La técnica de RT-qPCR requiere de la extracción y cuantificación del ARNm, la eliminación del ADN contaminante, la síntesis del ADNc (ADN copia) y la amplificación del mismo mediante PCR en tiempo real. El ARNm obtenido debe de ser de alta calidad (libre de ADN y proteínas) y debe estabilizarse (ya que es muy lábil). En la reacción de transcripción inversa, las moléculas de ARNm son copiadas a ADNc por el enzima transcriptasa inversa en presencia de un cebador. Entre las enzimas transcriptasas inversas existentes, las más utilizadas son la del Virus de Leucemia Murina Moloney (MMLV) y la del Virus de la Mieloblastosis Aviar (AMV) (Kubista y col., 2006).

La estrategia para la síntesis de moléculas de ADNc (*priming*) más usada para la transcripción inversa consiste en la adición del oligo (dT). El oligo (dT) es un cebador de 18-20 nucleótidos que contiene solamente timinas, esta cola de T hibrida la cola de poliadeninas (poli-A) que presentan los ARNm de la mayoría de organismo procariotas y eucariotas. La cantidad de estos ADNc (que es el reflejo de los ARNm correspondientes) se estima mediante PCRq. La cuantificación del ARNm se basa en la adición de una sustancia (fluorocromo) que incorpora señal fluorescente al ADNc amplificado. La fluorescencia producida es directamente proporcional a la cantidad de ADN amplificado (Kubista y col., 2006). Las moléculas fluorescentes empleadas pueden ser "agentes intercaladores fluorescentes" de la doble cadena de ADN y los que utilizan "sondas fluorescentes" (Taqman®, "*molecular beacons*" y "*scorpions*"). El SYBR® Green, es una molécula que se intercala al surco menor del ADN dúplex cuando este se va formando a partir del ADNc. De esta manera permite cuantificar la producción del amplicón generado. En la Figura 3 se muestran las 4 fases principales: a) la fase inicial, en la cual la fluorescencia de los primeros ciclos es mínima y no rebasa el nivel umbral del medio circundante, b) la fase exponencial temprana, la fluorescencia producida por el producto de PCR rebasa el umbral definido por el equipo, o por el investigador. El ciclo en el cual la fluorescencia ha alcanzado un umbral definido se conoce como Ct (*Cycle Threshold* o Ciclo umbral). Este valor es inversamente proporcional a la cantidad inicial del molde que hay en la reacción (a valores bajos de Ct, mayor es el número de copias del ADN molde en la reacción); c) la fase exponencial, en donde la cantidad de producto de PCR se dobla en cada ciclo (se

alcanza un estado de amplificación óptimo) y finalmente d) la fase estacionaria, en la cual los reactivos y el equipo han alcanzado el límite de detección y la reacción ha terminado (Wong y Medrano, 2005).

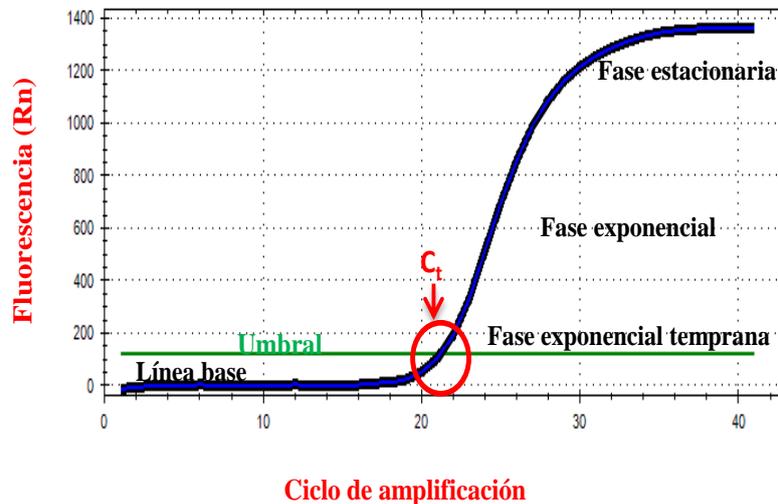


Figura 3. Curva de reacción de PCR en tiempo real

Para la detección se utiliza un termociclador especialmente adaptado para la lectura de cantidades mínimas de fluorescencia. La técnica RT-qPCR presenta una elevada sensibilidad, lo que permite la amplificación de fragmentos de ADN presentes en muy baja concentración (Wong y Medrano 2005; Deepak y col., 2007).

1.3.5 Criterios para la selección de cultivos iniciadores

A partir de 1980 se generalizó la utilización de cultivos iniciadores comerciales para llevar a cabo la FML en vinos. Ello ocurrió por dos razones: a) las dificultades para llevar a cabo de forma espontánea la FML en algunos vinos y b) la necesidad de asegurarse que la cepa que realizaba el proceso era una cepa eficaz y segura, es decir que no perjudicara el vino. Aunque se han utilizado diversas especies bacterianas para tal fin, la más comúnmente empleada es *O. oeni* dado que es la especie generalmente asociada a este proceso precisamente por tolerar mejor las condiciones del vino. Dado que *O. oeni* exhibe una alta diversidad fenotípica y fisiológica como ya se ha visto, las casas comerciales productoras de cultivos iniciadoras han hecho un importante esfuerzo para seleccionar las más adecuadas para llevar a cabo la FML. En muchos cultivos existentes en el mercado han sido fruto de colaboraciones entre empresas y universidades. Los criterios para seleccionar cepas de *O. oeni* como cultivos

malolácticos están principalmente relacionados, además de con su capacidad para degradar el ácido málico, con la capacidad de tolerar condiciones de estrés propias del vino o de la vinificación tales como el pH ácido, la elevada concentración de etanol y la presencia de sulfito (Guzzo y col., 2000). También se tienen muy en cuenta aspectos relacionados con las capacidades metabólicas de las cepas de *O. oeni*, ya que éstas van a tener una importante influencia sobre las características sensoriales del vino (Maicas y col., 1999; Krieger-Weber 2009). Los criterios que se utilizan generalmente para la selección de cepas malolácticas se recogen en la Tabla 2 y han sido extraídas de los trabajos de Suárez e Iñigo (2004), Krieger-Weber (2009) y Torriani y col. (2011).

Tabla 2. Criterios de selección de cepas malolácticas utilizadas en vinificación

| Propiedades |
|---|
| Resistencia a factores enológicos: |
| <ul style="list-style-type: none">• Resistencia a altos niveles de etanol (14 %)• Tolerancia a pH bajo (inferiores a 3.5)• Resistencia a altas concentraciones de SO₂• Tolerancia a bajas temperaturas |
| Características tecnológicas: |
| <ul style="list-style-type: none">• Alta capacidad maloláctica• Capacidad de realizar la FML en diferentes tipos de vinos• Rápido crecimiento en vino.• Buen crecimiento en medios sintéticos utilizados para la producción comercial• Baja producción de ácido acético al pH del mosto o del vino• Incapacidad de producir polisacáridos• Resistencia a bacteriófagos• Producción de bacteriocinas• Elevada resistencia a la lisozima• Actividad β-glicosidasa• Actividad esterasa• Producción de aromas afrutados• Reducción de sabores herbáceos• Capacidad para dar lugar a sensaciones de redondez de sabor en boca• Producción de baja astringencia• Producción de bajo amargor• Capacidad para producir acetaldehído (estabilización del color en vinos tintos)• Capacidad para producir cantidades moderadas de diacetilo• Capacidad para producir butanodiol• Que presente baja afinidad a la glucosa |
| Aspectos toxicológicos: |
| <ul style="list-style-type: none">• Incapacidad de producir aminos biógenos• Incapacidad de producir carbamato de etilo• Incapacidad de transferir genes de resistencia a los antibióticos |

También se ha postulado la introducción de otros criterios de selección como la resistencia a los pesticidas, ya que los vinos en los que se inoculen pueden tener residuos de los que se utilizan para el cultivo de la vid (Lonvaud-Funel, 1999; Capozzi y col., 2010), o el nivel de inducción de la proteína Lo18 asociada al estrés por calor (como ya que se ha visto, el nivel de expresión de este gen es alto en las cepas que presentan alta actividad maloláctica a pH bajos) (Coucheney y col., 2005a). Además, es importante estudiar la resistencia a la liofilización, ya que estos procesos de conservación son los que se van a utilizar durante la producción industrial de los mismos.

1.3.6 Técnicas de identificación y tipificación

La identificación y la tipificación de *O. oeni* puede realizarse utilizando una aproximación fenotípica, molecular o polifásica. La identificación por métodos fenotípicos se basa en el estudio de las características morfológicas, bioquímicas, fisiológicas y quimiotaxonómicas. La identificación por métodos moleculares se basa en el estudio de las moléculas del ADN o del ARN. Mientras que la técnica de identificación polifásica abarca el estudio de varias características fenotípicas, genotípicas y/o filogenéticas. Para ello pueden emplearse diferentes técnicas y la información obtenida tras un adecuado tratamiento de los datos, constituye un sistema de identificación de alta fiabilidad (Tracey y Britz, 1987) y además permite una caracterización muy precisa de cada cepa.

1.3.6.1 Métodos fenotípicos

Según el Ribéreau-Gayon y col. (2006), la especie de *O. oeni* se diferencia de las otras especies de BL del vino por las siguientes características: a) su morfología lenticular y el modo de agrupación de las células: en cadenas más o menos largas, b) ser de metabolismo heterofermentativo, c) su capacidad de crecimiento a pH 4.8 y al 10 % de etanol. Una descripción mucho más extensa de las características de esta especie se puede encontrar en *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Vos y col., 2011).

Una de las ventajas que representan los métodos fenotípicos para llevar a cabo la identificación es que son fáciles de realizar. En algunos casos se puede recurrir a sistemas miniaturizados comerciales que permiten una rápida y estandarizada identificación, aunque a veces no están adaptados a todas las especies como ocurre con *O. oeni* (Pardo y col., 1988, Jensen y Edwards, 1991). Sin embargo, tienen como

desventaja el que las características fenotípicas no se expresan de forma constante, sino que dependen de las condiciones ambientales o de cultivo. Muchos autores las han utilizado tanto para identificar como para caracterizar a las cepas de *O. oeni* (Garvie, 1967a). Aunque los métodos fenotípicos, por sí solos, tienen una resolución limitada para la correcta identificación de las especies, estas técnicas aún siguen en vigor y tienen interés científico. Además el estudio de las características fenotípicas permite no sólo identificar sino conocer el comportamiento de las cepas frente a diferentes factores fisicoquímicos así como sus capacidades metabólicas y enzimáticas, es decir caracterizar cada cepa.

1.3.6.2 Métodos moleculares

Los métodos moleculares tienen grandes ventajas respecto a los fenotípicos como su universalidad, mayor sensibilidad, resolución y poder discriminante. Este tipo de métodos sirve además de para identificar, para tipificar. Como desventaja hay que tener en cuenta que en algunos casos es necesario conocer las secuencias de ciertos genes para su aplicación, pero ello supone un problema menor en el caso de *O. oeni*, ya que muchas secuencias con información filogenética se hayan depositadas en bancos de datos accesibles a través de internet, como el EMBL, el NCBI, entre otros.

Identificación mediante análisis del ARN ribosómico 16S

Los genes ribosomales 16S y 23S contienen secuencias conservadas, variables e hipervariables, que pueden ser utilizadas para comparar tanto microorganismos muy próximos como muy alejados filogenéticamente. La identificación de los aislados se pueden llevar a cabo bien por secuenciación, bien por digestión del fragmento del gen ribosomal 16S previamente amplificado y tras su secuenciación se compara con las secuencias almacenadas en bases de datos. Un procedimiento alternativo es el 16S-ARDRA (*Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis*) donde primero se amplifica el fragmento 16S del ADNr, con cebadores específicos dirigidos a esta región, tras la posterior digestión de estos fragmentos ribosómicos con enzimas de restricción y la separación en un gel de agarosa se obtienen perfiles de bandas característicos de las diferentes especies de BL (Sato y col., 2011, Rodas y col., 2003). Una de las desventajas de esta técnica es que no siempre es capaz de diferenciar entre especies muy cercanas filogenéticamente. Sin embargo, *O. oeni* no es un caso problemático ya que las especies más cercanas filogenéticamente son *O. kitaharae* y *O. alcoholitolerans* (Endo

y Okada 2006; Badotti y col., 2014) y que pueden diferenciarse fácilmente con MseI y BfaI. La técnica 16S-ARDRA se ha utilizado para identificar aislados de *O. oeni* (Sato y col., 2001; Rodas y col., 2003 y 2005; Marques y col., 2010).

Identificación mediante hibridación con sondas

En esta técnica se utiliza un fragmento de ADN monocatenario (sonda), que es capaz de hibridarse con otro fragmento de ADN que posea la secuencia nucleotídica complementaria. Estas sondas que deben estar marcadas (radioisótopos, biotina-streptavidina, fluorocromos, etc.), se pueden hibridar bien directamente sobre el ADN problema extraído, depositado y desnaturalizado sobre una membrana de nitrocelulosa o directamente sobre las células fijadas y permeabilizadas (Dot-Blot e hibridación fluorescente *in situ*), o sobre ADNs digerido y cuyos fragmentos previamente separados por electroforesis se transfieren a una membrana, se desnaturalizan y se hibridan con una sonda ribosomal marcadas bien radioactivamente o biotiniladas. Así, solamente se detectan los fragmentos que contienen regiones homólogas a las de la sonda. La capacidad discriminante de esta técnica es hasta el nivel de especie en función de la secuencia de la sonda elegida (Farber, 1996). Esta técnica ha sido utilizada para identificar BL asociadas a vinos, entre ellas *O. oeni* (Dicks y col., 1990; Lonvaud-Funel y col., 1991; Tenreiro y col., 1994; Stahl y col., 1994; Zavaleta y col., 1997; Blasco, 2009).

Tipificación mediante secuenciación de genes *housekeeping*

En el tipado de secuencias multilocus (MLST) se secuencian al menos 5 genes localizados en diversos lugares del cromosoma. Esta técnica se ha utilizado para tipificar cepas de *O. oeni* de diferentes orígenes vínicos (De las Rivas y col., 2004; Bilhère y col., 2009; Bridier y col., 2010; González-Arenzana y col., 2014).

Tipificación mediante el estudio del polimorfismo de macrorrestricción

Estos métodos tienen como fundamento la digestión del ADN con enzimas de restricción que reconocen secuencias específicas del ADN poco frecuentes. Ello da lugar a fragmentos de gran tamaño, para cuya separación se utiliza la electroforesis de campo pulsado o PFGE (Schwartz y Cantor, 1984). El perfil de fragmentos de ADN obtenidos mediante PFGE, se considera una “huella genética” de la cepa en estudio. Este método ha sido descrito como el más discriminante a nivel intraespecífico de los

utilizados para el genotipado de BL y se le atribuye muy buena reproducibilidad. Sin embargo, requiere largo tiempo y es laborioso y caro, lo que limita su aplicación cuando se trata de analizar un elevado número de muestras (Blaiotta y col., 2001; Sánchez y col., 2004). Con todo, esta técnica se ha utilizado en algunas ocasiones para la tipificación de *O. oeni* (Pardo y col., 1998; Zapparoli y col., 2000; Lechiancole y col., 2006).

Tipificación mediante análisis del polimorfismo del ADN amplificado con cebadores arbitrarios (RAPD)

La técnica de RAPD, denominada también por otros autores AP-PCR (*Arbitrarily Primed PCR*) o DAF (*DNA Amplification Fingerprinting*), fue descrita simultáneamente por dos grupos de investigadores en 1990 (Welsh y McClelland, 1990; Williams y col., 1990). Es un método de tipado basado en la detección de diferencias en la secuencia del ADN genómico total de distintas cepas, utilizando un único cebador de secuencia arbitraria y de tamaño corto (10-20 nucleótidos). Las temperaturas de unión empleadas en esta técnica son mucho más bajas (35-39°C) que en una PCR tradicional, facilitando la hibridación del cebador a secuencias que no son 100 % homólogas y la amplificación de las zonas situadas entre las zonas que se ha unido a los cebadores en ambas cadenas. En una reacción de RAPD se generan numerosos fragmentos de amplificación de distinta longitud con diferentes pesos moleculares y tras su separación por electroforesis convencional se obtiene un perfil de bandas (*fingerprinting*) RAPD o huella RAPD específico de cada cepa. El uso de esta técnica se ha extendido debido a que tiene como ventajas la rapidez y sencillez de su metodología. No es necesario conocer previamente la secuencia del ADN a amplificar y se pueden utilizar una amplia variedad de cebadores arbitrarios comerciales. La principal desventaja de esta técnica es que presenta una baja reproducibilidad, debido a factores que pueden influir en la misma, entre ellos: longitud, tipo, composición y pureza del cebador, la concentración de ADN y magnesio, la temperatura de hibridación, etc.

Por todo ello, es esencial que las condiciones del análisis sean cuidadosamente controladas, para mejorar así la reproducibilidad (Welsh y McClelland, 1990; Williams y col., 1990). Esta técnica ha sido utilizada con éxito para conocer la biodiversidad de BL en productos lácteos (y col., 2006), en encurtidos (Sánchez y col., 2004), para la monitorización de procesos en la fermentación de cárnicos (Fontana y col., 2005) y para el tipado de BL de vino como *O. oeni*, entre otras (Zapparoli y col., 2000; Guerrini

y col., 2003; Reguant y Bordons, 2003; Rodas y col., 2005; Lechiancole y col., 2006; Solieri y col., 2010).

La tipificación mediante el análisis de polimorfismos amplificadas (AFLPs)

La técnica AFLP se basa en la detección de polimorfismos de fragmentos generados por digestión del ADN total y posterior amplificación selectiva de algunos de estos fragmentos de digestión. La ventaja de esta técnica es que analiza todo el genoma bacteriano y que no requiere el ningún conocimiento de las secuencias de ADN de los aislados. Es una técnica de fácil realización, altamente discriminante y reproducible. La reproducibilidad es alta cuando las condiciones de digestión, ligado y amplificación de las muestras no cambian, aunque es sensible a la calidad del ADN de la muestra. Esta técnica fue utilizada por primera vez por Cappello y col. (2008, 2010 y 2014), para el genotipado de cepas de *O. oeni*. Los autores describen haber alcanzado una gran diferenciación intraespecífica, aunque indican que es necesario realizar estudios comparativos con otras técnicas de caracterización fenotípica.

Tipificación mediante el análisis de la longitud de fragmentos de secuencias repetidas en tándem (VNTR)

Las repeticiones en tándem son secuencias nucleotídicas especiales de ADN organizadas cabeza con cola. Un número variable de estas repeticiones se distribuyen aleatoriamente sobre el genoma. Este tipo de secuencias son abundantes tanto en procariontas como en eucariotas. Estas repeticiones en tándem tienen un papel importante en la variabilidad genética y constituyen un mecanismo de adaptación bacteriana (Zhou y col., 2014). Las repeticiones en tándem se encuentran conservadas y se pueden clasificar en idénticas o degeneradas y según el tamaño de la unidad de repetición se denominan microsatélites, minisatélites y macrosatélites (Lopes y col., 2006). La técnica VNTR se basa en la amplificación de regiones de repeticiones en tándem en el genoma de un microorganismo. Tras una reacción de amplificación se pueden generar numerosos fragmentos de diferente tamaño que puedan dar lugar a un perfil VNTR para cada cepa. Para la amplificación de estas zonas repetidas se utilizan cebadores que son complementarios de las regiones colindantes conservadas (Claisse y col., 2012). Los VNTR se ha aplicado con éxito para tipificar cepas de *O. oeni* utilizando únicamente 5 regiones repetidas en tándem (Claisse y col., 2012; Claisse y col., 2014).



2. OBJETIVOS

El objetivo de esta Tesis Doctoral ha sido estimar la diversidad intraespecífica de la especie, para evaluar las relaciones fenotipo-genotipo, genotipo/fenotipo-propiedades tecnológicas, para seleccionar adecuadas cepas malolácticas y para evaluar la expresión de genes de estrés.

Para este objetivo general, el trabajo se ha articulado en torno a los siguientes objetivos específicos:

1. Caracterizar un conjunto de aislados de *Oenococcus oeni* desde los puntos de vista fenotípico, tecnológico, genómico y transcriptómico y utilizar estos resultados para estimar la existencia de caracteres o comportamientos que permitan diferenciar cepas aisladas de mostos y de vinos.
2. Determinar qué factores enológicos influyen principalmente en el crecimiento de *O. oeni*.
3. Determinar las relaciones existentes entre las características fenotípicas, tecnológicas y genómicas.
4. Establecer qué cepas son las más adecuadas como cultivos malolácticos y si existen características genómicas propias de este tipo de cepas que faciliten su identificación y selección.
5. Determinar si existen diferencias en el nivel de expresión de genes de estrés entre cepas resistentes y sensibles a diferentes tipos de estrés.



3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Microorganismos utilizados y condiciones de cultivo generales

Los aislados utilizados en este estudio se muestran en la Tabla 3. Estos procedían de diferentes localidades, diferentes tipos de vino y de diferentes momentos de la vinificación. También se utilizaron las siguientes cepas de referencia: *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* CECT 394, *Lactobacillus brevis* CECT 216 y *Yarrowia lipolytica* CECT 1240 y *Yarrowia lipolytica* CECT 12694.

El cultivo rutinario de los aislados de *O. oeni* se realizó en el medio de cultivo MLO (Zúñiga y col., 1993) ajustado a pH 4.8. Los cultivos se incubaron a 28 °C durante un periodo de 3 a 5 días. Las cepas de *Lactobacillus* y *Leuconostoc* se cultivaron en medio MRS (De Man y col., 1960) ajustado a pH 6.5, incubándose a 28 °C durante 2 días. Las cepas de levaduras se propagaron en el medio GPYA (Belloch y col., 1998) ajustado a pH 5.5, y se incubaron a 26 °C durante 3 días. Para el cultivo en placa se añadió 20 g/L de agar.

3.2 Conservación de los aislados microbianos

Los sistemas de conservación utilizados para los aislados fueron la congelación a -20 °C y la liofilización. La congelación se realizó mezclando en crioviales 500 µL de los cultivos en fase de crecimiento exponencial con 500 µL de glicerol estéril al 30 %. La mezcla se congeló a -20 °C para su conservación a medio plazo.

Para la conservación a largo plazo los aislados se liofilizaron. Para ello, los aislados crecidos hasta fase exponencial en 50 mL de los medios y condiciones señalados en el apartado 3.1, se centrifugaron durante 15 minutos a 6000 rpm (Heraeus Multifuge 1 S-R). Posteriormente, se lavaron con 50 mL de soluciones crioprotectoras (ácido glutámico 0.067 M para BL y leche descremada y glucosa al 15 % a razón 2:1, para levaduras). Las células lavadas se recuperaron por centrifugación en las condiciones descritas anteriormente. Tras esto, se resuspendieron en 2 mL de las soluciones crioprotectoras respectivas y se depositaron alícuotas de 400 µL de esta suspensión en tubos de cristal de 5 mm de diámetro. Estos tubos se congelaron, se liofilizaron, se cerraron al vacío y se almacenaron a 4 °C.

Tabla 3. Origen de los aislados y cepas de *O. oeni* utilizadas en este trabajo

| Localidad | Variedad | E ¹ | F ² | Aislados |
|-------------------|------------------|----------------|----------------|--|
| Los Isidros | Bobal | R | Mosto | 75 |
| Venta del Moro | Garnacha | T | Vino | 118 |
| Venta del Moro | Macabeo | B | Vino | 120 |
| Requena | Macabeo | B | Vino | 122 |
| Los Ruices | Bobal | T | Vino | 123, 124, 125 |
| Requena | Mezcla de tintos | T | Vino | 128, 138M, 171, 196 |
| Los Ruices | Bobal | R | Vino | 129, 130 |
| Los Ruices | Macabeo | B | Vino | 133 |
| Venta del Moro | Bobal | T | Vino | 134, 242 |
| El Derramador | Macabeo | B | Vino | 142, 234 |
| Sinarcas | Bobal | R | Vino | 149, 205A, 206, 213 |
| Sinarcas | Tempranillo | R | Vino | 158 |
| Fuenterrobles | Bobal | T | Vino | 160B, 160C, 237 |
| Casas de Prada | Bobal | R | Vino | 168, 169, 194, 197, 225, 228A, 251 |
| Cuevas de Utiel | Bobal | R | Vino | 176A |
| Casas de Prada | Tempranillo | T | Vino | 182, 188, 202, 229 |
| Sinarcas | Tempranillo | T | Vino | 217B, 218A, 219, 222M, 223A, 224 |
| Barbastro | Tempranillo | T | Vino | 226SM |
| Utiel | Bobal | T | Vino | 235, 236 |
| Venta del Moro | Bobal | R | Vino | 238, 239, 240 |
| Camporrobles | Bobal | R | Vino | 246 |
| Corrales de Utiel | Bobal | T | Vino | 248 |
| Corrales de Utiel | Tardana | T | Vino | 254 |
| Los Isidros | Bobal | R | Vino | 255 |
| Fuente La Higuera | Tempranillo | T | Vino | 504 |
| Peñafiel | Tempranillo | T | Vino | B19 |
| Fuensalida | Tempranillo | T | Vino | Z1, Z2, Z3, Z6, Z8 |
| Oporto | Syrah | T | Mosto | Po2, Po4, Po5, Po6, Po8, Po9, Po10, Po14, Po15, Po16 |
| Requena | Merseguera | B | Mosto | Me1, Me2, Me3, Me6, Me8 |
| La Rioja | Tempranillo | T | Mosto | Ix1, Ix5, Ix6, Ix9, Ix13, Ix14, Ix15, Ix19, Ix21 |
| Camporrobles | Bobal | T | Mosto | FS2, FS10, FS13, FS14, FS16, FS17, FS18, FS19, FS20, FS21, FS24, FS26, FS29, FS30, FS31, FS34, FS35, FS36, FS37 |
| ND | ND | ND | Vino | PSU-1 (ATCC [®] BAA-331 TM) |

| | | | | |
|----|----|----|------|-----------------------|
| ND | ND | ND | Vino | RM17(Lallemand) |
| ND | ND | ND | Vino | CECT 217 ^T |
| ND | ND | ND | Vino | ML34 CECT 218 |
| ND | ND | ND | Vino | CECT 4028 |
| ND | ND | ND | Vino | CECT 4029 |

¹Tipo de elaboración: B, blanco, R, rosado y T, tinto; ²momento de la vinificación: mosto o vino; ND: no determinado; ATCC: American Type Culture Collection; CECT: Colección Española de Cultivos Tipo; En **negrita** se muestran los nuevos aislados en este trabajo

3.3 Técnicas para estimar el crecimiento

Para evaluar el crecimiento de los aislados se han utilizado las siguientes técnicas:

3.3.1 Recuento de microorganismos viables

La estimación del número de microorganismos viables se realizó por siembra en superficie de diluciones decimales seriadas, realizadas en suero fisiológico estéril al 0.9 % (SF). Se depositaron 100 μ L de cada una de las diluciones respectivas en la superficie de las placas de MLO pH 4.8 y se distribuyeron con asa Drigalsky. Las muestras se incubaron a 28 °C durante 5 días. Las siembras se realizaron por triplicado y el resultado se expresó como la media de los recuentos en ufc/mL.

3.3.2 Recuento microscópico de microorganismos totales

El recuento de los microorganismos totales se realizó mediante el uso de una cámara Thoma. Las células se visualizaron con el objetivo 40X en un microscopio de fases Leica DMB 5000.

3.3.3 Determinación de la Densidad Óptica (D.O.)

El crecimiento de los microorganismos en medios líquidos y en vino sintético se determinó mediante la medida del aumento de la densidad óptica a 600 nm a lo largo del tiempo. Para ello se utilizó un espectrofotómetro CE 373 (Cecil Instruments) y una longitud de onda de 600 nm.

3.3.4 Expresión de los crecimientos como valores de área bajo la curva (ABC)

Este método se basa en el cálculo del área total que hay debajo de la curva de crecimiento convirtiéndose en una medida cuantitativa global del crecimiento (Gagnon

y Peterson 1998; Herbers y col. 2011). El ABC es la integral de una función trapezoidal (en nuestro caso las D.O.) que gráficamente queda determinada en un esquema de ejes cartesianos, en un intervalo de 2 puntos (tiempo) (Gagnon y Peterson 1998). Para ello se utilizó el programa Excel 2010 (Microsoft Office). Los valores de los crecimientos en vino tinto y en vino sintético se calcularon por triplicado en cada condición y a partir de los mismos se obtuvieron los valores ABC, expresados en unidades arbitrarias (UA). Las figuras se construyeron a partir de las medias y la desviación estándar de los triplicados de cada aislado.

3.3.5 Determinación del peso seco

Para determinar el peso seco se utilizaron 5 mL de un cultivo de *O. oeni* de D.O. $\lambda_{600\text{ nm}}$ igual a 0.5. Los cultivos se colocaron en tubos de 10 mL previamente pesados en una balanza analítica (Denver Instruments S.I-114). Las células correspondientes a ese volumen se recogieron por centrifugación en una Multifuge 1 S-R a 6000 g durante 20 minutos. Se descartó el sobrenadante y se eliminó la humedad del sedimento a 100 °C durante 4 horas. Para determinar el peso seco, al peso final obtenido al pesar los tubos sometidos a desecación se les restó el peso del tubo vacío determinado previamente. Los resultados se expresaron en mg/mL.

3.4 Aislamiento de nuevos especímenes de *O. oeni*

Para tener una buena colección de aislados de *O. oeni* de mosto, se muestrearon mostos de diferentes procedencias (Tabla 3). Los mostos se recogieron directamente en bodega en frascos estériles. Cien μL de diferentes diluciones decimales de estas muestras se sembraron en la superficie de placas de Agar MLO suplementado con natamicina 0.15 g/L, para inhibir el crecimiento de las levaduras. Todas las placas se incubaron a 28 °C durante 7 días. Transcurrido este tiempo se seleccionaron aquellos aislados que presentaban una morfología colonial y celular típica de *O. oeni*.

3.5 Identificación de los nuevos aislados incorporados a la colección ENOLAB

Para llevar a cabo este objetivo, se realizó una reacción de PCR específica utilizando 2 cebadores específicos, diseñados por Ferrer (comunicación personal):

I₂B: CCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGT

I₆B: TTCGGGTGAAGTGAGGCAATGACTA

Estos cebadores, amplificaban específicamente una región del ADN ribosomal 16S de *O. oeni*. Las amplificaciones se realizaron directamente desde colonia. Para obtener el ADN molde de una colonia se resuspendía en 10 µL de agua MilliU estéril (Millipore). Cada reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen total de 50 µL que contenía: 1 µL de cada uno de los cebadores a 50 mM, 1 µL de la mezcla de dNTP (Roche) a 200 µM en total, 5 µL de tampón de PCR 1X (Thermo Scientific), 0.5 µl de MgCl₂ a 50 mM (Thermo Scientific), 40 µL de agua MilliU (Millipore), 0.5 µL de DyNAzyme II ADN polimerasa (Thermo Scientific) y 1 µL de la suspensión celular como fuente de ADN molde. La PCR se llevó a cabo en un termociclador PTC-100TM (MJ Research) con las siguientes condiciones de amplificación: una desnaturalización inicial a 95 °C durante 5 min, 34 ciclos a 95 °C durante 30 s, 73 °C durante 1 min y 30 s y, para finalizar, una extensión a 72 °C durante 10 min.

Tras la amplificación, los fragmentos de PCR se separaron en gel de agarosa (SeaKem® LE, Cambrex) preparado al 1.2 % (p/v), en un tampón TBE 0.5 M. Las condiciones electroforéticas fueron 80V durante 45 minutos en tampón TBE 0.5 M. El tamaño de los fragmentos se estimó por comparación con el marcador de peso molecular 1Kb Plus *DNA Ladder* (Invitrogen). Una vez teñido el gel con bromuro de etidio 0.5 µg/mL (MO BIO), las bandas se visualizaron bajo la luz UV y la imagen se digitalizó mediante un sistema de captación de imagen acoplado a la cámara de luz ultravioleta (GelPrinter Plus, TDI).

3.6 Caracterización fenotípica

3.6.1 Morfología celular, carácter Gram y catalasa

Para estudiar la morfología celular se procedió a su observación mediante un microscopio de contraste de fases (Leica DMB 5000).

El carácter Gram se determinó emulsionando una colonia en una gota de KOH 3 % (p/v) (Gregersen, 1978) depositada sobre un portaobjeto. Las células Gram negativas se lisan en estas condiciones y dan lugar a la aparición de un hilo mucoso entre el portaobjeto y el asa de siembra. Las Gram positivas no se lisan y por lo tanto no se observa el moco.

La presencia de la enzima catalasa se determinó emulsionando una colonia sobre una gota de H₂O₂ al 10 % (Cappuccino y Sherman, 1977) colocada sobre un portaobjeto. Los aislados se consideraron catalasa positivos cuando se observó la aparición de burbujas en la emulsión, mientras que la ausencia de las mismas indicó que el aislado

era catalasa negativo, es decir que carece de la enzima catalasa. Solo se consideraron presuntos *O. oeni* aquellos aislados de morfología celular cocoide-lenticular, cuyas células se agrupaban en cadenas y eran Gram positivas y catalasa negativa.

3.6.2 Análisis de la capacidad para fermentar carbohidratos

La capacidad de los diferentes aislados para fermentar diferentes hidratos de carbono, se realizó en el medio basal MBFC (Garvie, 1967a), al que se le añadieron 0.5 mL de una solución estéril al 2 % de los siguientes carbohidratos: L-arabinosa, D-fructosa, D-maltosa, D-melibiosa, D-salicina, D-sacarosa, D-trehalosa, D-arabinosa, D-arbutina, D-celobiosa, D-galactosa, D-glucosa, D-lactosa, D-manitol, D-manosa, D-rafinosa, D-ribosa, D-xilosa y L-xilosa. Los tubos se sembraron al 4 % con una suspensión de células crecidas en MLO (D.O. $\lambda_{600\text{ nm}} = 0.8$) centrifugadas a 6000 g durante 15 minutos (Heraeus Multifuge 1 S-R), lavadas y resuspendidas en el volumen original de SF. La incubación se realizó a 28 °C durante 30 días. Se consideraron como fermentaciones positivas aquellas que presentaron un color amarillo. Este viraje del indicador de pH (verde de bromocresol) del verde al amarillo, se debe a la producción de ácido a partir de los carbohidratos y a la consiguiente disminución del pH.

3.6.3 Determinación de la capacidad para hidrolizar arginina

Para determinar la capacidad para hidrolizar arginina se evaluó la producción de amoníaco en el medio HFA, descrito por Pilone y col. (1991). Para ello, los aislados crecidos en MLO hasta la fase estacionaria se inocularon al 1 % en el medio HFA y se incubaron a 28 °C en anaerobiosis durante 7-10 días. Transcurrido este tiempo, el sobrenadante libre de células (SLC) se obtuvo por centrifugación a 10000 g durante 10 minutos (Heraeus Multifuge 1 S-R). La presencia de NH₃ se detectó por la aparición de una coloración naranja-marrón tras adicionar 2-3 gotas del reactivo Nessler a 1 mL del SLC. Como control positivo se utilizó la cepa *Lb. brevis* CECT 216 y como control negativo se utilizó la cepa *O. oeni* CECT 218.

3.6.4 Análisis de la capacidad para producir exopolisacáridos a partir de sacarosa

Para realizar esta prueba, los aislados se sembraron en Agar Sacarosa mediante la técnica de la triple estría (Garvie, 1967a) y se incubaron en anaerobiosis a 28 °C durante 14 días. La producción de dextrano se consideró positiva cuando aparecían colonias

grandes y mucosas. Como control positivo se utilizó la cepa *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* CECT 394.

3.6.5 Análisis de la capacidad para degradar ácidos orgánicos

Para llevar a cabo este análisis se utilizó el vino sintético a pH 3.7, 10 % de etanol; la elaboración del mismo se describirá en el apartado 3.7.2. El contenido de azúcares de este vino es 1.5 g/L de glucosa y la misma cantidad de fructosa. A 3 lotes de este vino se les añadieron separadamente: 5 g/L de ácido L-málico, 0.5 g/L de ácido cítrico y 5 g/L de ácido tartárico. Los diferentes vinos se inocularon al 2 % a partir de un cultivo precrecido en el Medio OPM (Berbegal, 2014), cuyas células se lavaron y resuspendieron en el mismo volumen de SF. Los tubos se incubaron a 28 °C tomándose muestras a los 3, 6 y 20 días. La concentración de los ácidos orgánicos en las muestras se determinó por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), siguiendo la metodología descrita por Frayne (1986).

3.6.6 Determinación de la producción de aminas biógenas

La capacidad de producir aminas se ensayó en tampón acetato 50 mM, pH 4.8, suplementado con los siguientes aminoácidos L-tirosina, L-histidina, L-ornitina, L-arginina y de L-lisina, precursores de las aminas tiramina, histamina, putrescina y cadaverina, respectivamente. Para ello, se sembraron 2 mL de los cultivos crecidos en medio MLO a una D.O. $\lambda_{600\text{ nm}} = 1.0$ en 8 mL del medio MDB (Landete y col., 2005) modificado con 10 mM de cada aminoácido por separado y se incubaron a 28 °C durante 3 días, para inducir la síntesis de enzimas descarboxilasas. Posteriormente las células se centrifugaron a 6000 g durante 15 minutos (Heraeus Multifuge 1 S-R) y se lavaron dos veces con tampón acetato 50 mM. Las células se resuspendieron en 1 mL del mismo tampón el cual contenía 10 mM de los precursores de las aminas biógenas por separado y se incubaron a 28 °C durante 4 días. Transcurrido este tiempo, se recogieron los sobrenadantes por centrifugación a 13000 g durante 10 minutos (PrismR Labnet) y se analizaron por HPLC. Las condiciones cromatográficas son las descritas por Peña-Gallego y col. (2009). La cuantificación se realizó mediante la medición de áreas de los picos cromatográficos. La calibración se llevó a cabo con patrones externos.

3.6.7 Análisis de las actividades enzimáticas extracelulares

Para determinar la capacidad de producción de enzimas hidrolíticas extracelulares, se realizaron las pruebas que se mencionan a continuación:

Ensayo de la actividad lipolítica

Para determinar la actividad lipolítica se utilizó Agar MLO pH 4,8 suplementado con tributirina (Sigma-Aldrich) al 1.0 % (Davis y col., 1988), el cual se sembró mediante la técnica del goteo. Para ello se recogieron por centrifugación, a 6000 g durante 15 minutos (Heraeus Multifuge 1 S-R), las células crecidas en 10 mL de medio MLO a una D.O. $\lambda_{600\text{ nm}} = 1.0$, se lavaron en SF y se resuspendieron en 10 mL del mismo. Se depositaron 10 μL de esta suspensión en forma de gota sobre la placa y ésta se incubó a 28 °C durante 7 días. Se consideraron positivos aquellos aislados que presentaban un halo de precipitación alrededor de la colonia. El precipitado se debía a la cristalización de sales cálcicas producidas a partir de los ácidos grasos liberados de los lípidos y de los iones Ca^{++} del medio.

Ensayo de la actividad β -glucanasa

Para evidenciar la producción de enzimas β -glucanasas, se utilizó el medio descrito Matthews y col. (2006) en el que el β -glucano de cebada se sustituyó por β -glucano de levadura (Megazyme) y al que se añadieron 0.5 g/L de fructosa. Los aislados a analizar se inocularon por la técnica del goteo según lo descrito en el apartado anterior, incubándose las placas a 28 °C durante 15 días. Para poner de manifiesto la actividad β -glucanasa, se procedió a retirar las colonias de la superficie de las placas con agua MiliQ estéril. A continuación, las placas se colorearon durante 15 minutos con una solución en agua de Rojo Congo 0.1 % (p/v), previamente disuelto en etanol al 20 % (v/v). Posteriormente, se añadió una solución de NaCl 1 M que se dejó actuar durante 15 minutos. La prueba se consideró positiva tras la aparición de un halo claro alrededor de la colonia.

Ensayo de la actividad β -glicosidasa

Para determinar la actividad de enzimas β -glicosidasas se utilizaron los sustratos esculina y arbutina. Para determinar la actividad sobre el primero se utilizó el medio de cultivo MBFC descrito por Garvie (1967a) con las siguientes modificaciones:

- Método 1: citrato de amonio férrico al 0.05 % y esculina al 0.2 % según fórmula utilizada por el sistema API 50 CH (API system, 1981)
- Método 2: citrato de amonio férrico al 0.05 % y esculina al 0.01 % (Smibert y Krieger, 1981)
- Método 3: citrato de amonio férrico al 0.5 % y esculina al 0.2 % (Carr, 1970)

Para determinar la actividad glicosidásica sobre la arbutina se utilizó el medio MFBC al cual se le adicionaron 5 g/L de arbutina y 0.5 % de citrato de amonio férrico y del cual se eliminó el verde de bromocresol.

Los tubos con los respectivos sustratos, se sembraron al 4 % con una suspensión de células crecidas en MLO (D.O. $\lambda_{600\text{ nm}} = 0.8$) centrifugadas a 6000 g durante 15 minutos (Heraeus Multifuge 1 S-R), lavadas y resuspendidas en el volumen original de SF. Los tubos se cubrieron con 1 mL de vaselina estéril y se incubaron a 28 °C durante 30 días. Se consideró que los tubos con esculina mostraban reacción positiva cuando presentaron un viraje de verde oliva a negro. Este ennegrecimiento es producto de la precipitación del complejo formado entre la esculetina (producto de la hidrólisis de la esculina y el Fe^{+3}). Se consideró que los aislados llevaban a cabo una hidrólisis rápida, media o lenta según produjeran el viraje en 7, 15 ó 30 días, respectivamente. Se consideró que los aislados presentaban actividad β -glicosidasa positiva sobre la arbutina cuando los tubos presentaron un viraje del color del medio de amarillo marrón a negro.

Ensayo de la actividad celulolítica

La actividad endoglucanasa se determinó utilizando carboximetilcelulosa (CMC) (Sigma-Aldrich) como sustrato. CMC presenta un alto grado de polimerización, por lo que se le considera un sustrato similar a la celulosa amorfa y por ello adecuado para determinar la actividad endoglucanasa.

Para evidenciar la producción de celulasas, se utilizó el medio de cultivo de Matthews y col. (2006) que contenía en g/L: 5 g de triptona, 2.5 g de extracto de levadura, 1 g de glucosa, 10 g de carboximetilcelulosa, 20 g de agar. Respecto a la fórmula original el medio que nosotros utilizamos difería en que el pH se ajustó a 4.8 y además contenía 0.5 g/L de fructosa. Este medio se inoculó e incubó de la misma manera que ya se ha descrito para la actividad lipolítica. Los aislados con actividad celulolítica se identificaron por la presencia de un halo de aclaramiento tras la coloración con Rojo

Congo y posterior lavado con NaCl de la placa donde habían crecido, como en el caso de la actividad β -glucanasa. Como control positivo se utilizó la celulasa comercial Onozuka R-10 obtenida de *Trichoderma viride* (Yakult Pharmaceutical Industry Co., Ltd).

Ensayo de la actividad tanasa

Para evidenciar esta actividad enzimática, se utilizó la metodología descrita por Matthews y col. (2006). Para el ensayo se utilizó como sustrato el metil galato (Sigma-Aldrich) a una concentración de 20 mM, previamente disuelto en tampón McIlvaine 0.1 M, pH 5.0. La mezcla de reacción consistió en 600 μ L de la solución con el sustrato y 400 μ L de una suspensión de células lavadas y resuspendidas en tampón McIlvaine a una D.O. $\lambda_{600\text{ nm}} = 0.5$. Esta reacción se incubó a 37 °C durante 6 horas. Tras ello, se procedió a eliminar las células mediante centrifugación a 13000 g durante 5 minutos (PrismR Labnet). A 500 μ L del SLC, se añadió un volumen de una solución saturada de NaHCO₃ (Panreac) y la mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. Transcurrido el tiempo se midió la absorbancia a 400 nm en el equipo FLUOstar OPTIMA (BGM Labtech) para cuantificar la actividad. Los ensayos se realizaron por duplicado. Como control positivo se utilizó la cepa *O. oeni* RM17 y como control negativo se utilizó la misma la solución de reacción pero a la que no se incorporaron células sino sólo 400 μ L de tampón McIlvaine.

Ensayo de la actividad esterasa

La actividad esterasa se determinó utilizando la metodología descrita por Matthews y col. (2006). En este ensayo se utilizaron tres tipos de ésteres: 4-nitrofenil acetato (Sigma-Aldrich), 4-nitrofenil butirato (Sigma-Aldrich) y 4-nitrofenil octanoato (Sigma-Aldrich), todos ellos previamente disueltos en etanol al 96 % (VWR Prolabo). La mezcla de reacción (1 mL volumen final) consistió en 860 μ L de tampón McIlvaine 0.1 M, 100 μ L de la suspensión de células lavadas y resuspendidas en el mismo tampón (D.O. $\lambda_{600\text{ nm}} = 0.5$) y 40 μ L de cada uno de los sustratos a una concentración stock de 25 mM. Esta mezcla de reacción se incubó a 37 °C durante 2 horas en agitación (100 rpm) sobre una plataforma Unimax 1010 (Heidolph). Posteriormente se procedió a eliminar las células mediante centrifugación a 13000 g durante 7 minutos (PrismR Labnet). Se colocaron 900 μ L del SLC en un tubo nuevo y se añadieron 100 μ L de una solución de NaOH 0.5 M, con el fin de alcalinizar la reacción. Se midió la absorbancia a

400 nm en un equipo FLUOstar OPTIMA (BGM Labtech) y la actividad específica se cuantificó mediante interpolación de los valores de D.O. obtenidos, en una recta patrón de soluciones estándares de ρ -nitrofenil. Los resultados se expresaron como μ moles de ρ -nitrofenil liberados por minuto por mg de peso seco. Todos los ensayos se realizaron por duplicado. Como control positivo se utilizó la cepa CHR Hansen Viniflora oenos y como control negativo se utilizó la misma solución de reacción pero a la que no se añadieron células, aunque sí 100 μ L del tampón McIlvaine.

3.7 Caracterización tecnológica

3.7.1 Determinación del crecimiento en vino tinto

Para estimar el crecimiento en vino tinto natural, se obtuvo uno en el laboratorio a partir de mosto tinto comercial Don Simón. Este mosto se fermentó con 0.25 g/L de la levadura seca *Saccharomyces cerevisiae* var. *bayanus* BY (Agrovin), previamente hidratada con SF a 28 °C durante 20 minutos. El mosto se dejó fermentar a 28 °C durante 5 días. Tras la FA se verificó la cantidad de azúcares residuales mediante HPLC (Frayne, 1986) y se eliminaron las levaduras mediante centrifugación a 10000 g durante 20 minutos (BECKMAN COULTER Avanti J-E). El vino se ajustó a pH 3.5, 11 % de etanol, 3 g/L de ácido málico y 1 g/L glucosa y se inoculó al 1 % con los respectivos cultivos de *O. oeni* preadaptados en el Medio OPM (Berbegal, 2014). El crecimiento en vino se determinó mediante recuento de células viables en medio MLO a lo largo de 12 días. Las placas sembradas se incubaron a 28 °C durante 5 días. El ensayo se realizó por triplicado. Con las medias de los recuentos se construyó una curva de crecimiento y se calculó el ABC.

3.7.2 Determinación del crecimiento en vino sintético a diferentes valores de pH, etanol y SO₂

Para determinar el crecimiento de los aislados en diferentes condiciones enológicas se utilizó un vino sintético obtenido según describió Guija (2011). La composición original de este vino se modificó añadiéndole 3 g/L de glucosa, 3 g/L de fructosa, 5 g/L de ácido L-málico, 5 g/L de extracto de levadura, 10 g/L de triptona y 1 mL de una solución de vitaminas concentrada 1000 veces (Liu, 1993). Diferentes lotes de este vino sintético se ajustaron a diferentes valores de pH, de SO₂ y de etanol. La condición estándar utilizada para comparar los crecimientos en las diferentes condiciones ensayadas fue un vino con 10 % etanol, pH 3.7 y 0 g/L SO₂. La capacidad para crecer a diferentes concentraciones

de etanol se determinó en el vino sintético a pH 3.7, el cual se ajustó con etanol absoluto a 10 %, 12 %, 14 % y 15 %. Para determinar la capacidad de crecimiento a diferentes valores de pH, se utilizó el vino sintético con 10 % de etanol, y el pH se ajustó a 2.9, 3.2, 3.5, 3.7 y 4.0 con HCl 10 N. Para la determinación de la resistencia de los aislados al SO₂ se utilizó un vino de pH 3.7 y 10 % etanol al que se le añadió K₂O₅S₂ (Agrovin) en cantidad suficiente para obtener las siguientes concentraciones finales de SO₂ total: 30, 40, 50, 60 y 70 mg/L. Finalmente, los vinos preparados según se ha descrito, se esterilizaron por filtración con membrana de 0.22 µm. Los vinos sintéticos se inocularon al 1 % con los diferentes aislados de *O. oeni* precultivados en el Medio OPM (con o sin SO₂) y se incubaron a 28°C durante 12 días. Para evaluar el crecimiento de los aislados en presencia de diferentes concentraciones de SO₂, al medio de preadaptación se le añadieron 30 mg/L de K₂O₅S₂ para ajustarlo a 15 mg/L SO₂ total y el nivel del inóculo que se utilizó en estos casos fue del 10 % en lugar del 1 % para compensar la posible muerte inicial de las células al enfrentarse a este antiséptico. Se realizó un seguimiento del crecimiento mediante lectura de la D.O. λ_{600 nm} cada 3 días (por triplicado) y la media de estos resultados se utilizó para calcular el ABC para cada una de las condiciones ensayadas.

3.8 Caracterización genómica

3.8.1 Tipificación de los aislados mediante RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*)

Esta técnica se basa en la amplificación simultánea de ciertas zonas del genoma que presentan cierta homología (complementariedad) con un único cebador de secuencia aleatoria. La obtención del ADN molde para la amplificación se realizó a partir de colonia, según se ha descrito en el apartado 3.5. Para la tipificación de los aislados se utilizó el cebador M13 descrito por Stendid y col. (1994) y utilizado previamente por Zapparoli y col. (2000) para tipificar cepas de *O. oeni*.

Cada reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen total de 50 µL que contenía: 1 µL del cebador a 50 mM, 1 µL de la mezcla de dNTP (Roche) a 200 µM en total, 5 µL de tampón de PCR 1X (Thermo Scientific), 0.5 µl de MgCl₂ a 50 mM (Thermo Scientific), 41 µL de agua MilliU (Millipore), 0.5 µL de DyNAzyme II ADN polimerasa (Thermo Scientific) y 1 µL de la suspensión celular como ADN molde.

La PCR se llevó a cabo en un termociclador TC-312 (Techne®) siguiendo las condiciones descritas por Rodas y col. (2003). El programa de amplificación fue el

siguiente: una desnaturalización inicial a 94 °C durante 5 min, seguida de 15 ciclos a 94 °C durante 30 s, 30 °C durante 30 s y 72 °C durante 1 min, seguido de 25 ciclos a 94 °C durante 30 s, 30 °C durante 30 s y 72 °C durante 1 min y, para finalizar, un periodo de extensión a 72 °C durante 10 min.

Tras la amplificación, los fragmentos de PCR se separaron en gel de agarosa (SeaKem® LE, Cambrex) al 1.2 % (p/v). La separación de las bandas se llevó a cabo por electroforesis en tampón TBE 0.5X a 80 V durante 3 horas. El tamaño de los fragmentos se estimó por comparación con el marcador de peso molecular 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). Una vez teñido el gel con bromuro de etidio 0.5 µg/mL (MO BIO), las bandas se visualizaron bajo la luz UV y la imagen se digitalizó mediante un captador de imagen acoplado a la cámara de luz ultravioleta (GelPrinter Plus, TDI).

3.8.2 Tipificación de los aislados mediante VNTR (*Variable Number of Tandem Repeat*)

Los cebadores utilizados en este estudio fueron los mismos que utilizaron Claisse y Lonvaud-Funel (2012). En este caso la metodología original utilizada por estos autores se modificó de forma que todos los cebadores se añadieron juntos en una única reacción de PCR. Todas las amplificaciones se realizaron en un volumen total de 46 µL que contenía: 0.5 µL de cada uno de los cebadores a 50 mM, 1 µL de la mezcla de dNTP (Roche) a 200 µM en total, 5 µL de tampón de PCR 10X (Invitrogen), 2 µL de MgCl₂ a 50 mM (Invitrogen), 31.5 µL de agua MilliU (Millipore), 0.5 µL de Taq *DNA Polymerase* (Invitrogen) y 1 µL de la suspensión celular, obtenido de la misma manera que en el apartado anterior, como ADN molde. La PCR se llevó a cabo en un termociclador PTC-100™ (MJ Research) con las siguientes condiciones de amplificación: una desnaturalización inicial a 95 °C durante 5 min, seguido de 40 ciclos a 95 °C durante 30 s, 58 °C durante 30 s y 72 °C durante 30 s y, para finalizar, una extensión a 72 °C durante 7 min. Los productos de PCR se separaron y analizaron como se ha descrito en el apartado 3.8.1.

3.8.3 Análisis de los perfiles de bandas de RAPD y VNTR

Las imágenes obtenidas de los geles de RAPD y VNTR se digitalizaron, normalizaron, analizaron y combinaron mediante el programa BioNumerics versión 6.5 (Applied Maths). Se utilizó el coeficiente de correlación cofenético de Pearson y se realizó un análisis de agrupamiento utilizando el algoritmo UPGMA (*Unweighted Pair Group*

Method with Arithmetic Averaging). La determinación del porcentaje mínimo de similitud entre los perfiles de RAPD y VNTR necesaria para la discriminación de los perfiles de bandas de aislados diferentes, se realizó estableciendo el mínimo porcentaje de similaridad al cual se unían los perfiles de 10 aislados seleccionados al azar y amplificados por duplicado tanto por RAPD como por VNTR (Rodas y col., 2003). Este nivel estableció el umbral de discriminación por debajo del cual los perfiles de los aislados se consideraron diferentes y por encima iguales.

Se evaluó la tipabilidad, repetitividad y poder discriminante de las técnicas RAPD y VNTR. La tipabilidad es el porcentaje de aislados que dan resultado inequívoco y la reproducibilidad es el porcentaje de aislados que dan el mismo resultado cuando se analizaban repetidas veces (Hunter y Gaston, 1988). Para evaluar el poder discriminante (D) de las técnicas RAPD y VNTR, se utilizó el valor complementario respecto a 1 del índice de diversidad de Simpson. Así cuando el valor D se aproxima a 1, el poder discriminante del método de tipado es mayor, es decir evalúa mejor la diversidad existente (Hunter y Gaston, 1988).

3.8.4 Detección de variaciones de las secuencias parciales de los genes *rpoB* y *rpoC*

Se amplificaron parcialmente los genes *rpoB* y *rpoC* que codifican para las subunidades β y β' de la ARN-polimerasa, respectivamente. Para ello se utilizaron los cebadores específicos descritos en la Tabla 4 y que fueron usados previamente por Guija (2011).

La PCR se llevó a cabo en un termociclador Mastercycler personal 5332 (Eppendorf). Para la amplificación del gen *rpoB* se realizó una desnaturalización inicial a 95 °C durante 5 min, seguido de 35 ciclos a 95 °C durante 1 min, 45 °C durante 1 min y 72 °C durante 10 min, para finalizar con 72 °C durante 10 min. La amplificación del gen *rpoC* se realizó una desnaturalización inicial a 94 °C durante 5 min, seguido de 35 ciclos a 94 °C durante 30 s, 60 °C durante 30 s y 72 °C durante 10 min y para finalizar con 72 °C durante 10 min. Los productos de PCR se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa (SeaKem® LE, Cambrex) al 1.2 % (p/v) en tampón TBE 0.5X a 80 V durante 1 hora. El tamaño de los fragmentos se estimó por comparación con el marcador de peso molecular 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). El producto de PCR se purificó, utilizando el Kit comercial MO BIO 12500, y se secuenció en el Servicio de Genómica del *Servei Central de Suport a la Investigació Experimental de la Universitat de València*. Tras obtener las secuencias nucleotídicas, éstas se analizaron con el programa

Mega 5.0 y se compararon con las secuencias previamente descritas por Renouf y col. (2009) utilizando para ello el programa *Blast*.

Tabla 4. Cebadores de los genes *rpoB* y *rpoC* utilizados en este trabajo

| Gen | Cebador 5' → 3' | Cebador 5' → 3' |
|-------------|------------------------|---------------------|
| <i>rpoB</i> | CAATCTCCAAGAGGGAGTCG | ATTGAAACTCCAGAAGGCC |
| <i>rpoC</i> | CCTGTTTCCGGACCTGGTAATC | TTATTGATGTTGGCTGCTC |

3.8.5 Evaluación de la presencia de marcadores moleculares

El análisis de la presencia de los marcadores moleculares relacionados con la resistencia a las condiciones del vino, descritos por Renouf y col. (2008), se realizó mediante PCR, utilizando para ello los cebadores y condiciones especificados por estos autores y que se describen en la Tabla 5. Los productos de amplificación se revelaron electroforéticamente en un gel de agarosa según se ha descrito en el apartado 3.8.4.

3.9 Cálculo de la diversidad intraespecífica (*D*)

Este índice se utiliza para estimar la biodiversidad en estudios ecológicos. Se basa en la probabilidad de que dos cepas no relacionadas y muestreadas al azar en una población pertenezcan al mismo grupo (Hunter y Gaston 1988). En el cálculo del valor *D*, *N* es el número de aislados, *S* es el número total de grupos (tipo de perfil), *n_j* el número de aislados que pertenecen a un determinado grupo (tipo de perfil) (Figura 4). Así, cuando el valor *D* se aproxima a 1 la diversidad existente es mayor (Hunter y Gaston 1988). Algunos autores utilizan esta misma fórmula para estudiar el índice discriminatorio (*ID*) o la diversidad (*D*) en sus cepas, por lo tanto estos dos términos tienen un significado semejante.

$$D = 1 - \frac{1}{N(N-1)} \sum_{j=1}^S n_j(n_j-1)$$

Figura 4. Índice de diversidad (*D*)

Tabla 5. Cebadores de marcadores moleculares utilizados en este estudio (tomadas de Renouf y col., 2008)

| Marcador | Cebador 5 → 3 | Cebador 5 → 3 |
|------------|-----------------------|------------------------|
| M1 | GAAGCTCAAGATACCATCC | CGACTTGTGCACAGATTCC |
| M2 | TTGGTTAATTCAGCCGTTGT | ATTGATCACGATGTCCCAAC |
| M3 | CTCGTAAGCATGGTTCTCTC | ATTGGTTTGATGAAAAATGG |
| M4 | ACGCATGATTCCTCATTATC | GGTCTTTCAAATACCATCG |
| M5 | TGGCAAACGTCTCAATCAAC | AGCTTACGGCTGATGCTTT |
| M6 | TACTGTTTCGTCAGCCGATGT | CTCCCGACAACTGCTAATG |
| M7 | CAATCAAGCCGGAATAGTT | TGACCAGTTCGAATGAATTC |
| M8 | ATGACGCCATTCTATATCCA | ATTTGCCTCGATAGTTTCTG |
| M9 | GGAAACAATTTACGCTTGC | CGGCCTGTTTGATAAAGAA |
| M10 | CCTCCTACTTAACCTTGACG | AGTCCCACCTCCTGAATAAA |
| M11 | TGGCTTAATCCCATCAGAAA | CCAAATTGTCCAGAATACCG |
| M12 | GTTTCTGAAGACCCGCTTA | TGATGCCCCCTTCGTAAT |
| M13 | CTAACGCATTCTGAAGAAC | CCCAACTATATCCCAGTGA |
| M14 | TTTTATCTGTCCAAGCAGGT | AATTAGAAGAACGCTGATAGCC |
| M15 | TGTAAACGATACGAAGCGCG | GAATCACTCCATTCCGTCACC |
| M16 | AAATAACGCAGGCCAATC | CCATGATTCCTGGTTTACTGAG |

M1: ATPasa tipo P transportadora de cadmio; M2: Ferritina DPS; M3: Proteína exportadora implicada en la biosíntesis de polisacáridos; M4: Maltosa fosforilasa; M5 y M7: Reguladores transcripcionales; M6: proteína con dominio de transportador pero de función desconocida en *Lb. plantarum* (DUF 1694); M8: Proteína hipotética; M9: Deshidrogenasa de azúcar-alcohol; M10: Chaperona de cobre; M11: Proteína MFS de arabinosa eZux; M12: Tiorredoxina; M13: Proteína facilitadora de captación de glicerol; M14: Permeasa de arabinosa eZux; M15: Glicosiltransferasa implicada en biogénesis de pared celular; M16: Proteína homóloga a una endoglucanasa tipo E de *Lb. plantarum* lp_3433.

En este trabajo se ha utilizado la fórmula de la Figura 4 para calcular: a) el poder discriminante de las técnicas RAPD y VNTR (perfiles de bandas), b) la diversidad fenotípica (perfiles fenotípicos), c) la diversidad tecnológica (perfiles tecnológicos), d) la diversidad genómica (perfiles genómicos) y e) la diversidad global (perfiles fenotípicos, tecnológicos y genómicos).

3.10 Análisis de la expresión de genes relacionados con el estrés en *O. oeni*

3.10.1 Cepas y factores de estrés ensayados

Para este ensayo se utilizaron 4 cepas de *O. oeni* de la colección ENOLAB 504, 129, FS13 y Me8, además de la cepa *O. oeni* PSU-1, que es un cultivo maloláctico. Las cepas utilizadas para este ensayo fueron seleccionadas previamente en base al momento de la vinificación del que se aislaron (mosto o vino) y a sus capacidades para tolerar mejor o peor las condiciones del vino. Las cepas 504 y 129 procedían de vino, siendo la primera altamente tolerante al etanol, mientras que la segunda era más sensible a este factor, al pH y al SO₂. Las cepas FS13 y Me8 se aislaron de mosto, siendo la primera más resistente al pH, al etanol y al SO₂ y la Me8 más sensible a los tres factores.

Los cultivos crecidos en el medio MLO líquido ajustado a pH 4.8 y con una D.O. $\lambda_{600\text{ nm}} = 1.0$, se inocularon a una concentración final de 10⁷ ufc/mL (Olguín y col., 2010) en 10 mL de MLO, ajustado a las siguientes condiciones de estrés:

- 1) Estrés por ácido: pH 3.2, etanol 0% y SO₂ 0 mg/L
- 2) Estrés por etanol: pH 4.8, etanol al 10 % y SO₂ 0 mg/L
- 3) Estrés por SO₂: pH 4.8, 0 % de etanol y 30 mg/L de SO₂

El ensayo control consistió en la inoculación en MLO pH 4.8 sin etanol ni de SO₂. Los cultivos se incubaron a 28 °C y el crecimiento se evaluó mediante la medida de la absorbancia. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

3.10.2 Extracción de ARN total de *O. oeni*

Para la extracción del ARN se utilizó el kit comercial High Pure RNA Isolation Kit (Roche), siguiendo las instrucciones del fabricante. En este ensayo se utilizaron los cultivos de las cepas de *O. oeni* recogidas a mitad de crecimiento exponencial (D.O. $\lambda_{600\text{ nm}} = 0.5$) en cada una de las condiciones de estrés. La pureza y concentración del ARN total se calculó mediante la medida de la absorbancia a 260/280 nm en un equipo Nanodrop 2000 (Thermo Scientific). Con el fin de comprobar la integridad del ARN extraído, se realizó una electroforesis en gel de agarosa a una concentración del 2.0 %

(Seakem® LE Agarose, Cambrex), en tampón TAE 1X, aplicando un voltaje de 100 V durante 45 minutos. Tras teñir el gel con bromuro de etidio se observó con luz ultravioleta y se fotografió con el equipo Gel Doc™ XR+ *Imaging System* (Biorad)

3.10.3 Síntesis de ADN complementario (ADNc)

Para evitar falsos positivos en las amplificaciones de la RT-qPCR, el ADN residual se eliminó mediante tratamiento con DNasa. Para ello, el ARN total se trató con 1 µL de Ambion® TURBO™ *DNA-free* (Life Technologies), incubándose a 37 °C durante 20 minutos. Luego se detuvo la reacción con 1 µL del inhibidor de DNasa del kit, se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos y se centrifugó a 13000 rpm durante 1.5 minutos, transfiriéndose posteriormente la muestra a un tubo nuevo.

Para obtener el ADNc, el ARN total se retrotranscribió utilizando el kit Taq Man® *Reverse Transcription Reagents* (Applied Biosystems) en un termociclador Mastercycler Gradient PCR 5341 (Eppendorf). El procedimiento usado para ello fue un paso inicial de amplificación a 25 °C durante 10 min y posteriormente otro a 48 °C durante 30 min. Finalmente, se detuvo la reacción aumentando la temperatura a 95 °C durante 5 min. Las muestras se conservaron a - 20 °C hasta su posterior uso.

3.10.4 Cuantificación de los ARNm mediante PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR)

A partir del ADNc sintetizado, se estimaron los niveles de expresión de los genes de estrés *cfa*, *clpP*, *ctsR*, *hsp18*, *rmlB* y *trxA*, mediante PCR cuantitativa a tiempo real. Como gen de referencia se amplificó un fragmento específico del gen lactato deshidrogenasa (*ldhD*) de *O. oeni*, cuya expresión es constitutiva (Beltramo y col., 2004; Desroche y col., 2005). Los cebadores utilizados para este ensayo se describen en la Tabla 6. La reacción de PCR en tiempo real se llevó a cabo en 25 µL de volumen final conteniendo 2 µL de ADNc molde, 0.5 µL de cada cebador a una concentración de 15 mM, 9.5 µL de agua libre de nucleasas y 12.5 µL de SYBR® Premix Ex Taq™ (Takara). Las amplificaciones se llevaron a cabo en un termociclador CFX96 Real Time System (Biorad) con un paso inicial a 95 °C durante 30 s, seguido de 40 ciclos a 95° durante 5 min y a 62 °C durante 30 s. Se realizó un paso adicional a 95 y 65 °C para establecer la curva de disociación. El equipo determinó automáticamente el valor del ciclo umbral. Los ensayos se realizaron por duplicado.

Tabla 6. Cebadores de los genes cuyo nivel de expresión se cuantificó mediante de RT-qPCR

| Cebador | Cebador F (5' → 3') | Cebador R (5' → 3') | Referencia |
|--------------|------------------------------|--------------------------|-----------------------|
| <i>ldhD</i> | GCCGCAGTAAAGAACTTGATG | TGCCGACAACACCAACTGTTT | Desroche y col., 2005 |
| <i>hsp18</i> | CGGTATCAGGAGTTTTGAGTTC | CGTAGTAACTGCGGGAGTAATTC | Desroche y col., 2005 |
| <i>rmlB</i> | TATCCGCAATGCGCAATTGG | GAACGGTCAACATGCGATTGAG | Olgún y col., 2010 |
| <i>ctsR</i> | GGGCCATGGCAGAAGCTAATATTTTCAG | AAACGGGTGTTGATTACATAATT | Desroche y col., 2005 |
| <i>clpP</i> | CGGTACCAAAGGCAAGCGTTTTAT | CTCTTCCGAGTCTTCAAAGTTGAT | Desroche y col., 2005 |
| <i>cfa</i> | TGGTATTACATTGAGCGAGGAG | CGTCTTTGAGATCACGATAATCC | Beltramo y col., 2006 |
| <i>txrA</i> | GCCACTTGGTGTACCCCTTGT | TCCATTTGCCGTTTCCTGGTTT | Beltramo y col., 2006 |

3.10.5 Cuantificación relativa de los ARNm

La cuantificación de la expresión génica puede expresarse de forma absoluta y/o relativa. En este trabajo se utilizó el valor de la expresión génica relativa. Para ello se utilizó el método $\Delta\Delta C_t$ descrito por Livak y Schmittgen en el 2001. El método del $\Delta\Delta C_t$ es un modelo matemático que calcula los cambios en la expresión génica como una diferencia entre la muestra experimental y la muestra de referencia. Este método incluye una corrección no ideal de la eficiencia de amplificación, en la cual la amplificación del gen diana y del gen de referencia es aproximadamente la misma.

3.11 Análisis estadísticos

Para estudiar la significatividad de los datos obtenidos en los ensayos se utilizó programa SPSS Statistics19 (IBM). Se utilizó el análisis de varianza de un factor (ANOVA) con un nivel de confianza del 95 % para identificar la existencia de posibles diferencias significativas (con un nivel de significación de 0.05) en la respuesta a las condiciones estudiadas. Para localizar las diferencias entre las medias de los tratamientos se utilizó la prueba *a posteriori* de Tukey. En el caso de variables no paramétricas se utilizó el estadístico Mann-Whitney con un nivel de confianza del 95 %. Así mismo, para conocer la relación entre las diferentes variables de algunos ensayos se utilizó el análisis de componentes principales (APC) y el análisis de conglomerados jerárquicos. Para estudiar las relaciones que existen entre las variables cuantitativas se utilizó el análisis de correlación bivariado utilizando los coeficientes de correlación de Pearson y el de Spearman. Para comprobar la existencia de relaciones entre las variables de tipo cualitativo se utilizó la prueba del χ^2 (chi cuadrado). En todas ellas se consideró un nivel de confianza del 95 %.



4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Identificación de los nuevos aislados de *O. oeni*

A partir de mostos procedentes de diferentes variedades de uva y diferentes denominaciones de origen se aislaron 43 colonias en el medio MLO (Tabla 7) que presentaban una morfología propia de *O. oeni*, es decir, pequeñas colonias con diámetro aproximado de 1 mm o inferior, de color crema o blanco y superficie brillante y de borde liso. En observación microscópica las células presentaban morfología cocácea o lenticular y estaban agrupadas en parejas o cadenas de 6 o más células, con diámetros de 0.5-1.0 μm . Dieron reacción negativa a la prueba de KOH al 3 %, es decir, no se lisaron las células lo que indicó que se trataba de bacterias Gram positivas. En la prueba de la catalasa se obtuvo un resultado negativo. Las colonias que presentaron estas características se consideraron presuntos *O. oeni* de manera preliminar. La confirmación de la identidad se realizó por PCR específica.

Todas las colonias que presentaban las características anteriores presentaban una banda de amplificación de alrededor de 300 pares de bases (pb), tras realizar la PCR específica descrita en el apartado 3.5. Este tamaño de banda correspondía al esperado en el caso de que se tratase de *O. oeni* (Figura 5). La secuenciación de esta banda presentaba la secuencia específica de esta especie (Ferrer, comunicación personal).

Tabla 7. Origen de los nuevos aislados de *O. oeni* procedentes de mosto e incorporadas a la colección ENOLAB en este trabajo

| Localidad | Variedad de uva | E ¹ | Aislado |
|--------------|-----------------|----------------|---|
| Oporto | Syrah | T | Po2, Po4, Po5, Po6, Po8, Po9, Po10, Po14, Po15, Po16 |
| Requena | Merseguera | B | Me1, Me2, Me3, Me6, Me8 |
| La Rioja | Tempranillo | T | Ix1, Ix5, Ix6, Ix9, Ix13, Ix14, Ix15, Ix19, Ix21 |
| Camporrobles | Bobal | T | FS2, FS10, FS13, FS14, FS16, FS17, FS18, FS19, FS20, FS21, FS24, FS26, FS29, FS30, FS31, FS34, FS35, FS36, FS37 |

¹: tipo de elaboración: B, blanco y T, tinto

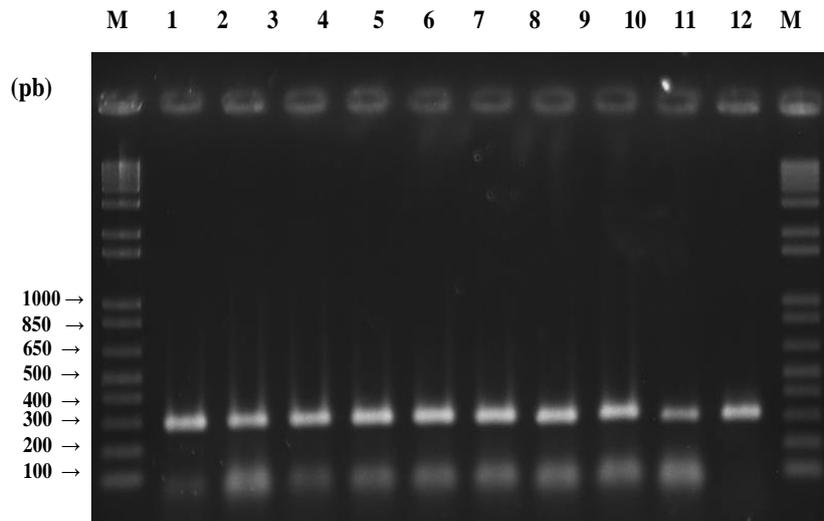


Figura 5. Resultados obtenidos tras realizar una PCR específica a aislados de presuntos *O. oeni*. M: Marcador de peso molecular 1 Kb plus; pb: pares de bases; carrera 1: aislado FS2; carrera 2: aislado FS10; carrera 3: aislado FS13; carrera 4: aislado FS14; carrera 5: aislado FS16; carrera 6: aislado FS17; carrera 7: aislado FS18; carrera 8: aislado FS19; carrera 10: aislado FS20; carrera 11: aislado FS21; carrera 12: aislado FS24

4.2 Caracterización fenotípica

4.2.1 Perfil de fermentación de carbohidratos

El conocimiento de la actividad de las bacterias lácticas del vino frente a determinados azúcares que se hallan presentes en el mosto o en el vino tiene, además de interés taxonómico y fisiológico, presenta además interés de tipo tecnológico, ya que el metabolismo de determinados azúcares puede afectar a las características organolépticas del vino, tanto positivamente como negativamente. Los 104 aislados de ENOLAB de *O. oeni* presentaban distintas capacidades fermentativas. Todos ellos se caracterizaban por la capacidad para fermentar ribosa y la incapacidad para fermentar amilosa, dextrina, galactosa, lactosa, maltosa, manitol, sacarosa y D y L-xilosa. Sin embargo presentaban un carácter variable para los siguientes carbohidratos: D-arabinosa, L-arabinosa, arbutina, celobiosa, fructosa, glucosa, manosa, melibiosa, salicina, y trehalosa, es decir su comportamiento frente a los mismos era dependiente del aislado (Tabla 8). Las distintas capacidades fermentativas de los aislados de *O. oeni* se agruparon en los 20 perfiles de fermentación que se muestran en la Tabla 8, mientras que en la Tabla 9 se describen las cepas de referencia.

Tabla 8. Carbohidratos fermentados por los aislados procedentes de mostos y vinos

| Perfil ^a | Perfil de fermentación | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-------------------------------------|------------------------|------|---|---|---|-----|---|----|-----|-----|----|-----|---|---|---|---|----|---|---|---|
| | A | B | C | D | E | F | G | H | I | J | K | L | M | N | O | P | Q | R | S | T |
| Nº aislados por perfil ^b | 3 | 21/1 | 1 | 4 | 1 | 1/1 | 4 | 18 | 2/5 | 1/2 | 1 | 2/5 | 9 | 4 | 3 | 2 | 3 | 2 | 7 | 1 |
| Nº total azúc. ferm. ^c | 3 | 3 | 4 | 4 | 7 | 8 | 3 | 2 | 4 | 6 | 3 | 4 | 3 | 4 | 7 | 8 | 10 | 3 | 5 | 4 |
| Amilosa | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| D-arabinosa | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| L-arabinosa | - | + | + | + | + | - | - | - | - | + | - | + | - | + | + | - | + | + | + | - |
| Arbutina | + | - | - | + | + | + | - | - | - | - | - | + | + | - | - | + | + | - | - | + |
| Celobiosa | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + | + | - | - | - |
| Dextrina | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Fructosa | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | - | - | - | + | + | - | - | - |
| Galactosa | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Glucosa | - | - | - | - | + | + | - | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Lactosa | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Maltosa | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Manitol | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Manosa | - | - | - | - | - | + | - | - | - | + | - | - | - | - | + | + | + | - | - | - |
| Melibiososa | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + | + | - | + | - |
| Ribosa | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Sacarosa | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Salicina | - | - | - | - | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - |
| Trehalosa | - | - | - | - | + | + | + | - | + | + | - | - | - | + | + | + | + | - | + | + |
| D-xilosa | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | ND | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| L-xilosa | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

+ : Reacción positiva, - : reacción negativa; ND: no determinado; ^a En rojo: perfiles que se encuentran mayoritariamente en aislados de mosto; en negro: perfiles que se encuentran mayoritariamente en aislados de vino; ^b En rojo: número total de aislados procedentes de mosto; en negro: número total de aislados procedentes de vino; ^c Número total de azúcares fermentados en cada perfil.

Tabla 9. Capacidades fermentativas de cepas de referencia de la especie *O. oeni*

| Carbohidrato | ML34 | CECT218 | CECT 4028 | CECT 4029 | CECT 217 ^T |
|--------------|------|---------|-----------|-----------|-----------------------|
| Amilosa | - | - | - | - | - |
| D-arabinosa | - | - | - | - | - |
| L-arabinosa | - | - | - | + | - |
| Arbutina | - | - | - | + | d |
| Celobiosa | - | - | - | - | - |
| Dextrina | - | - | - | - | - |
| Fructosa | + | + | + | + | + |
| Galactosa | - | - | - | - | - |
| Glucosa | + | - | - | + | - |
| Lactosa | - | - | - | - | - |
| Maltosa | - | - | - | - | - |
| Manitol | - | - | - | - | - |
| Manosa | - | - | - | - | - |
| Melibiosa | - | - | - | - | - |
| Ribosa | + | + | + | + | + |
| Sacarosa | - | - | - | - | - |
| Salicina | - | - | - | - | - |
| Trehalosa | + | - | - | - | - |
| D-xilosa | - | - | - | - | - |
| L-xilosa | - | - | - | - | - |
| Perfil | I | H | D | H | H |

En la Tabla 10 se agrupan los aislados en función de sus perfiles. Los perfiles más comunes son el B y el H, los aislados que pertenecen al perfil H fermentan únicamente 2 carbohidratos: fructosa y ribosa, mientras que los aislados que pertenecen al perfil B fermentaban. Los aislados que pertenecen al perfil H fermentan únicamente 2 carbohidratos: fructosa y ribosa, mientras que los aislados que pertenecen al perfil B fermentaban, además, la L-arabinosa. Los perfiles menos comunes fueron el C, E y T que presentan una única cepa como representante de los mismos. El perfil Q fue el que mostraba mayor número de carbohidratos fermentados (10). Las cepas de referencia presentaban los perfiles D, H e I, es decir fermentaban entre 2 y 5 carbohidratos (Tabla 9). Cuando se comparan las capacidades fermentativas de los aislados de mosto y vino se observan ciertos aspectos curiosos: todos los aislados de vino mostraron capacidad para degradar fructosa, mientras que era un carácter variable en los de mosto, lo contrario ocurría con la capacidad para degradar la glucosa por parte de los aislados de vino (Tabla 8).

Tabla 10. Adscripción de los aislados a los perfiles de fermentación

| Perfil | Aislado |
|--------|---|
| A | 129, Z6, Z8 |
| B | 120,122, 124, 125, 128, 130, 133, 138M, 142, 171, 196, 197, 217B, 223A, 224, 234, 238, 239, 246, 251, Z1, FS35 |
| C | 205A |
| D | 218A, 240, 248, 254 |
| E | 118 |
| F | 75 , 255 |
| G | 158, 169, 182, 222M |
| H | 134, 149, 168, 176A,188, 194, 202, 206, 213, 219, 225, 228A, 235, 236, 237, 242, Z2, Z3 |
| I | 123, 160B, Po14, Me3, Me6, FS17, FS30 |
| J | 160C, Me8, FS36 |
| K | 229 |
| L | 226SM, 504, Po9, Po16, FS2, FS20, FS29 |
| M | Po2, Po4, FS10, FS14, FS18, FS19, FS26, FS34, FS37 |
| N | Po8, Ix5, Ix14, FS24 |
| O | FS13, FS16, FS21 |
| P | Po10, FS31 |
| Q | Po5, Po6, Po15 |
| R | Me1, Me2 |
| S | Ix1, Ix6, Ix9, Ix13, Ix15, Ix19, Ix21 |
| T | B19 |

En rojo se muestran los aislados de mosto y en negro los aislados de vino.

Igualmente, los aislados de vino son incapaces de fermentar la celobiosa, manosa y melibiosa, mientras que el 20 % de los aislados de mosto sí lo hacen (Tabla 8).

Respecto al número total de azúcares fermentados por uno y otro grupo de aislados hay que decir que el 79 % de los de vino fermentan tan sólo 2-3 azúcares, mientras que el 75 % de los aislados de mosto fermenta más de 3, de hecho los aislados que mayor número de azúcares (10, perfil Q) proceden de mosto (Po5, Po6 y Po15). También, se han encontrado diferencias en la capacidad de un grupo y otro en la frecuencia de utilización

de la trehalosa, presentándose esta característica con más frecuencia en el caso de los aislados de mosto que en los de vinos. Esto se confirma también en el caso de las cepas de referencia (Tabla 9). La trehalosa es el tercer azúcar en abundancia en el mosto de uva, después de la glucosa y la fructosa. Tras realizar el análisis estadístico del Chi cuadrado, se ha observado que existe una asociación entre el perfil fermentativo y la fase de procedencia de los aislados. Los aislados de mostos están asociados a los perfiles I, L, M y S, mientras que los de vino están asociados a los perfiles B y H.

O. oeni es una especie heterogénea desde el punto de vista metabólico, como han demostrado Lafon-Lafourcade y col. (1983), Davis y col. (1988), Pardo y col., (1988) y Edwards y col., (1991). Sin embargo, es difícil sacar buenas conclusiones respecto a las capacidades de esta especie cuando se comparan los resultados de distintos autores, ya que utilizan para su evaluación diferentes medios y procedimientos (método tradicional en tubo, galerías API, etc). Así, se ha dado la circunstancia de que una misma cepa de referencia analizada por un único grupo de investigación o por varios, ha mostrado diferentes resultados cuando se analiza con diferentes sistemas de análisis (Garvie, 1967a y 1967b; Pardo y col., 1988; Jensen y Edwards, 1991; Fugelsang y Edwards, 2007).

En nuestro caso, las pruebas de fermentación de carbohidratos se realizaron en el medio semisólido descrito por Garvie (1967a), que también ha sido utilizada por otros autores (Chalfan y col., 1977; Garvie, 1960). Se prefirió utilizar este procedimiento frente a otros más modernos y sistematizados como la galería API 50 CHL porque este último sistema daba un elevado número de fermentaciones negativas en el caso de *L. oenos* (syn. *O. oeni*) (Pardo y col., 1988). La razón de este elevado número de falsos negativos se debía a que ni el medio basal de fermentación ni los tiempos de incubación propios de este sistema eran los adecuados para mostrar las actividades de esta especie, ya que *O. oeni* tiene requerimientos especiales y precisa de largo tiempo para crecer (Jensen y col., 1991; Pardo y col., 1988). Aunque Jensen y Edwards (1991) consiguieron mejorar los resultados cambiando el medio basal y alargando el tiempo de incubación de la galería API 50 CHL, en este trabajo se prefirió utilizar en el medio semisólido diseñado por Garvie (1967a). De esta manera, se tenía la garantía de que todos los requerimientos de *O. oeni* estaban cubiertos y que la incubación a tiempos periodos superiores a 1 semana se realizaba con menores riesgos de contaminación de los que se podían producir en la galería API, ello permitió conseguir resultados muy fiables. A pesar de las dificultades apuntadas, se ha considerado importante establecer similitudes y

diferencias entre el comportamiento de nuestros aislados y los de otros autores a fin de tener una visión amplia sobre la diversidad metabólica de esta especie.

La descripción de la especie *L. oenos* (syn. *O. oeni*) que proporcionaron Holt y col. (1994) en el *Bergey's manual of determinative bacteriology* 9ª edición, muestra como características propias de la misma la capacidad para fermentar fructosa y trehalosa, pero no sacarosa. Estas características permitían separarla de otras especies del género *Leuconostoc*. Sin embargo, los datos obtenidos en este trabajo, muestran que la fermentación de la trehalosa es un carácter dependiente de cepa (Tablas 8 y 9). Otra discrepancia respecto a la descripción original de la especie es su comportamiento frente a la sacarosa. Aunque nuestros aislados se ajustan a la descripción original, Davis y col. (1988) encuentran cepas que si la fermentan y, según afirmación de Garvie recogida por Gasser y col. (1994), este azúcar puede ser fermentado por algunos *Leuconostoc* acidófilos en determinadas circunstancias.

Como ya se ha comentado todos los aislados analizados en este trabajo fermentaron la ribosa, sin embargo, Davis y col. (1988) encontraron que sólo el 55 % de sus cepas eran capaces de hacerlo. Ya se ha apuntado en este trabajo que la glucosa es fermentada sólo por un 23 % de los aislados de vino y a una velocidad más baja que la fructosa y ribosa, mientras que todos los de mosto la fermentan. Lafon-Lafourcade y col. (1983) también encuentran diferencias de comportamiento respecto a la fructosa y la glucosa entre las cepas de *O. oeni* que ellos estudiaron, mientras que Davis y col. (1988) describieron que el 100 % de sus cepas fermentaban ambos azúcares. El hecho de que algunos aislados no fermenten la glucosa o lo hagan con dificultad está relacionado con la incapacidad que muestran algunas cepas para reoxidar el NAD(P)H cuando crecen con glucosa como única fuente de carbono (Maicas y col., 2002). Sin embargo, sí son capaces de utilizarla eficazmente cuando se cometaboliza con la fructosa (Maicas y col., 2002).

El 48 % de nuestros aislados fermentó la L-arabinosa. La capacidad de fermentar pentosas fue un criterio utilizado por Peynaud y Domercq (1968) para proponer la creación de dos especies de leuconostocs del vino (*L. gracile* incapaz de fermentar pentosas y *L. oenos* (syn. *O. oeni*) capaz de fermentar L-arabinosa, L-xilosa o ambos inclusive), aunque esta propuesta no se consolidó. La diversidad de comportamientos fermentativos respecto a los carbohidratos se manifiesta también el manitol, y la D y L-xilosa. Así, en este trabajo no se encontró ningún aislado que los fermentara, mientras que Davis y col. (1988), encontraron que alguna de sus cepas sí eran capaces de hacerlo.

Lo mismo ocurría con la melibiosa, que sólo fue fermentada por el 14 % de nuestros aislados mientras que el 42.3 % de las cepas ensayadas por Davis y col. (1988), lo hacían.

4.2.2 Producción de amoniaco a partir de arginina

Cincuenta de los 104 aislados daban una respuesta claramente positiva a esta prueba (Tabla 11 y Figura 6). La mayoría de los aislados capaces de desaminar la arginina procedían de mosto (86 %). Además, según la prueba del Chi cuadrado a un nivel de significación de 0.05, existe una asociación estadísticamente significativa entre la capacidad de desaminar la arginina y los aislados procedentes de mosto. Se observan también distintos comportamientos sobre la arginina entre las cepas de *O. oeni* de referencia. Así, las cepas ML-34 CECT 218, CECT 4028 y CECT 217^T, dieron resultado negativo (Arg -), mientras que la CECT 4029 dio resultado positivo (Arg +). La incapacidad de la cepa ML-34 CECT 218 para degradar arginina ya fue descrita por Liu y col. (1995). La desaminación de la arginina se empleó en los años 80 y 90's para diferenciar entre cocos homofermentativos y bacilos heterofermentativos del vino, los primeros se describieron como incapaces de llevar a cabo esta actividad mientras que los segundos sí eran capaces (Chalfan y col., 1977; Maret y col., 1977; Sharpe, 1979; Delfini, 1983).

Tabla 11. Resultados de la prueba de desaminación de la arginina en aislados de *O. oeni*

| Reacción | Aislado |
|-------------------|---|
| Positiva 12/38 | 118, 168, 169, 182, 202, 206, 222M, 223A, 226SM, 229, 237, 504, FS2, FS10, FS13, FS14, FS16, FS17, FS18, FS19, FS20, FS24, FS26, FS29, FS30, FS31, FS34, FS35, FS36, FS37, Ix1, Ix5, Ix6, Ix9, Ix14, Ix15, Ix19, Ix21, Me1, Me2, Me3, Me6, Po2, Po4, Po5, Po6, Po8, Po9, Po10, Po15 |
| Negativa 48/6 | 75 , 120, 122, 123, 124, 125, 128, 129, 130, 133, 134, 138M, 142, 149, 158, 160B, 160C, 171, 176A, 188, 194, 196, 197, 205A, 213, 217B, 218A, 219, 224, 225, 228A, 234, 235, 236, 238, 239, 240, 242, 246, 248, 251, 254, 255, Z1, Z2, Z3, Z6, Z8, B19, FS21, Ix13, Me8, Po14, Po16 |

En negro se muestran los aislados de vino, en rojo los aislados de mosto.

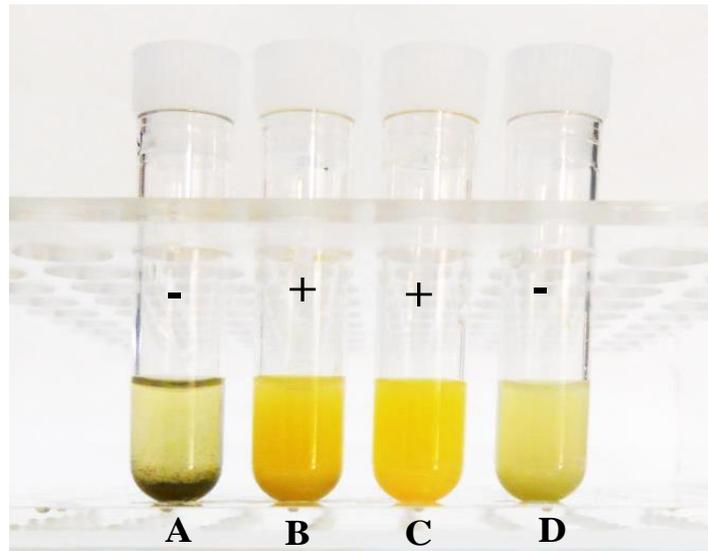


Figura 6. Respuesta de los aislados de *O. oeni* sobre la arginina, tras adición del reactivo Nessler. A: control negativo (medio sin inocular); B: *L. brevis* CECT 216 (control positivo); C: aislado FS36; D: aislado 120; +: reacción positiva; -: reacción negativa.

En otras ocasiones, varios autores han constatado que algunas cepas de *O. oeni* eran capaces de hidrolizar la arginina (Garvie y Farrow, 1980; Pilone y col., 1991; Liu y Pilone 1998). Así, Pilone y col. (1991) detectaron que el 75 % de las cepas de *L. oenos* (syn *O. oeni*) que ellos estudiaron producían amonio a partir de la arginina. Años después Liu y col. (1995) corroboraron esta observación.

Desde el punto de vista biológico la desaminación de la arginina podría mejorar el crecimiento de *O. oeni*, ya que la degradación de este aminoácido da lugar a carbamoil-P, CO₂ y NH₃ con la subsiguiente formación de 1 molécula de ATP (Terrade y Mira de Orduña, 2009). Sin embargo, Terrade y Mira de Orduña (2009), no observaron que la adición de arginina estimulase el crecimiento de *O. oeni* en vino. La degradación parcial de este aminoácido puede generar citrulina o el carbamil-P que son precursores del carbamato de etilo (potencialmente cancerígeno) y las cepas que presentan estas características deben considerarse potencialmente peligrosas.

Los resultados obtenidos en este trabajo corroboran los ya encontrados por Pilone y col. (1991) y demuestran que este carácter es variable según las cepas, lo que tiene importantes connotaciones taxonómicas respecto a la validez de esta prueba para determinar qué cepas pertenecen a la especie *O. oeni* (Pilone y col., 1991).

Liu y Pilone (1998), argumentaron que dado que ninguna otra especie del antiguo género *Leuconostoc* era capaz de desaminar la arginina, este carácter era una prueba más que apoyaba la reclasificación de *L. oenos* como *O. oeni*, propuesta por Dicks y col. (1995). Además, recomendaron que se describiera a esta nueva especie como arginina variable. Por ello, esta característica dejaría de ser un criterio útil para separar los cocos de los lactobacilos heterofermentativos del vino.

La elevada proporción de aislados de *O. oeni* arginina positivas de esta especie es sorprendente dado que la incapacidad para desaminar este aminoácido se describió como característica propia del género *Leuconostoc* (el cual estuvo adscrito *L. oenos* hasta 1995). Pilone y col. (1991), demostraron que la ausencia de la respuesta positiva a la desaminación de la arginina en muchas cepas era debida a que el método de Chalfan y col. (1977), que se había utilizado hasta el momento, no era lo suficientemente sensible. La falta de sensibilidad, según estos autores, se debía a que la concentración de arginina en el medio era insuficiente para generar concentraciones de NH_3 detectables por el reactivo Nessler. Para evitar este problema Pilone y col. (1991) diseñaron un medio en el que la arginina estaba al doble de concentración (6 g/L) de la que se utilizaba anteriormente (Chalfan y col., 1977); esto permitía que aquellas cepas que presentaban una actividad de desaminación reducida fuesen detectables (Pilone y col., 1991). Liu y col. (1995) y Liu y col. (1996) demostraron que *L. oenos* (syn. *O. oeni*) degradaba la arginina vía arginina desaminasa (ADI) y que la actividad de los enzimas de esta vía se ven afectadas por el tipo de azúcar en el medio de ensayo (Liu y Pilone, 1998); la glucosa ejerce represión de estos enzimas en lactococos, ciertos lactobacilos homofermentativos, estreptococos, *Pseudomonas aeruginosa* y algunos vibrios; también se ha demostrado que la sacarosa y la fructosa reprimen la síntesis de los enzimas de la vía ADI en *Streptococcus sanguis* y *Streptococcus mitis*. Liu y col. (1996), describieron que la glucosa no ejerce inhibición en *L. oenos*, pero sí la fructosa; como resultado de ello resultarían arginina negativas todas aquellas cepas que aun presentando la vía ADI, la tuvieran inhibida por la presencia de este azúcar.

Es por ello que para ensayar la actividad arginina desaminasa en los aislados de *O. oeni* se utilizó el medio de Pilone y col. (1991) pero desprovisto de fructosa. En función del grado de inhibición que la fructosa ejercía sobre la desaminación de la arginina, Liu y col. (1996) las agruparon en dos grupos. Al primer grupo pertenecen las cepas que poseen un ritmo muy acelerado en la utilización de la fructosa, lo que hace que este

azúcar no se acumule y por ello no pueda inhibir la síntesis de las enzimas de la ruta ADI. En el segundo grupo se encuentran cepas que utilizan la fructosa lentamente, de modo que su presencia inhibe los enzimas de la vía ADI y, por ello, producen poco NH_3 a partir de la arginina. Hemos encontrado una relación estadísticamente significativa entre la incapacidad para fermentar fructosa y la capacidad para desaminar arginina entre nuestros aislados y que ambas características se presentan asociadas a los aislados de mosto.

4.2.3 Producción de dextrano a partir de sacarosa

La producción de dextrano a partir de la sacarosa, es una prueba que hace años se usaba para diferenciar dentro del género *Leuconostoc* a las especies productoras del mismo, tales como: *L. mesenteroides* subsp. *dextranicum*, *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides*, *L. carnosum* y *L. gelidum* de otras especies de leuconostocs que eran incapaces de producirlo y de los actuales *O. oeni*.

Sin embargo, en la actualidad se ha demostrado que existen cepas de *O. oeni* productoras de exopolisacáridos (Ibarburu y col., 2007; Ciezack y col., 2010). Este polisacárido se ha identificado como un β -glucano. La cepa de *O. oeni* que lo produce lo hace desde glucosa o desde fructosa y la presencia de ambos azúcares en el medio de cultivo induce una mayor producción del EPS. El hecho de que no se encontraran entre nuestros aislados productores de EPS pudo deberse a que se utilizó sacarosa para llevar a cabo esta prueba, en lugar de glucosa o fructosa. Sin embargo, Ciezack y col. (2010) encontraron que la presencia de la sacarosa potenciaba la producción del mismo. Tanto Ibarburu y col. (2007) como Ciezack y col. (2010) estudiaron el efecto del etanol sobre la producción de EPS en *O. oeni*, llegando a la conclusión de que la concentración del mismo (5 %) lo estimulaba y altas concentraciones (10 %) lo inhibían.

En un trabajo reciente, Dimopoulou y col. (2014), detectaron que la incapacidad para producir EPS desde sacarosa por cepas de *O. oeni* estaba relacionada con mutaciones en el sitio activo de los genes *dsrO*, *dsrV* y *levO*.

4.2.4 Degradación de ácidos orgánicos

Se observaron importantes diferencias en la velocidad y en la eficiencia con la que los aislados analizados llevaron a cabo la FML (Figura 7). Los aislados 149, 205A, 213, 504, Z1 y Z2 presentaron un porcentaje de degradación de ácido málico del 98 % durante los 3 primeros días. Los aislados 118, 120, 122, 124, 125, 130, 133, 138M, 142,

158, 160B, 168, 171, 182, 188, 196, 197, 206, 222M, 229, 235, 236, 237, 248, 251, Z3, Po2 y Po4, fueron algo más lentos requiriendo unos 6 días para degradar entre un 90 y el 100 % del ácido málico. Los más lentos requirieron 20 días de incubación para degradar entre el 87 y el 100 % de ácido málico. Los aislados más ineficaces fueron FS2, FS13, FS14, FS31 y FS37, que sólo consumieron entre el 8 y 11 % de ácido málico, mientras que el aislado FS36 no consumió nada de este ácido tras 20 días de incubación. En general, se observó que los aislados más ineficaces procedían mayoritariamente de mosto.

El análisis estadístico ANOVA y la prueba *a posteriori* TukeyB, con un nivel de significación de 0.05, demostró que los aislados que degradan significativamente el ácido málico (considerando los 3, 6 y 20 días de incubación) son los aislados: 504, Z2, Z1, 205A, 197, 171, 182, 149 y 142 (por orden decreciente).

También se observaron diferencias en la velocidad y en la eficiencia del consumo del ácido cítrico. Los aislados más rápidos y eficaces fueron 138M, 171, 197 y Z1 ya que consumieron el 100 % del ácido cítrico en los primeros 3 días. Algo más lentos fueron los aislados 142, 149, 158, 160B, 168, 182, 196, 205A, 213, 235, 237, 248, 504, Z2 y Z3 que lo eliminaron completamente transcurridos 6 días. Los más lentos fueron los aislados 118, 120, 122, 124, 129, 130, 133, 218A, 219, 229 y 234 que requirieron 20 días para degradarlo por completo. Los aislados más ineficaces fueron los aislados 134, B19, Ix13 y Me2, ya que sólo degradaron entre el 1 y el 2 % de ácido cítrico tras 20 días del ensayo (Figura 8). La mayor parte de los aislados capaces de degradar ácido cítrico eficazmente provenían de vino, mientras que los que no lo degradan o lo hacen pobremente procedían del mosto.

El análisis estadístico ANOVA y la prueba *a posteriori* TukeyB, con un nivel de significación de 0.05, demostró que los aislados que degradan significativamente el ácido cítrico (considerando los 3, 6 y 20 días de incubación) son los aislados: Z1, 197, 171, 138M, 182, 205A, 213, 149 y 504 (por orden decreciente).

Ninguno de nuestros aislados degradaba el ácido tartárico, lo cual concuerda con lo descrito hasta el momento respecto a esta capacidad.

Como *O. oeni* es la principal especie asociada con la MLF, la capacidad para degradar L-málico es el principal carácter que se utiliza para su selección como un cultivo maloláctico.

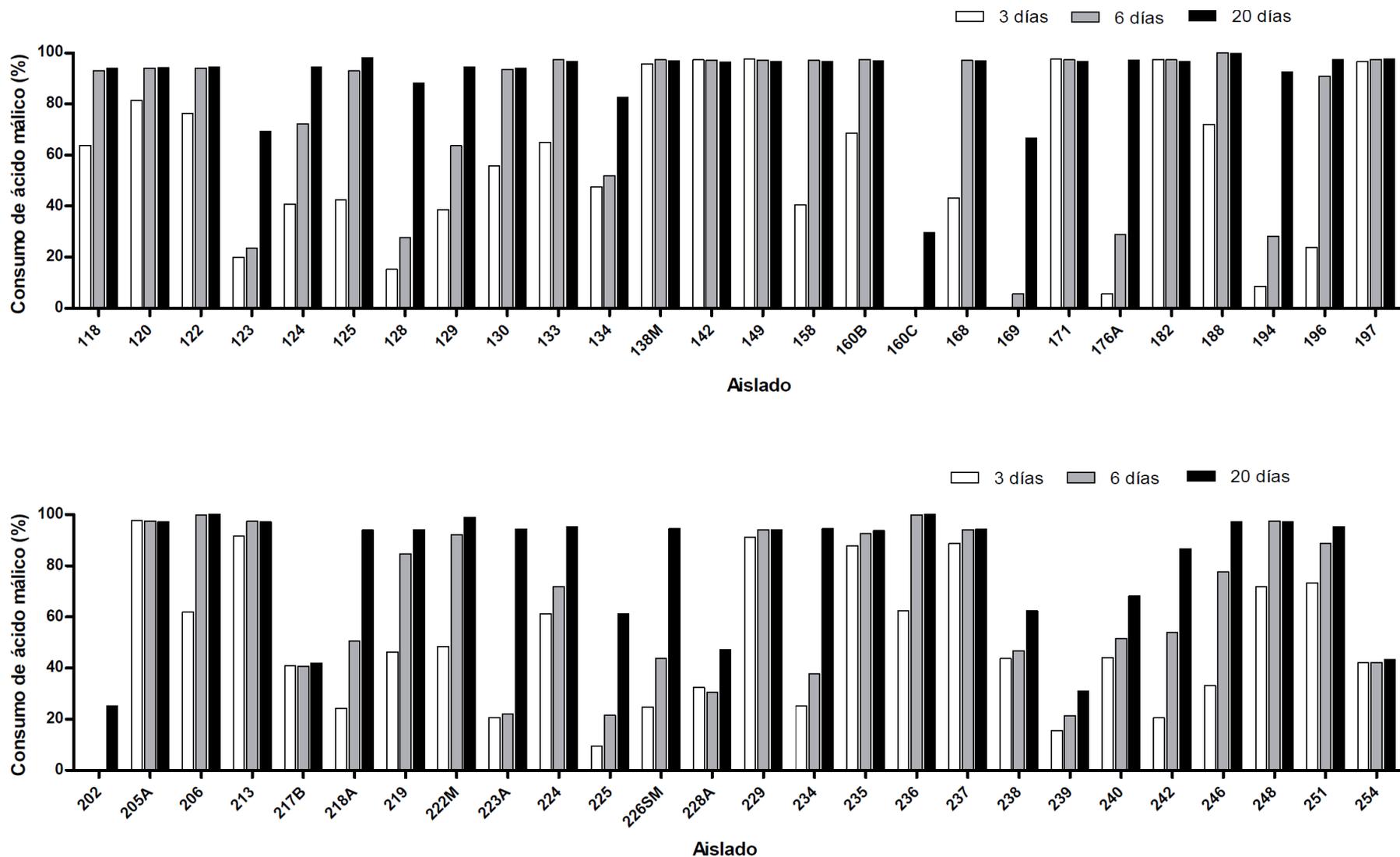


Figura 7. Porcentaje de degradación del ácido málico por los aislados de *Oenococcus oeni* a diferentes tiempos. En rojo se muestran los aislados de mosto y en negro los de vino

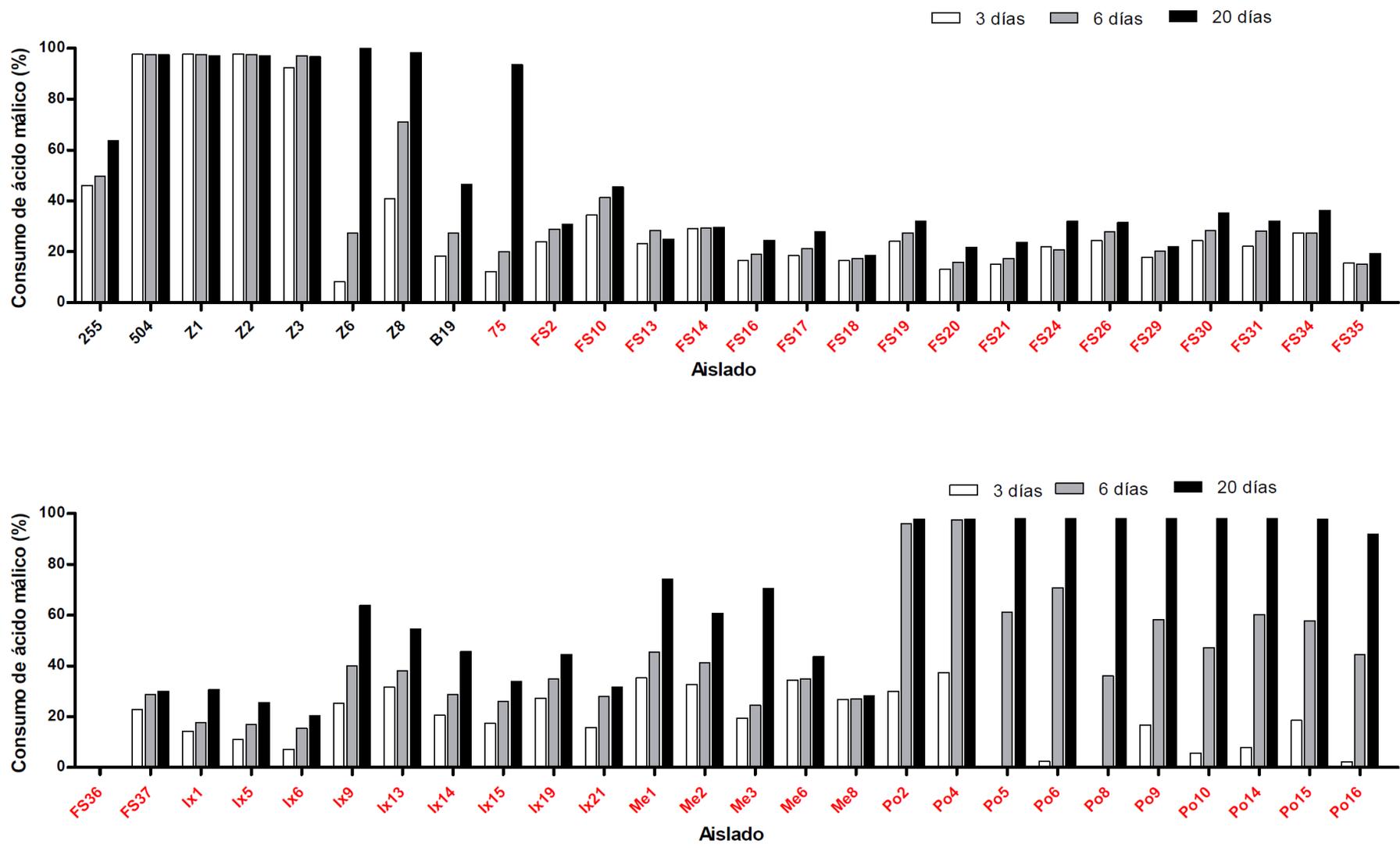


Figura 7. (... Continuación)

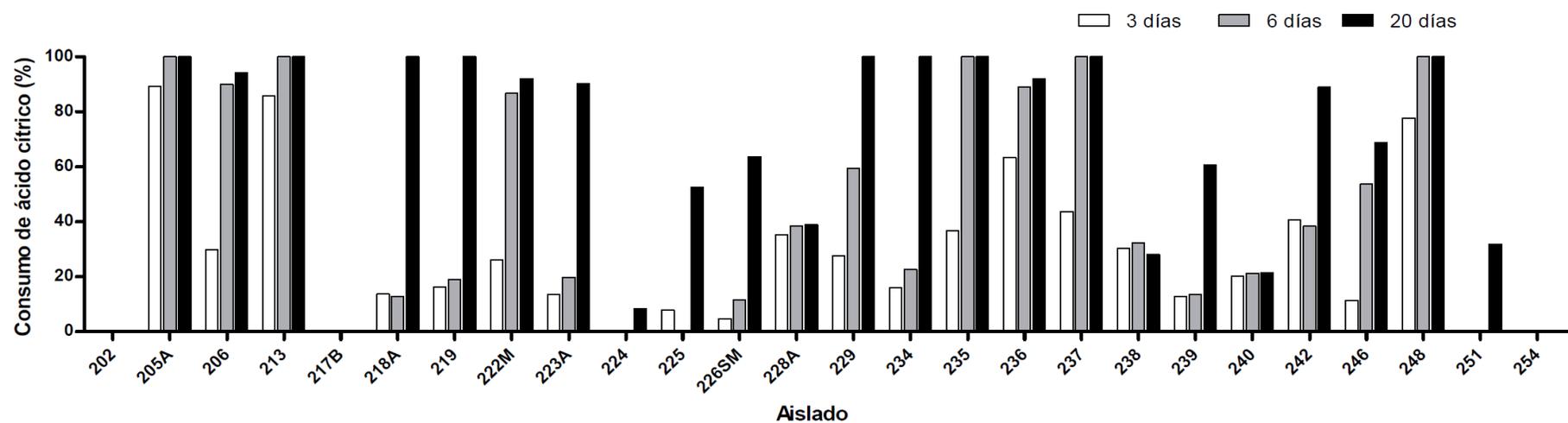
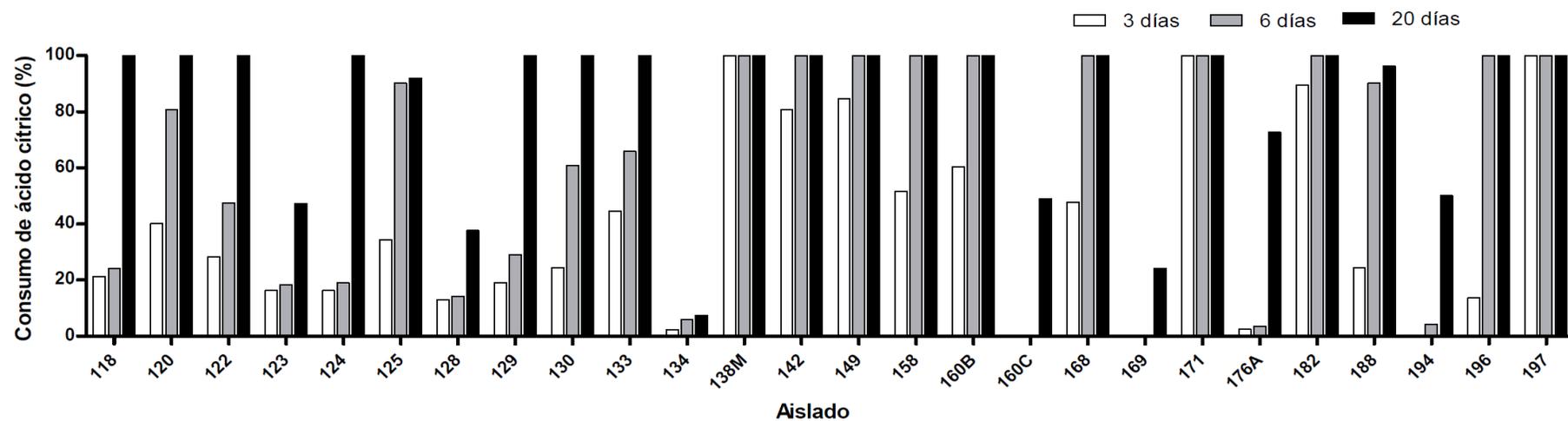


Figura 8. Porcentaje de degradación del ácido cítrico por los aislados de *Oenococcus oeni* a diferentes tiempos. En rojo se muestran los aislados de mosto y en negro los de vino

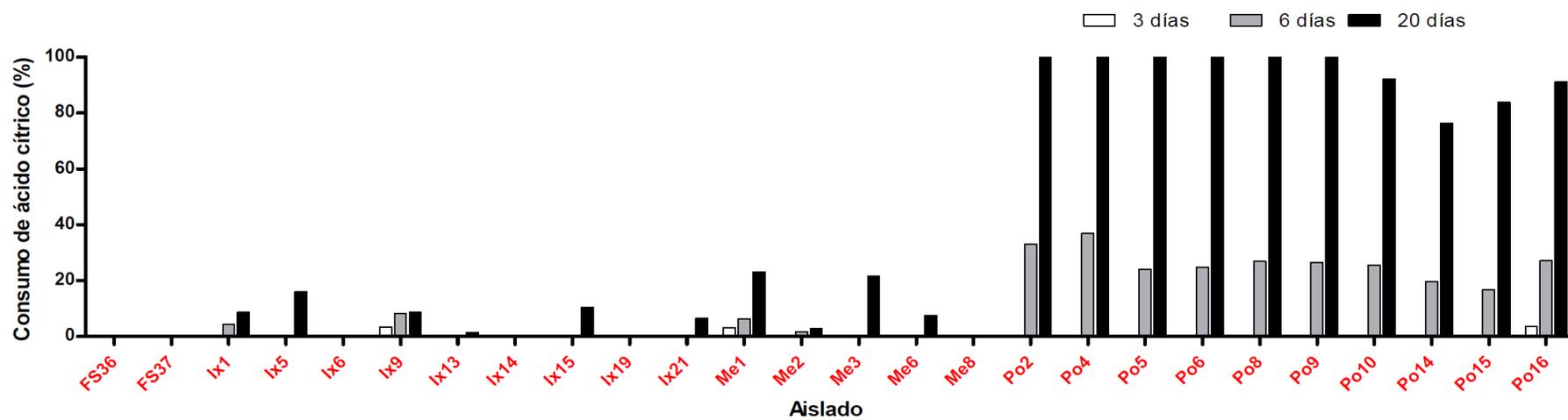
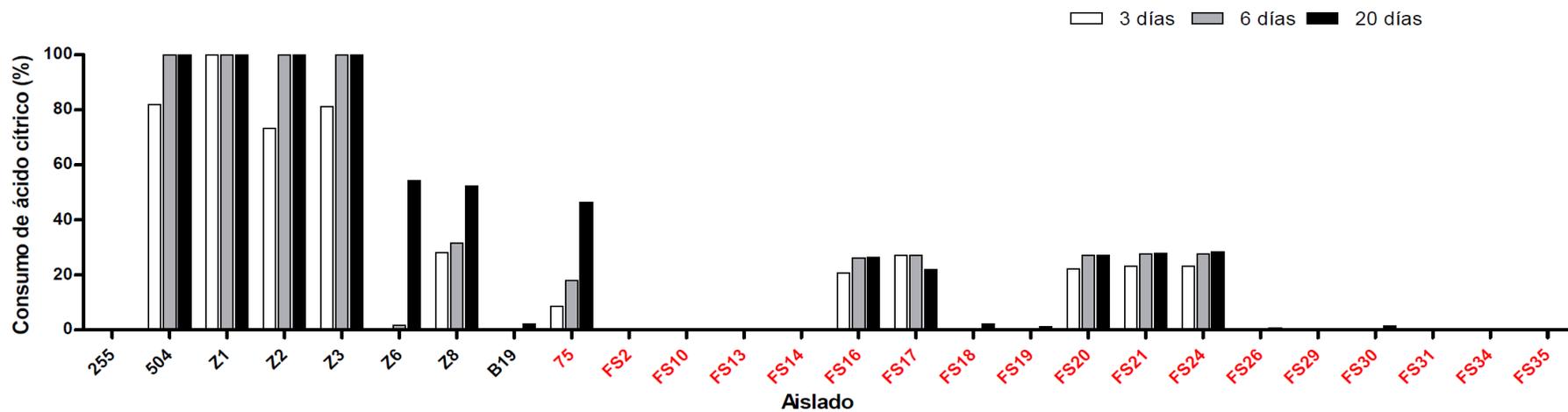


Figura 8. (... Continuación)

La diversidad de comportamientos que muestran nuestros aislados respecto al ácido málico, ya fue observada por otros autores como Henick-Kling y col. (1989), Izquierdo y col. (2004), Coucheney y col. (2005a), Capello y col. (2008 y 2010) e Izquierdo y col. (2013). Henick-Kling y col. (1989) encontraron diferencias en la degradación del ácido málico tanto en cepas de *L. oenos* (syn. *O. oeni*) aisladas por ellos como en aquéllas presentes en cultivos malolácticos comerciales. Ambos grupos de cepas degradaron entre un 40 y 99 % del málico contenido en un medio de laboratorio a pH 4.0 durante los 3 primeros días de incubación, e Izquierdo y col. (2013) observaron que una cepa indígena de *O. oeni*, aislada de vinos de Castilla-La Mancha, era más eficiente para llevar a cabo la MLF que las de los cultivos iniciadores malolácticos (PN4 y Alpha). Izquierdo y col. (2004) también observaron que las cepas de *O. oeni*, aisladas de vinos Cencibel, degradaban entre el 95 y 30 % del ácido málico tras 7 días de incubación. Coucheney y col. (2005a) observaron que sólo 1 de 3 cepas mostraba alta capacidad maloláctica, tras ser inoculada en vino tinto. También se ha descrito diferencias en la tasa de consumo de ácido málico en cepas indígenas de *O. oeni* procedentes de vinos Malvasia Nera (Capello y col., 2008 y 2010) y de vinos Nero di Troia (Capozzi y col., 2010).

Nuestros aislados también exhiben diferencias en su capacidad para utilizar el ácido cítrico. Aunque el ácido cítrico se encuentra en bajas concentraciones, su metabolismo tiene considerables consecuencias sensoriales para el vino (Bartowsky y Pretorius, 2009). El ácido cítrico puede ser transformado en ácido acético, dando lugar a un incremento de la acidez volátil del vino, o en diacetilo y otros compuestos cetónicos que pueden mejorar el perfil organoléptico del vino. Sin embargo, en este trabajo no se ha observado que la degradación del ácido cítrico conduzca a un aumento en la cantidad de ácido acético por parte de nuestros aislados. Algunos investigadores han considerado que la degradación parcial del ácido cítrico es preferible a la degradación total, ya que esto limitaría la acumulación excesiva de los productos finales (Bartowsky y Pretorius, 2009). Capello y col. (2010) también observaron que todas las cepas de *O. oeni* que aislaron consumían el ácido cítrico en su totalidad, en un medio de laboratorio.

Una característica positiva de nuestros aislados es que ninguno de ellos fue capaz de degradar el ácido tartárico. En general, la degradación del tartrato conduce a una alteración negativa del vino denominada *tourne* (Unden y Zaunmüller, 2009). Radler y Yannisis, (1972) demostraron que el metabolismo del ácido tartárico es poco frecuente en especies de BL homo y heterofermentativas, ya que de un total de 78 cepas, tan sólo

4 pertenecientes la especie *L. plantarum* y una a *L. brevis* fueron capaces de hacerlo. Además, la degradación del ácido tartárico sólo tiene lugar en vinos con pHs elevados (próximos o superiores a 4) y da lugar a un incremento del contenido en ácido acético (Suárez e Íñigo 2004).

4.2.5 Producción de aminas biógenas

Ninguno de los aislados de *O. oeni* mostró capacidad para producir tiramina. De un total de 104 aislados, 55 % (57 aislados) produce al menos una amina biógena. El 32 % de los aislados ensayados fue capaz de producir histamina, el 30 % produjo putrescina bien a partir de la ornitina o bien a partir de la arginina y el 13 % produjo cadaverina. Los aislados 138 y 169 fueron altamente productoras de histamina dando lugar a concentraciones de 61.6 y 82 mg/L, respectivamente (Tabla 12).

Treinta y un aislados fueron capaces de sintetizar putrescina desde ornitina, aunque con producciones variables, desde 1.5 hasta 382.81 mg/L. Los aislados FS16 y 234 procedentes de mosto y de vino produjeron entre 382.81 y 83.0 mg/L de putrescina, respectivamente, mostrándose como los mayores productores de esta amina. Sólo los aislados 118 y FS24 fueron capaces de producir putrescina tanto desde arginina como desde ornitina.

Trece aislados mostraron capacidad para producir cadaverina. Los aislados que la produjeron en altas concentraciones fueron la FS16 y FS34 que dieron lugar a concentraciones de 115.6 y 49,1 mg/L, respectivamente (Tabla 12). Curiosamente los aislados que produjeron cadaverina fueron incapaces de producir histamina.

La capacidad de producir histamina por cepas de *O. oeni*, ha sido estudiada por muchos investigadores y los resultados obtenidos por ellos son dispares. Moreno-Arribas y col. (2003) demostraron que ninguna de las cuatro cepas comerciales de *O. oeni*, ni las aisladas de vinificaciones eran capaces de producir ni histamina. Costantini y col. (2006) tampoco encontraron cepas de *O. oeni* productoras de histamina cuando las ensayaron en un medio de cultivo. Corroboraba esta incapacidad el hecho de que ninguna presentaba los genes que codifican para la descarboxilasa responsable de la síntesis de las mismas. Sin embargo, otros autores pusieron en evidencia que *O. oeni* contribuye significativamente al contenido global de histamina, así como de otras aminas biógenas en el vino (Coton y col., 1998). Guerrini y col. (2002) observaron que 26 cepas de *O. oeni* (59 %) producían entre un 1-32 mg/L de histamina en un medio de laboratorio.

Tabla 12. Producción de aminas biógenas por aislados de *O. oeni*. Solamente se muestran los aislados productores de aminas

| Aislado | Amina Biógena (mg/L) | | | |
|---------|----------------------|-------------------------|-------------------------|------------|
| | Histamina | Putrescina ^O | Putrescina ^A | Cadaverina |
| 118 | - | 6.10 | 2.10 | - |
| 120 | 30.40 | 9.10 | - | - |
| 122 | 7.10 | 6.80 | - | - |
| 123 | 7.40 | 15.90 | - | - |
| 124 | - | - | - | 16.70 |
| 125 | 29.00 | - | - | - |
| 128 | - | 8.70 | - | 7.60 |
| 129 | 25.60 | 4.80 | - | - |
| 130 | 24.00 | 13.00 | - | - |
| 133 | - | 1.10 | - | 5.79 |
| 134 | 55.70 | - | - | - |
| 138M | 29.80 | 3.58 | - | - |
| 160C | - | - | - | 1.40 |
| 169 | 82.00 | - | - | - |
| 188 | 31.10 | - | - | - |
| 197 | - | 4.50 | - | - |
| 206 | 11.9 | - | - | - |
| 217B | 12.00 | - | - | - |
| 219 | 19.40 | - | - | - |
| 228A | 22.10 | - | - | - |
| 234 | - | 83.70 | - | 7.20 |
| 236 | 5.70 | - | - | - |
| 238 | 61.60 | - | - | - |
| 239 | 45.50 | 2.90 | - | - |
| 240 | 27.00 | - | - | - |
| 246 | 37.00 | - | - | - |
| 248 | 18.10 | - | - | - |
| 251 | 34.40 | - | - | - |
| 254 | 2.50 | - | - | - |
| 255 | 11.00 | - | - | - |
| Z8 | 51.30 | - | - | - |
| 75 | 2.70 | 7.50 | - | 25.00 |
| FS13 | 6.30 | - | - | - |
| FS14 | 3.40 | 5.96 | 0.50 | - |

| | | | | |
|-------------|-------|--------|---|--------|
| FS16 | - | 382.81 | - | 115.60 |
| FS17 | 15.00 | - | - | - |
| FS18 | 5.40 | - | - | - |
| FS20 | 6.70 | - | - | - |
| FS21 | 6.50 | - | - | - |
| FS31 | - | - | - | 34.87 |
| FS34 | - | - | - | 49.12 |
| FS35 | - | 6.91 | - | 23.35 |
| FS36 | - | 15.77 | - | 34.87 |
| FS37 | - | 3.60 | - | - |
| Ix1 | - | 1.00 | - | - |
| Ix5 | - | 1.00 | - | - |
| Ix6 | - | 1.73 | - | - |
| Ix9 | - | 1.37 | - | - |
| Ix13 | 25.80 | 1.54 | - | - |
| Ix14 | - | 1.29 | - | - |
| Ix15 | - | 1.00 | - | 4.22 |
| Ix19 | - | 1.10 | - | 2.37 |
| Me6 | - | 1.18 | - | - |
| Me8 | 5.40 | 1.57 | - | - |
| Po9 | - | 1.50 | - | - |
| Po10 | - | 2.00 | - | - |
| Po14 | - | 1.00 | - | - |

Putrescina^O: producción de putrescina desde ornitina; Putrescina^A: producción de putrescina desde arginina; -: no produce. En rojo se muestran los aislados de mosto y en negro los de vino

En este mismo sentido, Landete y col. (2005) encontraron 25 cepas de *O. oeni* capaces de producir de histamina en un rango de entre 5 y 99 mg/L en un medio sintético. Izquierdo y col. (2009b) observaron que algunas de sus cepas producían entre 0.11-9.24 mg/L de histamina, tras ser inoculadas en vinos tintos. En este trabajo también se ha detectado aislados productores de histamina aunque en un sistema tampón, distinto al que habían utilizado los autores reseñados. La producción de la histamina está regulada tanto por las concentraciones de histidina e histamina presentes en el medio, ya que la expresión del gen *hdc*, que codifica para la enzima histidina descarboxilasa, se induce en presencia de histidina (sustrato de la enzima), se reprime por la histamina, entre otros factores (Landete y col., 2006). La capacidad histaminogénica es dependiente de cepa y

de las condiciones fisicoquímicas en las que éstas crecen, tal como muestran los autores antes citados y los datos de esta tesis. Es por ello que no es extraño el que unos autores encuentren cepas productoras y otros no. Sin embargo, existe mucha controversia sobre la capacidad/incapacidad de *O. oeni* para producir histamina, tal y como reflejan García-Moreno y Muñoz, (2012).

Con respecto a la producción de putrescina, nuestros resultados concuerdan con los de Guerrini y col. (2002) quienes encontraron que de un total de 26 cepas de *O. oeni*, 7 fueron productoras de putrescina en un medio de laboratorio en un rango de entre 9.9 y 146 mg/L. Marcobal y col. (2004), observaron que sólo 1 de 42 cepas de *O. oeni* procedentes de vinos tintos españoles, era altamente productora de putrescina.

Izquierdo y col. (2009b) también encontraron que 27 cepas de *O. oeni* eran capaces de producir esta amina en concentraciones de entre 3.31 y 12.62 mg/L en vino tinto.

Mangani y col. (2005), observaron que una cepa de *O. oeni* era capaz de producir putrescina tanto desde la ornitina como de la arginina. Además, detectaron que existían una interacción metabólica entre una cepa que metabolizaba la arginina pero que era incapaz de producir putrescina y otra que si la produce pero no a partir de la arginina. En este trabajo también se han encontrado que únicamente los aislados 118 y FS14 fueron capaces de descarboxilar la arginina y de producir putrescina tanto a partir de arginina, como de ornitina, el resto solo la producen a partir de ornitina. Las que son incapaces de producir putrescina a partir de arginina son menos peligrosas ya que la cantidad de ornitina presente en el vino es inferior a la arginina. Además, los aislados 118 y FS14 no sólo actúan descarboxilando la arginina sino que también puede desaminarla (Tabla 11).

Guerrini y col. (2002) encontraron que el 27 % de las cepas de *O. oeni* que estudiaron fueron capaces de producir cadaverina entre 14.8 y 34.2 mg/L en un medio de laboratorio. Izquierdo y col. (2009b) también detectaron que 27 de entre 90 cepas de *O. oeni* fueron capaces de producir cadaverina en concentraciones algo inferiores en vino tinto (0.24-0.63 mg/L). En nuestro trabajo también se han encontrado aislados de *O. oeni* capaces de producir cadaverina en altas concentraciones, aunque aquí el ensayo se ha realizado en un sistema tampón.

A pesar de que Choudhury y col. (1990) describieron que *O. oeni* DSMZ 20252 era capaz de producir tiramina en zanahorias fermentadas y en un medio sintético, otros autores han demostrado todo lo contrario (Moreno-Arribas y col., 2000; Moreno-

Arribas y col., 2003; Guerrini y col., 2002; Landete y col., 2007; Moreno-Arribas y Polo (2009). Gardini y col. (2005), utilizando un sistema tampón demostraron que *O. oeni* T56 producía tiramina (5.32-514.22 mg/L) y que la producción de la misma dependía del pH, etanol, de las concentraciones de arabinosa, piridoxal 5-fosfato y del nivel de SO₂. También, Garai y col. (2007) encontraron una cepa de *O. oeni*, aislada de sidra, que producía cantidades elevadas de tiramina tanto en medio sintético (543.99 mg/L) como en sidra (21.33 mg/L). Sin embargo, no se ha detectado esta capacidad en los aislados de *O. oeni* utilizadas en este trabajo.

4.2.6 Actividades enzimáticas

El ensayo para determinar la presencia de actividad β-glucanasa sobre β-glucano de levadura mostró que el 50 % de los aislados analizados en este trabajo la presentan (Tabla 13, Figura 9).

Tabla 13. Resultados obtenidos en la detección de la actividad β-glucanasa sobre β-glucano de levadura de los 104 aislados de *O. oeni*. En rojo, aislados procedentes de mosto y en negro, aislados procedentes de vino

| Reacción | Aislados |
|---------------------|---|
| Positiva (38/14) | 118, 120, 122, 125, 128, 130, 133, 138M, 160B, 169, 182, 188, 194, 196, 205A, 206, 217B, 218A, 219, 222M, 224, 226SM, 228A, 234, 236, 237, 239, 240, 246, 248, 251, 254, 255, Z3, Z6, Z8, B19, 504, FS14, FS17, FS20, FS26, FS31, FS35, FS36, Me2, Me8, Po2, Po4, Po9, Po15, Po16 |
| Negativa (22/30) | 75, 123, 124, 129, 134, 142, 149, 158, 160C, 168, 171, 176A, 197, 202, 213, 223A, 225, 229, 235, 238, 242, Z1, Z2, FS2, FS10, FS13, FS16, FS18, FS19, FS21, FS24, FS29, FS30, FS34, FS37, Ix1, Ix5, Ix6, Ix9, Ix13, Ix14, Ix15, Ix19, Ix21, Me1, Me3, Me6, Po5, Po6, Po8, Po10, Po14 |

Además, según la prueba del Chi cuadrado a un nivel de significación de 0.05, existe una asociación estadísticamente significativa entre la presencia de la actividad β-glucanasa y la procedencia de los aislados de *O. oeni*, siendo mucho más frecuente esta actividad en los aislados procedentes de vino que en los de mosto. Matthews y col. (2006), encontraron que solo un 26 % de las cepas de *O. oeni* que analizaron presentaban actividad β-glucanasa frente al β-glucano de cebada. La menor frecuencia

de cepas glucanasa positivas encontradas por estos autores respecto a la encontrada por nosotros puede ser debida a que el β -glucano de cebada es menos susceptible a la hidrólisis por las β -glucanasas de *O. oeni* que el de la pared celular de las levaduras. Es interesante el hecho de que este carácter esté asociado fundamentalmente a aislados procedentes de vino (78 %). La posesión de actividad β -glucanasa puede ser útil a la hora de evaluar la interacción entre cepas de *O. oeni* y levaduras, ya que los aislados que presentan este enzima podría facilitar la lisis de las levaduras, tal y como demostraron Guilloux-Benatier y col. (2000). Además de los nutrientes que podría conseguir *O. oeni* por la lisis de las levaduras, la actividad β -glucanasa podría proporcionarle un excedente de fuente de carbono y energía en forma de glucosa (derivada de la hidrólisis directa de este polisacárido). La muerte de la levadura supondría además una disminución de la competición por los nutrientes presentes en el vino tras la FA. Estos efectos mejorarían el crecimiento de bacterias en el vino (Guilloux-Benatier y col., 2000).

El ensayo de la actividad lipolítica sobre la tributirina mostró que el 67 % de los aislados presentaba actividad sobre ese sustrato y que esta actividad era más frecuente en aislados de vino (67 %) que en los de mosto (33 %) (Tabla 14, Figura 9). Esta asociación entre actividad lipolítica y el origen de los aislados (vino) es estadísticamente significativa, según determinó la prueba del Chi cuadrado a un nivel de significación de 0.05.

Tabla 14. Resultados obtenidos en la detección de la actividad lipolítica sobre tributirina de los 104 aislados de *O. oeni*. En rojo, aislados procedentes de mosto y en negro, aislados procedentes de vino

| Reacción | Aislados |
|---------------------|---|
| Positiva (47/23) | 75, 118, 120, 122, 123, 124, 125, 128, 129, 130, 133, 142, 158, 160B, 160C, 168, 169, 171, 176A, 182, 188, 194, 196, 202, 205A, 206, 213, 217B, 219, 222M, 224, 226SM, 229, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 246, 248, 254, 255, Z1, Z3, Z8, B19, 504, FS10, FS13, FS14, FS17, FS18, FS20, FS24, FS26, FS34, FS37, Ix1, Ix5, Ix6, Me1, Me2, Po5, Po6, Po8, Po9, Po10, Po14, Po15 |
| Negativa (13/21) | 134, 138M, 149, 197, 218A, 223A, 225, 228A, 234, 242, 251, Z2, Z6, FS2, FS16, FS19, FS21, FS29, FS30, FS31, FS35, FS36, Ix9, Ix13, Ix14, Ix15, Ix19, Ix21, Me3, Me6, Me8, Po2, Po4, Po16 |

La frecuencia de este carácter entre nuestros aislados es algo mayor a la que encontraron Davis y col. (1988) entre las suyas un 57 %. Sin embargo, Matthews y col. (2006) no detectaron esta actividad en ninguna de sus cepas. Las razones de esta disparidad de resultados puede deberse, además de a la variabilidad de este carácter entre cepas, a diferencias en los métodos de detección empleados; tanto en el trabajo de Davis y col. (1988) como en este se utiliza una mayor concentración de tributirina en el medio de ensayo que en el de Matthews y col. (2006), lo que posiblemente permitió detectar mejor esta actividad. El hecho de que la mayoría de los aislados con capacidad lipolítica procedan de vino, puede deberse a que este grupo está más adaptado al uso de lípidos (mono-, di- y triacilglicérols, entre otros), procedentes de la autólisis de las levaduras tras la FA y que podrían constituir fuente de carbono y energía para la bacteria.

La hidrólisis de lípidos provenientes también tiene importantes connotaciones sobre las características organolépticas de los vinos ya que daría lugar a la formación de una amplia gama de ácidos grasos (Matthews y col., 2006). Muchos de ellos tienen bajo umbrales de detección y mejoran el perfil aromático del vino (Blanco-Gomis y col., 2001), aunque también es cierto que algunos confieren notas desagradables definidas con los términos *vinegary*, *cheesy* y *sweaty* (Etievant 1991). Además de por su contribución propia al aroma del vino los ácidos grasos son precursores de otro importante grupo de compuestos aromáticos del vino, como ésteres, cetonas y aldehídos que confieren incluso mejores aromas que los propios ácidos grasos (Charpentier y Feuillat, 1993).

La actividad celulolítica se ensayó sobre carboximetilcelulosa. El 38 % de los aislados estudiados presentaban actividad celulolítica sobre este sustrato, de los cuales el 58 % procedían de vino y el resto de mosto (Tabla 15, Figura 9). Sin embargo, según la prueba del Chi cuadrado a un nivel de significación de 0.05, no existe una asociación estadísticamente significativa entre la presencia de la actividad celulolítica y los aislados procedentes de vino. La frecuencia de esta actividad en nuestros aislados es menor de la que se ha encontrado para las dos actividades anteriores. Similares resultados obtuvieron Matthews y col. (2006), quienes detectaron esta actividad en el 41 % de los cultivos malolácticos de *O. oeni* que ensayaron. En general, la presencia de polisacáridos como la celulosa o las pectinas pueden afectar negativamente el proceso de vinificación, ya que son responsables de la turbidez, viscosidad y taponan los filtros (Van Rensburg y Pretorius, 2000).

Tabla 15. Resultados obtenidos en la detección de la actividad celulolítica sobre carboximetilcelulosa de los 104 aislados de *O. oeni*. En rojo, aislados procedentes de mosto y en negro, aislados procedentes de vino

| Reacción | Aislados |
|---------------------|---|
| Positiva (23/17) | 118, 125, 133, 138M, 160B, 169, 182, 188, 194, 196, 206, 218A, 223A, 224, 226SM, 228A, 236, 239, 240, 246, 248, B19, 504, FS2, FS13, FS14, FS17, FS19, FS20, FS24, FS26, FS29, FS30, FS37, Me8, Po2, Po4, Po9, Po15, Po16 |
| Negativa (37/27) | 75, 120, 122, 123, 124, 128, 129, 130, 134, 142, 149, 158, 160C, 168, 171, 176A, 197, 202, 205A, 213, 217B, 219, 222M, 225, 229, 234, 235, 237, 238, 242, 251, 254, 255, Z1, Z2, Z3, Z6, Z8, FS10, FS16, FS18, FS21, FS31, FS34, FS35, FS36, Ix1, Ix5, Ix6, Ix9, Ix13, Ix14, Ix15, Ix19, Ix21, Me1, Me2, Me3, Me6, Po5, Po6, Po8, Po10, Po14 |

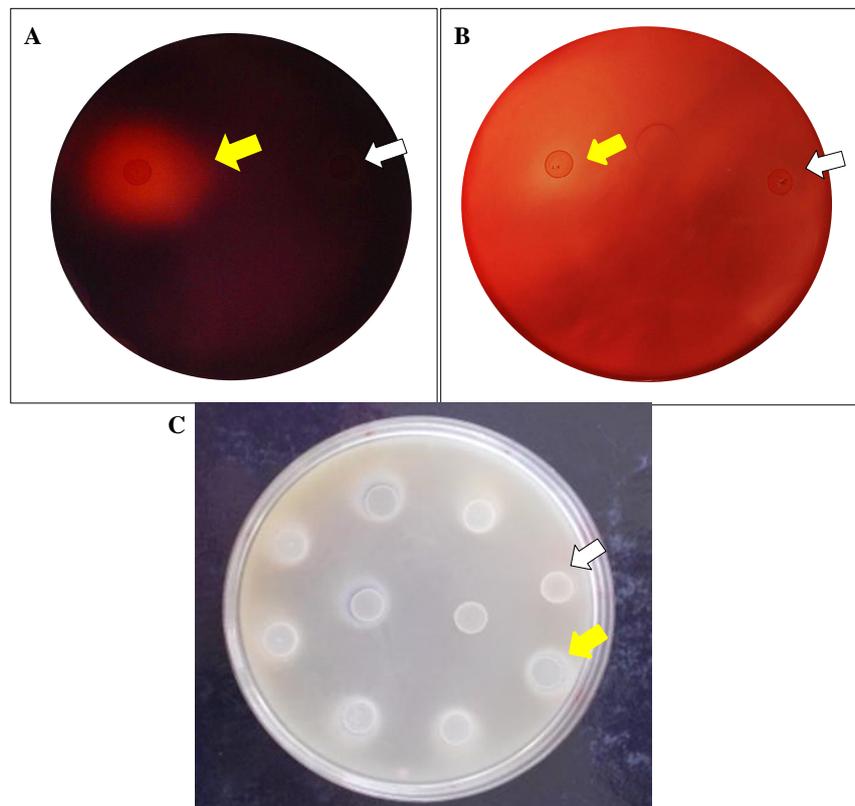


Figura 9. Actividades enzimáticas en aislados de *O. oeni*. A: actividad β -glucanasa; B: actividad celulolítica; C: actividad lipolítica. Las flechas de color amarillo indican la presencia de la actividad y las de color blanco la ausencia

La existencia de cepas de *O. oeni* que poseen enzimas capaces de utilizar estos polisacáridos es beneficiosa, ya que se disminuirían los problemas relacionados con polisacáridos, por ejemplo la clarificación o el taponamiento de filtros durante la filtración del vino (Matthews y col., 2004).

La presencia de actividad β -glicosidasa en los aislados que son objeto de este estudio se ensayó sobre dos tipos de sustratos: esculina y arbutina. La detección de esta actividad se realizó en primera instancia sobre un subconjunto de 58 aislados, para determinar el mejor método de los 3 y se utilizó para ello el medio basal MBFC propuesto por Garvie (1960 y 1967a) con las concentraciones de esculina y de citrato férrico (indicador) que utiliza el sistema miniaturizado API 50 CHL de Biomerieux (Método 1). Con este método sólo un 14 % dio un resultado positivo rápido (tras 7 días de incubación) (Tabla 16, Figura 10). El resto de aislados positivos, lo hicieron tras 15 días o 30 días (43 % y 34 %, respectivamente). Un 3 % de los aislados dio un resultado dudoso y un 5 % de los aislados dieron resultado negativo como se puede apreciar en la Tabla 16. La repetición del ensayo confirmó estos resultados.

Para dilucidar si la metodología usada era la responsable del gran número de respuestas lentas o dudosas se ensayaron otros porcentajes de esculina y de citrato férrico en el medio MBFC, que ya habían sido usados previamente por otros autores (Smibert y Krieger, 1981 y Carr, 1970). Cuando se comparan los resultados obtenidos con el Método 1 y el Método 2 (Tabla 16) se deduce que el 76 % de los aislados mostraron una respuesta más lenta o más dudosa en el segundo método que en el primero y tan sólo un 19 % mostró una respuesta más rápida o un cambio de respuesta de negativa a positiva frente a la esculina. Cuando se comparan los resultados obtenidos con el Método 1 y el Método 3 se observa que el 72 % de los aislados presentaban o bien una respuesta más rápida, media o un cambio de respuesta de negativo a positivo, mientras que sólo un 24 % muestra una respuesta más lenta. Parece que la menor concentración de esculina en el Método 2 respecto al Método 1 disminuye la sensibilidad para detectar actividades β -glicosidasas menos intensas o más lentas; por el contrario, las mayores concentraciones de esculina y de indicador del Método 3 permitieron detectar un mayor número de aislados con actividad β -glicosidasa y disminuir el número de aislados con resultados negativos, dudosos o lentos. Por ello, se optó por utilizar el Método 3 para evaluar la capacidad para hidrolizar la esculina de los 46 aislados restantes.

Tabla 16. Resultados obtenidos en la prueba de detección de actividad β -glucosidasa sobre la esculina en un subconjunto de 58 aislados utilizando para ello tres métodos diferentes (ver texto). R: hidrólisis rápida (a los 7 días de incubación); M: hidrólisis media (a los 15 días de incubación); L: hidrólisis lenta (tras 30 días de incubación); D: reacción dudosa, -: hidrólisis negativa. En rojo, aislados de mosto y en negro, aislados de vino

| Método | | | Aislados |
|--------|---|---|--|
| 1 | 2 | 3 | |
| R | M | R | 75, 118, 176A, 202 |
| M | L | M | 120, 129, 124, 133, 149, 171, 197, 219, 222M, 223A, 228A, 224, 225, 234, 235, 236, 238, 246, 248 |
| L | L | M | 122, 123, 130, 158, Z1, Z3, Z8 |
| L | L | L | 125, 128, 168, 206, 213, 229, |
| D | D | L | 134, 188 |
| R | L | M | 138 |
| L | D | L | 142, 182, 205A, 240 |
| M | M | M | 160B, 237, Z6 |
| L | M | R | 160C |
| R | L | L | 169 |
| L | D | M | 194 |
| R | R | R | 217B, 255 |
| M | D | M | 218A, 239 |
| M | - | L | 242 |
| L | M | M | 251 |
| - | L | M | 254 |
| - | - | - | 196, Z2 |

Este grupo de aislados presentó un comportamiento similar al primero analizado. En el conjunto de los 104 aislados se observa que el 95 % de ellos presentan actividad β -glucosidasa, aunque la intensidad de esta actividad variaba entre los mismos (Tabla 17). Así, el 35 % de los aislados hidrolizaron rápidamente la esculina (a los 7 días), un 41 % algo más lentamente (a los 15 días), y el 19 % restante lo hicieron lentamente (a los 30 días o más). Solamente el 5 % de los aislados fueron incapaces de hidrolizar la esculina al término del ensayo (Tabla 17). Cuando se analiza la presencia de esta actividad enzimática en aislados de mostos y vinos se observa que está igualmente repartida entre

ambos grupos de aislados Sin embargo, los aislados de mosto llevan a cabo la hidrólisis de la esculina más rápidamente que las de los aislados de vino (Tabla 17).

Tabla 17. Resultados obtenidos en la detección de la actividad β -glicosidasa sobre esculina en el conjunto de los 104 aislados, usando el Método 3. Las categorías Rápida, Media, Lenta y corresponden a las descritas en de Tabla 16 como (R), (M), (L) y (-). En rojo, aislados procedentes de mosto, y en negro, aislados procedentes de vino

| Hidrólisis | Aislados |
|------------|--|
| Rápida | 75, 118, 160C, 176A, 202, 217B, 255 Po2, Po4, Po5, Po6, Po9, Po10, Po15, Me1, Me2, Me3, Me6, Ix15, FS2, FS10, FS13, FS14, FS16, FS17, FS18, FS19, FS20, FS21, FS26, FS29, FS30, FS31, FS34, FS36, FS37 |
| Media | 120, 122, 123, 124, 129, 130, 133, 138, 149, 158, 160B, 171, 194, 197, 218A, 219, 222M, 223A, 226SM, 228A, 224, 225, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 246, 248, 251, 251, 504, B19, Z1, Z3, Z6, Z8, Po8, Po14, Po16, FS24, FS35 |
| Lenta | 125, 128, 134, 142, 168, 169, 182, 188, 205A, 206, 213, 229, 240, 242, Me8, Ix1, Ix5, Ix13, Ix14, Ix19 |
| Negativa | 196, Z2, Ix6, Ix9, Ix21 |

La detección de actividad β -glicosidasa sobre la arbutina mostró que el 91 % de los aislados hidrolizan este sustrato (Tabla 18, Figura 10), de ellos el 24 % lo hicieron rápidamente (tras 7 días de crecimiento), el 36 % lo hidrolizaron a velocidad moderada (a los 15 días de incubación) y el 32 % restante lo hicieron de forma lenta (tras 30 días de incubación). Nueve aislados fueron incapaces de hidrolizar la arbutina (Tabla 18).

El análisis conjunto de la actividad de los 104 aislados sobre estos dos sustratos demostró que todos ellos presentaban actividad β -glicosidasa pero que esta actividad dependía del sustrato sobre el que se ensayaba. Se observó que 14 aislados hidrolizaba únicamente uno de los dos sustratos, o esculina o arbutina. Los aislados que hidrolizan únicamente la esculina son 120, 122, 158, 213, 222M, 225, 228AA, 240 y 242. Los que utilizan la arbutina pero no la esculina son 196, Z2, Ix6, Ix9 e Ix21. Noventa aislados, es decir el 87 % del total, fueron capaces de hidrolizar ambos sustratos.

Tabla 18. Resultados obtenidos en la detección de la actividad β -glicosidasa sobre la arbutina de los 104 aislados. En rojo, aislados procedentes de mosto y en negro, aislados procedentes de vino

| Hidrólisis | Aislados |
|------------|---|
| Rápida | 118, 124, 125, 129, 133, 182, 218A, 219, 223A, 226SM, 229, 235, 236, 237, 238, 246, 248, 254, 255, Z3, Z8, Po2, Po8, Po15, Po16 |
| Media | 75 , 123, 128, 130, 142, 160C, 169, 171, 176A, 194, 202, 206, 217B, 504, Z2, Z6, B19, FS17, FS26, FS31, FS35, Ix1, Ix5, Ix6, Ix9, Ix13, Ix14, Ix15, Ix19, Ix21, Me1, Me2, Me3, Me6, Me8, Po4, Po6 |
| Lenta | 134, 138, 149, 160B, 168, 188, 196, 197, 205A, 224, 234, 239, 251, Z1, FS2, FS10, FS13, FS14, FS16, FS18, FS19, FS20, FS21, FS24, FS29, FS30, FS34, FS36, FS37, Po5, Po9, Po10, Po14 |
| Negativa | 120, 122, 158, 213, 222M, 225, 228A, 240, 242 |

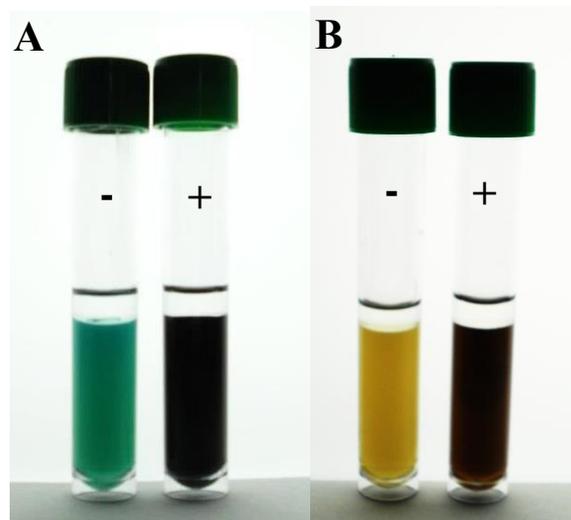


Figura 10. Actividad β -glicosidasa en cepas de *O. oeni*. A: Hidrólisis de la esculina; B: Hidrólisis de la arbutina; -: reacción negativa; +: reacción positiva

Hay una mayor proporción de aislados incapaces de hidrolizar arbutina que esculina. Hay 17 aislados que exhiben la misma velocidad de hidrólisis para ambos sustratos, pero la mayoría de ellos incumple esta relación, encontrándose que aislados que hidrolizan rápidamente la esculina, hidrolizan más lentamente la arbutina y viceversa. Grimaldi y colaboradores en sus trabajos publicados en 2000 y 2005 encontraron una frecuencia de la actividad β -glicosidasa entre sus aislados similar a la que nosotros hemos encontrado en el nuestro. Estos autores demostraron que esta actividad era cepa dependiente, aunque muy común entre las cepas comerciales de *O. oeni* que ellos analizaron. Mansfield y col. (2002) también detectaron enzimas β -glicosidasas en cepas de *O. oeni*. Estas cepas eran capaces de hidrolizar el sustrato artificial *p*-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside, pero incapaces de hidrolizar glicósidos naturales de las uvas. Sin embargo, D’Incecco y col. (2002) encontraron que algunas cepas de *O. oeni* sí actuaban frente a glicósidos extraídos de un mosto Moscatel. Otros autores, como McMahon y col. (1999) han descrito que cepas comerciales de *O. oeni* no eran siquiera capaces de hidrolizar arbutina, que es uno de los sustratos habituales para detectar la actividad β -glicosidasa. Las diferencias entre los resultados de McMahon y col. (1999) y los nuestros pueden deberse a diferencias en los métodos de detección utilizados, ya que ellos utilizaban tiempos de incubación más cortos que los que se han utilizado en este trabajo. Este hecho pudo impedir el que se detectasen reacciones positivas pero lentas. De hecho, muchos de nuestros aislados requerían de un periodo mínimo de siete días para dar una respuesta positiva.

El análisis de la actividad tanasa se llevó a cabo utilizando como sustrato el metil galato. Tan sólo 3 de los 104 aislados (129, 222M y FS31) fueron capaces de hidrolizar este sustrato, es decir el 3 %. Según lo descrito por otros autores la presencia de este tipo de actividad en cepas de *O. oeni* no debe de ser muy frecuente ya que ni Vaquero y col. (2004) ni Ruiz y col. (2010) fueron capaces de detectarlas en las cepas que ellos analizaron (42 y 84 cepas, respectivamente). Sin embargo, Matthews y col. (2006) encontraron que todas sus cepas de *O. oeni* (23 cepas) mostraban actividad tanasa. En este trabajo, también se pone en evidencia la presencia de actividad tanasa entre nuestros aislados aunque esta se presentó en baja frecuencia (3 %). El efecto de las tanasas, además, de la liberación de ácido gálico puede tener efectos benéficos como estimular el crecimiento y la FML en *O. oeni* (Vivas y col., 1997). A pesar de que el 50 % del color del vino tinto lo proporcionan los taninos, si estos se oxidan con el O₂ hasta

quinonas, éstas podrían dar lugar a una turbidez no deseable, que disminuye la apreciación del vino (Aguilar y Gutiérrez-Sánchez, 2001). Las tanasas se han utilizado junto con las enzimas lacasas para eliminar sustancias fenólicas del zumo de uva y mosto con el fin de estabilizar químicamente el vino.

La actividad esterasa se evaluó cuantitativamente sobre 3 tipos de sustratos: *p*-nitrofenil acetato, *p*-nitrofenil butirato y *p*-nitrofenil octanoato. El 60 % de los aislados analizados exhibieron actividad esterásica frente a alguno de los tres sustratos ensayados, aunque diferían entre ellos en el tipo de sustrato hidrolizado y en la efectividad de la hidrólisis. Así, 39 aislados (el 38 %) fueron capaces de liberar compuestos *p*-nitrofenil a partir de *p*-nitrofenil acetato con un rango de actividad de entre 0.19-12.24 (μ moles de *p*-nitrofenil liberado por minuto por mg de peso seco) (Tabla 19). Los que no presentaron actividad no se muestran en la tabla. El *p*-nitrofenil butirato fue hidrolizado por 50 aislados (el 48 %) con un rango de actividad entre 0.19-34.6 (μ moles de *p*-nitrofenil liberado por minuto por mg de peso seco). Por el contrario, el *p*-nitrofenil octanoato, fue el sustrato menos utilizado, tan sólo lo hidrolizaron un 34 aislados (un 33 %), con un rango de actividad de 0.14-12.13 (μ moles de *p*-nitrofenil liberado por minuto por mg de peso seco). El orden de preferencia por los sustratos en el conjunto de los aislados fue 1º: el *p*-nitrofenil butirato, 2º: el *p*-nitrofenil acetato y el 3º: el *p*-nitrofenil octanoato. La mayoría de los aislados que podían utilizar los 3 sustratos evidenciaron una mayor actividad sobre el *p*-nitrofenil butirato, que tiene 4 cadenas de carbono.

Respecto a la distribución de actividades esterásicas en aislados procedentes de distintas fases de la vinificación se ha observado que, a) respecto al sustrato *p*-nitrofenil acetato, 19 de los aislados que daban reacción positiva procedían de mostos y 20 de vinos; b) respecto al sustrato *p*-nitrofenil butirato, de los 50 aislados que lo hidrolizaban, 35 procedían de mosto y 15 de vino y c) respecto al sustrato *p*-nitrofenil octanoato, de los 34 aislados que lo utilizaban, 30 procedían de mosto y 4 de vinos. La especificidad de uso de los ésteres de 2 y 8 átomos de carbono (*p*-nitrofenil acetato y *p*-nitrofenil octanoato, respectivamente) fue similar en los aislados de mosto. La mitad de los aislados procedentes de mosto son capaces de actuar sobre los tres sustratos, mientras que sólo el 13 % de los de vino tienen esta capacidad. También se han detectado que las actividades más altas están presentes en los aislados de mosto.

Tabla 19. Actividades esterásicas en los 104 aislados *O. oeni* procedentes de mostos (nombres en rojo) y de vinos (nombres en negro)

| Aislado | Unidades de actividad esterasa ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{miligramo}$ de peso seco) | | |
|---------|---|----------------------------------|-----------------------------------|
| | <i>p</i> -nitrofenil acetato | <i>p</i> -nitrofenil butirato | <i>p</i> -nitrofenil octanoato |
| 120 | - | 5.63 | - |
| 122 | 2.11 | 1.68 | - |
| 125 | 0.68 | - | - |
| 149 | - | 2.07 | 1.32 |
| 182 | 0.86 | - | - |
| 188 | 0.19 | - | - |
| 205A | 1.13 | - | - |
| 206 | 1.34 | 0.19 | - |
| 218A | 1.08 | 9.26 | - |
| 219 | 0.36 | 2.88 | - |
| 222M | 0.82 | - | - |
| 223A | 1.81 | 5.48 | 0.66 |
| 225 | 1.59 | 5.41 | - |
| 226SM | 5.22 | 4.19 | 3.84 |
| 228A | 2.68 | 8.10 | - |
| 229 | - | 3.71 | - |
| 234 | 0.68 | - | - |
| 235 | 4.57 | 18.25 | 4.66 |
| 239 | - | 11.54 | - |
| 251 | 1.68 | - | - |
| Z2 | 5.80 | 7.88 | - |
| Z6 | 1.41 | - | - |
| Z8 | 2.05 | - | - |
| B19 | 7.56 | 8.82 | - |
| 75 | 0.81 | - | - |
| FS2 | - | 2.16 | 0.87 |
| FS10 | 0.75 | 11.94 | 2.75 |
| FS13 | 3.49 | 17.14 | 1.02 |
| FS14 | - | 5.57 | 12.13 |
| FS16 | - | 2.09 | 0.43 |
| FS17 | 0.91 | 2.21 | 4.47 |
| FS18 | 9.71 | 34.60 | 2.53 |
| FS19 | 12.24 | 5.44 | 1.20 |
| FS20 | - | 4.37 | - |
| FS24 | 0.44 | 1.45 | 0.14 |
| FS29 | - | 7.82 | 0.86 |
| FS30 | 0.82 | 3.23 | 1.84 |
| FS31 | 6.95 | 10.19 | 1.13 |
| FS34 | - | 3.61 | 1.43 |
| FS35 | - | 4.23 | 0.93 |
| FS36 | 1.26 | 4.33 | 0.56 |
| FS37 | - | 14.43 | 4.80 |
| Ix1 | 1.63 | 2.95 | 0.80 |
| Ix5 | 3.08 | 4.34 | 2.43 |
| Ix6 | - | 0.21 | - |
| Ix9 | 3.88 | 2.17 | - |

| | | | |
|-------------|------|-------|-------|
| Ix13 | 1.81 | 3.82 | 1.75 |
| Ix14 | 9.22 | 9.08 | 5.03 |
| Ix15 | 4.47 | 6.59 | 2.53 |
| Ix19 | - | 3.39 | 0.75 |
| Ix21 | - | 6.73 | - |
| Me1 | - | 1.16 | 3.01 |
| Me2 | - | 8.46 | 4.36 |
| Me3 | - | 1.06 | 2.15 |
| Me6 | - | - | 0.72 |
| Me8 | 2.30 | 3.18 | 3.08 |
| Po2 | - | 1.21 | 10.82 |
| Po4 | - | 21.25 | 0.76 |
| Po5 | - | 1.99 | - |
| Po6 | 5.46 | 24.38 | 0.96 |
| Po8 | - | 11.15 | - |
| Po14 | 0.55 | - | - |

Los valores están expresados en $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{miligramo}$ de peso seco y representan la media de los duplicados. -: ausencia de la actividad. En rojo se muestran los aislados de mosto y en negro los de vino

El 83 % de los aislados de vino presentan actividad frente al *p*-nitrofenil acetato, el 63 % la presentan frente al *p*-nitrofenil butirato y sólo el 17 % frente al *p*-nitrofenil octanoato. El 50 % de los aislados de mosto presentan actividad frente al *p*-nitrofenil acetato, mientras que la práctica totalidad de los mismos (el 92 %) lo hace frente al *p*-nitrofenil butirato y un 82 % sobre el *p*-nitrofenil octanoato. Parece por tanto, que los aislados de mosto hidrolizan preferentemente los sustratos de 4 y 8 átomos de carbonos, mientras que los de vino prefieren los de 2 y 4 átomos. Los valores más altos de actividad enzimática los presentan los aislados FS18, Po4 y Po6 procedentes de mosto y las exhiben sobre *p*-nitrofenil butirato. También proceden de mosto los aislados que dan actividades hidrolíticas más altas sobre los otros dos sustratos.

El análisis estadístico ANOVA y la prueba *a posteriori* TukeyB, con un nivel de significación de 0.05, demostró que los aislados que significativamente presentan actividad frente el *p*-nitrofenil acetato son los aislados: FS19, FS18 e Ix14, frente al *p*-nitrofenil butirato son los aislados FS18, Po6, Po4, 235, FS13 y FS37 y frente al *p*-nitrofenil octanoato son los aislados FS14 y Po2.

Davis y col. (1988) han estudiado la actividad esterásica en *O. oeni* encontrando que el 65 % de sus cepas presentaban esta actividad. Un porcentaje similar de aislados con actividad esterasa se encontró entre los aislados estudiados en este trabajo. Los trabajos de Matthews y col. (2006), evidenciaron que los cultivos comerciales analizados por

ellos, mostraban la más alta actividad sobre el *p*-nitrofenil acetato (0.040 y 0.050 unidades de actividad), algo menor sobre el *p*-nitrofenil octanoato (0.036 unidades de actividad), y la menor de todas sobre el *p*-nitrofenil butirato (0.031 unidades de actividad). Un año más tarde, Matthews y col. (2007) observaron que 3 de las cepas altamente productoras de esterases de un estudio previo, mostraban las actividades más altas sobre los sustratos de 8 átomos de carbono o menos, siendo el butirato el sustrato sobre el que exhibían la mayor actividad y sobre los sustratos de 14 y 18 átomos de carbono mostraban las más bajas actividades. Una tendencia similar observaron Zapparoli y col. (2012) al analizar 13 cepas de *O. oeni* procedentes de vinos Amarone. Sin embargo, Pérez-Martín y col. (2013) encontraron que sólo 1 de las 6 cepas de *O. oeni* que ensayaron utilizaban sustratos de cadena corta, mientras todas mostraron alta actividad sobre el *p*-nitrofenil octanoato (entre 24.34-2412.20 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{miligramo}$ de peso seco). Estos autores, dedujeron que esas diferencias se deben a que hay más de un tipo de enzima en estas cepas y que la actividad de estas enzimas depende de la cepa y sustrato ensayado. Los ésteres (acetato de etilo, acetato isoamílico, hexanoato de etilo, octanoato de etilo y decanoato de etilo) son cualitativamente un grupo de aromas más importantes del vino por su bajo umbral de detección y porque contribuyen a incrementar los aromas afrutados (Fugelsang y Edwards, 2007). El perfil aromático de un vino, no sólo implica la presencia de ésteres sino que también depende de los compuestos liberados por las esterases, tales como los ácidos grasos y alcoholes superiores (Sumbly y col., 2010). Recientemente, Sumbly y col. (2013) demostraron que las enzimas purificadas de *O. oeni* identificadas como esterasa EstA2 y EstB28 catalizan a la vez la síntesis e hidrólisis de ésteres de cadena corta ($\leq C8$). La producción y la hidrólisis de los ésteres dependían del tipo de vino y de la cepa se utilice en los ensayos. De este modo la presencia de estas enzimas conferían mejores aromas a los vinos (Sumbly y col., 2013). Aunque esta actividad no proporcionaría un beneficio en vinos con bajas concentraciones de ésteres, pero podría suponer un papel importante en la mejora de la calidad de vinos con concentraciones superiores a 200 mg/L de los mismos (Matthews y col., 2007).

Los 104 aislados ensayos se agruparon en 16 perfiles que agrupaban las diferentes actividades enzimáticas (Tabla 20). Los perfiles 2 y 5 mostraron el mayor número de actividades enzimáticas: 5. Los perfiles 1, 4, 9 y 13 presentaron 4 actividades. Los perfiles 3, 6, 7, 8, 11, 12 y 14 comprenden 3 actividades.

Tabla 20. Perfiles de actividades enzimáticas cualitativas en aislados de *O. oeni*

| Perfil | Actividades enzimáticas | | | | | | Aislado |
|--------|-------------------------|--------|----------|----------------------|--------|----------|---|
| | β -glucanasa | Lipasa | Celulasa | β -glicosidasa | Tanasa | Esterasa | |
| 1 | + | + | + | + | - | - | 118, 133, 160B, 169, 194, 196, 224, 236, 240, 246, 248, 504, FS26, Po9, Po15 |
| 2 | + | + | + | + | - | + | 125, 182, 188, 206, 226SM, 239, B19, FS14, FS17, FS20 |
| 3 | + | + | - | + | - | - | 128, 130, 217B, 237, 254, 255, Z3 |
| 4 | + | + | - | + | - | + | 120, 122, 205A, 219, Z8, Me2 |
| 5 | + | + | - | + | + | + | 222M |
| 6 | + | - | - | + | - | + | 234, 251, Z6, FS35, FS36 |
| 7 | + | - | - | + | + | - | FS31 |
| 8 | + | - | + | + | - | - | 138M, Po16 |
| 9 | + | - | + | + | - | + | 218A, 228A, Me8, Po2, Po4 |
| 10 | - | + | - | + | - | - | 123, 124, 142, 158, 160C, 168, 171, 176A, 202, 213, 238, Z1, Po10 |
| 11 | - | + | - | + | - | + | 229, 235, 75, FS10, FS18, FS34, Ix1, Ix5, Ix6, Me1, Po5, Po6, Po8, Po14 |
| 12 | - | + | - | + | + | - | 129 |
| 13 | - | + | + | + | - | + | FS13, FS24, FS37 |
| 14 | - | - | + | + | - | + | 223A, FS2, FS19, FS29, FS30 |
| 15 | - | - | - | + | - | - | 134, 197, 242 |
| 16 | - | - | - | + | - | + | 149, 225, Z2, FS16, FS21, Ix9, Ix13, Ix14, Ix15, Ix19, Ix21, Me3, Me6 |

+: Presencia de la actividad; -: ausencia de la actividad; en rojo se muestran los aislados de mosto; en negro se muestran los aislados de vino

Los perfiles 10 y 16 exhiben 2 actividades. El único perfil que presenta una única actividad es el 15 y lo presentan los aislados 134, 197, 242. Todos los aislados presentaron la actividad β -glicosidasa. Las actividades más frecuentes fueron las actividades lipasa, la esterasa, la β -glucanasa, y la celulasa, que estaban presentes en un 67, 60, 50 y 38 % de los aislados, respectivamente (Tablas 13, 14, 15 y 19). La actividad tanasa fue a menos frecuente (3 %).

4.3 Caracterización tecnológica

En la caracterización de los aislados a nivel tecnológico, se estudió la influencia de algunos factores fisicoquímicos relacionados con el vino o la vinificación (etanol, pH y SO_2). Para ello se evaluó el crecimiento de los aislados en vino natural y en vino sintético ajustado a diferentes condiciones enológicas.

4.3.1 Crecimiento en vino tinto

En la Figura 11 se muestran los valores de ABC de los aislados de *O. oeni* crecidos en vino tinto, cuyas características se han descrito en el apartado 3.7.1. Los aislados de mosto mostraron crecimientos que comprendían desde 4.6×10^6 a 3.9×10^9 UA, mientras que los de vino desde 4.1×10^6 a 8.85×10^9 . Aunque los rangos de ABC son parecidos entre los grupos hay un mayor número de aislados de vino que dan ABC elevadas, de hecho el 42 % de los aislados de vino superan o igualan el valor de ABC de 10^9 UA, mientras que sólo el 11 % de las de mosto lo hacen. En general se ha observado que los aislados de mosto crecen peor cuando se inoculan en vinos tintos, es decir crecen peor.

El aislado 219 mostró el valor más alto de ABC, seguido por los aislados 239, 237, Z1, 235, FS20, 242, 504, 234, 118, Po14, FS21, 213, 158, 171, 205A, Z2, 128, 130, Z3, FS18, 122, 142, Po4 y 229 (en orden decreciente). Cinco de ellos se aislaron de mosto y 20 de vino. Los aislados que peor soportaron las condiciones del vino tinto fueron FS13, FS14 y 202, que apenas crecieron, aunque tampoco murieron (Figura 11). De estos tres aislados, los 2 primeros proceden de mostos y el tercero de vino.

El aplicación del análisis estadístico ANOVA y de la prueba *a posteriori* TukeyB, con un nivel de significación de 0.05, demostró que los aislados que difieren significativamente del resto son 219, 239 y 237 (ordenados en forma decreciente) que crecen mucho mejor y los aislados 202, FS13, FS14 que crecen mucho peor.



Figura 11. Valores de crecimiento de los aislados de *O. oeni* en vino tinto natural expresado como ABC. En rojo se indica los aislados de mosto y en negro los de vino. La línea azul indica un umbral arbitrario establecido para discriminar altos crecimientos y representa la media de los valores de ABC de los aislados de mosto que es 3.4×10^8 UA. Para una mejor comprensión de los datos se han expresado los valores de ABC en escala logarítmica

4.3.2 Crecimiento en vino sintético a diferentes condiciones enológicas

La mayoría de los aislados analizados fueron capaces de crecer en todas las concentraciones de etanol ensayadas (Figuras 12-15) aunque el valor de las ABC disminuía conforme aumentaba la concentración de etanol (Figura 16).

Se aprecian diferencias importantes entre los aislados en su capacidad para crecer en etanol, incluso a la más baja concentración ensayada (10 %). Los aislados que presentan mayores valores de ABC en la condición más favorable (10 % de etanol) son 219, 223A, 226SM, 225, 218A, 504, 133, 239, 229, Z3, 205A, 222M, 75, 182, 149 y 237 (en orden decreciente) y los que tienen menores valores de ABC son la 123, 217B, FS18 y Po6 (Figura 12). Los aislados de mosto presentaban valores de ABC que van desde 0.962 a 3.563 UA, mientras que los de vinos van desde 0.939 a 6.131 UA.

A 12 % de etanol los valores de ABC que presentan los aislados de mosto van de 0.827 a 2.670 UA y los de vino de 0.699 a 4.365 UA. Cincuenta y uno de los 60 aislados de vino presentan valores de ABC iguales o superiores al valor medio de ABC de los aislados de mosto, lo que significa que los primeros crecen mejor que los segundos a esta concentración de etanol. Los aislados que presentan valores de ABC más altos son los mismos que a 10 % y con la excepción de 133, 239, Z3, 222M, 75, 182, 149 y 237. Los que presentaron menores valores de ABC también son los mismos que a 10 % y además los aislados 75, 196, 251, 254, 255, B19, Z8 y la mayor parte de los aislados de mosto (Figura 13).

A 14 % de etanol los valores de ABC de los aislados de mosto varían entre 0.554 a 1.098 UA, mientras que los de vino entre 0.632 y 2.265 UA. En este caso el 78 % de los aislados de vino superan el valor medio de ABC presentado por los aislados de mosto. Los aislados que presentaron mayores valores de ABC fueron los mismos que a 10 y a 12 (Figura 14). Aunque al 15 % de etanol el crecimiento de la mayor parte de los aislados es mínimo, inferior a 1.6 UA, los que mayores valores de ABC exhiben son 219, 223A, 218A, 229, 225, 239, 504, Z3 y 122 (en orden decreciente), es decir, algunas que presentaban valores más altos a 14 %, todas ellas provienen de vino. Los aislados que muestran valores más bajos de ABC son FS20, FS21 y FS24 y provienen de mosto.

A 15 % de etanol los valores de ABC que presentan los aislados de mosto varían entre 0.498 a 1.026 UA, mientras que los de vino entre 0.573 a 1.494 UA.

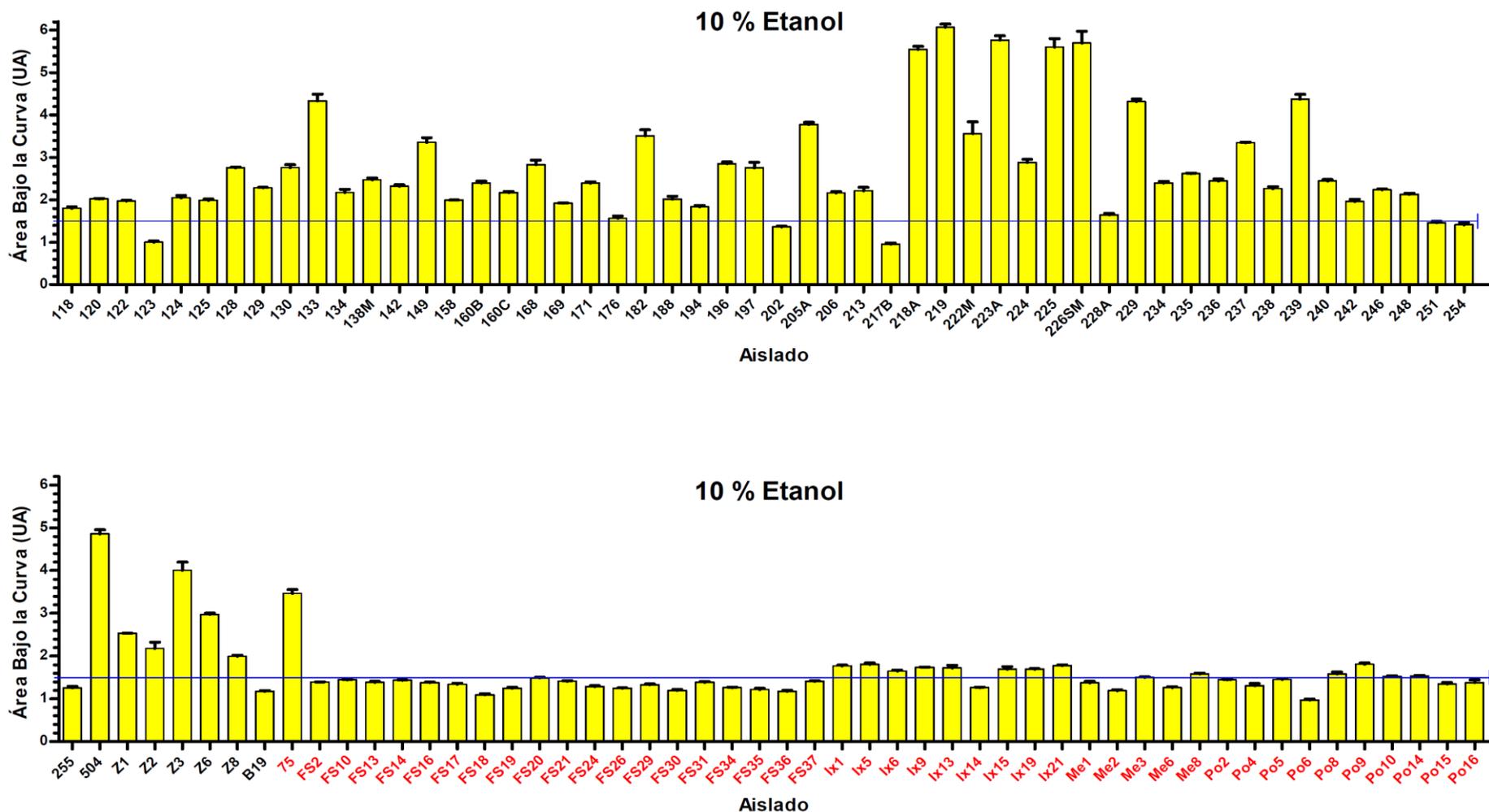


Figura 12. Valores de crecimiento de los aislados de *O. oeni* en vino sintético a una concentración de etanol del 10 %, expresado como ABC. En rojo se indica los aislados de mosto y en negro los de vino. La línea azul indica un umbral arbitrario establecido para discriminar altos crecimientos. Representa la media de los valores de ABC de los aislados de mosto que es 1.470 UA.

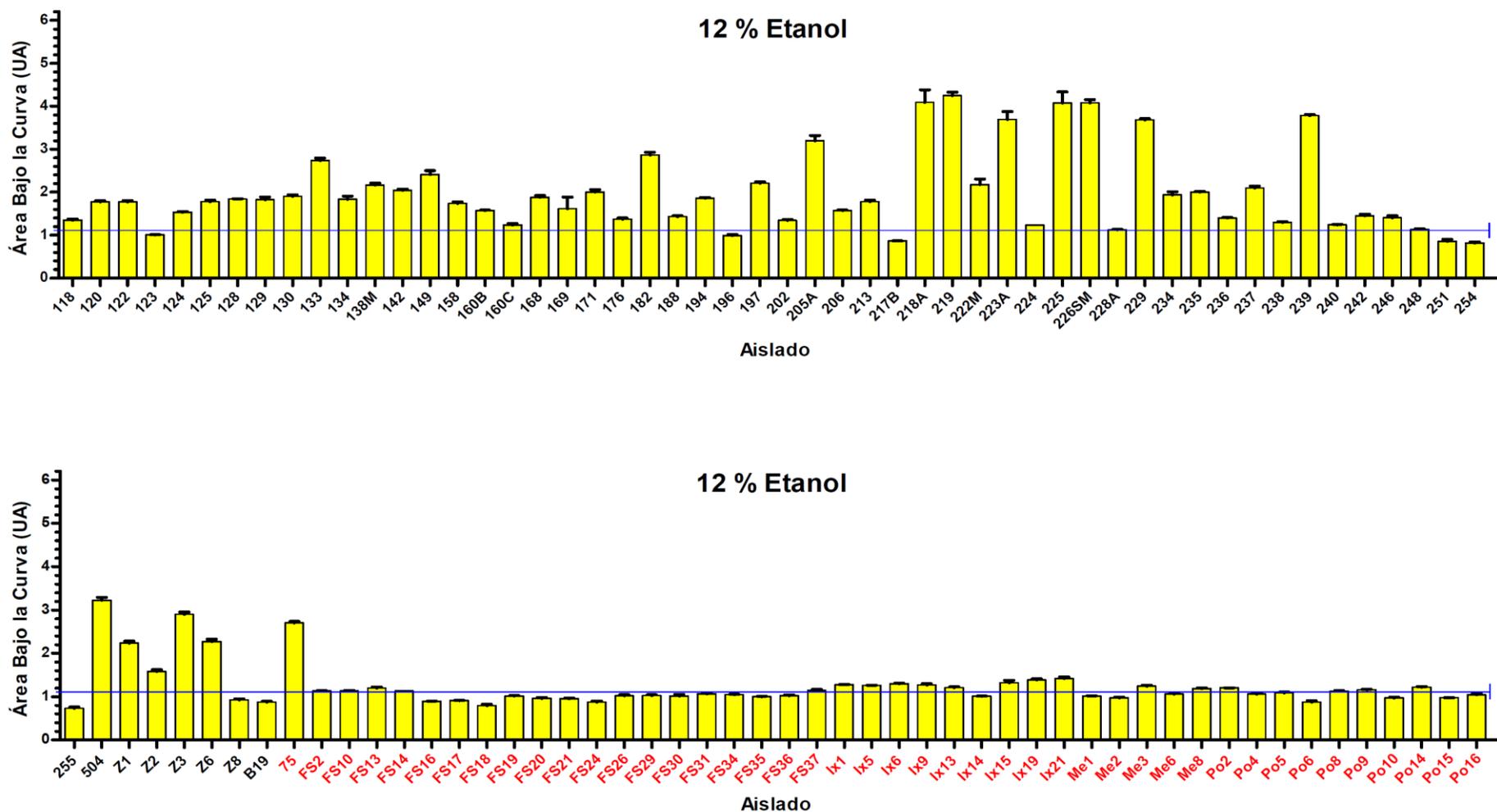


Figura 13. Valores de crecimiento de los aislados de *O. oeni* en vino sintético a una concentración de etanol del 12 %, expresado como ABC. En rojo se indica los aislados de mosto y en negro los de vino. La línea azul indica un umbral arbitrario establecido para discriminar altos crecimientos. Representa la media de los valores de ABC de los aislados de mosto que es 1.121 UA.

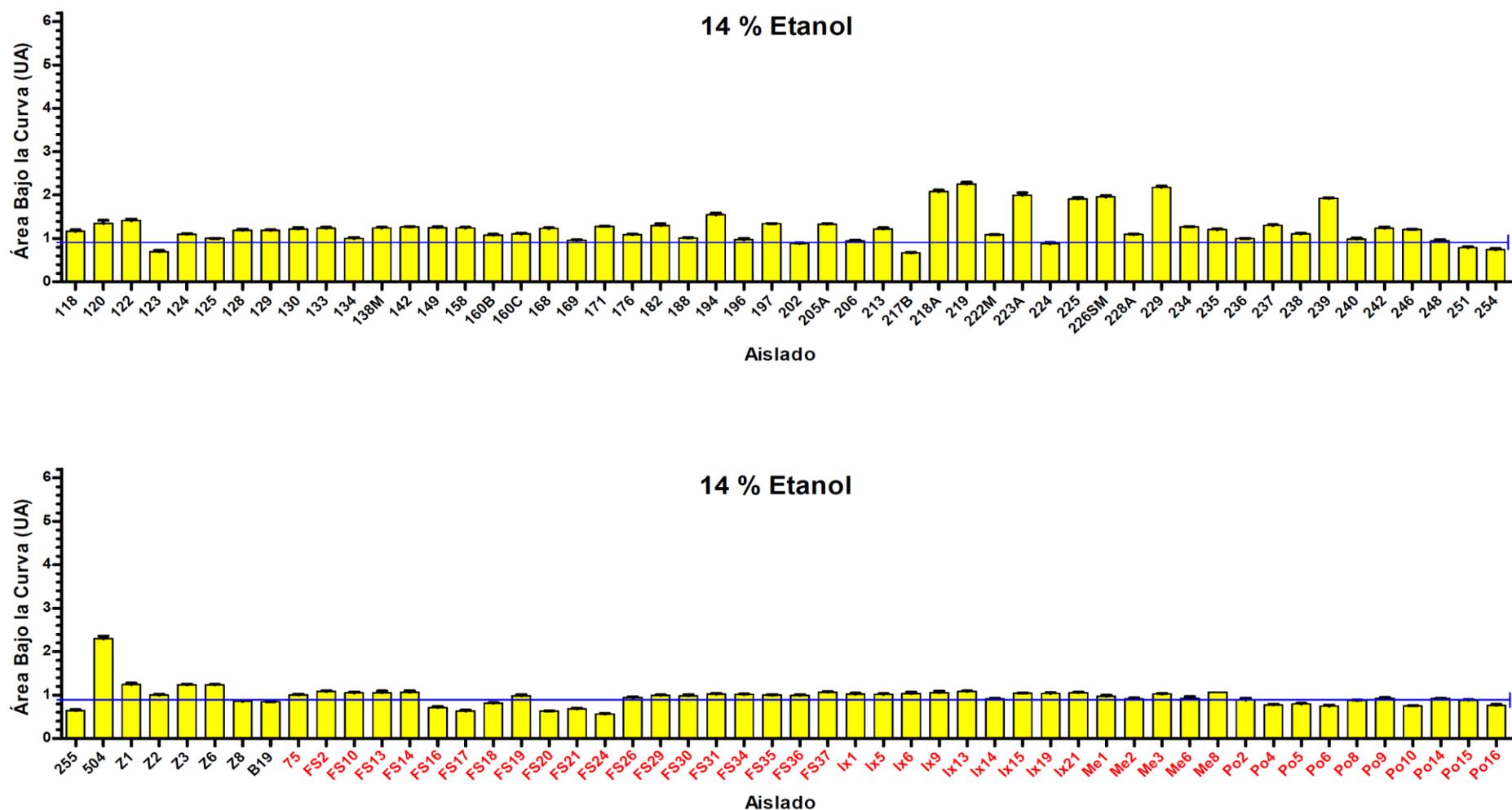


Figura 14. Valores de crecimiento de los aislados de *O. oeni* en vino sintético a una concentración de etanol del 14 %, expresado como ABC. En rojo se indica los aislados de mosto y en negro los de vino. La línea azul indica un umbral arbitrario establecido para discriminar altos crecimientos. Representa la media de los valores de ABC de los aislados de mosto que es 0.924 UA.

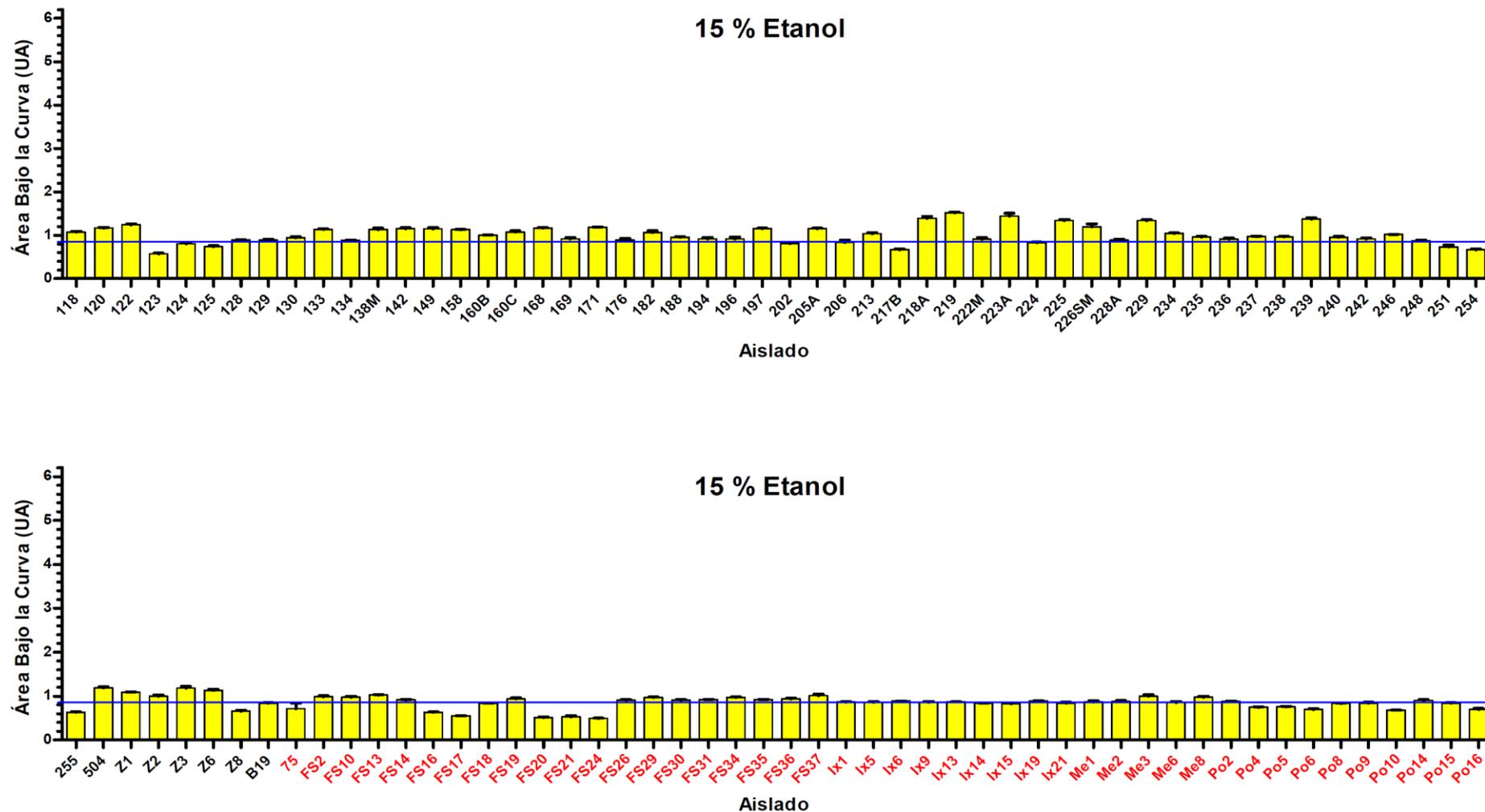


Figura 15. Valores de crecimiento de los aislados de *O. oeni* en vino sintético a una concentración de etanol del 15 %, expresado como ABC. En rojo se indica los aislados de mosto y en negro los de vino. La línea azul indica un umbral arbitrario establecido para discriminar altos crecimientos. Representa la media de los valores de ABC de los aislados de mosto que es 0.834 UA.

A partir de los datos correspondientes a cada concentración de etanol se puede deducir que los crecimientos de los aislados procedentes de mosto son inferiores a los de vino. Esto es particularmente evidente a concentraciones de etanol de 12 y 14 % (Figura 13-14). Considerando todas las concentraciones de etanol, los aislados que presentan los más altos valores de ABC son 219, 218A, 226SM, 225, 223A, 504, 229 y 239 (en orden decreciente) (Figura 17). Ningún aislado de mosto supera un valor de ABC de 1.463 UA, que es la media mientras que el 60 % de los de vino superan este valor.

En cuanto a la condición etanol, se observó que las medias y varianzas de los valores de ABC correspondientes a las diferentes concentraciones de etanol ensayadas difieren significativamente (Figura 16). Esto demuestra que la condición etanol influye de forma inequívoca sobre el crecimiento, ya que a medida que éste aumenta el crecimiento de los aislados disminuye. La disminución del ABC depende de la concentración ensayada, como se puede apreciar en la Figura 16. También, se observó que el valor de la varianza se reduce conforme aumenta la concentración de etanol (Figura 16), es decir que se discrimina peor el comportamiento de los aislados a altas concentraciones de etanol.

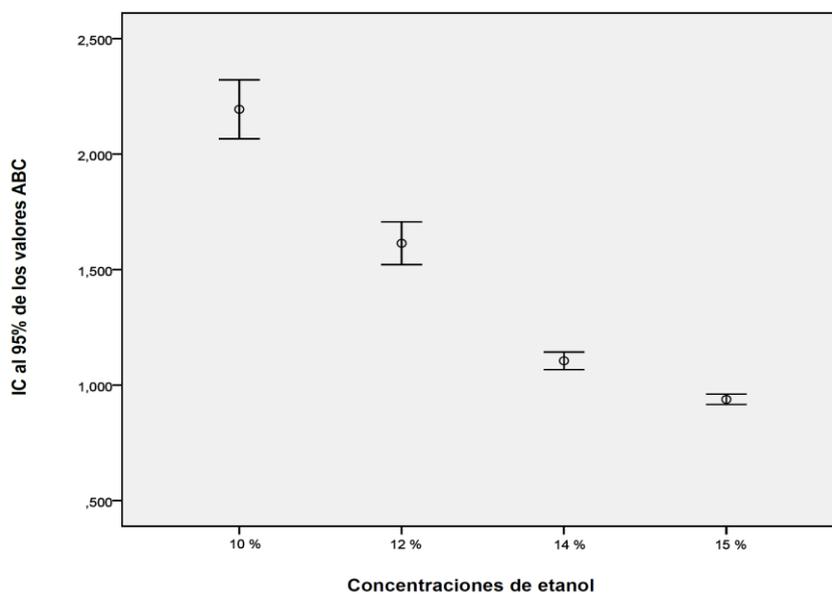


Figura 16. Representación de las medias con sus intervalos de confianza de los valores ABC del crecimiento de *Oenococcus oeni* a diferentes concentraciones de etanol ensayadas

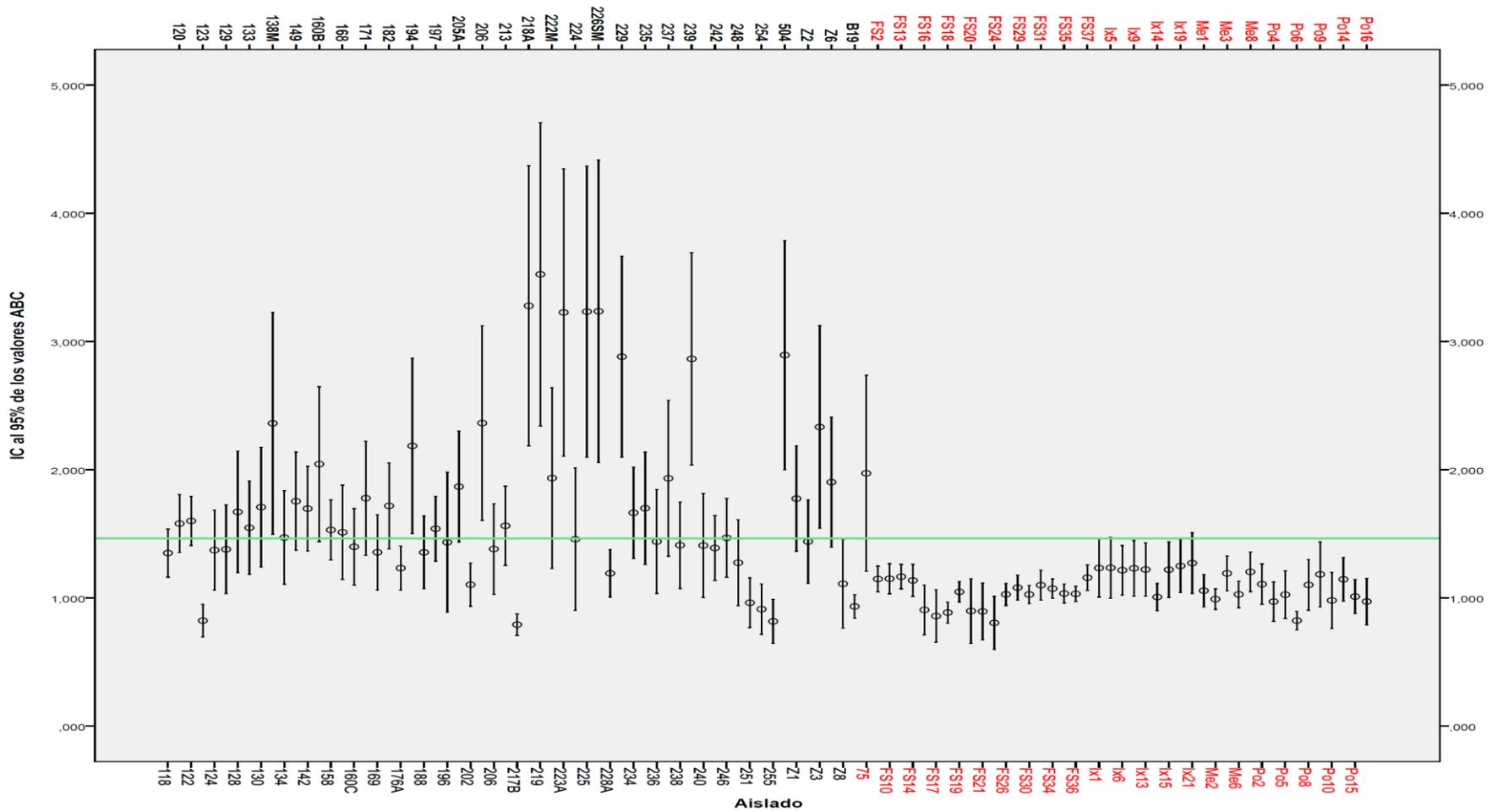


Figura 17. Representación de las medias e intervalos de confianza de las ABC globales de cada aislado de *Oenococcus oeni* en vino sintético con diferentes concentraciones de etanol. Las medias e intervalos se han obtenido a partir de todos los valores de ABC mostradas por cada aislado a las diferentes concentraciones de etanol ensayadas (10-15 %). La línea verde indica la media global de los ABC de todos los aislados y tiene un valor de 1.463 UA

El análisis estadístico ANOVA y la prueba *a posteriori* TukeyB, con un nivel de significación de 0.05, demostró que los aislados que tienen mayores valores de ABC globales (considerando todos los valores de ABC obtenidos en todas las concentraciones de etanol) son los aislados: 219, 218A, 226SM, 225, 223A, 504, 229 y 239 (por orden decreciente) y las que tienen menor valor son: 217B, FS24 y 255. De la Figura 17 se deduce que los aislados procedentes de mosto presentan menores valores de ABC que las de vino en presencia de etanol, es decir crecen peor.

O. oeni es la bacteria láctica mejor adaptada al medio vínico, sin embargo, la capacidad para crecer y resistir las condiciones del vino es altamente variable entre las cepas, como se ha demostrado en el presente trabajo y en otros anteriores (López y col., 2008). López y col. (2008) comprobaron que algunas cepas de *O. oeni* que ellos ensayaron exhibían una alta capacidad para crecer en vino y resistir al etanol en un vino sintético. En este trabajo también se ha comprobado que 3 de los aislados que mejor crecen en vino tinto eran los más resistentes al etanol (219, 229 y 504).

Con respecto al comportamiento de los aislados en relación al pH, se observa que existen diferencias entre ellas en sus valores del ABC para cada valor ensayado (Figuras 18-22) y también que estos valores disminuyen a medida que disminuye el valor del pH del vino sintético (Figura 23). Los aislados que presentan mayor valor de ABC al pH más favorable (pH 4.0) son 226SM, 75, 218A, 219, 225, 239, 223A, 229, 237, 222M, 504, 235, 133, 205A, 128, 130, 182, Z3, 224, 236, 242, 149, 124, 123, 240, 118 y 129 (ordenados en forma decreciente) y la que peor la Po6 (Figura 18). Los aislados de mosto presentaban ABC que van desde 1.221 a 5.916 UA, mientras que los de vinos van desde 1.524 a 6.095 UA.

A pH 3.7 los aislados de mosto presentaban ABC que van desde 0.962 a 3.563 UA, mientras que los de vinos van desde 0.939 a 6.131 UA. Los aislados que mostraron un mayor valor de ABC son 219, 223A, 226SM, 225, 218A, 504, 239, 133, 229, Z3, 239, 205A, 222M, 182, 75, 149 y 237, es decir 16 de los 27 con mayor valor de ABC a pH 4.0 y las que mostraron menor ABC en este valor de pH son Po6 y 217B (Figura 19).

A un pH intermedio (pH 3.5) los aislados de mosto presentaban ABC que van desde 0.852 a 1.982 UA, mientras que los de vinos van desde 0.729 a 4.101 UA. Los aislados que exhiben mayores valores de ABC son los mismos que a pH 3.7, con excepción de la 223A, 239, 229, 205A, 222M, 75, 149 y 237; a los valores de ABC más bajos son 123, 217B, Po6, Po10 (Figura 20).

De los 8 aislados que mostraron mayores valores de ABC a pH 3.7 y 3.5, sólo 504, 182, Z3 y 133, fueron los que mayores valores de ABC mostraron a pH 3.2, a este grupo se suman los aislados 205A, 197, Z6, 138M, Z1, 171, 213 y 142. Los que presentan menores valores de ABC en este valor de pH son los mismos que a pH 3.5 y además los aislados 75, 124, 129, 235, 237, 242, FS16, FS17, FS20, FS24 y Po5 (Figura 21). A pH 3.2 los aislados de mosto presentaban ABC que van desde 0.797 a 1.398 UA, mientras que los de vinos van desde 0.645 a 3.314 UA.

Al valor de pH más bajo (pH 2.9) los aislados que muestran mayores valores de ABC son 504, Z3 y 168 149, mientras que los que muestran valores más bajos son 123, 124, 128, 129, 217B, 235, 237, 240, 242, 248, 250, 251, Z8 y todos los procedentes de mosto (Figura 22). Los aislados de mosto presentaban ABC que van desde 0.639 a 1.004 UA, mientras que los de vinos van desde 0.519 a 1.308 UA.

Entre los aislados que crecen mejor a pH bajos encontramos dos (504 y Z3) que ya presentaban valores de ABC altos a pH 4.0, pero también otros 2 de los que presentaban bajos valores de ABC. Se observó que existían diferencias significativas entre las medias y las varianzas de las ABC del conjunto de los 104 aislados a cada uno de los valores de pH ensayados. Esto, demuestra que la condición pH influye sobre el crecimiento, y que a medida que éste aumenta el crecimiento de los aislados también se incrementa. Este incremento y depende del valor de pH ensayado, como se puede apreciar en las Figuras 23 y 24.

También se observó que la varianza entre los valores de ABC a los diferentes pH era mayor cuanto más alto era el valor de este último. Además, que el valor de la varianza se reduce conforme disminuye el valor del pH, es decir que a pH 2.9 no se puede discriminar bien el comportamiento de los aislados.

El análisis estadístico ANOVA y la prueba *a posteriori* TukeyB, a un nivel de significación de 0.05, demostró que los aislados que tienen mayores valores de ABC globales (considerando todos los pHs ensayados) son 504, 219, 226SM, 225, 218A, 223A y 133 (en orden decreciente) y los que tienen menores valores son los aislados: Po6, 217B, FS24, FS18 y FS17 (en orden creciente).

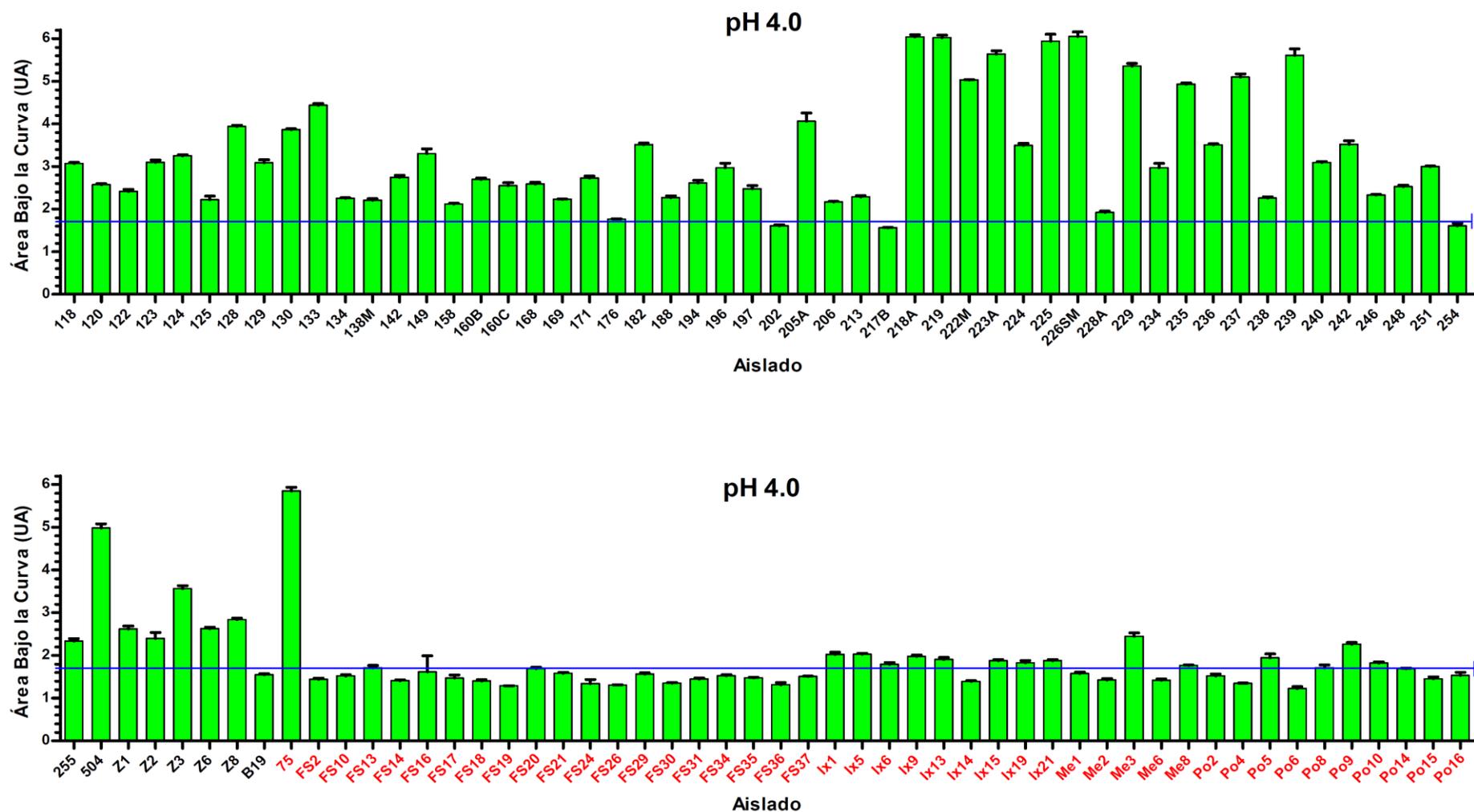


Figura 18. Valores de crecimiento de los aislados de *O. oeni* en vino sintético a pH 4.0, expresado como ABC. En rojo se indica los aislados de mosto y en negro los de vino. La línea azul indica un umbral arbitrario establecido para discriminar altos crecimientos. Representa la media de los valores de ABC de los aislados de mosto que es 1.730 UA.

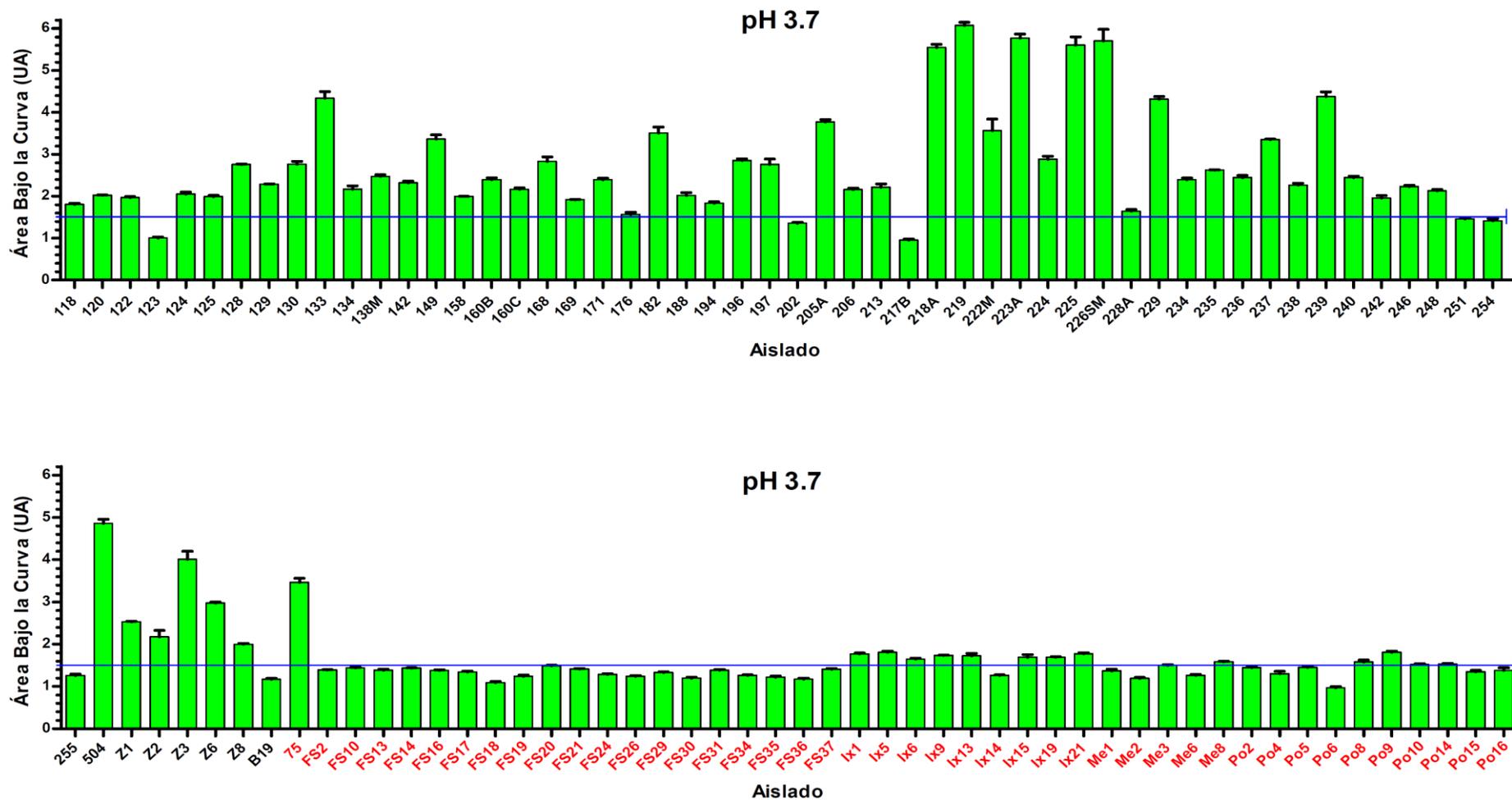


Figura 19. Valores de crecimiento de los aislados de *O. oeni* en vino sintético a pH 3.7, expresado como ABC. En rojo se indica los aislados de mosto y en negro los de vino. La línea azul indica un umbral arbitrario establecido para discriminar altos crecimientos. Representa la media de los valores de ABC de los aislados de mosto que es 1.474 UA.

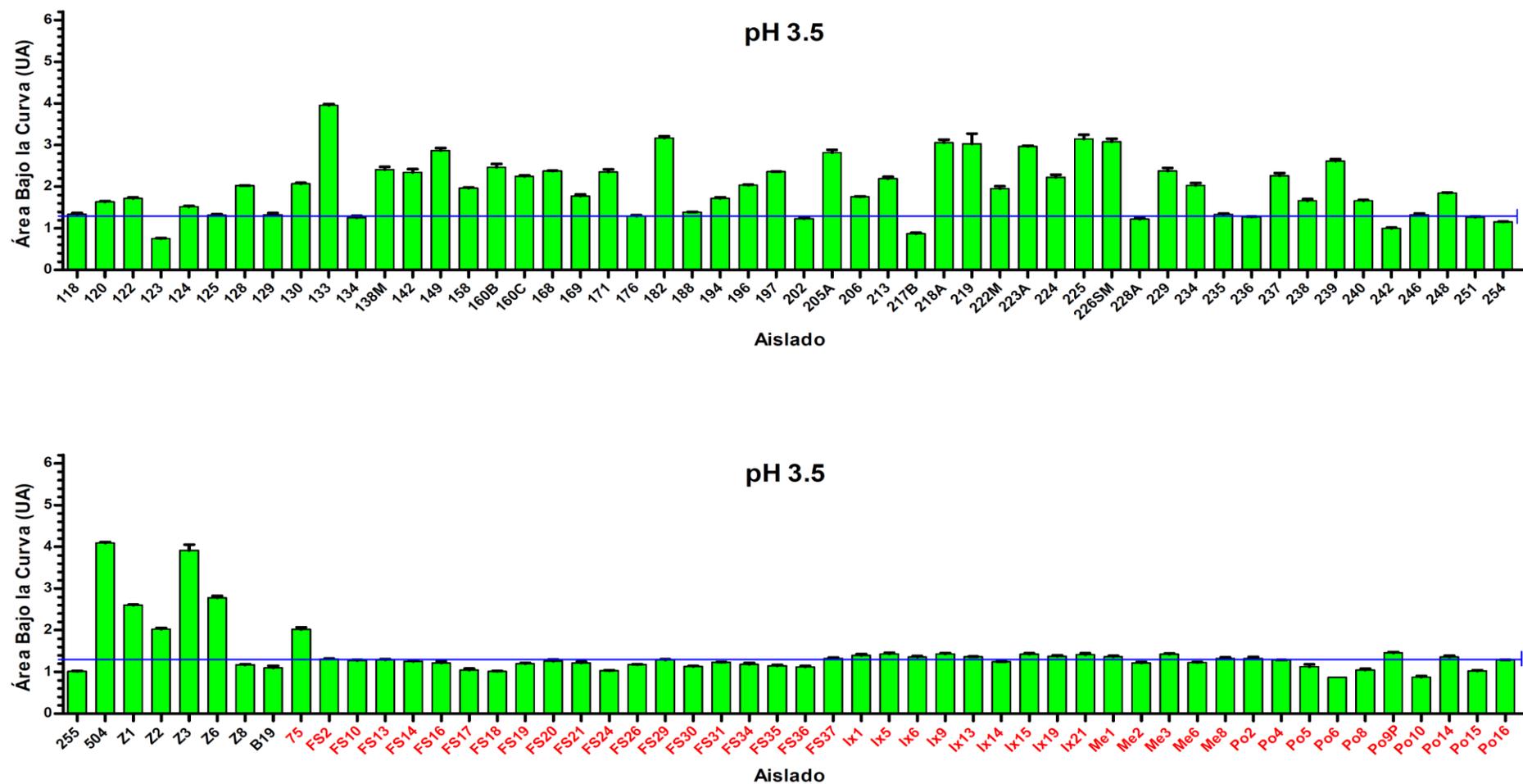


Figura 20. Valores de crecimiento de los aislados de *O. oeni* en vino sintético a pH 3.5, expresado como ABC. En rojo se indica los aislados de mosto y en negro los de vino. La línea azul indica un umbral arbitrario establecido para discriminar altos crecimientos. Representa la media de los valores de ABC de los aislados de mosto que es 1.252 UA.

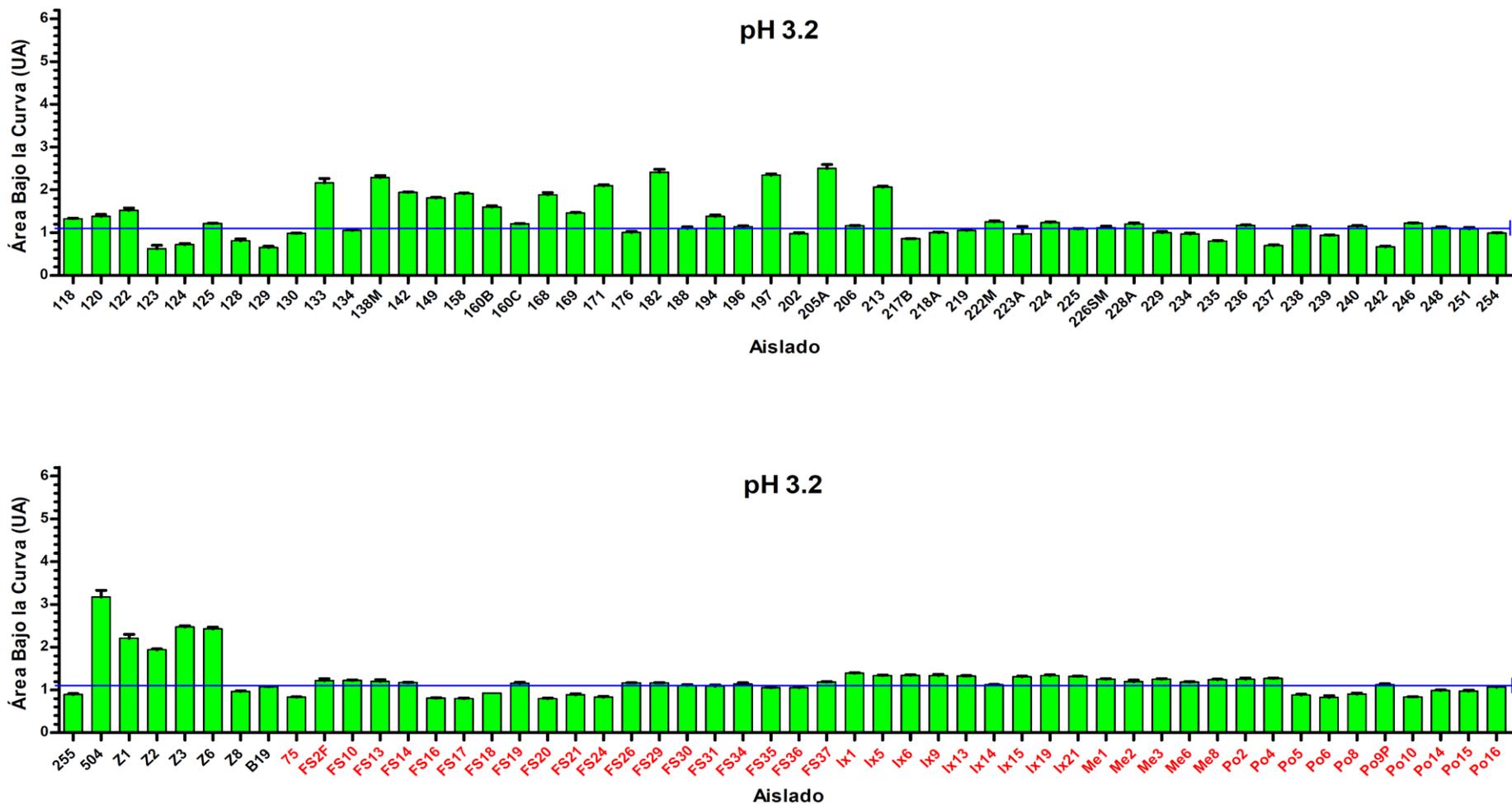


Figura 21. Valores de crecimiento de los aislados de *O. oeni* en vino sintético a pH 3.2, expresado como ABC. En rojo se indica los aislados de mosto y en negro los de vino. La línea azul indica un umbral arbitrario establecido para discriminar altos crecimientos. Representa la media de los valores de ABC de los aislados de mosto que es 1.109 UA.

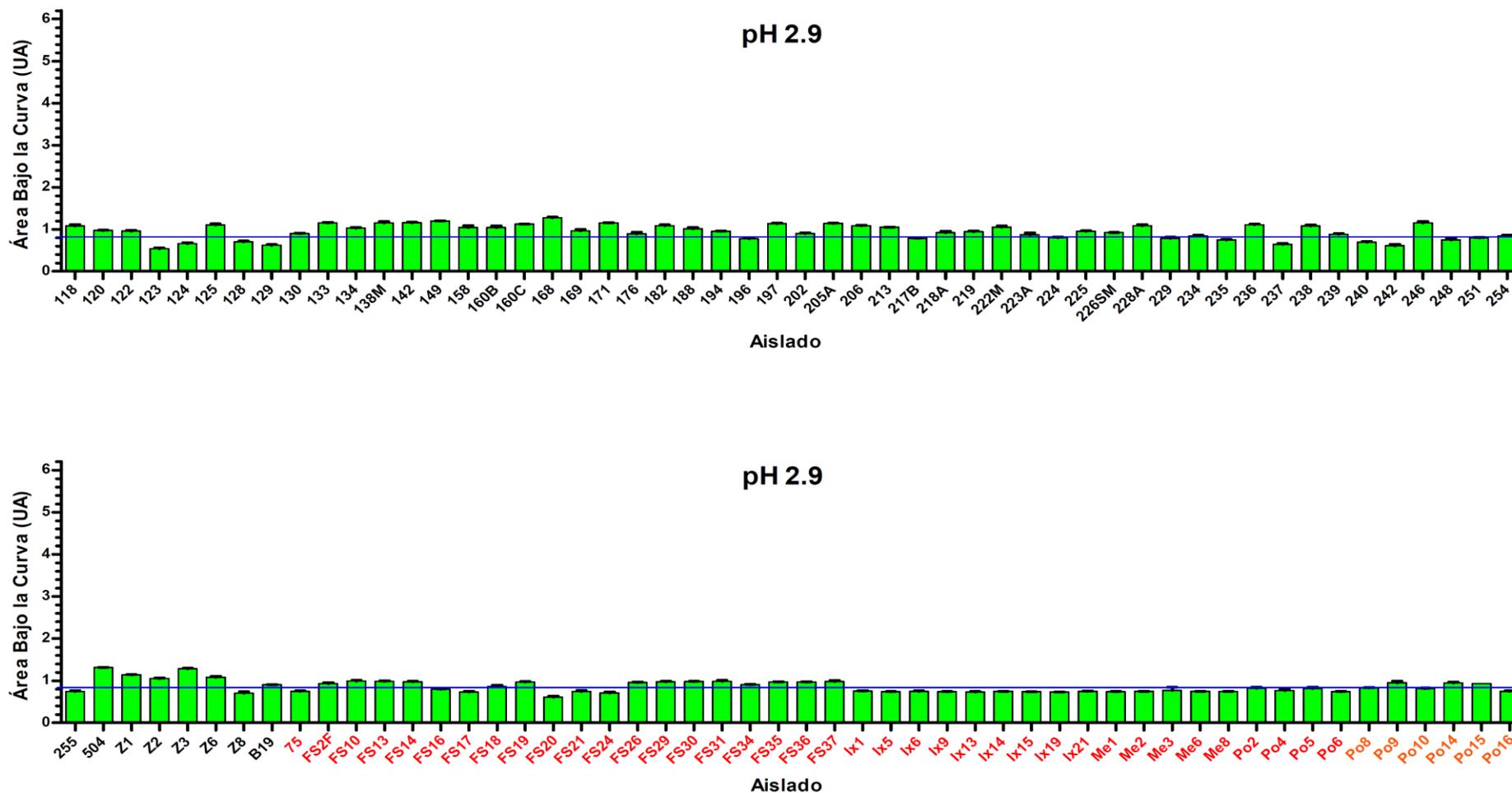


Figura 22. Valores de crecimiento de los aislados de *O. oeni* en vino sintético a pH 2.9, expresado como ABC. En rojo se indica los aislados de mosto y en negro los de vino. La línea azul indica un umbral arbitrario establecido para discriminar altos crecimientos. Representa la media de los valores de ABC de los aislados de mosto que es 0.830 UA.

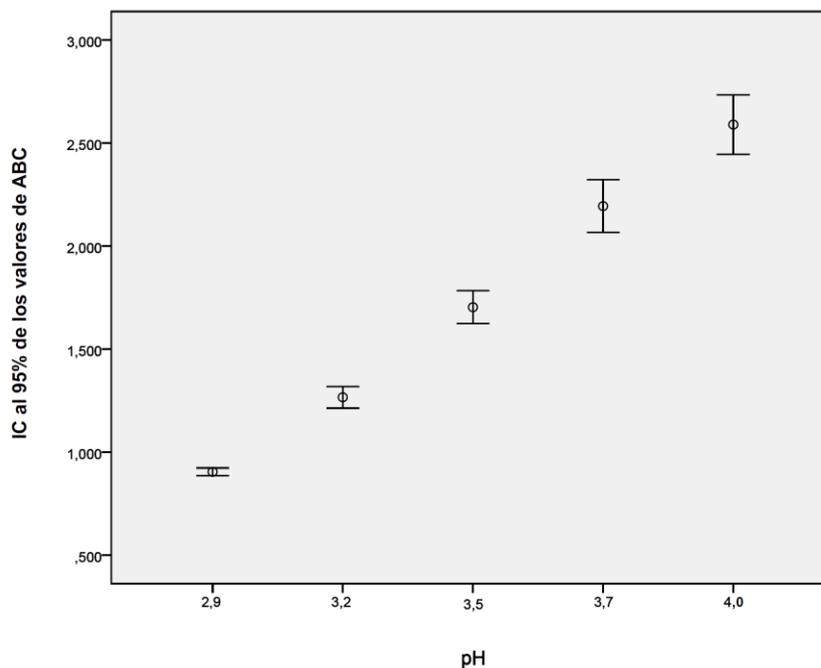


Figura 23. Representación de las medias con sus intervalos de confianza de los valores ABC del crecimiento de *Oenococcus oeni* a diferentes valores de pH.

En las Figuras 25-30 se representan los valores de ABC de los aislados crecidos en vino sintético con diferentes concentraciones de SO₂ total. En la Figura 25 se muestran los valores de ABC en vino sintético sin SO₂, como referencia. Los aislados de *O. oeni* ensayados crecieron a las concentraciones de 30, 40 y 50 mg/L de SO₂, (Figura 26, 27, y 28), pero no a 60 ni a 70 mg/L (Figura 29 y 30). Se observa que los valores de ABC disminuyen conforme aumenta la concentración de SO₂ (Figura 31).

Los aislados 219, 218A, 226SM, 225, 223A, 239, 229, 504, 205A y 237 (ordenados decreciente) mostraron los mayores valores de ABC a 30 mg/L de SO₂. Los que mostraron menores valores fueron FS16, FS17, FS18, FS19, FS20, FS21, FS24, FS26, FS29, FS30, FS30, FS35, FS36, Ix21, Me2 y Me6, todas ellas procedentes de mosto (Figura 26). Los aislados de mosto presentaban ABC que van desde 0.560 a 3.060 UA, mientras que los de vinos van desde 0.730 a 4.430 UA.

A 40 mg/L de SO₂ los aislados con valores de ABC más altos son los mismos que a 30 mg/L de SO₂, además del aislado 236 y con excepción de 205A y 237. Los que presentaron menores valores de ABC son los mismos que a 30 mg/L y además de los aislados 176, 194, 202, Me2 y Me6 (Figura 27).

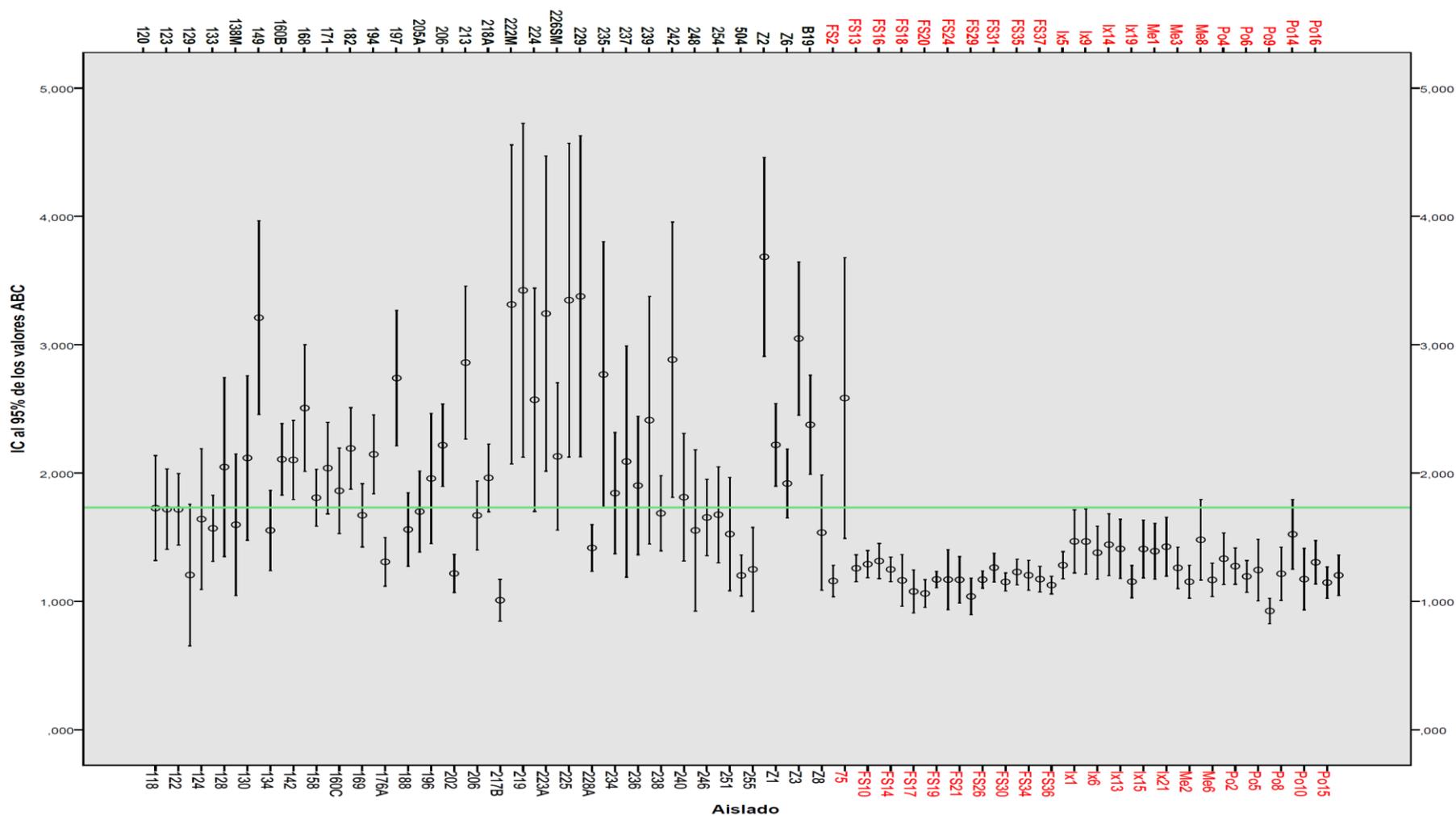


Figura 24. Representación de las medias e intervalos de confianza de las ABC globales de cada aislado de *Oenococcus oeni* en vino sintético con diferentes valores de pH. Las medias e intervalos se han obtenido a partir de todos los valores de ABC mostradas por cada aislado a los diferentes valores de pH ensayados (4.0-2.9). La línea verde indica la media global de los ABC de todos los aislados y tiene un valor de 1.731 UA

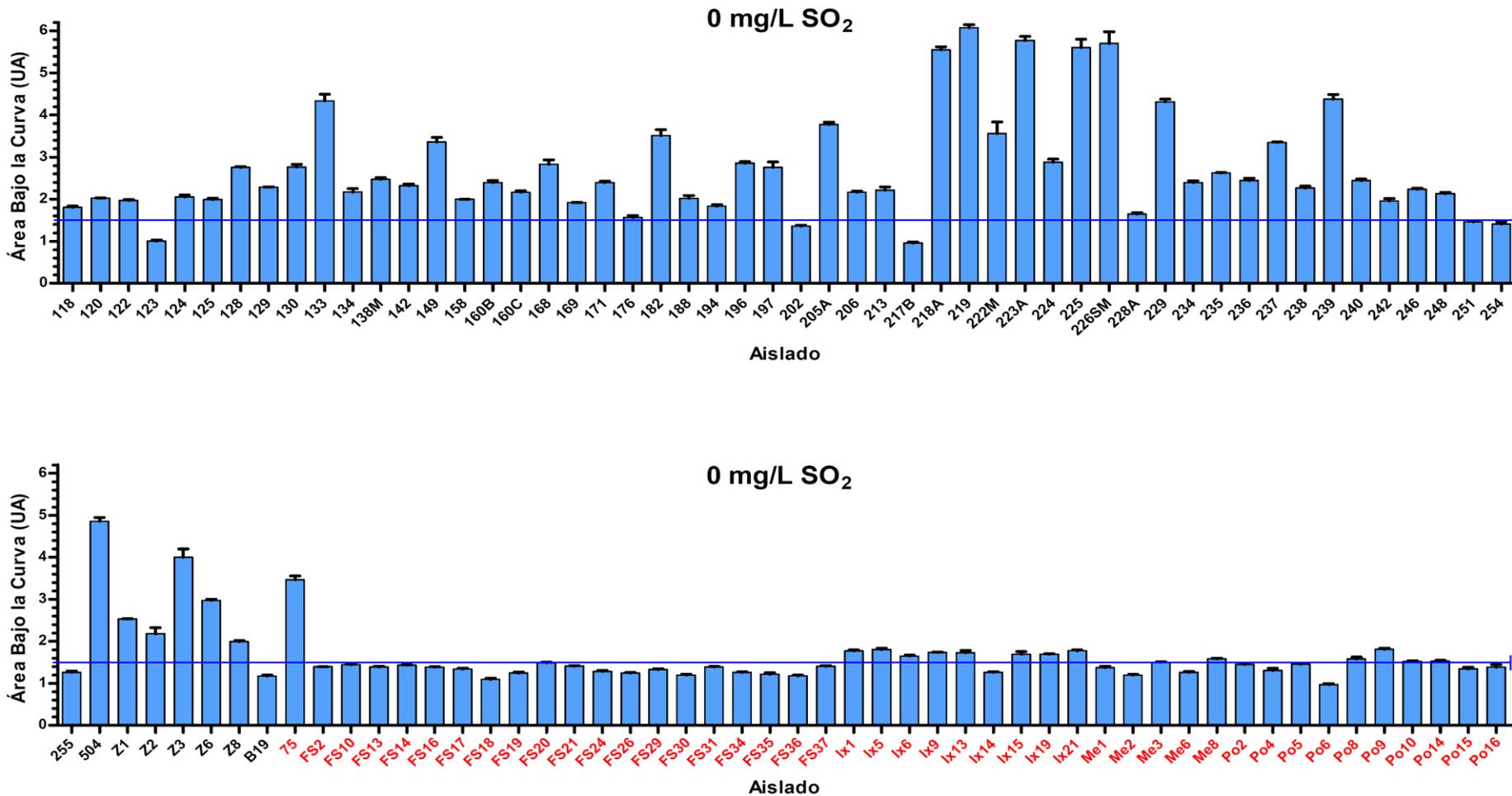


Figura 25. Valores de crecimiento de los aislados de *O. oeni* en vino sintético sin SO₂, expresado como ABC. En rojo se indica los aislados de mosto y en negro los de vino. La línea azul indica un umbral arbitrario establecido para discriminar altos crecimientos. Representa la media de los valores de ABC de los aislados de mosto que es 1.474 UA

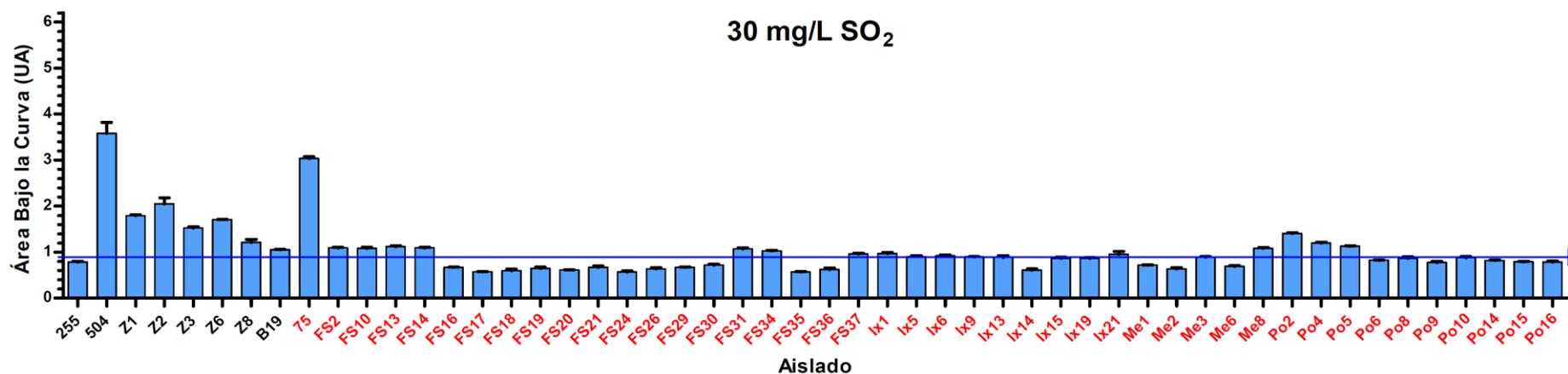
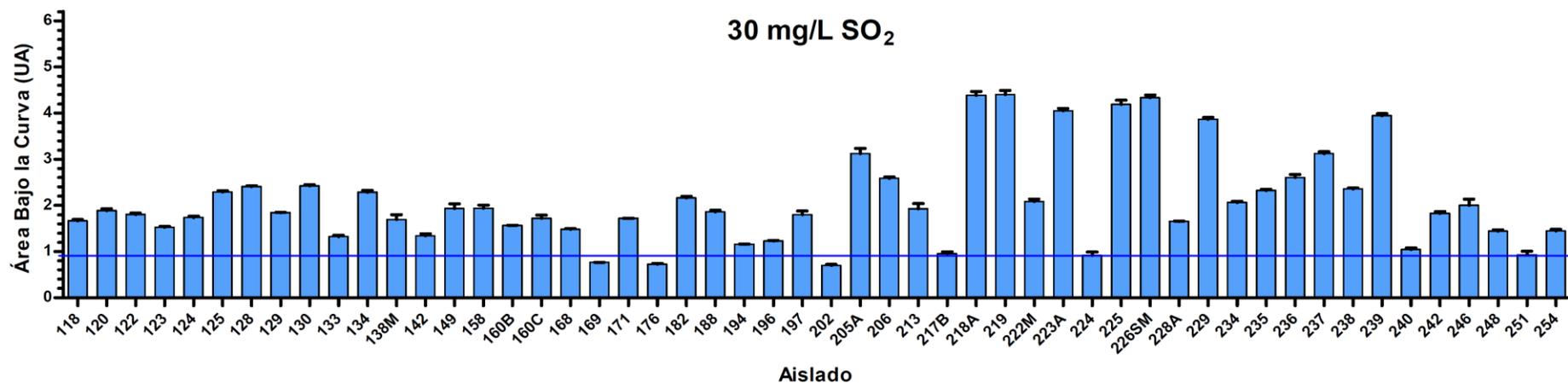


Figura 26. Valores de crecimiento de los aislados de *O. oeni* en vino sintético a una concentración de 30 mg/L de SO₂, expresado como ABC. En rojo se indica los aislados de mosto y en negro los de vino. La línea azul indica un umbral arbitrario establecido para discriminar altos crecimientos. Representa la media de los valores de ABC de los aislados de mosto que es 0.900 UA

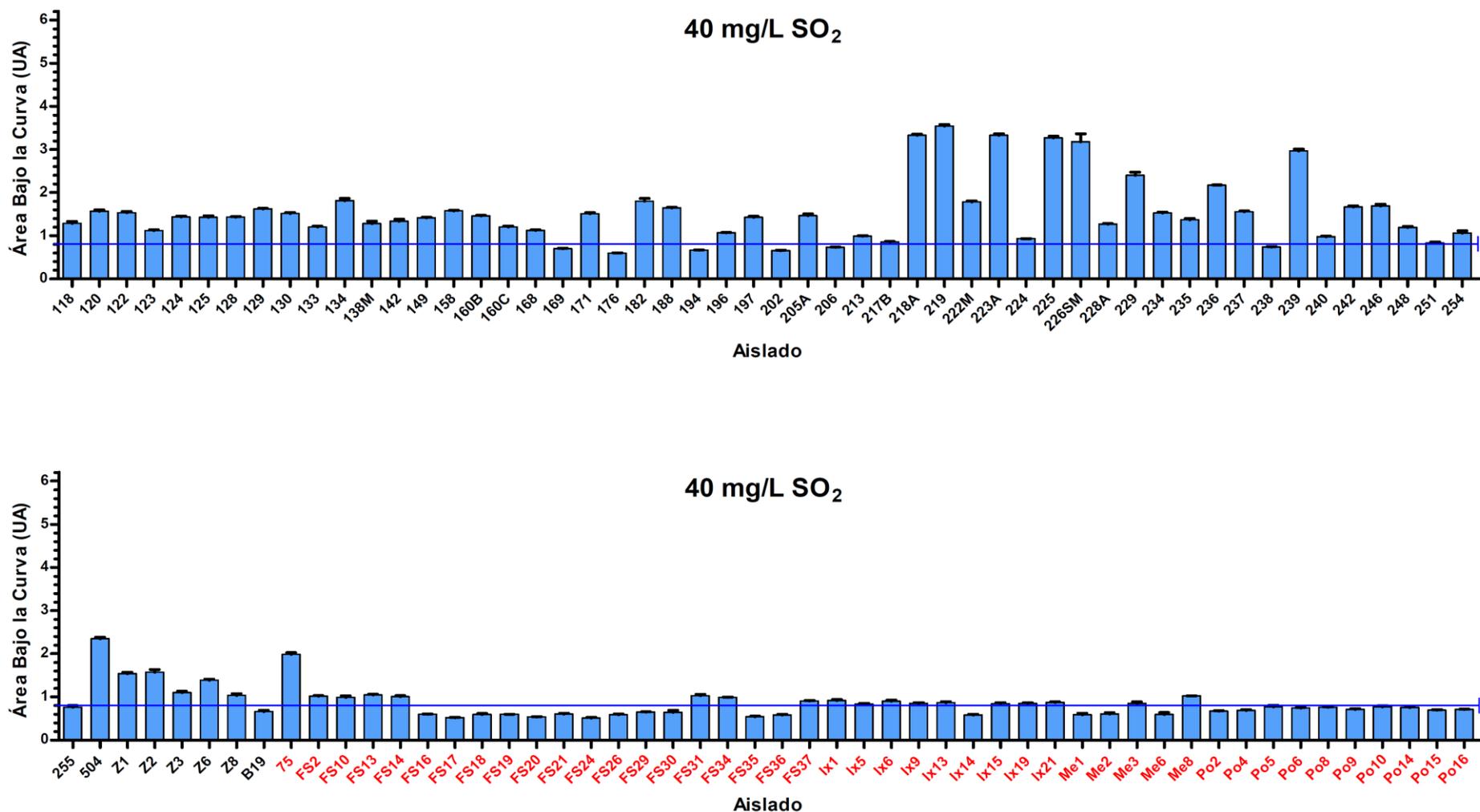


Figura 27. Valores de crecimiento de los aislados de *O. oeni* en vino sintético a una concentración de 40 mg/L de SO₂, expresado como ABC. En rojo se indica los aislados de mosto y en negro los de vino. La línea azul indica un umbral arbitrario establecido para discriminar altos crecimientos. Representa la media de los valores de ABC de los aislados de mosto que es 0.787 UA

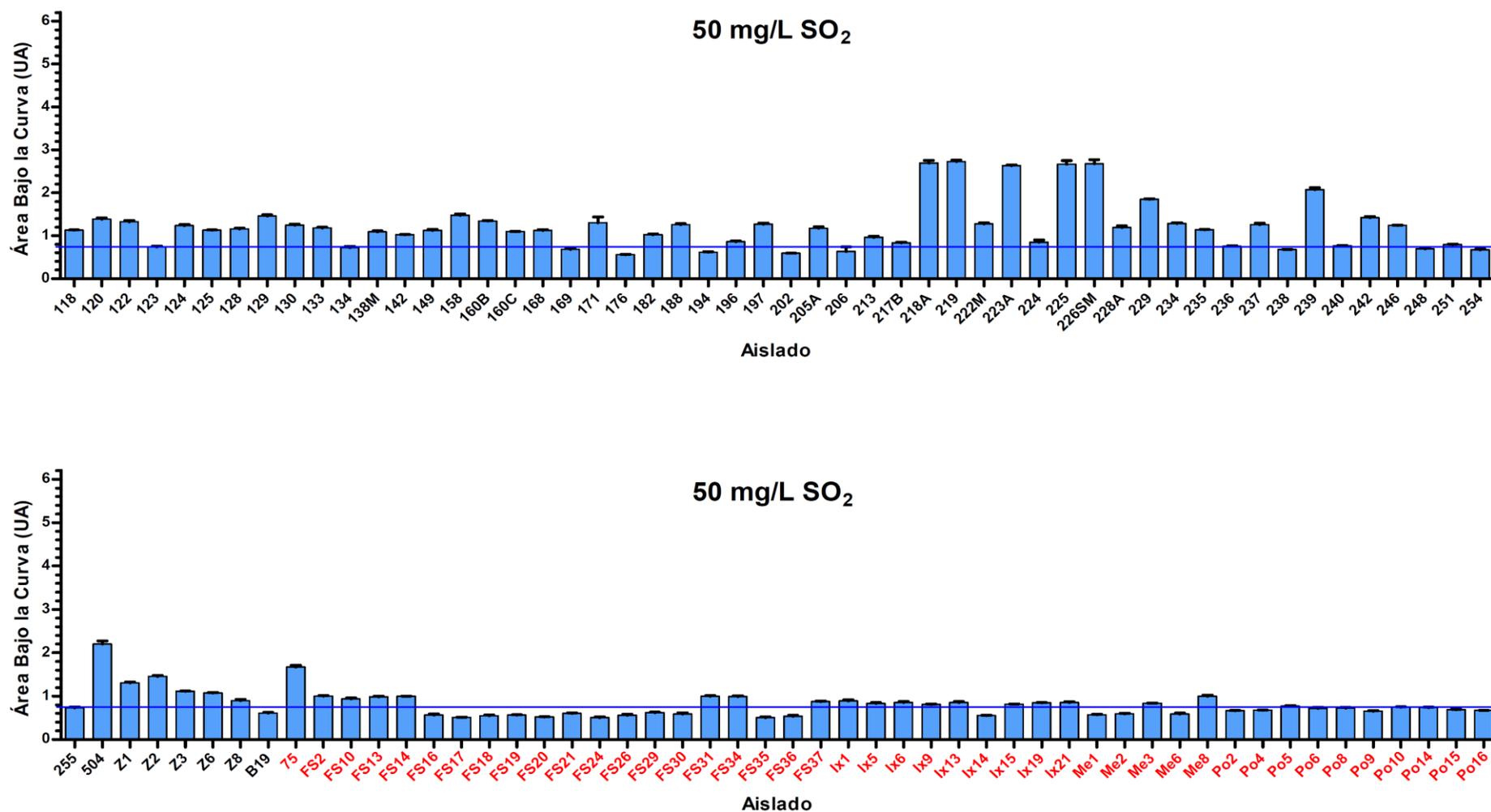


Figura 28. Valores de crecimiento de los aislados de *O. oeni* en vino sintético a una concentración de 50 mg/L de SO₂, expresado como ABC. En rojo se indica los aislados de mosto y en negro los de vino. La línea azul indica un umbral arbitrario establecido para discriminar altos crecimientos. Representa la media de los valores de ABC de los aislados de mosto que es 0.751 UA

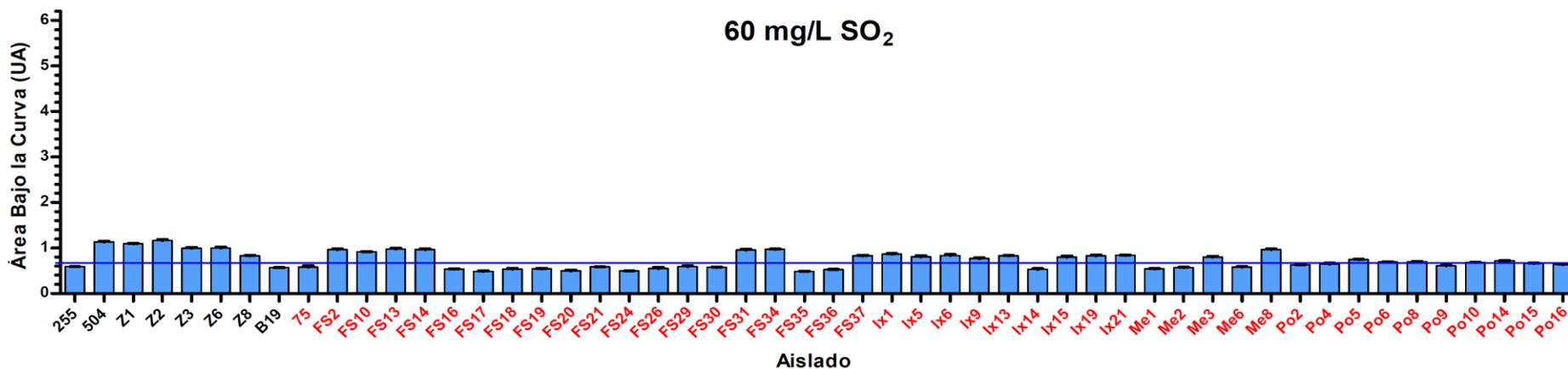
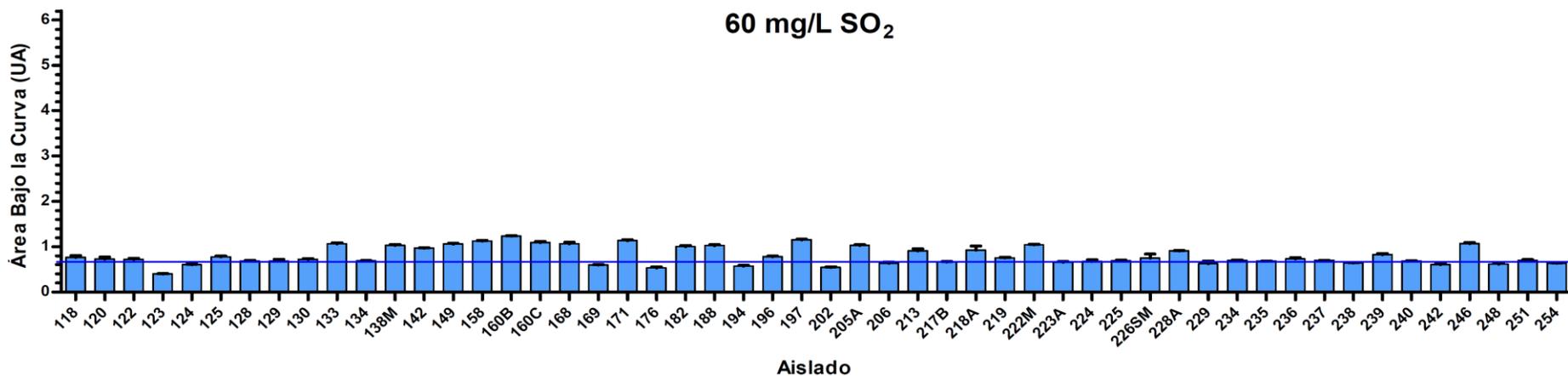


Figura 29. Valores de crecimiento de los aislados de *O. oeni* en vino sintético a una concentración de 60 mg/L de SO₂, expresado como ABC. En rojo se indica los aislados de mosto y en negro los de vino. La línea azul indica un umbral arbitrario establecido para discriminar altos crecimientos. Representa la media de los valores de ABC de los aislados de mosto que es 0.699 UA

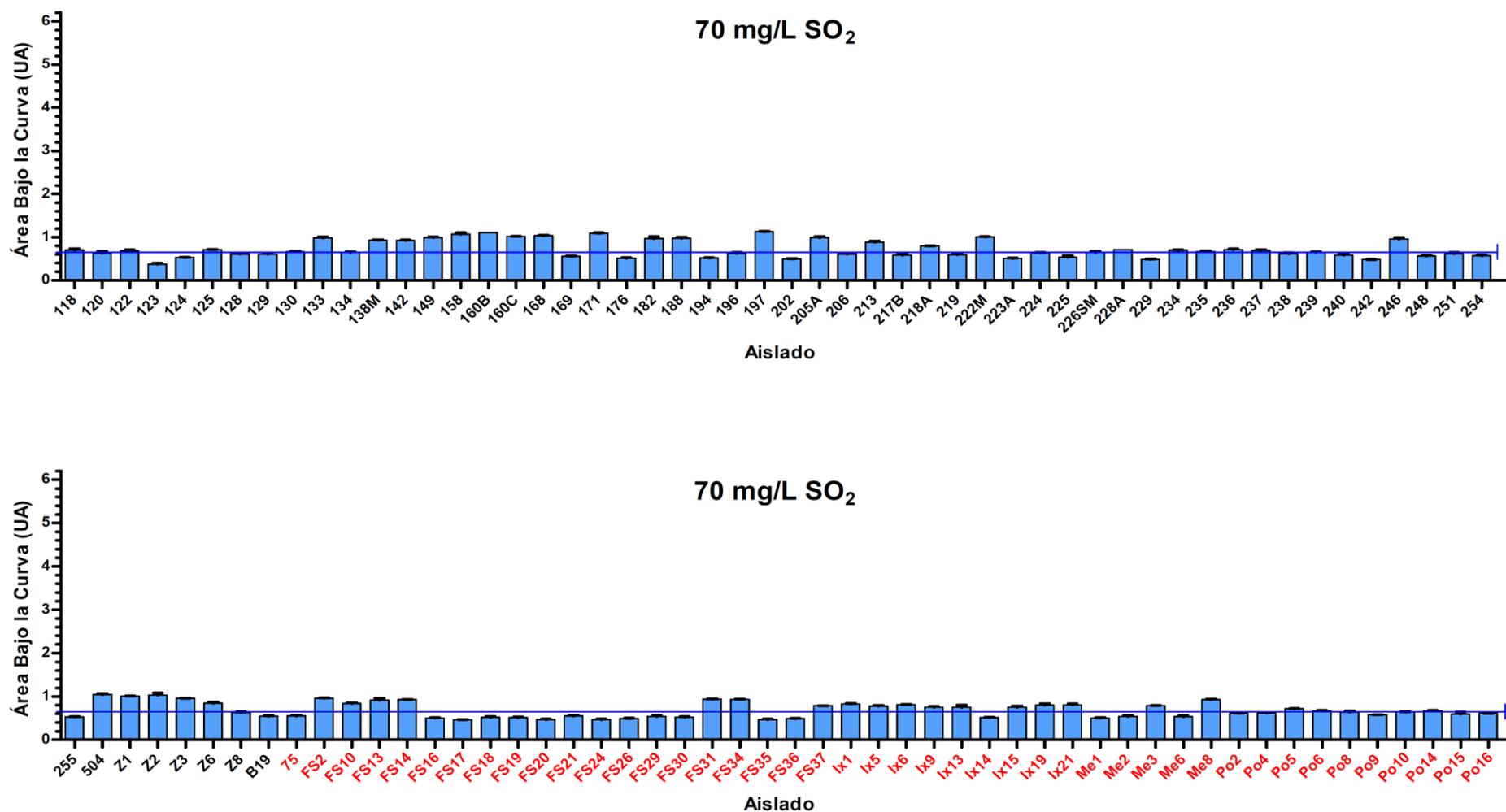


Figura 30. Valores de crecimiento de los aislados de *O. oeni* en vino sintético a una concentración de 60 mg/L de SO₂, expresado como ABC. En rojo se indica los aislados de mosto y en negro los de vino. La línea azul indica un umbral arbitrario establecido para discriminar altos crecimientos. Representa la media de los valores de ABC de los aislados de mosto que es 0.664 UA

A una concentración de 40 mg/L de SO₂, los aislados de mosto presentaban ABC que van desde 0.520 a 1.980 UA, mientras que los de vinos van desde 0.600 a 3.540 UA.

A 50 mg/L de SO₂ los aislados que presentaron mayores valores de ABC fueron los mismos que a 30 y 40 mg/L SO₂, con la excepción de 236 y los que mostraron menores valores son los mismos que ya los presentaban a 30 y 40 mg/L SO₂ (Figura 28). Los aislados de mosto presentaban ABC que van desde 0.490 a 1.670 UA, mientras que los de vinos van desde 0.560 a 2.76 UA.

El análisis estadístico de los valores de ABC obtenidos en el experimento de SO₂, demostró que existen diferencias significativas entre las medias y las varianzas correspondientes a cada una de las concentraciones ensayadas. Como en los anteriores factores analizados (etanol y pH), se ha observado que el SO₂ influye sobre el crecimiento, de manera que cuando éste aumenta el crecimiento de los aislados disminuye. La disminución depende de la concentración de SO₂ ensayada, como se puede apreciar la Figura 31.

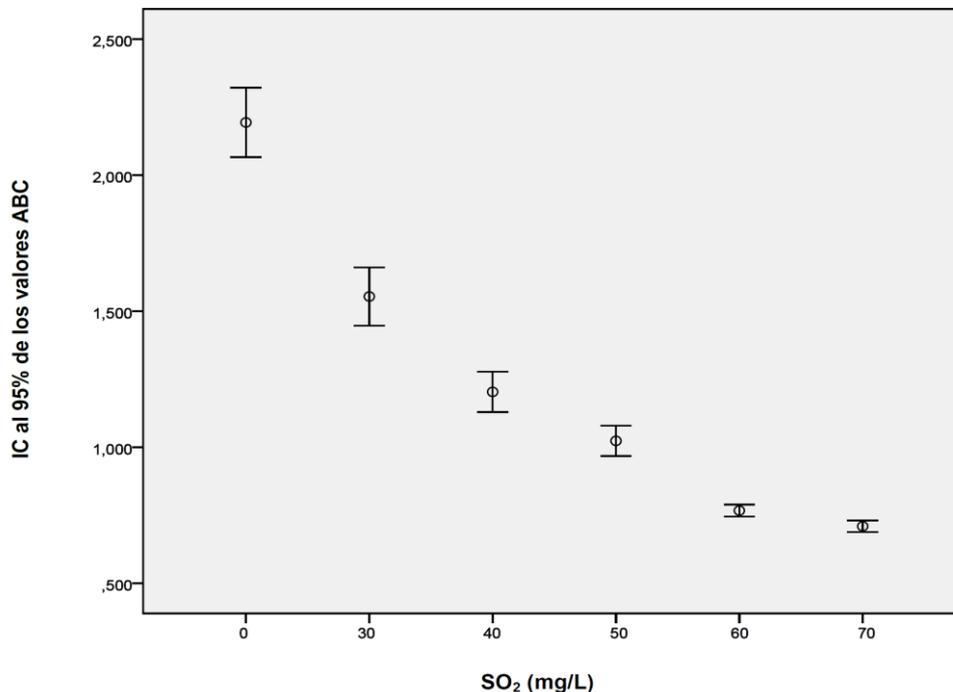


Figura 31. Representación de las medias con sus intervalos de confianza de los valores ABC del crecimiento de *Oenococcus oeni* en las diferentes concentraciones de SO₂

Además, cuando hacemos una comparación de las medias de los valores de ABC para cada concentración de SO₂, observamos que las medias del ensayo control (sin SO₂) y el de 30 mg/L de SO₂ son iguales, es decir no existen diferencias significativas de crecimiento entre estos 2 ensayos. Las medias de los valores de ABC de los ensayos con 60 y 70 mg/L de SO₂ no presentaron diferencias significativas entre sí, debido a que en realidad los aislados eran incapaces de crecer a estas concentraciones de SO₂ tan altas.

El análisis estadístico ANOVA y la prueba *a posteriori* TukeyB, a un nivel de significación de 0.05, demostró que los aislados que tienen mayores valores medios de ABC para todas las concentraciones de SO₂ ensayados fueron 219, 218A, 226SM, 225, 223A, 504, 239 y 229 (ordenados en forma decreciente), y los que tienen menores fueron FS35, FS24, FS17 y FS18 (Figura 32).

En este trabajo se demostró que la preadaptación de los aislados a bajas concentraciones de SO₂ (15 mg/L) aumentaba la tolerancia de las células a concentraciones más elevadas ensayadas de SO₂ en el vino sintético. Esta preadaptación les permitió crecer hasta concentraciones de SO₂ de 50 mg/L, mientras que sin esta etapa de preadaptación previa no fueron capaces de crecer ni siquiera a 30 mg/L de SO₂ (Guija, 2011). En este mismo sentido, Guzzo y col. (1998) demostraron que la adición de dosis subletales de sulfito a un medio ácido incrementaba la tolerancia de *O. oeni* al mismo.

En este trabajo se han encontrado aislados capaces de crecer en un vino sintético suplementado con 50 mg/L de SO₂. Algunos autores han puesto en manifiesto la existencia de cepas de *O. oeni* capaces de crecer en un medio de laboratorio suplementado con 30 mg/L SO₂ (Guzzo y col., 1998; Capozzi y col., 2010), 60 mg/L (Davis y col., 1988; Mesas y col., 2004; Sico y col., 2008; Guzzon y col., 2009) e incluso a 256 mg/L de SO₂ (Davis y col., 1988). Mientras que las cepas utilizadas por Zapparoli y col. (2012) fueron incapaces de crecer a 30 mg/L de SO₂ y a 60 mg/L (Guzzo y col., 1998). Así mismo el crecimiento también depende del pH, del vino, del tiempo entre la adición de SO₂ y la siembra, etc.

De los resultados obtenidos se deduce que los aislados que son capaces de crecer mejor a altas concentraciones de etanol son los mismos que mejor crecen a concentraciones altas de SO₂ son 219, 218A, 226SM, 225, 223A, 239, 504 y 229 (Figura 17-33). Sin embargo no todos ellos presentaron mayores ABC a valores de pH bajo (pH 3.2), ya que sólo la 504 mostró altos valores de ABC a 3.2 y a 2.9.

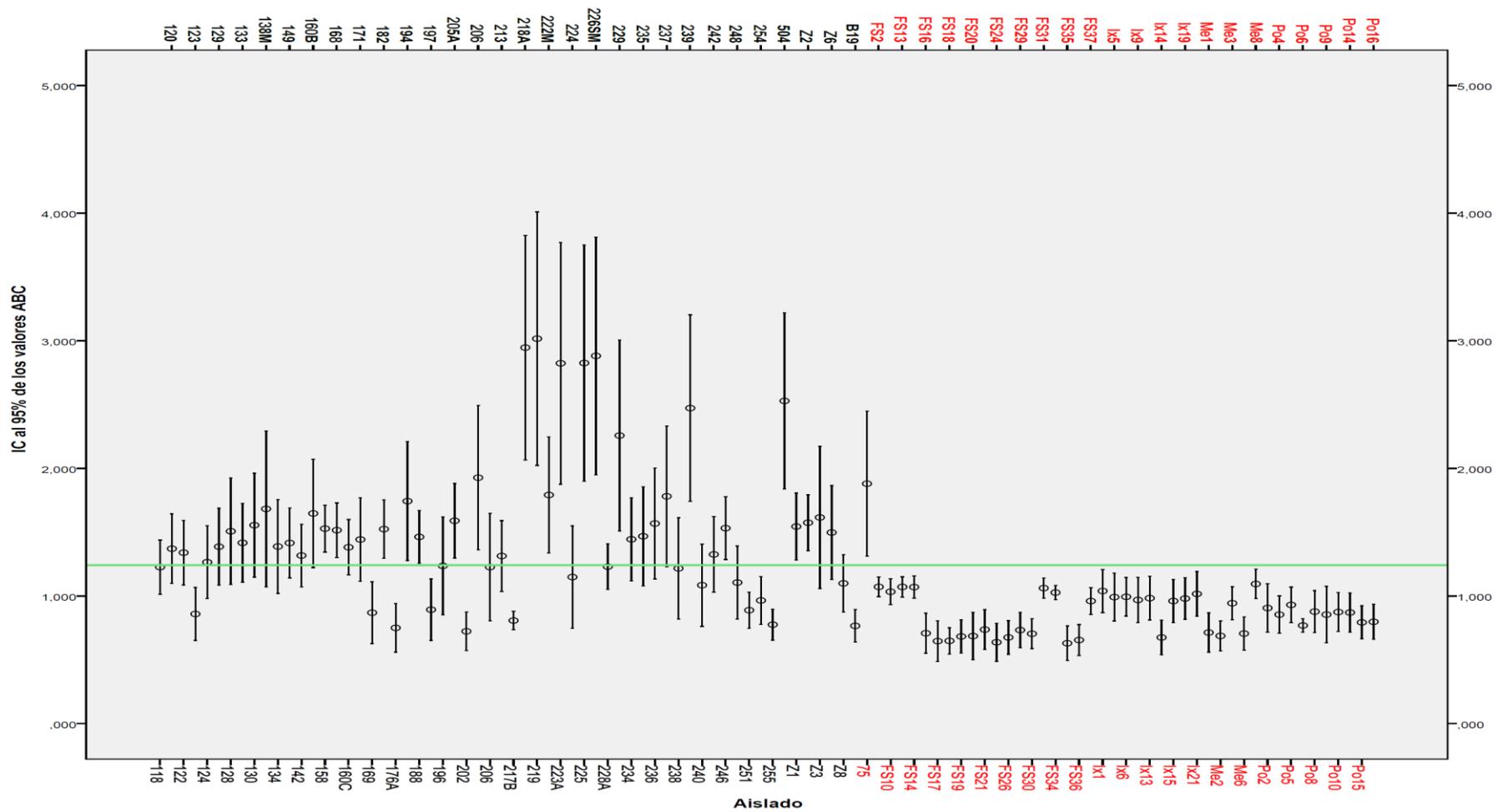


Figura 32. Representación de las medias e intervalos de confianza de las ABC globales de cada aislado de *Oenococcus oeni* en vino sintético con diferentes concentraciones de SO₂. Las medias e intervalos se han obtenido a partir de todos los valores de ABC mostradas por cada aislado a los diferentes concentraciones de SO₂ (0-70 mg/L). La línea verde indica la media global de los ABC de todos los aislados y tiene un valor de 1.242 UA

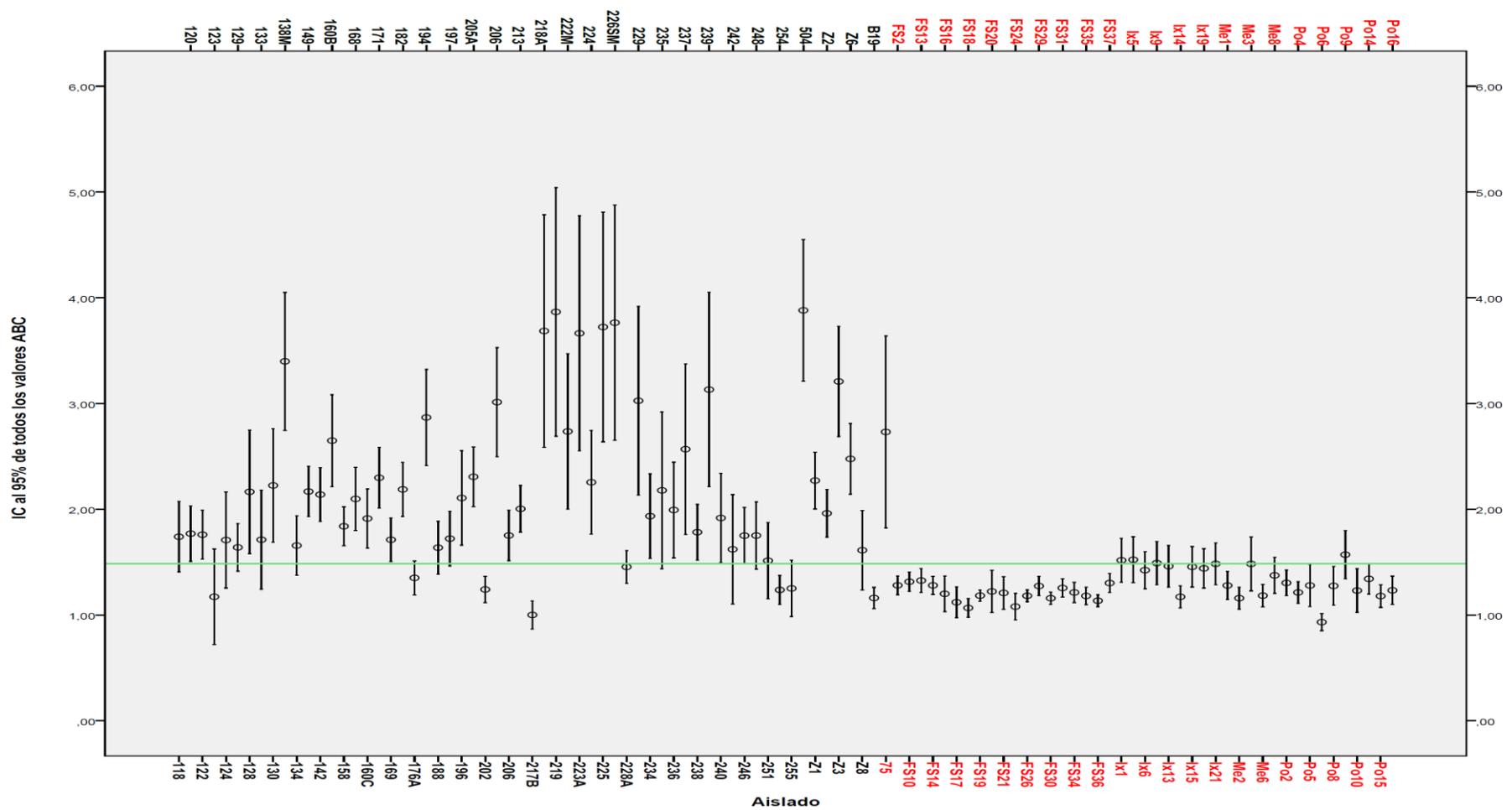


Figura 33. Representación de las medias e intervalos de confianza de las ABC globales de cada aislado de *Oenococcus oeni* en vino sintético con diferentes valores de pH, concentraciones de etanol y de SO₂. Las medias e intervalos se han obtenido a partir de todos los valores de ABC mostradas por cada aislado en las 3 condiciones ensayadas. La línea verde indica la media global de los ABC de todos los aislados y todas las condiciones y tiene un valor de 1.464 UA

Parece deducirse de estos datos el que existe una mayor relación entre la capacidad de crecer en etanol y en SO₂ que entre la capacidad de crecer en bajo pH y en SO₂. El análisis de correlación bivariado demostró que existe una relación estadísticamente significativa entre los valores de ABC de etanol y los de SO₂. Cuando se compara el efecto inhibitor de los 3 factores, se aprecia que la influencia sobre el crecimiento que ocasiona el etanol y el SO₂ a la célula es superior al que ocasiona el pH, mientras que la menor influencia se debe al SO₂ usado a concentraciones iguales o inferiores a 50 mg/L. De los aislados más resistentes a los 3 factores analizados (etanol, pH y SO₂), 4 de ellos crecen bien en vino natural (219, 239, 504 y 229). Es decir se confirma su capacidad de resistir a estos factores en vinos naturales.

Los aislados 218A, 219, 223, 225, 226SM, 229, 239 y 504 mostraron buenas capacidades para crecer a altas concentraciones de etanol (14 y 15%) y a concentraciones de SO₂ de 50 mg/L, mientras que a pH bajos (2.9 y 3.2) el aislado 504 era el que mejor crecía, seguido por los aislados 133, 218A, 219, 223A, 225, 226SM.

García-Alegría y col. (2004) observaron que las velocidades de crecimiento promedio de 22 cepas de *O. oeni* en un medio de laboratorio, disminuían a valores de pH 3.6, 3.3 y 3.2 en un 62.8, 60 y 53.8 %, respectivamente, y a concentraciones de etanol de 7, 12 y 13 % en un 115.2, 84.4 y 65.3 %, respectivamente. Observaron también un efecto positivo del 7% de etanol en el crecimiento de sus cepas. Además, observaron que la resistencia y la sensibilidad de sus cepas a diferentes valores de etanol y pH era variable, encontrando que 3 de ellas eran capaces de crecer bien a pH 3.2, como ocurre con alguno de los nuestros (504, 133, 218A, 219, 223A, 223, 225 y 226SM). Mientras que García-Alegría y col. (2004) y Capozzi y col. (2010) encontraron algunas cepas de *O. oeni* que eran capaces de crecer a 13 % de etanol, nosotros también hemos encontrado aislados capaces de crecer a estas concentraciones e incluso a concentraciones superiores. Coincidiendo estos hallazgos con los resultados obtenidos en este trabajo con los obtenidos por Bravo-Ferrada y col. (2011), Davis y col. (1988) quienes encontraron cepas de *O. oeni* capaces de tolerar una concentración de 15%. Aunque, Guzzon y col. (2009) encontraron una cepa capaz de crecer en vinos con una graduación alcohólica de hasta 16 % de etanol, tolerante a valores de pH de 3.0, tolerante a 60 mg/L de SO₂. Nosotros también hemos encontrado aislados tolerantes a 15 % de etanol, tolerantes a pH 3.2 y a concentraciones de 50 mg/L de SO₂.

Por otro lado, para explicar cuál o cuáles de las condiciones ensayadas explicaban los resultados obtenidos, se realizó un Análisis de Componentes Principales (ACP). Este análisis mostró que los componentes (variables o condiciones) que más peso tienen a la hora de explicar la variación de los datos globales de todos los aislados en todas las condiciones ensayadas son los dos primeros que aparecen en la Tabla 21 y en la Figura 34. El primer componente explicaba un 66.6 % de la varianza total de la nube de puntos y el segundo componente un 19.1 %. Ambos componentes explicaban conjuntamente el 85.8 % de la varianza total de los valores de ABC.

Tabla 21. Varianza total explicada del APC de los valores de las ABC de los 104 aislados de *O. oeni*

| Componente | Autovalores iniciales | | | Sumas de las saturaciones al cuadrado de la extracción | | | Suma de las saturaciones al cuadrado de la rotación | | |
|------------|-----------------------|------------------|-------------|--|------------------|-------------|---|------------------|-------------|
| | Total | % de la varianza | % acumulado | Total | % de la varianza | % acumulado | Total | % de la varianza | % acumulado |
| 1 | 9.990 | 66.599 | 66.599 | 9.990 | 66.599 | 66.599 | 9.011 | 60.074 | 60.074 |
| 2 | 2.860 | 19.069 | 85.668 | 2.860 | 19.069 | 85.668 | 3.839 | 25.594 | 85.668 |
| 3 | 0.686 | 4.570 | 90.239 | | | | | | |
| 4 | 0.540 | 3.599 | 93.838 | | | | | | |
| 5 | 0.339 | 2.263 | 96.101 | | | | | | |
| 6 | 0.175 | 1.168 | 97.269 | | | | | | |
| 7 | 0.111 | 0.740 | 98.008 | | | | | | |
| 8 | 0.073 | 0.485 | 98.494 | | | | | | |
| 9 | 0.071 | 0.476 | 98.970 | | | | | | |
| 10 | 0.055 | 0.365 | 99.334 | | | | | | |
| 11 | 0.051 | 0.340 | 99.675 | | | | | | |
| 12 | 0.030 | 0.198 | 99.873 | | | | | | |
| 13 | 0.019 | 0.127 | 100.000 | | | | | | |
| 14 | 0.000 | 0.000 | 100.000 | | | | | | |
| 15 | 0.000 | 0.000 | 100.000 | | | | | | |

En la Figura 34, se muestra en el espacio rotado la distribución de las diferentes condiciones de ensayo que explican la variabilidad de todas las ABC obtenidas. Así, el 66.6 % de la varianza queda explicada por: los valores de pH 3.5, 3.7 y 4.0, las concentraciones de etanol 10, 12, 14, 15 % y las concentraciones de SO₂ 0, 30, 40 y 50 mg/L. Las que conforman el segundo componente que explica el 19.1 % de la variabilidad restante son los valores de pH más bajos (2.9 y 3.2) y las concentraciones más elevadas de SO₂ (60 y 70 mg/L). Sin embargo, cuando consideramos el subconjunto de los aislados de mosto los factores que explican la varianza de los datos de ABC de estos son 4, como se puede observar en la Tabla 22. El componente 1 explica un 54.75 % de la varianza total de la nube de puntos, el segundo componente

explica el 25.33 %, el tercer componente explica el 7.99 % y el cuarto componente un 7.42 %.

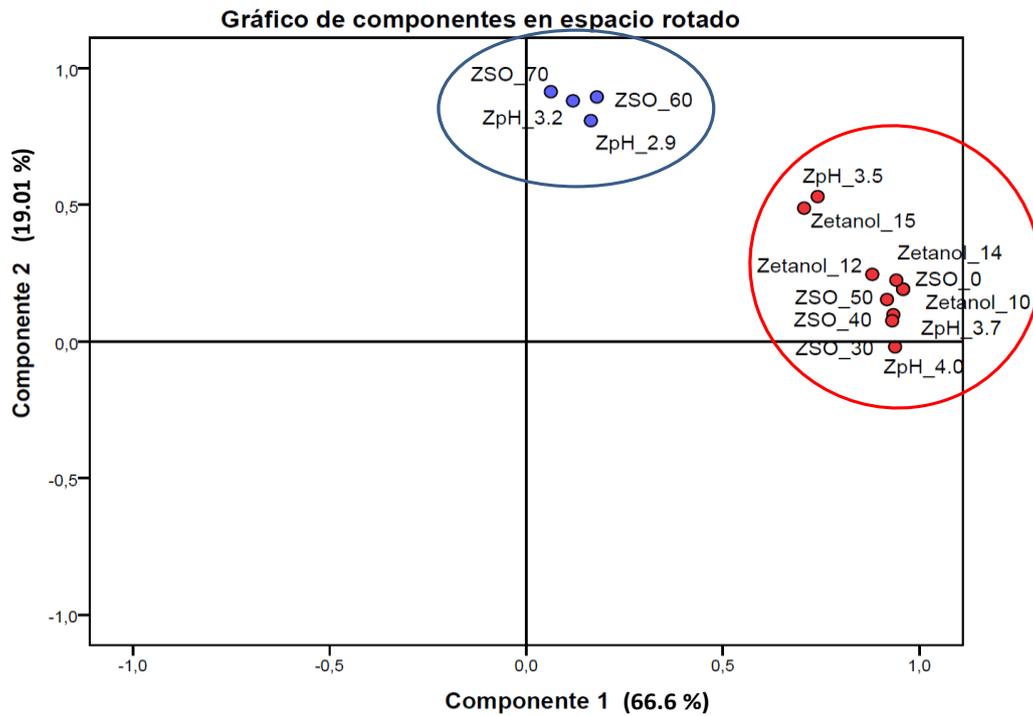


Figura 34. Resultado de APC en espacio rotado de las variables que afectan las ABC de los 104 aislados de *O. oeni* ensayados

Tabla 22. Varianza total explicada del APC de las ABC del subconjunto de los aislados de mosto

| Componente | Autovalores iniciales | | | Sumas de las saturaciones al cuadrado de la extracción | | | Suma de las saturaciones al cuadrado de la rotación | | |
|------------|-----------------------|------------------|-------------|--|------------------|-------------|---|------------------|-------------|
| | Total | % de la varianza | % acumulado | Total | % de la varianza | % acumulado | Total | % de la varianza | % acumulado |
| 1 | 8.213 | 54.751 | 54.751 | 8.213 | 54.751 | 54.751 | 7.536 | 50.237 | 50.237 |
| 2 | 3.800 | 25.332 | 80.083 | 3.800 | 25.332 | 80.083 | 2.815 | 18.767 | 69.004 |
| 3 | 1.198 | 7.988 | 88.071 | 1.198 | 7.988 | 88.071 | 2.241 | 14.938 | 83.942 |
| 4 | 1.112 | 7.415 | 95.486 | 1.112 | 7.415 | 95.486 | 1.732 | 11.544 | 95.486 |
| 5 | 0.241 | 1.604 | 97.090 | | | | | | |
| 6 | 0.182 | 1.214 | 98.304 | | | | | | |
| 7 | 0.099 | 0.657 | 98.961 | | | | | | |
| 8 | 0.056 | 0.375 | 99.336 | | | | | | |
| 9 | 0.041 | 0.273 | 99.609 | | | | | | |
| 10 | 0.025 | 0.167 | 99.777 | | | | | | |
| 11 | 0.021 | 0.138 | 99.915 | | | | | | |
| 12 | 0.007 | 0.049 | 99.964 | | | | | | |
| 13 | 0.005 | 0.036 | 100.000 | | | | | | |
| 14 | 0.000 | 0.000 | 100.000 | | | | | | |
| 15 | 0.000 | 0.000 | 100.000 | | | | | | |

Pero cuando observamos el gráfico de sedimentación que se usa para determinar de manera visual la cantidad de factores que, por su utilidad, deben ser retenidos (Figura 35), observamos que los tres primeros componentes son los que más peso aportan a la variación de los datos globales, explicando conjuntamente el 88.07 % de la varianza total de los valores de ABC. Mientras que el cuarto componente está muy cercano al tercero, mostrando una pendiente con una tendencia a aplanarse lo que significa que puede descartarse como componente individual del análisis. La fusión de ambos en un único componente, explicaría un 15.40 % de la variación de los datos y daría lugar a la distribución espacial que se aprecia en la Figura 36.

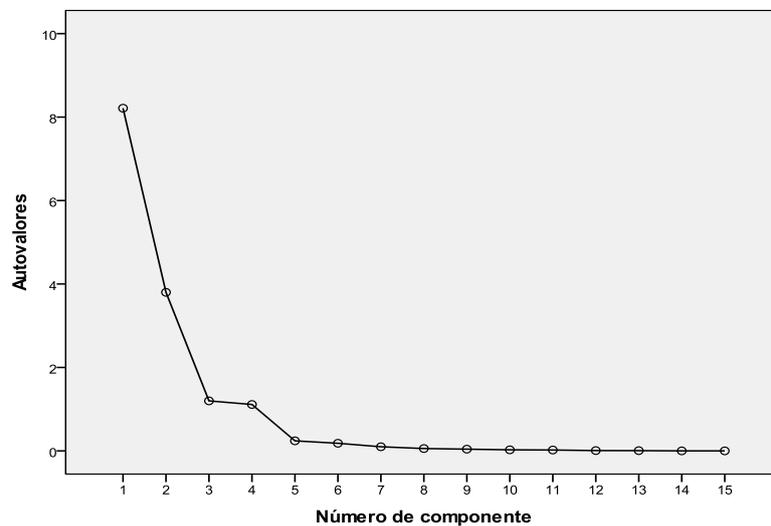


Figura 35. Gráfico de sedimentación en el que se representan los autovalores iniciales totales en espacio rotado de los datos de ABC del subconjunto de aislados de mostos

Podemos observar que en el gráfico de componentes principales (Figura 36) en espacio rotado, las condiciones que conforman el primer componente son las siguientes: los valores de pH 3.5, 3.7 y 4.0, las concentraciones de etanol 10 y 12% y las concentraciones de SO_2 0, 30, 40 y 50 mg/L. Las que conforman el segundo componente son: las concentraciones más elevadas de SO_2 (60 y 70 mg/L). Las que conforman el tercer componente son los valores de pH más bajos (2.9 y 3.2) y las concentraciones más elevadas de etanol (14 y 15 %) (Figura 36).

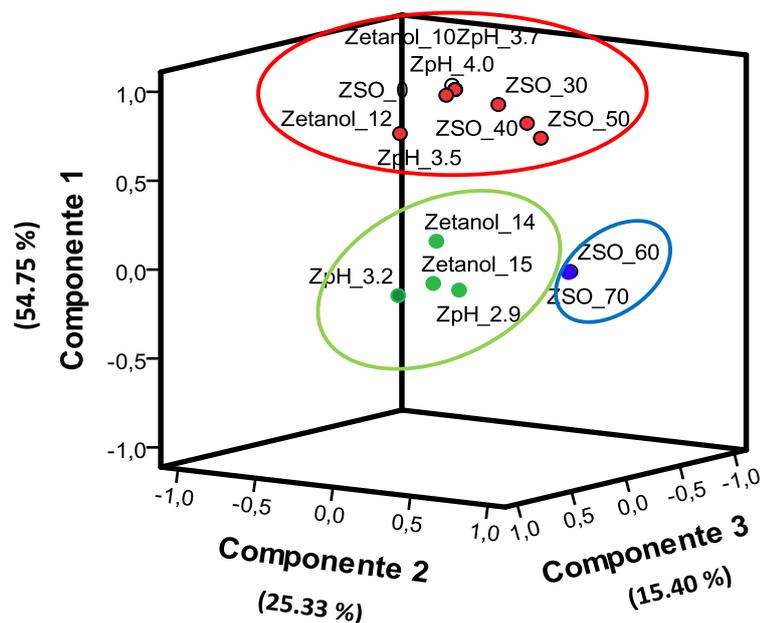


Figura 36. Resultados de APC en espacio rotado de las variables que afectan el ABC del subconjunto de los aislados de mostos

Los factores que explican la varianza de los datos de ABC en el subconjunto de aislados procedentes de vino son 2, como se puede observar en la Tabla 23. El primer componente explica un 62.52 % de la varianza total de la nube de puntos y el segundo un 23.27 %. Ambos componentes explican conjuntamente el 85.79 % de la varianza total de los valores de ABC. En la Figura 37, podemos observar que las condiciones que conforman el primer componente que explican el 62.52 % de varianza son las siguientes: los valores de pH 3.5, 3.7 y 4.0, las concentraciones de etanol 10, 12, 14, 15 % y las concentraciones de SO₂ 0, 30, 40 y 50 mg/L. Las que conforman el segundo componente que explica el 23.27 % de la varianza son: los valores de pH más bajos (2.9 y 3.2) y las concentraciones más elevadas de SO₂ (60 y 70 mg/L). En los aislados de vino el primer componente contempla concentraciones de etanol entre 10-15 %, mientras que en los de mosto sólo 10-12 %. Se observa que aislados de vino muestran mayor resistencia al etanol que los aislados de mosto que apenas crecen a 14 %.

Tabla 23. Varianza total explicada del APC de ABC del subconjunto de los aislados de vino

| Componente | Autovalores iniciales | | | Sumas de las saturaciones al cuadrado de la extracción | | | Suma de las saturaciones al cuadrado de la rotación | | |
|------------|-----------------------|------------------|-------------|--|------------------|-------------|---|------------------|-------------|
| | Total | % de la varianza | % acumulado | Total | % de la varianza | % acumulado | Total | % de la varianza | % acumulado |
| 1 | 9.378 | 62.518 | 62.518 | 9.378 | 62.518 | 62.518 | 8.901 | 59.342 | 59.342 |
| 2 | 3.490 | 23.269 | 85.787 | 3.490 | 23.269 | 85.787 | 3.967 | 26.445 | 85.787 |
| 3 | 0.664 | 4.424 | 90.211 | | | | | | |
| 4 | 0.515 | 3.431 | 93.642 | | | | | | |
| 5 | 0.294 | 1.960 | 95.602 | | | | | | |
| 6 | 0.188 | 1.255 | 96.857 | | | | | | |
| 7 | 0.135 | 0.899 | 97.756 | | | | | | |
| 8 | 0.086 | 0.575 | 98.331 | | | | | | |
| 9 | 0.078 | 0.520 | 98.851 | | | | | | |
| 10 | 0.062 | 0.413 | 99.264 | | | | | | |
| 11 | 0.052 | 0.344 | 99.608 | | | | | | |
| 12 | 0.036 | 0.239 | 99.848 | | | | | | |
| 13 | 0.023 | 0.152 | 100.000 | | | | | | |
| 14 | 0.000 | 0.000 | 100.000 | | | | | | |
| 15 | 0.000 | 0.000 | 100.000 | | | | | | |

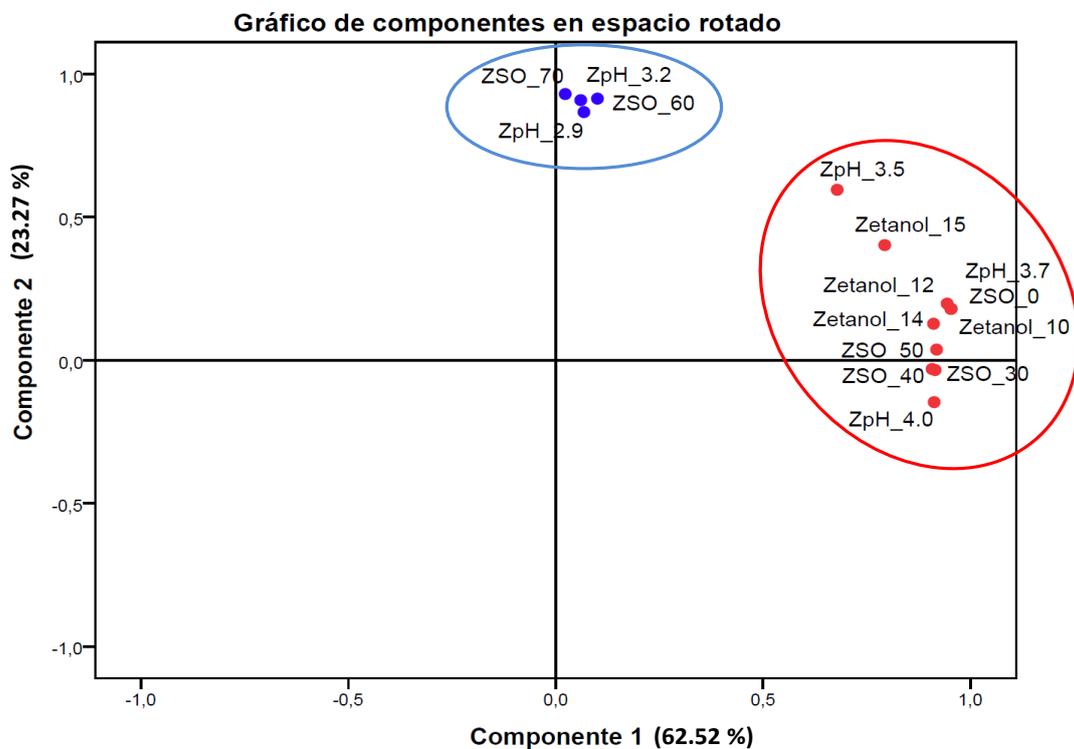


Figura 37. Resultados del ACP de las variables que afectan las ABC del subconjunto de los aislados de vino

Además, con el fin de estimar la situación relativa de cada uno de los aislados en las condiciones ensayadas, se graficó en un sistema de ejes coordenadas (XY) los valores obtenidos tras el análisis de regresión de los 2 componentes resultantes de la extracción del ACP (Figura 38). Los 2 componentes resumen y/o explican la información contenida en los valores de ABC en las 3 condiciones enológicas estudiadas (pH, etanol y SO₂) de los 104 aislados de *O. oeni*. El componente 1, como ya se ha dicho anteriormente, está formado por las ABC a diferentes concentraciones de etanol (10-15 %) y SO₂ (0-50 mg/L) y diferentes valores de pH (3.5-4.0). El componente 2 está formado por las ABC a diferentes valores de pH 2.9 y 3.2, y las concentraciones de etanol 60 y 70 mg/L.

En general los aislados más resistentes (mayores ABC) a los parámetros ensayados se han aislado de vino, pero no existen aislados que resistan igualmente bien al etanol, pH bajos y al SO₂. Ello se confirma porque en la Figura 38 hay una zona (sobreada de gris) vacía de aislados en los espacios que corresponden a valores altos del componente 1 y 2. Los aislados de mosto no alcanzan valores altos en ninguno de los 2 componentes.

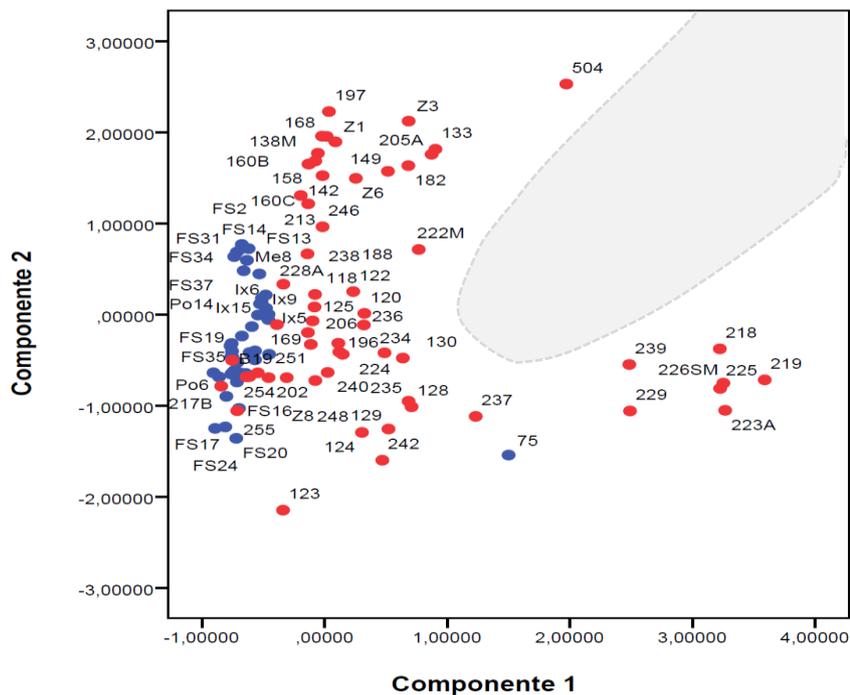


Figura 38. Representación gráfica de las 2 componente creadas por el APC que explican la variación en el crecimiento de los aislados de *O. oeni*. En azul se muestran los aislados de mosto y en rojo los de vino

Por otro lado, para valorar la consistencia de los dos componentes obtenidos tras el APC del conjunto total de los aislados, se realizó un análisis de conglomerados jerárquicos utilizando la correlación de Pearson y la media aritmética de las distancias existentes entre los valores de ABC en las diferentes condiciones ensayadas (pH, etanol y SO₂). Este análisis nos permitió identificar cuáles son las condiciones de ensayo que muestran varianzas similares, es decir grupos homogéneos. Tras el análisis de conglomerados jerárquicos de todos los aislados (Figura 39) se ha observado la existencia de 2 grupos de factores a una distancia de 14. El primer grupo está formado por los valores de pH 3.5, 3.7 y 4.0, concentraciones de etanol de 10, 12, 14, 15 % y de SO₂ de 0, 30, 40 y 50 mg/L, y el segundo grupo está formado por las concentraciones de SO₂ de 60 y 70 mg/L y los valores de pH 2.9 y 3.2. Los resultados de este análisis estadístico confirman los resultados obtenidos con el ACP (Figura 34).

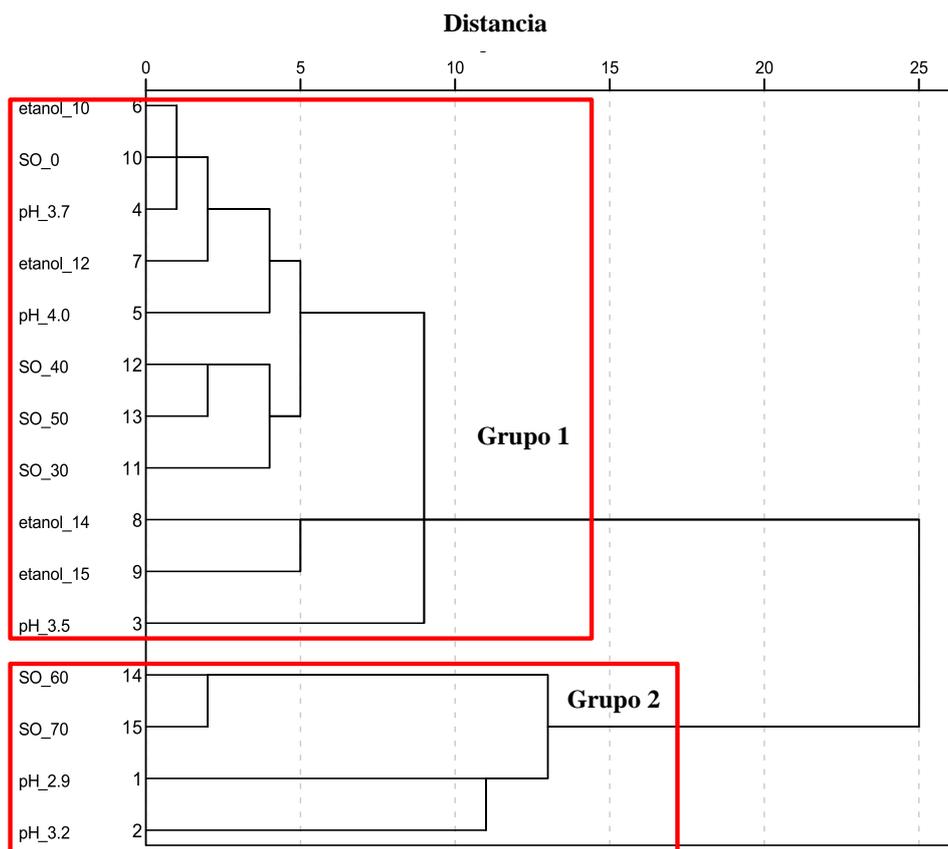


Figura 39. Dendrograma obtenido tras análisis de conglomerados jerárquicos. En él se explica la distancia de las variables enológicas ensayadas que afectan los valores de ABC de los aislados de *O. oeni*

4.4 Caracterización genómica

La caracterización genómica se llevó a cabo para complementar la caracterización fenotípica, para determinar si existían patrones genómicos propios de cepas de mosto y de vino, y para evaluar la diversidad genómica de esta especie, y para estudiar la posible existencia de relaciones entre los fenotipos y genotipos. Para ello se trabajó con el mismo conjunto de 104 aislados provenientes de diferentes zonas geográficas, diversos tipos de vino y diferentes momentos de la vinificación. Se analizó el perfil genómico mediante RAPD y VNTR, el tipo de alelo de los genes *rpoB* y *rpoC* y la presencia o ausencia de determinados genes marcadores relacionados con el estrés.

4.4.1 Tipificación de aislados de *O. oeni* mediante RAPD y VNTR

Se pretendía establecer cuál de los dos métodos evidenciaba mejor la diversidad genotípica y por tanto podría mostrar de forma más realista la existencia de diversas cepas entre los 104 aislados del trabajo. Para ello se analizaron aspectos como la reproducibilidad, el poder discriminante y la tipabilidad de cada uno de los 2 métodos. La técnica RAPD agrupó los 104 aislados en 62 grupos, a un nivel de corte de 96.6 % de similitud (Figura 40). Este nivel de corte es el valor más bajo de la reproducibilidad. De estos 62 grupos, 43 grupos presentaron un único aislado como representante y los 19 restantes, presentaron 2 o más aislados. El coeficiente de correlación cofenético fue del 74 %. La reproducibilidad de los perfiles de bandas obtenidos mediante RAPD fue estimada utilizando el promedio del valor de similaridad de todos los aislados analizados 2 veces (10 analizados) y fue de 98.1 ± 0.5 %. El poder discriminante fue de 0.98. La tipabilidad fue del 100 %. La técnica de los VNTR agrupó los aislados en 36 grupos, con un nivel de corte de 95.7 % de similitud (Figura 41). Este nivel de corte es el valor más bajo de la reproducibilidad. De ellos, 21 grupos presentaron un único aislado como representante y los 15 restantes presentaron 2 o más aislados. El coeficiente de correlación cofenético fue del 83 %. La reproducibilidad de los perfiles de bandas obtenidos mediante VNTR fue estimada utilizando el promedio del valor de similaridad de todos los pares de los duplicados y fue de 95.5 ± 2.3 %. El poder discriminante fue de 0.90. La tipabilidad fue del 100 %. El análisis combinado de los perfiles de bandas obtenidos mediante RAPD y VNTR, agrupó a los 104 aislados en 88 grupos a un nivel de corte de 97.5 % (Figura 42) de los cuales 78 presentaban un único aislado como representante y los 10 restantes 2 o más aislados. El coeficiente de correlación cofenético fue del 76 %.

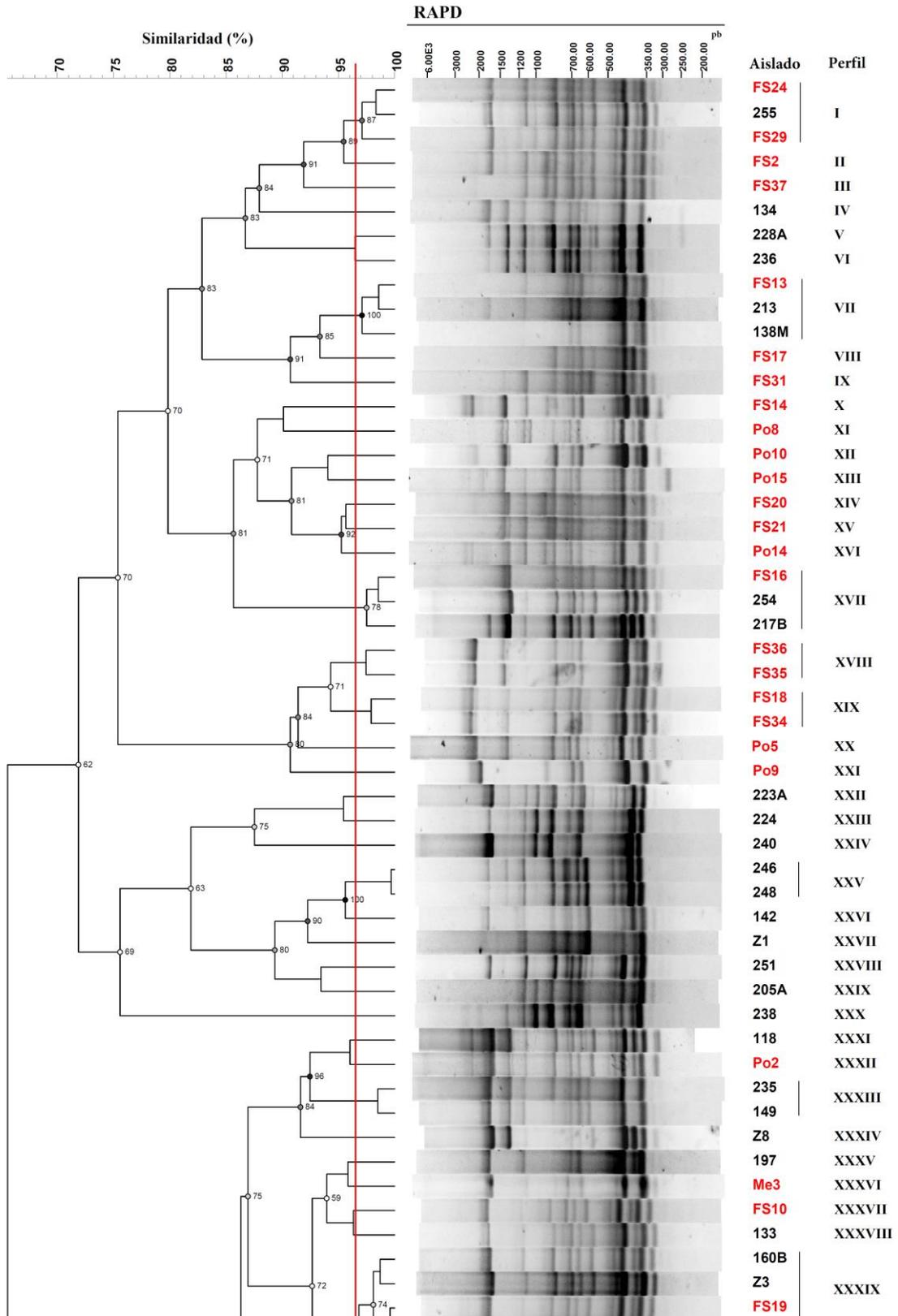


Figura 40. Dendrograma de similaridad construido a partir de los perfiles de RAPD de 104 aislados de *O. oeni*, agrupados por el método UPGMA, utilizando el coeficiente de Pearson, un valor de optimización de 1 y 2.5 % de tolerancia. La línea vertical roja indica el nivel de corte que discrimina entre perfiles diferentes o iguales y que es 96.6 %

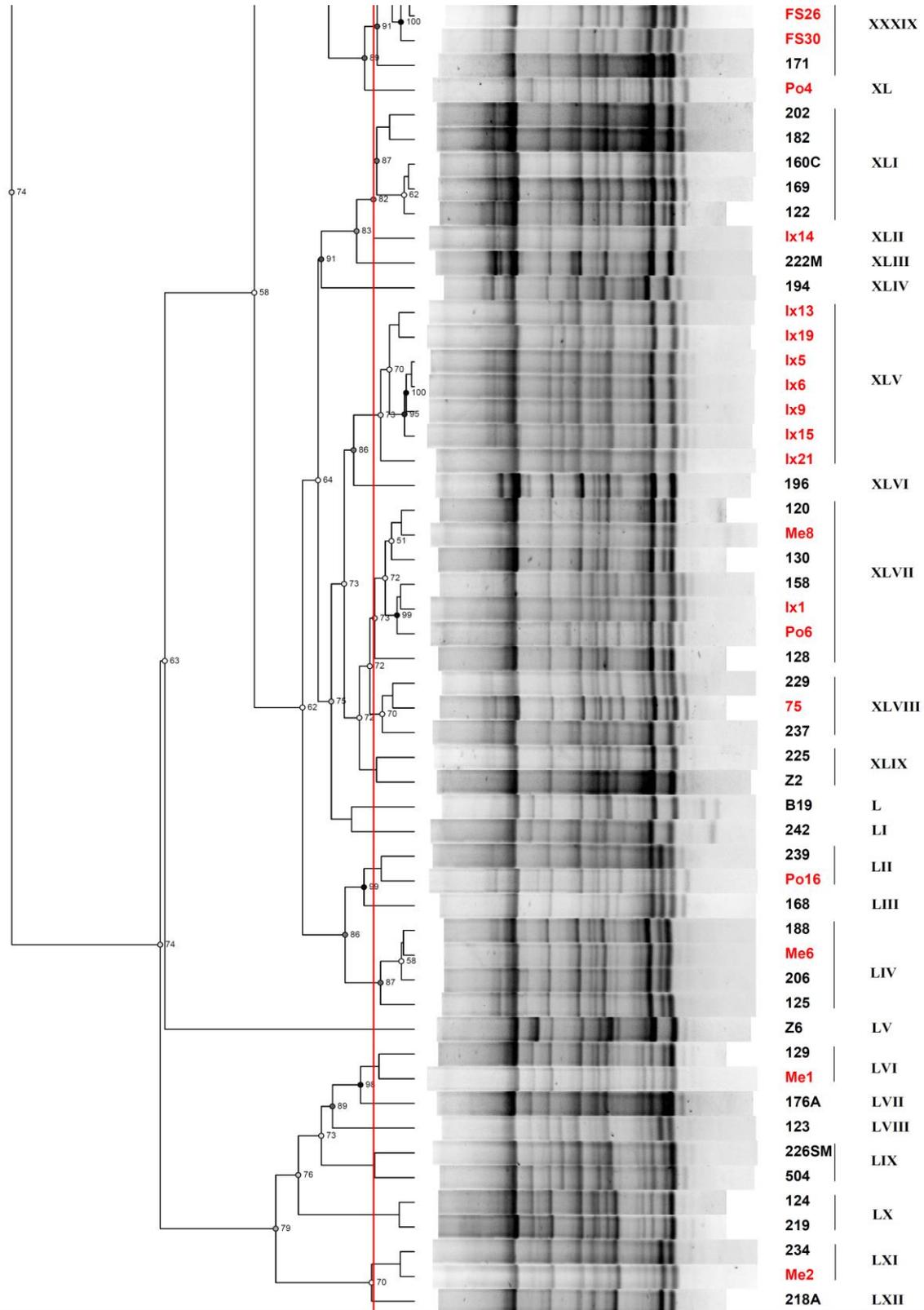


Figura 40. Continuación...

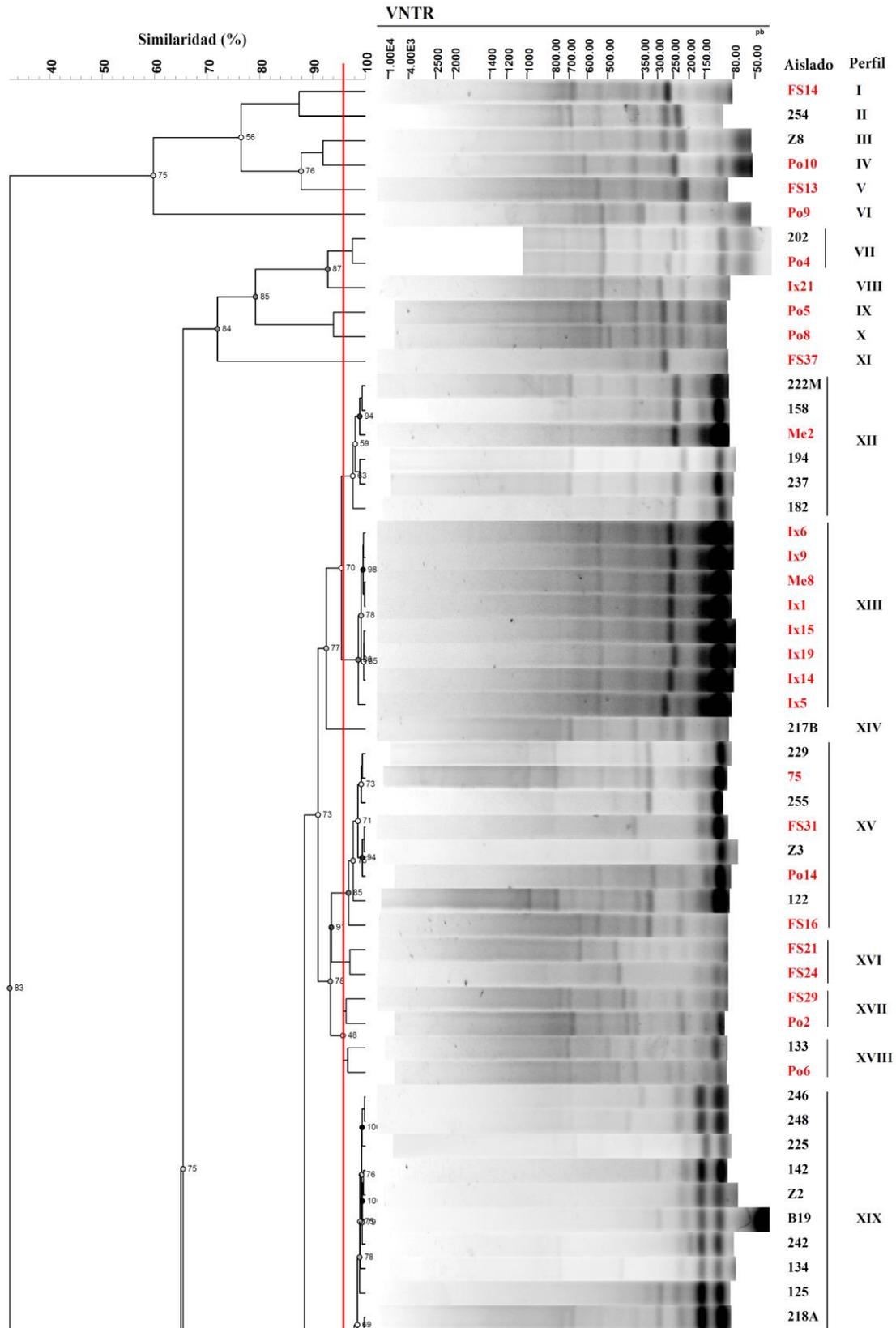


Figura 41. Dendrograma de similitud construido a partir de los perfiles de VNTR de 104 aislados de *O. oeni*, agrupados por el método UPGMA, utilizando el coeficiente de Pearson, un valor de optimización de 1 y 2.5 % de tolerancia. La línea vertical roja indica el nivel de corte que discrimina entre perfiles diferentes o iguales y que es 95.7 %

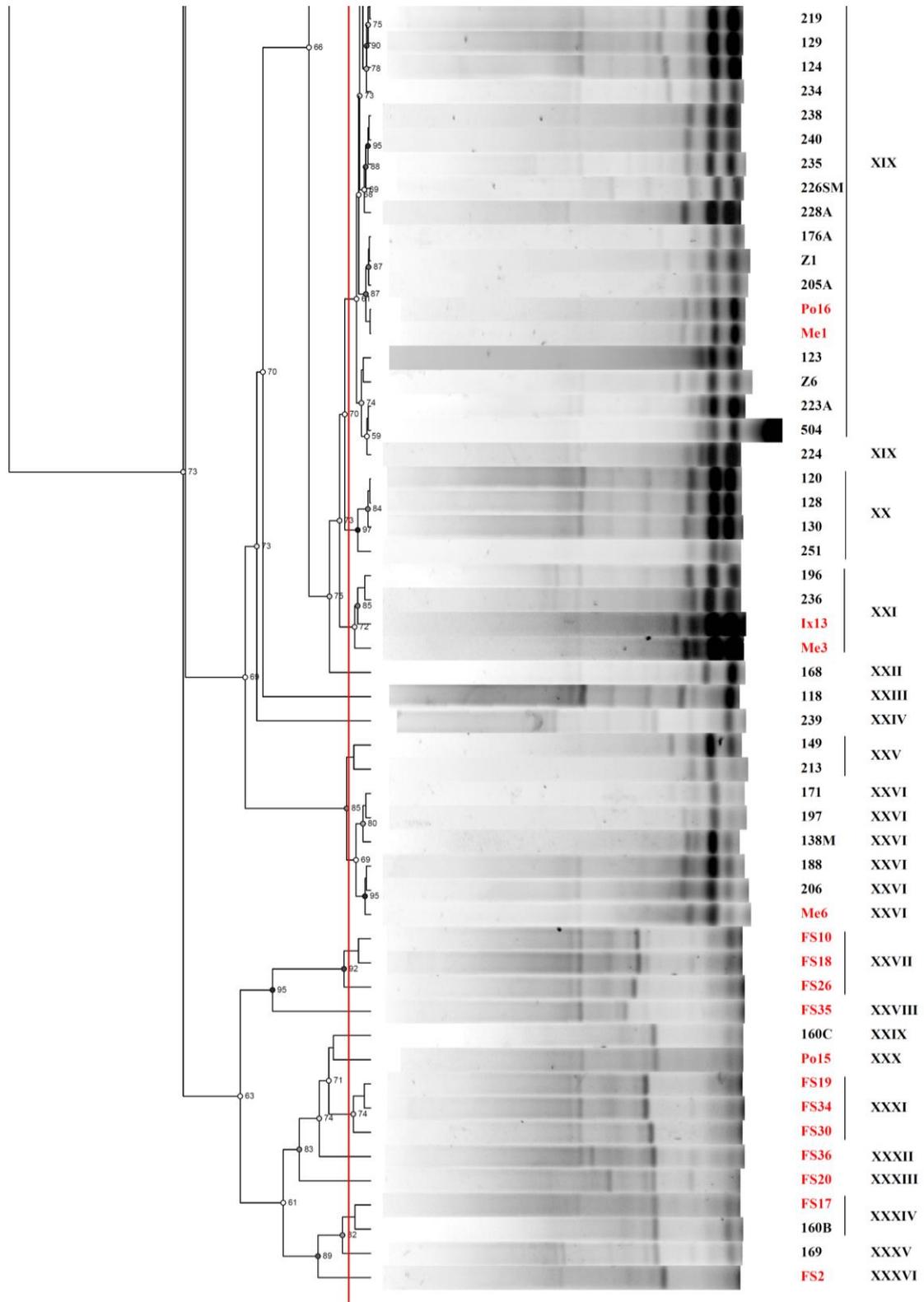


Figura 41. Continuación...

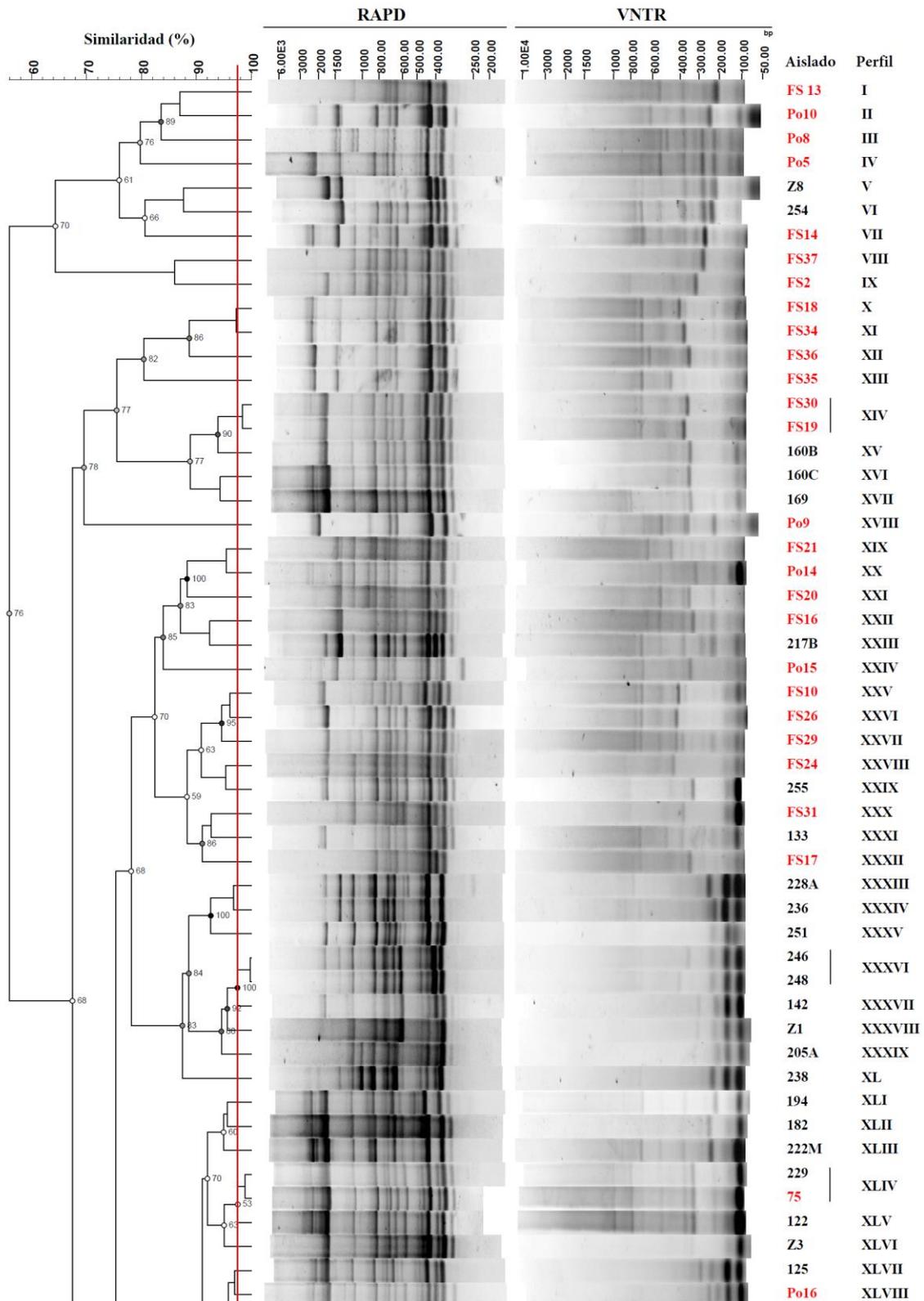


Figura 42. Dendrograma de similaridad construido a partir de los perfiles combinados de RAPD y VNTR de 104 aislados de *O. oeni*, agrupados por el método UPGMA, utilizando el coeficiente de Pearson, un valor de optimización de 1 y 2.5 % de tolerancia. La línea vertical roja indica el nivel de corte que discrimina entre perfiles diferentes o iguales y que es 97.5 %

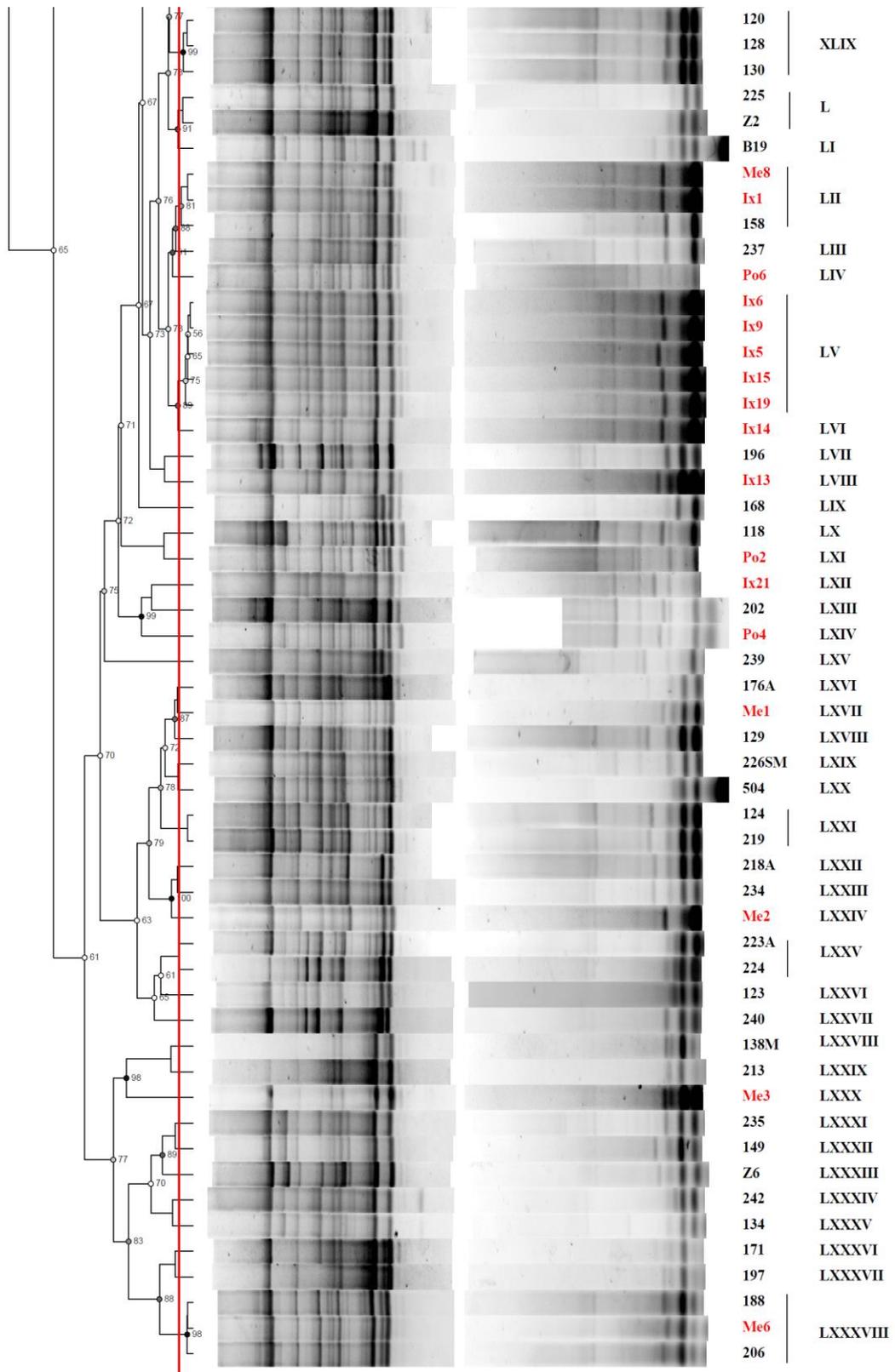


Figura 42. Continuación...

El conjunto de las 2 técnicas RAPD-VNTR mostró un poder discriminante de 0.995, lo cual demostró la existencia de una alta diversidad intraespecífica entre los perfiles generados de las técnicas RAPD-VNTR, teniendo en cuenta que el máximo valor del índice de diversidad es 1 (Hunter y Gastón 1988).

La congruencia, proporciona información de la direccionalidad de un conjunto de datos (perfiles de bandas) obtenidos por 2 métodos diferentes (A y B) (técnicas diferentes), es decir que la probabilidad de que dos individuos (aislados) sean clasificados juntos utilizando el método A y el método B (Severiano y col., 2011).

La congruencia entre los resultados obtenidos a partir de cada técnica individual y combinada se muestra en la Figura 43. El grado de concordancia entre las técnicas RAPD y VNTR fue del 15.3 %. La congruencia entre RAPD y el análisis combinado RAPD-VNTR fue del 62.3 %, mientras que la congruencia entre las técnicas VNTR y RAPD-VNTR fue del 86.7 %. De ello se deduce que el análisis VNTR es más congruente que el RAPD respecto al análisis global de los aislados de *O. oeni*.

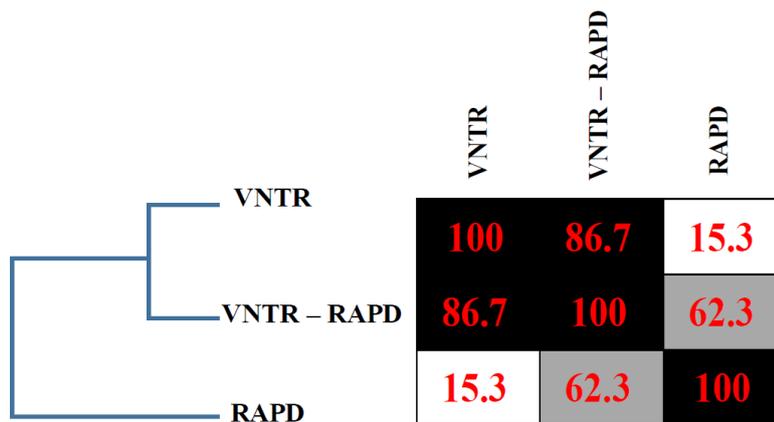


Figura 43. Resultados obtenidos tras el análisis de la congruencia de los resultados obtenidos por las técnicas RAPD y VNTR y RAPD/VNTR

Cuando se representaron gráficamente las correlaciones entre los perfiles de bandas de cada aislado obtenidos con RAPD y VNTR se observó una gran dispersión de puntos y que la correlación entre estas dos técnicas fue baja $r = 37.6 \%$ (Figura 44).

Sin embargo, cuando se comparó cada una de las técnicas de tipificación individual con el análisis global RAPD-VNTR, se observó una menor dispersión de los datos, ya que éstos se agrupan alrededor de la bisectriz y valores de r entre RAPD y RAPD-VNTR menores (72.9 %) (Figura 45) que entre VNTR y RAPD-VNTR (81.5 %) (Figura 46).

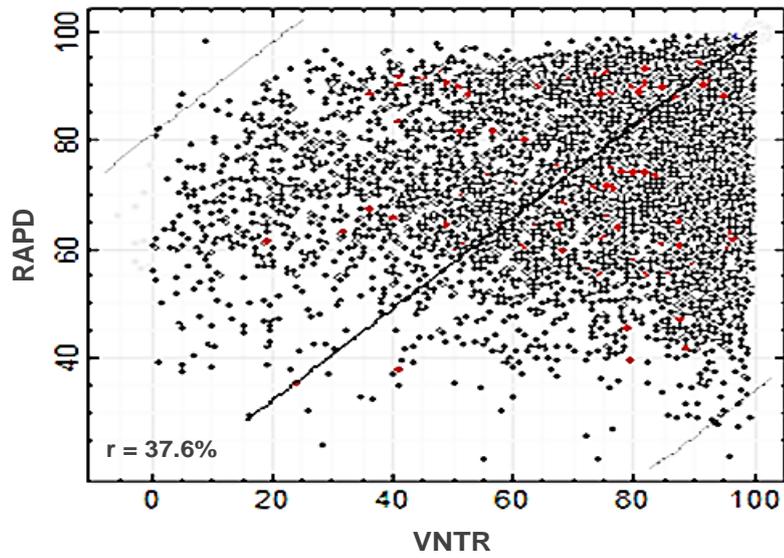


Figura 44. Distribución de las correlaciones entre los perfiles de bandas obtenidas para cada aislado mediante las técnicas RAPD y VNTR

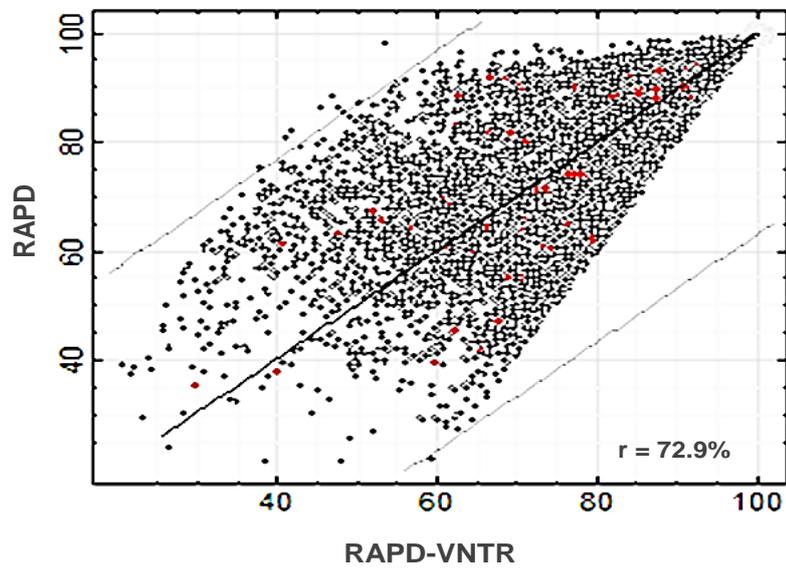


Figura 45. Distribución de las correlaciones entre los perfiles de bandas obtenidas para cada aislado mediante las técnicas RAPD y el análisis global RAPD-VNTR.

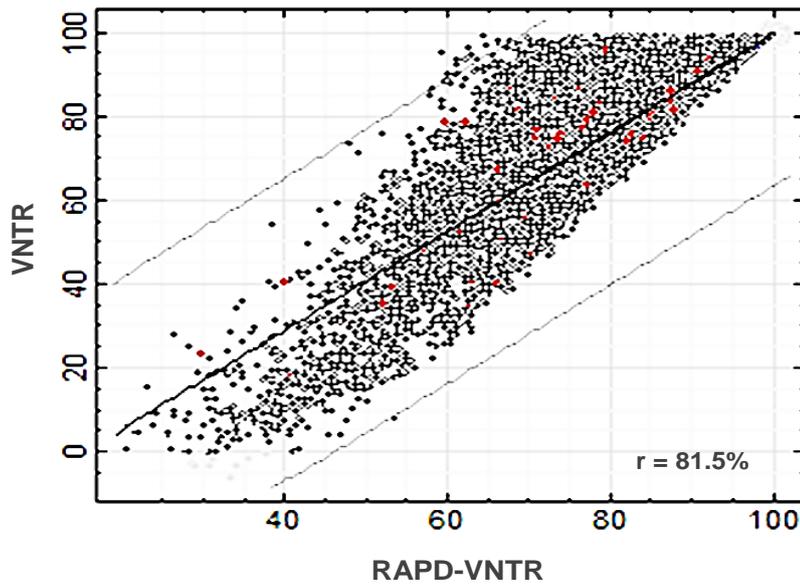


Figura 46. Distribución de las correlaciones entre los perfiles de bandas obtenidas para cada aislado mediante las técnicas VNTR y el análisis global RAPD-VNTR.

Esto significa que las relaciones de similitud entre las parejas de aislados en base al análisis congruente VNTR-RAPD y RAPD o VNTR son más parecidas que las que se obtienen en base al análisis de cada técnica por separado.

Además, la información más completa a la hora de la caracterización molecular de cada aislado se obtiene combinando ambas técnicas. Por ello, el perfil combinado se utilizó para determinar el número de cepas diferentes entre los aislados. En base a este perfil de bandas combinado, se determinó la existencia de 88 perfiles genéticos diferentes (Figura 42) que se corresponderían a 88 “cepas” diferentes. Se entrecomilla el término cepa en este caso porque la igualdad de los perfiles de bandas no tiene por qué suponer la igualdad genética total ni la igualdad fenotípica, de manera que el término cepa *sensu stricto* se reserva para el aislado o conjunto de aislados que exhiban iguales perfiles fenotípicos y genómicos y es ese análisis conjunto el que permitirá una estimación real de la biodiversidad.

Tanto la técnica RAPD como los VNTR han sido utilizadas por varios autores tanto para la tipificación de cepas como para la evaluación de la diversidad genómica intraespecífica existente en *O. oeni*. En este sentido Zapparoli y col. (2000), Bartowsky

y col. (2003), Reguant y Bordons (2003), Lechiancole y col. (2006), Solieri y col (2010) y Marques y col. (2011) entre otros, han utilizado la primera de estas técnicas para estimar la diversidad genómica existente en determinados conjuntos de cepas aisladas de diferentes vinos. Los resultados obtenidos por estos autores variaban en función de, a) el tamaño del grupo muestral, b) la diversidad de orígenes de las cepas (diferentes vinos, diferentes bodegas, diferentes vendimias), c) el tipo y número de cebadores aleatorios utilizados y d) el tipo de análisis aplicado a los resultados. En general, cuanto mayor es el número de aislados analizados, más diversos son los orígenes de los vinos muestreados, mayor el número de cebadores utilizados y mayor el número de tipos diferentes de perfiles RAPD analizados conjuntamente, mayor diversidad se ponía de manifiesto.

Así, Bartowsky y col. (2003) encontraron diversidades genómicas diferentes al analizar 17 aislados de *O. oeni* mediante RAPD. Estos autores utilizando 4 cebadores aleatorios diferentes encontraron que el análisis individualizado o conjunto de los perfiles obtenidos con cada cebador daban diferentes estimaciones de la diversidad. Así, si se estimaba esta diversidad considerando los perfiles individuales, se obtenía un número de perfiles diferentes que variaba entre 6 y 8, mientras que si se contemplaban conjuntamente todos los perfiles, este número aumentaba hasta 10, es decir, la diversidad era mayor con este último tipo de análisis. Zapparoli y col. (2000) también encontraron una elevada diversidad genómica intraespecífica en un conjunto de aislados de *O. oeni* de diferentes vinos italianos y españoles al analizar de forma conjunta los cuatro perfiles RAPD obtenidos con los cebadores COC, 1283, M13 y M14. Con esta forma de proceder, encontraron 54 perfiles genómicos diferentes a partir de 60 aislados. Sin embargo, Solieri y col (2010), Marques y col. (2011) y Reguant y Bordons (2003) estimaron que la diversidad genómica del conjunto de cepas que ellos analizaron era mucho menor que la encontrada por los anteriores autores, y eso, a pesar de que analizaron un número mayor de aislados 120, 121 y 800, respectivamente. En los tres casos, únicamente se tuvo en cuenta un único tipo de perfil de bandas para la estimación de la diversidad, el que se deriva de la utilización del cebador M13, en el caso de Solieri y col. y Marques y col. (2011) o el que se deriva de la utilización de dos cebadores (Coc y On2) utilizados en una PCR multiplex en el caso de Reguant y Bordons (2003). Solieri y col. (2010) encontraron 40 perfiles genómicos diferentes entre sus 120 aislados, Marques y col. (2011) 49 entre 121, y Reguant y Bordons (2003), tan solo 32 entre 800. En nuestro trabajo se encontró una mayor diversidad genómica (0.98) que la

encontrada por otros autores que utilizaron el mismo cebador (M13) para tipificar *O. oeni* ya que se discriminaron 62 perfiles entre los 104 aislados analizados. Por ello, la estimación de la diversidad genómica en nuestros aislados fue mayor que la encontrada por Solieri y col. (2010) y Marques y col. (2011), 0.88 y 0.93, respectivamente.

Claisse y col. (2012) abordaron la caracterización molecular de un conjunto de 236 aislados de *O. oeni* mediante la técnica de VNTR. Estos autores utilizaron 5 parejas de cebadores distintas que amplificaban los locus TR1, TR2, TR3, TR4 y TR5. Como en el caso del trabajo de Bartowsky y col. (2003) con los RAPD, Claisse y col. encontraron que la diversidad genómica obtenida del análisis individual de cada perfil de VNTR era inferior (índices de discriminación entre 0.554 y 0.969) a la que se obtenía con el análisis conjunto de los 5 tipos de perfiles (0.994). En esta tesis en lugar de utilizar 5 cebadores distintos para generar 5 tipos de perfiles distintos, se añadieron todos juntos en una única reacción de PCR, por lo que se obtuvo un único tipo de perfil de bandas para cada cepa, en lugar de 5. Ello supuso que el índice de diversidad que se calculó para nuestro conjunto de cepas fuese inferior (0.90) al que obtuvieron Claisse y col. (2012) con su forma de proceder.

Una aproximación parecida a la que han utilizado Zapparoli y col. (2000) y Claisse y col. (2012), y que consistía en analizar globalmente los varios tipos de perfiles conseguidos por RAPD o por VNTR, la han seguido otros autores para caracterizar los aislados de *O. oeni*, pero utilizando dos técnicas de tipificación diferentes. Así, Ruiz y col. (2008) observaron que la diversidad genómica intraespecífica de un grupo de aislados de *O. oeni* aumentaba si se analizaban conjuntamente los perfiles de RAPD y los de PFGE. El análisis de los perfiles RAPD discriminó 20 perfiles diferentes, el de los perfiles PFGE 10 y el análisis conjunto de ambos tipos de perfiles 31. Lo mismo se deduce del trabajo de González-Arenzana y col. (2014) y del que se presenta en esta tesis, ya que los resultados obtenidos con el grupo de nuestros 104 aislados se ha calculado un índice de discriminación de 0.98 en base al análisis de los perfiles de RAPD únicamente, uno de 0.90 en base al de los VNTR y un 0.995 cuando se analizaban conjuntamente ambos tipos de perfiles.

4.4.2 Secuenciación de los genes *rpoB* y *rpoC*

Se analizaron las secuencias de estos genes para determinar si existían secuencias exclusivas de cepas aisladas bien de fases tempranas de la vinificación (mosto) o bien de tardías (vino), tal como había sido postulado por Renouf y col. (2009). Se analizaron los aislados de uno y otro grupo excepto los aislados 160B, 168, 202 y FS14.

Las amplificaciones con los cebadores dirigidos a los genes *rpoB* y *rpoC* dieron lugar a fragmentos de amplificación de alrededor de 400 y 500 pb, respectivamente (Figura 47).

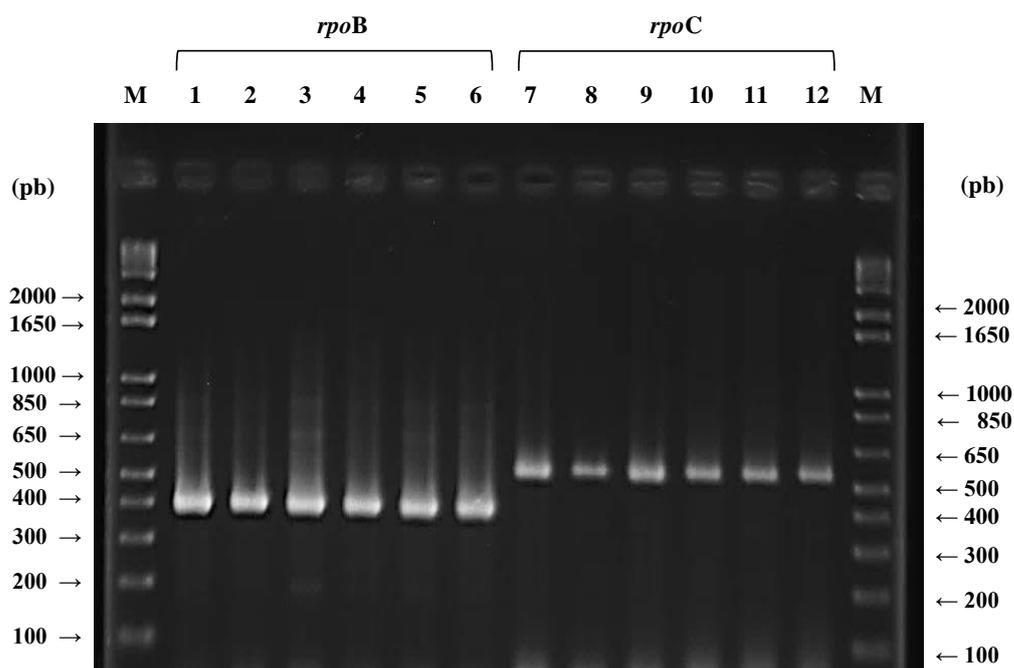


Figura 47. Resultado de las amplificaciones de los genes *rpoB* y *rpoC* de diferentes aislados de *O. oeni*. M: Marcador de peso molecular 1kB plus; pb: pares de bases. Gen *rpoB* (carreras 1-6): carrera 1: aislado 118; carrera 2: aislado 120; carrera 3: aislado 122; carrera 4: aislado 123; carrera 5: aislado 124; carrera 6: aislado 125. Gen *rpoC* (carreras 7-12) carrera 7: aislado 118; carrera 8: aislado 120; carrera 9: aislado 122; carrera 10: aislado 123; carrera 11: aislado 124; carrera 12: aislado 125

La secuenciación del gen *rpoB* reveló la presencia de 6 tipos de alelos, 2 de ellos correspondían a los alelos H y L ya descritos previamente por Renouf y col. (2009), mientras que los otros 4 correspondían a nuevos alelos a los que se denominó I, II, III y IV. Estos alelos se describen en este trabajo por primera vez y han sido obtenidos con cebadores diferentes a los utilizados por Renouf y col. (2009). La distribución de estos 6 alelos en un subconjunto de los 100 aislados se muestra en la Tabla 24. Las diferencias entre los alelos del gen *rpoB* residen en el tipo de nucleótido presente en las posiciones: 1254, 1281, 1284, 1291, 1323, 1350, 1384 y 1385 del gen (Tabla 25). El

alelo más frecuente del gen *rpoB* en el conjunto de los 100 aislados analizados es el L, presente en el 63 % de los aislados ensayados.

La aplicación de la prueba del Chi cuadrado ha demostrado que existe una asociación estadísticamente significativa, a un nivel de significación de 0.05, entre el tipo de alelo y la fase de aislamiento de los aislados en los casos de los 2 alelos mayoritarios. El alelo L del gen *rpoB* está asociado significativamente a los aislados de mosto (aunque existe una cantidad importante de aislados de vino que presentan este alelo) y el alelo H está asociado de igual manera a los aislados de vino. Los alelos minoritarios I, II, III y IV se asocian significativamente a los aislados de mosto, la única excepción a esta relación la constituye el aislado 123 que presenta el alelo I. La hipótesis de Renouf no se cumple de forma absoluta. Es cierto que existe una tendencia (especialmente para el alelo H, pero poco para el alelo L), pero no más. Hay otros alelos más (I-IV), y pueden haber muchos más.

Tabla 24. Distribución de los alelos del gen *rpoB* encontrados en los aislados de *O. oeni*. En rojo se muestran los aislados de mosto y en negro los de vino. Entre paréntesis el número total de aislados de vino y mosto que presentan un determinado alelo

| Alelo | Aislado |
|---------------------|---|
| L (29/34) | 75, 118, 120, 133, 134, 149, 158, 160C, 169, 176A, 182, 194, 196, 213, 217B, 222M, 228A, 229, 235, 236, 237, 238, 239, 242, 251, 255, Z3, Z6, Z8, B19, FS2, FS10, FS13, FS16, FS17, FS18, FS19, FS20, FS21, FS24, FS26, FS29, FS30, FS31, FS34, FS36, FS37, Ix1, Ix5, Ix6, Ix9, Ix13, Ix14, Ix15, Ix19, Ix21, Po2, Po4, Po5, Po6, Po14, Po15, Po16 |
| H (27/4) | 122, 124, 125, 128, 129, 130, 138M, 142, 171, 188, 197, 205A, 206, 218A, 219, 223A, 224, 225, 226SM, 234, 240, 246, 248, 254, 504, Z1, Z2, Me1, Me2, Me6, Me8 |
| I (1/1) | 123, Me3 |
| II (1) | Po8 |
| III (1) | Po9 |
| IV (2) | Po10, FS35 |

Tabla 25. Alelos del gen *rpoB* encontrados en los aislados de *O. oeni*. En negrita se muestran los alelos detectados en este trabajo

| Posición y tipo de nucleótido en el gen <i>rpoB</i> | | | | | | | | Alelo |
|---|------|------|------|------|------|------|------|------------|
| 1254 | 1281 | 1284 | 1291 | 1323 | 1350 | 1384 | 1385 | |
| C | T | C | C | G | G | G | C | L |
| C | T | C | C | G | G | A | C | H |
| C | T | C | C | G | G | G | T | I |
| T | C | T | C | A | A | G | C | II |
| C | C | T | A | A | A | G | C | III |
| C | C | T | C | A | A | G | C | IV |

Así mismo, Renouf y col. (2009) observó que las cepas L (alelo L del gen *rpoB*) y las cepas H (alelo H del gen *rpoB*) presentaban diferencias nucleotídicas en el gen *rpoC*. Cuatro alelos en la parte 1 del gen (3 alelos en las cepas L y 1 en las H) y 3 alelos en la parte 2 del gen (2 alelos en las cepas L y 1 en las H). Por ello, para clarificar proponemos utilizar el término H_c para indicar la combinación alélica que se muestra en la Tabla 26 y a partir de este momento lo llamamos así.

La secuenciación del fragmento *rpoC* ha puesto en evidencia la existencia de 8 alelos diferentes de los cuales solamente uno de ellos (el H_c) ya había sido descrito por Renouf y col. (2009) mientras que los otros 7 eran nuevos, descritos aquí por primera vez, y se les denominó 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7 (Tabla 27). Las diferencias encontradas entre los distintos alelos del gen *rpoC* están en las posiciones 1136, 1107, 1125, 1176, 1180, 1193, 1245, 1311, 1314 y 1317 del gen (Tabla 26). El alelo más frecuente del gen *rpoC* en el conjunto de los 100 aislados analizados es el alelo H_c , que está presente en el 58 % de los aislados estudiados.

La aplicación de la prueba del Chi cuadrado ha demostrado que existe una asociación estadísticamente significativa, a un nivel de significación de 0.05, entre el tipo de alelo y la fase de aislamiento de los aislados en los casos de alelos mayoritarios. Así, el alelo H_c está asociado significativamente a aislados de vino y el alelo 1 está asociado a los aislados de mosto, aunque hay algunas excepciones. Los alelos más infrecuentes 2, 3, 4, 5, 6 y 7 se asocian fundamentalmente a los aislados de mosto.

Tabla 26. Alelos del gen *rpoC* encontrados en los aislados de *O. oeni*. En negrita se muestran los alelos detectados en este trabajo

| Posición y tipo de nucleótido en el gen <i>rpoC</i> | | | | | | | | | | Alelo |
|---|------|------|------|------|------|------|------|------|------|----------------|
| 1036 | 1107 | 1125 | 1176 | 1180 | 1193 | 1245 | 1311 | 1314 | 1317 | |
| T | G | A | C | C | G | A | A | C | C | H _c |
| A | G | A | T | C | G | G | A | C | T | 1 |
| A | G | A | C | T | G | A | A | C | C | 2 |
| A | G | A | C | C | G | A | A | T | C | 3 |
| A | G | A | T | C | A | G | A | C | T | 4 |
| A | G | C | T | C | G | G | A | C | T | 5 |
| A | G | A | C | C | G | A | A | C | C | 6 |
| A | G | C | C | C | G | A | A | C | C | 7 |

Tabla 27. Distribución de los alelos del gen *rpoC* encontrados en los aislados de *O. oeni*. En rojo se muestran los aislados de mosto y en negro los de vino. Entre paréntesis el número total de aislados de vino y mosto que presentan un determinado alelo

| Alelo | Aislado |
|--|---|
| H_c (44/14) | 120, 122, 124, 125, 128, 129, 130, 133, 134, 138M, 149, 160C, 169, 171, 182, 188, 194, 196, 197, 205A, 206, 213, 218A, 219, 222M, 223A, 224, 225, 226SM, 228A, 229, 234, 235, 236, 237, 242, 246, 248, 251, Z1, Z2, Z3, Z6, Z8, Ix1, Ix5, Ix9, Ix13, Ix14, Ix15, Ix19, Ix21, Me1, Me2, Me3, Me6, Me8 |
| 1 (9/20) | 75, 118, 158, 176A, 217B, 238, 239, 254, 255, B19, FS2, FS13, FS17, FS19, FS20, FS21, FS24, FS26, FS29, FS35, FS36, Po4, Po5, Po6, Po8, Po9, Po10, Po14, Po16 |
| 2 (1) | 123 |
| 3 (1) | 240 |
| 4 (4) | Po15, FS18, FS30, FS34 |
| 5 (3) | Po2, FS10, FS37 |
| 6 (1) | 142 |
| 7 (2/1) | FS16, FS31, 504 |

Sin embargo, estos alelos también están presentes en algunos aislados procedentes de vino 123, 240, 142 y 504. En el caso de los alelos mayoritarios del gen *rpoC*, el H_c, el 73 % de los aislados que lo presentan proceden de vino; sin embargo, también presentaban este alelo un 32 % de los aislados procedentes de mosto.

Los resultados obtenidos de la secuenciación parcial de los genes *rpoB* y *rpoC* muestran que existe una diversidad de alelos superior a la descrita por otros autores. Según nuestros datos, ambos alelos (alelo L o H del gen *rpoB*) están presentes en aislados de cualquier momento de la vinificación. Estos resultados difieren de los obtenidos por Renouf y col. (2009) quienes indicaban que las cepas procedentes de estadios tardíos de vinificación presentan exclusivamente el alelo H del gen *rpoB* y son más resistentes al etanol y al SO₂, que cepas de estadios tempranos tienen el alelo L.

Esta relación entre tipo de alelo y resistencia a estas condiciones enológicas no se ha observado en nuestros aislados ni otros autores (Bordons, comunicación personal). García-Ruíz y col. (2013) también encontraron los alelos H y L del gen *rpoB* en 66 cepas de *O. oeni*. Sesenta y tres de ellas presentaban el alelo L y las 3 restantes el alelo H, estas últimas cepas procedían de vinos inoculados con cultivos malolácticos comerciales, mientras que las que presentaban el alelo L procedían de vinos que habían realizado la FML de forma espontánea o de vinos que contenían extractos fenólicos. Estos datos tampoco apoyan la hipótesis de Renouf y col. (2009).

4.4.3 Determinación de la presencia de marcadores moleculares

Se analizaron 80 aislados procedentes tanto de mosto como de vino para determinar si poseían los genes marcadores M1-M16 descritos en la Tabla 5 y ver si existía una distribución diferente de los mismos en aislados o cepas que provenían de diferentes momentos de la vinificación. Los resultados de las amplificaciones de estos genes marcadores mostraron que tanto el número como el tipo de estos marcadores variaban entre los aislados. Así, algunos aislados presentaban tan solo 2, mientras que otros presentaban los 16 marcadores (Tabla 28).

El marcador M11 que codifica para una proteína implicada en la exportación de arabinosa MFS es el que se presenta en mayor número de aislados, está en el 95 % de los aislados, seguido por los marcadores M14 y M9 que codifican respectivamente para una permeasa de la arabinosa eZux y una deshidrogenasa de azúcares-alcoholes, presentándose ambos con frecuencias del 93 y 91 %, respectivamente.

Tabla 28. Perfiles de distribución de marcadores moleculares, en un subconjunto de 80 aislados de *O. oeni*. En rojo se muestran los aislados de mosto y en negro los de vino

| Perfil | Aislado | Nº Marc. | Tipos de Marcadores moleculares |
|--------|-------------------------------------|----------|---|
| 1 | 138M, 197 | 16 | M1-M16 |
| 2 | 122, 237 | 15 | M2, M3, M4, M5, M6, M7, M8, M9, M10, M11, M12, M13, M14, M15, M16 |
| 3 | Me1, Me6 | 14 | M2, M3, M5, M6, M7, M8, M9, M10, M11, M12, M13, M14, M15, M16 |
| 4 | 125 | 14 | M2, M3, M4, M5, M6, M7, M8, M9, M10, M11, M13, M14, M15, M16 |
| 5 | Me8 | 14 | M2, M3, M4, M5, M6, M7, M8, M9, M11, M12, M13, M14, M15, M16 |
| 6 | 120 | 10 | M7, M8, M9, M10, M11, M12, M13, M14, M15, M16 |
| 7 | Z2 | 9 | M3, M7, M8, M9, M11, M13, M14, M15, M16 |
| 8 | 124, 188, 206 | 8 | M3, M4, M7, M8, M9, M11, M14, M15 |
| 9 | Po9 | 7 | M3, M4, M8, M9, M11, M14, M15 |
| 10 | 129, 130, 149, 218A, 223A, 235, Me2 | 7 | M3, M7, M8, M9, M11, M14, M15 |
| 11 | 219, 226SM | 7 | M4, M7, M8, M9, M11, M14, M15 |
| 12 | 168 | 7 | M8, M9, M11, M13, M14, M15, M16 |
| 13 | 504 | 6 | M3, M7, M8, M11, M14, M15 |
| 14 | Po5, Po10, Po14, FS16, FS31 | 6 | M3, M8, M9, M11, M14, M15 |
| 15 | 128 | 6 | M8, M9, M11, M12, M13, M14 |
| 16 | Ix21 | 6 | M5, M8, M9, M10, M11, M14 |
| 17 | 142, 234 | 6 | M7, M8, M9, M11, M14, M15 |
| 18 | 123 | 5 | M2, M5, M8, M9, M11 |
| 19 | 213 | 5 | M3, M4, M8, M14, M15 |
| 20 | FS13, FS14, FS20, FS21, FS35, Po15 | 5 | M3, M9, M11, M14, M15 |
| 21 | FS17 | 5 | M3, M8, M11, M14, M15 |
| 22 | 133, 239, Ix14 | 5 | M7, M8, M9, M11, M14 |
| 23 | FS24 | 5 | M8, M9, M11, M14, M15 |
| 24 | FS19 | 5 | M8, M9, M11, M12, M14 |
| 25 | FS36 | 4 | M3, M9, M11, M14 |
| 26 | 225 | 4 | M4, M7, M11, M15 |

| | | | |
|----|---|---|------------------|
| 27 | 75, 118, 158, 160B, 160C, 182, 229, FS2, FS10, FS30, FS37, Ix1, Ix5, Ix6, Ix9, Ix13, Ix15, Ix19, Me3, Po16, 75, Po4, Po6 | 4 | M8, M9, M11, M14 |
| 28 | 242, B19 | 3 | M3, M7, M15 |
| 29 | Po2 | 3 | M8, M9, M11 |
| 30 | FS18, FS26, FS29, FS34 | 3 | M9, M11, M14 |
| 31 | Po8 | 2 | M3, M15 |

M1: ATPasa tipo p transportadora de cadmio; M2: Ferritina DPS; M3: Proteína exportadora implicada en la biosíntesis de polisacáridos; M4: Maltosa fosforilasa; M5 y M7: Reguladores transcripcionales; M6: proteína con dominio de transportador pero de función desconocida en *Lb. plantarum* (DUF 1694); M8: Proteína hipotética; M9: Deshidrogenasa de azúcar-alcohol; M10: Chaperona de cobre; M11: Proteína MFS de arabinosa eZux; M12: Tiorredoxina; M13: Proteína facilitadora de captación de glicerol; M14: Permeasa de arabinosa eZux; M15: Glicosiltransferasa implicada en biogénesis de pared celular; M16: Proteína homóloga a una endoglucanasa tipo E de *Lb. plantarum* lp_3433

Los marcadores menos frecuentes fueron M1, M2, M4, M5, M6, M10, M12, M13 y M16 que codifican para una ATPasa transportadora de cadmio, una ferritina, una maltosa fosforilasa, un regulador transcripcional, una proteína con dominio anotado pero de función desconocida en *O. oeni*, una chaperona de cobre, una tiorredoxina, una proteína transportadora de glicerol y una proteína homóloga a una endoglucanasa tipo E de *L. plantarum* lp_3433, respectivamente (Renouf y col., 2008).

Según el estadístico Mann-Whitney, a un p valor de 0.05, existen diferencias estadísticamente significativas entre la cantidad de marcadores y la procedencia de los aislados. Así, los aislados de vino muestran una mayor cantidad de marcadores en relación a los de mosto. Sin embargo, existe una relación baja entre ambos ($r = 0.310$), es decir sólo el 9 % de la variación en la cantidad de marcadores podría explicar el hecho de que los aislados de vino difieran de los de mosto. Apoyaría a esta afirmación, que se ha evidenciado de que algunos aislados de mosto y de vino presentan el mismo número de marcadores o de que cepas de vino presentes menos marcadores. Además, según la prueba del Chi cuadrado, a un nivel de significación de 0.05, existe una asociación estadísticamente significativa entre presencia de los marcadores M2, M4, M7, M8, M10, M13, M15 y M16 y los aislados procedentes de vino. Mientras que sólo 2 marcadores (M9 y M11) están asociados de forma significativa a aislados procedentes de mosto.

García-Ruíz y col. (2013) observaron que las cepas de *O. oeni* que ellos analizaron sólo presentaron 6 de los 16 marcadores moleculares, concretamente M3, M7, M8, M9, M11 y M15. Además, describieron que las cepas aisladas de vino adicionado con extractos fenólicos durante la FML (tanto espontánea como inoculada) mostraron un menor número de marcadores moleculares (3) que las procedentes de vinos sin extractos fenólicos (4 y 5 marcadores). Estos resultados apoyarían la idea de que un mayor número de marcadores no representarían una ventaja frente a condiciones difíciles del vino, como se ha visto en este trabajo.

4.5 Diversidad en los aislados de *O. oeni*

La diversidad intraespecífica existente entre los aislados de la especie *O. oeni* utilizados en este estudio se estudió mediante 3 aproximaciones: la fenotípica, la tecnológica y la genotípica.

En la evaluación de la diversidad fenotípica se obtuvo en cuenta, el tipo de perfil de fermentación de carbohidratos, la reacción de desaminación frente a la arginina, la capacidad para degradar ácidos orgánicos, la producción de aminas biógenas, y el perfil de actividades enzimáticas. La combinación de todas estas características dio lugar a 103 perfiles fenotípicos diferentes, 102 de ellos conformados por un único aislado y sólo 1 perfil conformado por 2 aislados. El índice de diversidad fenotípica fue de 0.9998.

Para estimar la diversidad tecnológica se tuvieron en cuenta los crecimientos de los aislados en vino natural y en vino sintético con diferentes concentraciones de etanol y SO₂ y ajustado a diferentes valores de pH. En este caso obtuvieron 83 perfiles diferentes, 76 de ellos conformados por un único aislado y 7 perfiles conformados por 2 o 3 aislados. El índice de diversidad tecnológica fue de 0.9903.

Para estimar la diversidad genómica se utilizaron los perfiles de bandas obtenidos por RAPD-VNTR, el tipo de alelo de los genes *rpoB* y *rpoC* y el perfil de marcadores de resistencia. El análisis de todas estas características mostró la existencia de 98 perfiles genómicos, 95 de ellos conformados por único aislado y 3 perfiles conformados por 2 o más aislados. El índice de diversidad genómica fue de 0.9978.

Se estimó la diversidad global teniendo en cuenta los datos fenotípicos, tecnológicos y genómicos. De este análisis surgieron 104 perfiles globales diferentes que se correspondían con los 104 aislados, lo que demostró que se trataban de 104 cepas diferentes. El índice de diversidad en este caso es igual a 1.

En un estudio polifásico de aislados de *O. oeni* procedentes de vinos de la Patagonia, Bravo-Ferrada y col. (2011) obtuvieron una diferenciación robusta a nivel de cepa utilizando como herramienta de tipificación la técnica molecular RAPD y el perfil de fermentación de carbohidratos. En este trabajo también se ha obtenido una muy buena diferenciación a nivel de cepa utilizando una aproximación polifásica que comprende un gran número de características fenotípicas, tecnológicas y genómicas, por lo que resulta mucho más concluyente que la llevada a cabo por otros autores.

Aunque diversos autores utilizando técnicas de tipificación han demostrado que *O. oeni* es una especie genéticamente homogénea (Zavaleta y col., 1996 y 1997; Sato y col., 2001; Guerrini y col., 2003). Los datos obtenidos en este trabajo no coinciden con los obtenidos por estos autores, ya que se ha encontrado una alta heterogeneidad genómica entre las cepas de *O. oeni* que se han analizado en este trabajo, aunque hay que decir que esto es lógico ya que en este trabajo se ha calculado la diversidad genómica haciendo uso de un mayor número de características que en los otros casos. El análisis del fenotipo es el que proporcionó un valor más elevado de diversidad en el conjunto de nuestras cepas se ha observado que los aislados divergen en su capacidad de fermentar carbohidratos, de desaminar de la arginina, de degradar los ácidos málico y cítrico y en la de producir enzimas hidrolíticas y aminas biógenas. También, se han observado importantes diferencias en las tolerancias a factores fisicoquímicos típicos de los vinos tales como los diferentes valores de pH, concentraciones de etanol y SO₂. Es decir, también existe una diversidad fenotípica y tecnológica, aunque en esta última es la que presenta un índice *D* más bajo. Ello significa que a pesar de que distintas cepas puedan diferir fenotípicamente su comportamiento en condiciones enológicas es parecido.

La elevada variabilidad global probablemente está relacionada con la elevada diversidad alélica existente en esta especie como han apuntado de las Rivas y col. (2004). Marcobal y col., (2008) y Marcobal y Mills, (2009) observaron que *O. oeni* tiene una alta tasa de mutación espontánea, que está relacionada con la pérdida genes implicados en la reparación de los apareamientos erróneos del ADN (MMR). Así, la pérdida de estos genes podría favorecer la generación de algunas cepas con mutaciones benéficas y de utilidad para su adaptación a ambientes difíciles como lo es el vino (Bon y col., 2009). Sin embargo, la acumulación de mutaciones deletéreas conduciría a una disminución de su capacidad para crecer en medios de cultivo menos restrictivos que del que han sido aisladas (Marcobal y col. 2008). Estas suposiciones apoyarían a los resultados obtenidos en este trabajo.

4.6 Relación fenotipo-genotipo, genotipo/fenotipo-propiedades tecnológicas

Se han observado diferencias específicas entre las cepas a nivel fenotípico, tecnológico y genómico. Los aislados que han resultado ser más resistentes a las condiciones de pH, SO₂ y etanol son: 218A, 219, 223A, 225, 226SM, 229, 239 y 504. Sin embargo, no parece haber relación entre ABC global y perfil de fermentación de carbohidratos (B, D, K, L), sólo tienen en común la ribosa. Tampoco con la desaminación de la arginina, las cepas 223A, 226SM, 229 y 504 sí lo degradaron mientras que las cepas 218A, 219, 225 y 239 no lo hicieron. Ni con la capacidad para degradar eficazmente el ácido málico, sólo 2 de ellas lo hacen, así la 504 y la 229. Ni con la capacidad para degradar eficazmente el ácido cítrico. No se ha encontrado una relación entre los valores de las ABC globales y la producción de aminas biógenas, de todas las que presentan mayores ABC sólo la 219 y la 239 son capaces de producir aminas biógenas, el resto no lo hace. Tampoco en la posesión de actividades β -glucanasa (218A, 219, 226SM, 239 y 504 son positivas y la 223A, 225 y 229 son negativas), ni con la lipolítica (219, 226SM, 229, 239 y 504 son positivas y la 218A, 223A y 225 son negativas), ni con la celulolítica (218A, 223A, 226SM, 239 y 504 son positivas y la 219, 225 y 229 son negativas), ni con la β -glicosidasa (todas tienen una actividad alta sobre la esculina pero otras media o baja actividad, tanto sobre la esculina como sobre la arbutina, tampoco son las que exhiben mayor actividad esterásica, la 504 no tiene ninguna y las otras tienen actividades medias o bajas. En general tienen perfiles enzimáticos variados y por ello tampoco están relacionados con el ABC, así la cepa 504 (perfil 1), 226SM y 239 (perfil 2), 219 (perfil 4), 218A (perfil 9), 229 (perfil 11), 223A (perfil 13) y 225 (perfil 16).

No se ha observado la existencia de una relación entre el perfil genómico obtenido del análisis RAPD/VNRT, la capacidad de degradar el málico por las cepas 504 y 142 y la presencia de los alelos H del gen *rpoB* y alelo 7 y 6 del gen *rpoC*, respectivamente. Aunque, la primera de ellas es más resistente al pH, etanol y SO₂.

No existe una relación entre las cepas que degradan más eficientemente el ácido málico y la presencia de los alelos L y H del gen *rpoB* y el alelo H del gen *rpoC*, ya que también muestran esos alelos las cepas que lo degradan con menor eficiencia y alguna de ellas son capaces de producir alguna amina biógena, con la excepción de 171, 182, 237, 229, 235 y Z3.

El número de marcadores que poseen las cepas más resistentes a las condiciones enológicas ensayadas varían entre 4 y 7 y los comunes a todos ellos son M8, M11 y

M14, el M9 está presente en todos menos en el aislado 504 y el M15 en todas excepto en 229 y 239. Sin embargo, estos mismos marcadores también se han encontrado en los aislados de mosto, mucho más sensibles a estas condiciones enológicas. Los resultados encontrados en este trabajo no apoyarían las afirmaciones de Renouf y col. (2008), los cuales indican que las cepas más resistentes a las condiciones del vino presentan mayor número de marcadores.

Por otro lado, todas las cepas que fueron resistentes al etanol exhibían el marcador M9 que codifica para una azúcar alcohol-deshidrogenasa, menos la 504; mientras que las que muestran el marcador M15 (codifica para una glicosiltransferasa implicada en la biogénesis de la pared celular) sólo lo presentaba la cepa que más resiste al pH (504), con excepción de la 239 y 229. Sin embargo, el M15 también estaba presente en cepas que resultaron sensibles al etanol, pH y SO₂.

Las cepas 218A, 219, 223A, 225, 226SM y 504 se mostraron como las más resistentes al pH, etanol, SO₂ y son capaces de utilizar el carbohidrato arabinosa (menos la cepa 219 y 229) y a su vez poseen los marcadores moleculares M11 y M14 que codifican para la proteína MFS de arbinosa eZux y para una permeasa de arabinosa eZux, respectivamente. De ello, se podría deducir que estos marcadores serían importantes para la adaptación de cepas resistentes al vino. Sin embargo estos marcadores no se encuentran exclusivamente en el grupo en mención, ya que también se encuentran con una alta frecuencia en el conjunto global de cepas ensayadas. De esta manera, se deduce que los marcadores que están relacionados con el transporte de la arabinosa se encuentran de forma general en *O. oeni*, independiente de la resistencia o sensibilidad a los factores enológicos.

Algunos autores han demostrado que la tioredoxina tiene un papel importante en la respuesta de *O. oeni* a los estreses térmico y oxidativo (Guzzo y col., 2000) y que el gen correspondiente también se encuentra en cepas resistentes a las condiciones de un vino sintético (Renouf y col., 2009). Sin embargo, en este trabajo no se ha detectado el marcador M12 en cepas resistentes al pH, etanol y SO₂. El marcador M12 sólo lo exhiben las cepas que mostraron una resistencia intermedia a los factores tecnológicos ensayados (138M, 197 y 237) y en 4 cepas procedentes de mosto (sensibles). Es posible que sean otras tioredoxinas diferentes de la codificada por este marcador las que estén implicadas en las resistencias a los estreses, térmico y oxidativo, o que la resistencia a factores enológicos no está relacionada con esta tioredoxina.

El marcador M13 que codifica una proteína encargada de la captación del glicerol fue uno de los marcadores infrecuentes (15 %) y se encontró en 9 cepas de vino y en 3 de mosto. Aunque se ha reportado que una de las estrategias para mantener la integridad de la membrana celular es el transporte del glicerol (van der Heide y Poolman, 2000), en este trabajo no se han observado evidencias que apoyen estas afirmaciones. Por el contrario, Renouf y col., (2009) observaron que la presencia de este marcador era importante en cepas mejor adaptadas al vino.

Por otro lado, algunos investigadores han observado una relación parcial entre perfiles PFGE y perfil de ácidos grasos (Guerrini y col., 2003) y entre los perfiles AFLP y la capacidad de realizar la FML (Cappello y col., 2008). Sin embargo, Solieri y col. (2010) no encontraron una correlación entre los perfiles de bandas RAPD de las cepas de *O. oeni* y su capacidad de hacer la FML. Los resultados de este trabajo coinciden con los de este último autor. No se ha observado la existencia de una relación entre el fenotipo y genotipo de las cepas de *O. oeni* utilizadas.

4.7 Selección de cepas malolácticas de interés

De acuerdo con los resultados obtenidos de la caracterización fenotípica, tecnológica y genética de cepas de *O. oeni* analizadas, existen algunas cepas que reúnen las características que, *a priori*, pueden resultar interesantes para ser utilizadas en un futuro como cultivos iniciadores malolácticos.

Inicialmente, del total de las 104 cepas que se han utilizado en este estudio, las que reúnen las condiciones más adecuadas para constituir adecuados cultivos malolácticos son la 504, 205A y 229. La primera resultó altamente resistente a valores bajos de pH y a diferentes concentraciones de etanol y de SO₂, mientras que las otras dos exhibieron una resistencia intermedia a esos factores. En cuanto a la capacidad de degradar málico en vino sintético las 3 cepas son capaces de hacerlo en un 98 % durante los tres primeros días. Ninguna de ellas fue capaz de producir EPS ni de producir aminas biógenas. Una de las cepas que se perfilaba como candidata para su uso como cultivo iniciador, fue la cepa 219 que en vino sintético degradaba el 80 % del ácido málico contenido en el vino sintético durante 6 días, y se caracterizaba por su resistencia a altas concentraciones de etanol y SO₂, bajos valores de pH que las anteriores y por su gran capacidad de sobrevivir en vino tinto. Sin embargo, la cepa 219 presentaba como inconveniente el que producía histamina, lo que la hacía inadecuada como cultivo

iniciador maloláctico. De aquí se desprende la importancia de realizar amplia caracterización de cepas para realizar una correcta selección.

Las cepas 218A, 223A, 225 y 226SM, altamente resistentes de los factores fisicoquímicos ensayados, incapaces de producir aminas ni EPS, tenían el inconveniente de consumir más lentamente el ácido málico que las anteriores.

En la selección de cepas de *O. oeni* para su uso como cultivos iniciadores malolácticos, Solieri y col. (2010) propusieron una estrategia basada en 4 fases: I) constitución de una colección de cepas; II) caracterización de los aislados a nivel genómico; III) realizar una selección de estos genotipos en base a sus propiedades tecnológicas; IV) comprobación de que pueden llevar a cabo la FML en vinos. En este trabajo se ha utilizado un esquema similar aunque mucho más completo que el llevado a cabo por Solieri y colaboradores, lo que ha proporcionado una selección racional y robusta de cepas malolácticas.

4.8 Niveles de expresión de genes de estrés en *O. oeni*

Tras haber caracterizado fenotípica, tecnológica y genotípicamente a las 104 cepas y haber determinado en base a ello las mejores cepas malolácticas se procedió al estudio de las respuestas al estrés comparando las que exhiben 2 cepas resistentes y 2 sensibles, procedentes de mosto y de vino. Los niveles de transcripción de 6 genes relacionados con el estrés en 5 cepas de *O. oeni* se muestran en la Figura 48. Los factores de estrés a los que se sometieron las cepas fueron el pH, el etanol y el SO₂. Los genes elegidos fueron: *cfa*, *clpP*, *ctsR*, *hsp18*, *rmIB* y *trxA*, que codifican para una ciclopropano sintetasa implicada en la síntesis de ácidos grasos, una proteasa, un regulador de la respuesta al estrés, la proteína de estrés Lo18, la dtdP-glucosa-4,6-dehidratasa y una tioredoxina, respectivamente. Estos genes se expresan diferencialmente frente a estos factores de estrés, según describieron Olguín y col., 2010.

Las cepas elegidas para el ensayo han sido algunas resistentes y sensibles a los distintos factores de estrés, según se deduce de los resultados presentados en el apartado 4.3. La cepa 504 muestra una elevada resistencia a los factores de estrés y procede del vino, y la cepa FS13 también muestra resistencia al estrés y procede de mosto, mientras que las cepas 129 y Me8 son sensibles y proceden de vino y de mosto, respectivamente. En este trabajo se consideran niveles de sobreexpresión de los genes en estudio cuando éste supera 2 veces el del gen *ldhD*.

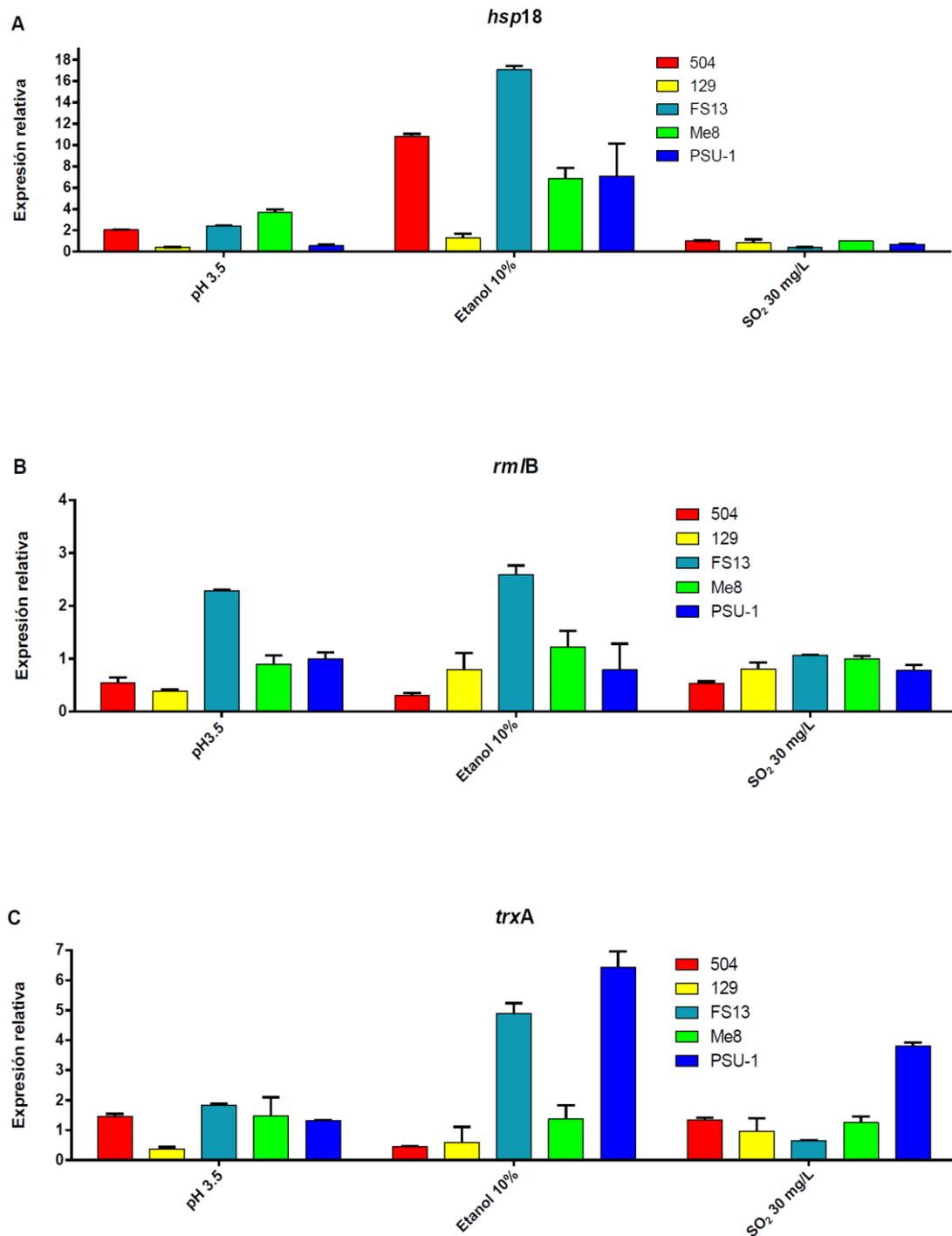


Figura 48. Expresión de genes de estrés en diferentes cepas de *O. oeni* en relación al gen *ldhD*, frente al pH, etanol y SO₂. Cepas aisladas de vino (504 y 129), las de mosto (FS13 y Me8). Cepas resistentes (504 y FS13) y sensibles (129 y Me8), A: gen *hsp18*; B: gen *rm1B*; C: gen *trxA*; D: gen *clpP*; E: gen *ctsR*; F: gen *cfa*

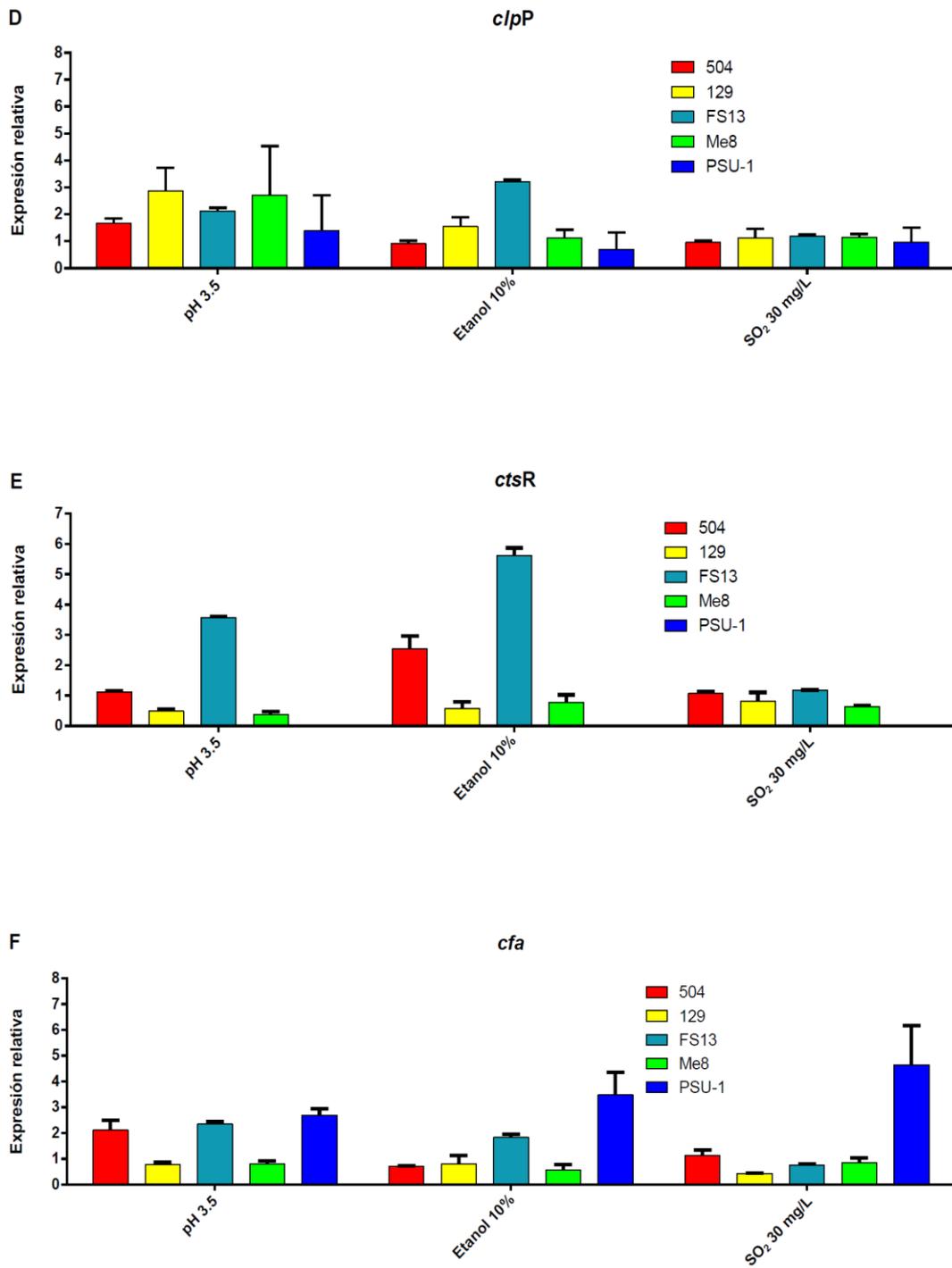


Figura 48. (Continuación).

El factor pH promueve sobre todo la sobreexpresión de los genes *hsp18*, *ctsR*, *clpP* y *cfa*. El nivel de sobreexpresión más alto que induce este factor es el del gen *hsp18* en la cepa Me8 (3.7); este nivel es 1.5 veces superior en esta cepa que en la cepa FS13 que es la resistente. El segundo puesto en orden de sobreexpresión respecto a este factor lo ocupa el gen *ctsR* que se sobreexpresa en la cepa FS13 (3.6), es decir 9.6 veces más que en la cepa sensible de mosto (Me8). En la cepa resistente de vino el nivel de sobreexpresión es menor: 3.3 en la 504. Es el gen en el que mayores expresiones diferenciales se encuentran entre las cepas como respuesta al pH.

El tercer puesto en cuanto a niveles de sobreexpresión lo ocupa el gen *clpP* que se sobreexpresa a un nivel de 2.9 en la cepa 129, es decir 1.8 veces más que en la 504 y 1.3 veces más que en la FS13. El cuarto puesto en orden de sobreexpresión lo ocupa el gen *cfa* que se sobreexpresa a un nivel de 2.4 en la cepa FS13 y 2.1 en la 504, es decir 2.9 y 2.8 veces más que en la Me8 y 129, respectivamente.

Considerando las diferentes cepas el factor pH promueve la sobreexpresión, a niveles parecidos, de los genes: *hsp18*, *ctsR*, *clpP* y *cfa* tanto en la cepa resistente como en la cepa sensible de vino. Entre las cepas resistentes los niveles de sobreexpresión más discriminantes son los que se muestran los genes *rmIB* y *ctsR* que se sobreexpresan más en la cepa resistente FS13. Entre las cepas sensibles y resistentes de mostos no hay diferencias significativas en los niveles de sobreexpresión de ningún gen, excepto en el caso del *hsp18*, que se sobreexpresa más en la sensible que en la resistente (3.7 frente a 0.4).

El factor etanol induce niveles de sobreexpresión mayores que el pH y el SO₂. Fundamentalmente promueve la sobreexpresión del gen *hsp18*. Los mayores niveles de sobreexpresión de este gen se observan en las dos cepas resistentes, tanto de mosto como de vino, aunque en la de mosto lo hace hasta un nivel de 17 y en la de vino sólo hasta 11. Las diferencias de sobreexpresión entre las cepas sensibles de mosto y de vino son menos importantes que las que se observan entre las resistentes de ambos orígenes y la expresión diferencial más elevada respecto al factor etanol en la que se observa para el gen *hsp18* que se sobreexpresa aproximadamente 5.4 veces más en la de mosto que en la de vino. En segundo y tercer lugar, respecto al nivel de sobreexpresión, aparecen los genes *ctsR* y *trxA*. En todos estos genes la cepa resistente de mosto muestra mayores valores de sobreexpresión que la de vino y las mayores diferencias en los niveles de expresión entre estas dos cepas son las que se dan en el gen *trxA*.

El factor SO₂ no provoca elevada sobreexpresión en ninguno de los genes de ninguna de las cepas analizadas (niveles inferiores a 1.4), con la excepción de la cepa de referencia PSU-1, en la que los genes *cfa* y *trxA* se sobreexpresa a valores de 4.6 y 3.8, respectivamente respecto al gen de referencia *ldhD*.

En el caso del factor pH se sobreexpresan más los 6 genes en la cepa resistente de mosto que en las sensible del mismo origen (*hsp18* y *clpP*) y lo mismo ocurre con las correspondientes de vino, pero sólo en dos de los 6 genes estudiados (*hsp18* y *cfa*) (Figura 48).

Respecto al etanol se sobreexpresan más los 6 genes en la cepa resistente de mosto y en la sensible del mismo origen sólo sobreexpresan uno (*hsp18*). Mientras que la cepa resistente de vino sobreexpresó 2 genes (*hsp18* y *ctsR*).

Sin embargo, la aplicación de la prueba estadística ANOVA y del análisis *a posteriori* Tukey B a los resultados de la sobreexpresión de los genes utilizados en este ensayo ha demostrado que únicamente hay una sobreexpresión estadísticamente significativa del gen *hsp18* frente al factor etanol, pero no frente a los otros factores en el conjunto de las cepas analizadas, es decir incluyendo la cepa PSU-1 que se ha utilizado como control positivo de la amplificación de los genes. Sin embargo, cuando la excluimos del análisis estadístico, la sobreexpresión del gen *hsp18* es significativa frente a los factores pH y etanol en las 4 cepas objeto del presente estudio.

No se han encontrado relaciones estadísticamente significativas entre los niveles de sobreexpresión de estos genes y la capacidad para crecer en vino o para resistir a los factores selectivos, pero sí respecto al origen de las cepas (mosto o vino). Es decir, las cepas de mosto expresan más genes que las cepas de vino. Este hecho podría deberse a que al no estar adaptadas a este medio necesitan sobreexpresar más genes que las cepas de vino para sobrevivir.

Se ha observado que para superar las diferentes situaciones de estrés, *O. oeni* sintetiza proteínas de estrés y pone en marcha mecanismos que le capacitan para seguir realizando sus funciones. También, se ha observado que el gen que más se sobreexpresa en condiciones de estrés es el gen *hsp18*, que codifica la proteína Lo18, siendo el etanol el factor que más influye en su expresión. El que el etanol sea el factor que más influye en la sobreexpresión de este gen también ha sido demostrada por Guzzo y col. (1997) y Olgún y col., (2010) quienes observaron que este gen se induce fuertemente por etanol

(12 %). Sin embargo, a una concentración de etanol al 13 % se ha observado una sobreexpresión baja de este gen (1.8 veces) (Capozzi y col., 2010). En este trabajo se ha observado que la cepa resistente al etanol procedente de vino sobreexpresó 11 veces este gen. En comparación con los resultados de estos autores, aunque en nuestro caso (en condiciones menos drásticas) la expresión de este gen fue mayor a la que ellos describen para cepas resistentes al etanol. Guzzo y col. (1997), Beltramo y col. (2006) y Olguín y col., (2010), también observaron una sobreexpresión de este gen a pH bajo (pH 3.5). Valores similares de expresión de este gen se ha obtenido en este trabajo en la cepa 504 resistente al pH, etanol y SO₂.

El gen *ctsR* se expresó frente al pH y al etanol. En la cepa resistente de vino (504) sólo se sobreexpresó 2.6 veces frente al pH. En la cepa resistente de mosto (FS13) se expresó tanto frente al pH como al etanol, 3.6 y 5.6 veces, respectivamente. Sin embargo, Beltramo y col. (2006) no observaron la sobreexpresión de este gen en una cepa de *O. oeni* crecida en un medio de cultivo a pH 3.5, aunque sí lo hacía (10 veces) tras en un vino sintético a pH 3.5 y 10% de etanol. Mientras que las cepas utilizadas por Olguín y col. (2010) sí lo hacían a pH 3.5 y al 11 % de etanol.

La expresión gen *trxA*, que codifica para una tioredoxina (TrxA), sólo lo sobreexpresaron la cepa FS13 y PSU-1, mientras que la 504 lo hace en bajos niveles (1.5 veces en pH y 1.3 veces en etanol). El gen *trxA* participa en la biosíntesis de ácidos nucleicos y de la pared celular. Jobin y col. (1999) observaron que este gen se expresa sólo en condiciones de estrés oxidativo (ocasionado por el etanol) y por el calor.

Beltramo y col. (2006) observaron que el gen *trxA* se sobreexpresaba 4 y 6.5 veces en *O. oeni* crecidas en un medio de cultivo (pH 3.5) y en un vino sintético, respectivamente. Olguín y col. (2010) obtuvieron similares resultados en una cepa con alta capacidad maloláctica al final de la FML en un medio de laboratorio a pH 3.5 y al 12 % de etanol. Sin embargo, en este trabajo la cepa 504 con la misma característica tecnológica no expresó niveles significativos de ese gen.

Los niveles de transcritos para la proteína ClpP no fueron tan elevados como los del gen *hsp18* en las cepas analizadas en este trabajo. Aunque, algunos autores han observado que este gen incrementa su expresión 6.5 veces en cepas de *O. oeni* crecidas en vino sintético a pH 3.5 (Beltramo y col., 2006; Olguín y col., 2010).

También se ha observado que la sobreexpresión del gen *cfb* fue de 2.1 y 2.3 veces en la cepa 504 y FS13, respectivamente, frente al pH, en esta última se expresó 1.8 veces frente al etanol. Sólo la cepa PSU-1 la sobreexpresó más frente a los 3 factores

ensayados (entre 2.7 y 4.6 veces). Otros autores han observado un aumento en los niveles de los transcritos del gen *cfa*, cuando *O. oeni* crece en presencia de etanol y pH bajo (Beltramo y col., 2006; Grandvalet y col., 2008). Nuestros resultados coinciden con los obtenidos por Olgúin y col (2010) quienes observaron que este gen se sobreexpresaba 2 veces en una de las cepas eficientes en la degradación del ácido málico a inicio de la FML.

El gen *rmlB*, sólo lo expresó la cepa FS13 procedente de mosto en 2.3 veces y 2.6 veces frente al pH y al etanol, respectivamente. Olgúin y col. (2010) observaron que una de las cepas eficientes en la degradación de málico lo hacía 2 veces. Los valores de expresión de este gen coinciden con los reportados en este trabajo, aunque la cepa que lo expresó no fue eficiente en la degradación del ácido málico.

Lo18 está implicada en el mantenimiento de la integridad de la membrana celular ya que actúa directamente estabilizando a los fosfolípidos de la membrana bajo diversas condiciones de estrés (Coucheney y col., 2005b). El gen *ctsR*, es un regulador de la expresión de proteínas de estrés que son necesarias frente al estrés (por etanol o pH) (Grandvalet y col., 2005). El incremento funcional de estas dos proteínas explicaría la mayor resistencia de estas cepas al pH, SO₂ y etanol. La proteína ClpP, tiene un papel importante en la remodelación y repliegue de proteínas durante diferentes situaciones de estrés (Guzzo y Desroche, 2009), la proteína TrxA participa en la biosíntesis de ácidos nucleicos (Jobin y col., 1999) y la proteína CFA está implicada en la biosíntesis de ácidos grasos. Esto puede explicar las modificaciones de la membrana plasmática que sufren las células en estas condiciones (Grandvalet y col., 2008). El gen *rmlB* está relacionado con la biosíntesis de pared celular, mecanismo que le permitiría afrontar el estrés que ocasiona el pH o el etanol (Silveira y col., 2004; Olgúin y col., 2010).

Los resultados de este apartado no demuestran la utilidad del análisis de la expresión de genes para la caracterización de cultivos malolácticos de *O. oeni* por sí solos. Sin embargo es necesario investigar la existencia de otros genes cuyas expresiones proporcionarían una ventaja a la hora de caracterizar cepas de *O. oeni* como cultivos malolácticos. Además, hay que realizar análisis más profundos, y tener en cuenta las propiedades genómicas, fenotípicas y tecnológicas, como se ha mostrado antes. Muy probablemente, haya también que cambiar el enfoque del tipo de análisis de estos datos de expresión: al mirar solamente el grado de expresión relativa frente a un gen

supuestamente constitutivo, perdemos toda la perspectiva de los niveles de expresión absolutos y su relación con la posible resistencia real a factores de estrés. No solamente importa cuanto aumenta el nivel de transcripción relativa de un gen, sino realmente que cuánto contribuye a aumentar esa resistencia (por ejemplo no se mira el nivel proteína final). No hay que olvidar, por otro lado, los grandes errores experimentales y sesgos en este tipo de análisis de expresión de genes. También se deberá mejorar las metodologías de estudio en un futuro.



5. CONCLUSIONES

- Se han encontrado diferencias notables entre los aislados procedentes de mosto y de vino, sobre todo a nivel tecnológico: los de vino son capaces de tolerar mejor las altas concentraciones de etanol y SO₂, y de crecer más a pH más bajos. Además, son los que degradan de forma más rápida y eficiente el ácido málico, por lo que son los mejores candidatos como cultivos malolácticos.
- Los factores que explican la mayor parte de la variabilidad del crecimiento de los aislados fueron los niveles de pH entre 3.5 y 4.0, concentraciones de etanol de hasta 50 mg/L, y concentraciones de etanol entre 10 y 15%.
- Se consiguió discriminar un mayor número de cepas con la técnica de RAPD que con VNTR. Sin embargo, la discriminación entre cepas aumentó notablemente al combinar los resultados de ambas técnicas.
- Se han encontrado 6 alelos distintos del gen *rpoB*, de los cuales cuatro se han descrito por primera vez en este trabajo. En el caso del gen *rpoC*, se han encontrado 8 alelos, de los cuales 7 constituyen nuevas descripciones.
- Existe una elevada diversidad fenotípica, tecnológica y genómica entre los aislados de *O. oeni*. Considerando cada uno de estos tres tipos de características individualmente, los valores de diversidad (*D*) más altos se obtuvieron a partir de las fenotípicas y genómicas, aunque la combinación de todas ellas proporcionaron valores superiores. Los 104 aislados constituyen 104 cepas diferentes.
- No se ha encontrado ninguna relación biunívoca clara entre características genómicas y las características fenotípicas y tecnológicas, ni tampoco entre las primeras y la procedencia de los aislados (mosto o vino) de los aislados/cepas.
- Se ha constatado que las cepas 205A, 229 y 504, especialmente ésta última, muestran características adecuadas para ser utilizadas como cultivos malolácticos, ya que son capaces de sobrevivir y crecer en vino tinto, degradan eficaz y

rápidamente el ácido málico, son incapaces de producir aminos biógenas y presentan actividades enzimáticas de interés, tales como β -glicosidasa, β -glucanasa y celulasa.

- El único gen que se sobreexpresa significativamente es el gen *hsp18* frente a los factores etanol y pH. Los mayores niveles de sobreexpresión de este gen se observan en los aislados de mosto y vino más resistentes a las condiciones adversas. La sobreexpresión de este gen, considerada aisladamente, no permite seleccionar un buen cultivo maloláctico.



6. BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar, C. N., & Gutiérrez-Sánchez, G. (2002). Review: sources, properties, applications and potential uses of tannin acyl hydrolase. *Food Science and Technology International*, 7, 373–382.
- Alexandre, H., Costello, P. J., Remize, F., Guzzo, J., & Guilloux-Benatier, M. (2004). *Saccharomyces cerevisiae*-*Oenococcus oeni* interactions in wine: current knowledge and perspectives. *International Journal of Food Microbiology*, 93(2), 141–154.
- Amoroso, M. J., Saguir, F. M., & Manca de Nadra, M. C. (1993). Variation of nutritional requirements of *Leuconostoc oenos* by organic acids. *Journal International Des Sciences de La Vigne et Du Vin*, 27, 135–144.
- APIsystems. (1981). API 50 CHL *Lactobacillus*. La Balme, les Grottes, France.
- 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.
- Axelsson, L. (1998). Lactic acid bacteria: classification and physiology. In *Lactic acid bacteria. Microbiology and functional aspects*. S. Salminen & A. Von Wright (Eds.), (2nd ed. pp. 1–72). New York, Hong Kong: Marcel Dekker, Inc.
- Badotti, F., Moreira, A. P. B., Chimetto Tonon, L., Luckwu de Lucena, B. T., Gomes, F. C. O., Kruger, R., Thompson, C. C., de Moraes, M. A., Rosa, C. A., & Thompson, F. L. (2014). *Oenococcus alcoholitolerans* sp. nov., a lactic acid bacteria isolated from cachaça and ethanol fermentation processes. *Antonie van Leeuwenhoek*, 106(6), 1259–67.
- Barata, A., Malfeito-Ferreira, M., & Loureiro, V. (2012). The microbial ecology of wine grape berries. *International Journal of Food Microbiology*, 153(3), 243–59.
- Barbagallo, R. N., Spagna, G., Palmeri, R., & Torriani, S. (2004). Assessment of β -glucosidase activity in selected wild strains of *Oenococcus oeni* for malolactic fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*, 34(3-4), 292–296.
- Bartowsky, E. J., Mccarthy, J. M., & Henschke, P. A. (2003). Differentiation of Australian wine isolates of *Oenococcus oeni* using random amplified polymorphic DNA (RAPD). *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 9, 122–126.
- Bartowsky, E., & Pretorius, I. (2009). Microbial formation and modification of flavor and off-flavor compounds in wines. In *Biology of microorganisms on grapes*,

- musts and wines*. H. König, G. Uden, & J. Fröhlich (Eds.), (pp. 209–231). Berlin-Heidelberg: Springer-Verlag.
- Bartowsky, E. J., & Borneman, A. R. (2011). Genomic variations of *Oenococcus oeni* strains and the potential to impact on malolactic fermentation and aroma compounds in wine. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 92, 441–447.
- Bauer, R., Nel, H. A., & Dicks, L. M. T. (2003). Pediocin PD-1 as a method to control growth of *Oenococcus oeni* in wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 54, 86–91.
- Bauer, R., & Dicks, L. M. T. (2004). Control of malolactic fermentation in wine. A review. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 25, 74–88.
- Belloch, C., López, L., Esteve, B., Martínez, M. D., & Uruburu, F. (1998). Catálogo de cepas. In *Colección Española de cultivos tipo CECT* (4th ed.). Universidad de Valencia.
- Beltramo, C., Grandvalet, C., Pierre, F., & Guzzo, J. (2004). Evidence for multiple levels of regulation of *Oenococcus oeni* *clpP-clpL* locus expression in response to stress. *Journal of Bacteriology*, 186(7), 2200–2205.
- Beltramo, C., Desroche, N., Tourdot-Maréchal, R., Grandvalet, C., & Guzzo, J. (2006). Real-time PCR for characterizing the stress response of *Oenococcus oeni* in a wine-like medium. *Research in Microbiology*, 157(3), 267–274.
- Berbegal, C. (2014). Novel liquid starter cultures for malolactic fermentation in wine. *Ph D Thesis, Valencia University (Spain)*.
- Bilhère, E., Lucas, P. M., Claisse, O., & Lonvaud-Funel, A. (2009). Multilocus sequence typing of *Oenococcus oeni*: detection of two subpopulations shaped by intergenic recombination. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(5), 1291–1300.
- Blaiotta, G., Moschetti, G., Simeoli, E., Andolfi, R., Villani, F., & Coppola, S. (2001). Monitoring lactic acid bacteria strains during 'Cacioricotta' cheese production by restriction endonuclease analysis and pulsed-field gel electrophoresis. *Journal of Dairy Research*, 68, 139–144.
- Blanco-Gomis, D., Mangas-Alonso, J. J., Cabrales, I. M., & Abrodo, P. A. (2001). Gas chromatographic analysis of total fatty acids in cider. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49, 1260–1263, 49, 1260–1263.

- Blasco, L. (2009). *Aplicación de las técnicas FISH, PCR específica y 16S-ARDRA al estudio de la población bacteriana asociada a vinificación*. Universidad de Valencia.
- Bon, E., Delaherche, A., Bilhere, E., De Daruvar, A., Lonvaud-Funel, A., & Le Marrec, C. (2009). *Oenococcus oeni* genome plasticity associated with fitness. *Applied & Environmental Microbiology*, *15*(7), 2079–2090.
- Bordas, M., Araque, I., Alegret, J. O., Khoury, M. E, Lucas, P., Rozès, N, Reguant, C., & Bordons, A. (2013). Isolation, selection, and characterization of highly ethanol-tolerant strains of *Oenococcus oeni* from south Catalonia. *International Microbiology*, *16*, 113–123.
- Borneman, A., Bartowsky, E., McCarthy, J., & Chambers, P. (2010). Genotypic diversity in *Oenococcus oeni* by high-density microarray comparative genome hybridization and whole genome sequencing. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *86*(2), 681–691.
- Borneman, A. R., McCarthy, J. M., Chambers, P. J., & Bartowsky, E. J. (2012). Comparative analysis of the *Oenococcus oeni* pan genome reveals genetic diversity in industrially-relevant pathways. *BMC Genomics*, *13*(1), 373.
- Bourdineaud, J., Nehme, B., Tesse, S., & Lonvaud-funel, A. (2003). The *ftsH* Gene of the wine bacterium *Oenococcus oeni* is involved in protection against environmental stress. *Applied and Environmental Microbiology*, *69*(5), 2512–2520.
- Bourdineaud, J.-P., Nehmé, B., Tesse, S., & Lonvaud-Funel, A. (2004). A bacterial gene homologous to ABC transporters protect *Oenococcus oeni* from ethanol and other stress factors in wine. *International Journal of Food Microbiology*, *92*(1), 1–14.
- Bravo-Ferrada, B. M., Delfederico, L., Hollmann, A., Valdés-La Hens, D., Curilén, Y., Caballero, A., & Semorile, L. (2011). *Oenococcus oeni* from Patagonian red wines: isolation, characterization and technological properties. *International Journal of Microbiology Research*, *3*(1), 48–55.
- Bridier, J., Claisse, O., Coton, M., Coton, E., & Lonvaud-Funel, A. (2010). Evidence of distinct populations and specific subpopulations within the species *Oenococcus oeni*. *Applied and Environmental Microbiology*, *76*(23), 7754–7764.
- Britz, T. J., & Tracey, R. P. (1990). The combination effect of pH, SO₂, ethanol and temperature on the growth of *Leuconostoc oenos*. *Journal of Applied Bacteriology*, *68*, 23–31.

- Cabanis, J. C., Cabanis, M. T., Cheynier, V., & Teissedre, P. L. (2000). Tablas de composición. In *Enología fundamentos científicos y tecnológicos*. C. Flanzy (Ed.), (pp. 218–231). AMV y Mundi-Prensa ediciones.
- Cappello, M. S., Stefani, D., Grieco, F., Logrieco, A., & Zapparoli, G. (2008). Genotyping by amplified fragment length polymorphism and malate metabolism performances of indigenous *Oenococcus oeni* strains isolated from Primitivo wine. *International Journal of Food Microbiology*, *127*(3), 241–245.
- Cappello, M. S., Zapparoli, G., Stefani, D., & Logrieco, A. (2010). Molecular and biochemical diversity of *Oenococcus oeni* strains isolated during spontaneous malolactic fermentation of Malvasia Nera wine. *Systematic and Applied Microbiology*, *33*(8), 461–467.
- Cappello, M. S., De Domenico, S., Logrieco, A., & Zapparoli, G. (2014). Bio-molecular characterisation of indigenous *Oenococcus oeni* strains from Negroamaro wine. *Food Microbiology*, *42*, 142–148.
- Capozzi, V., Russo, P., Beneduce, L., Weidmann, S., Grieco, F., Guzzo, J., & Spano, G. (2010). Technological properties of *Oenococcus oeni* strains isolated from typical southern Italian wines. *Letters in Applied Microbiology*, *50*(3), 327–334.
- Cappuccino, J. G., & Sherman, N. (1977). *Microbiology: a laboratory manual*. Benjamin Cummings Pub., Co., Inc, Melo Park, California.
- Capucho, I., & San Romão, M. V. (1994). Effect of ethanol and fatty acids on malolactic activity of *Leuconostoc oenos*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *42*, 391–395.
- Carr, J. G. (1970). Tetrad-forming cocci in ciders. *Journal Applied Bacteriology*, *33*, 371–379.
- Carreté, R., Vidal, M. T., Bordons, A., & Constantí, M. (2002). Inhibitory effect of sulfur dioxide and other stress compounds in wine on the ATPase activity of *Oenococcus oeni*. *FEMS Microbiology Letters*, *211*(2), 155–159.
- Cavin, J. F., Andioc, V., Etievant, P. X., & Divies, C. (1993). Ability of wine lactic acid bacteria to metabolize phenol carboxylic acids. *American Journal of Enology and Viticulture*, *44*, 76–80.
- Chalfan, Y., Goldberg, I., & Mateles, R. I. (1977). Isolation and characterization of malo-lactic bacteria from Israeli red wines. *Journal of Food Science*, *42*, 939–943.

- Charpentier, C., & Feuillat, M. (1993). Yeast autolysis. In *Wine microbiology and biotechnology*. G. H. Fleet (Ed.), (pp. 225–242). Chur, Switzerland: Hardwood academis publisher.
- Chatonnet, P., Viala, C., & Dubourdieu, D. (1997). Influence of polyphenolic components of red wines on the microbial synthesis of volatile phenols. *American Journal of Enology and Viticulture*, *48*, 443–448.
- Choudhury, N., Hansens, W., Engesser, D., Hammes, W. P., & Holzapfel, W. H. (1990). Formation of histamine and tyramine by lactic acid bacteria in decarboxylase assay medium. *Letters in Applied Microbiology*, *11*, 278–281.
- Choy, H. E., & Fowler, R. G. (1985). The specificity of base-pair substitution induced by the *mutL* and *mutS* mutators in *E. coli*. *Mutation Research Letters*, *142*, 93–97.
- Chu-Ky, S., Tourdot-Marechal, R., Marechal, P.-A., & Guzzo, J. (2005). Combined cold, acid, ethanol shocks in *Oenococcus oeni*: effects on membrane fluidity and cell viability. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1717*(2), 118–124.
- Ciezack, G., Hazo, L., Chambat, G., Heyraud, A., Lonvaud-Funel, A., & Dols-Lafargue, M. (2010). Evidence for exopolysaccharide production by *Oenococcus oeni* strains isolated from non-ropy wines. *Journal of Applied Microbiology*, *108*(2), 499–509.
- Claisse, O., & Lonvaud-Funel, A. (2012). Development of a multilocus variable number of tandem repeat typing method for *Oenococcus oeni*. *Food Microbiology*, *30*, 340–347.
- Claisse, O., & Lonvaud, A. (2014). Multiplex variable number of tandem repeats for *Oenococcus oeni* and applications. *Food Microbiology*, *38*, 80–86.
- Coppola, S., Fusco, V., Andolfi, R., Aponte, M., Blaiotta, G., Ercolini, D., & Moschetti, G. (2006). Evaluation of microbial diversity during the manufacture of Fior di Latte di Agerola, a traditional raw milk pasta-filata cheese of the Naples area. *Journal of Dairy Research*, *29*, 1–9.
- Costantini, A., Cersosimo, M., Del Prete, V., & Garcia-Moruno, E. (2006). Production of biogenic amines by lactic acid bacteria: screening by PCR, thin-layer chromatography, and high-performance liquid chromatography of strains isolated from wine and must. *Journal of Food Protection*, *69*, 391–396.
- Coton, E., Rollan, G., Bertrand, A., & Lonvaud-Funel, A. (1998). Histamine-producing lactic acid bacteria in wines: early detection, frequency, and distribution. *American Journal of Enology and Viticulture*, *49*, 199–204.

- Coucheney, F., Desroche, N., Bou, M., Tourdot-Maréchal, R., Dulau, L., & Guzzo, J. (2005a). A new approach for selection of *Oenococcus oeni* strains in order to produce malolactic starters. *International Journal of Food Microbiology*, *105*(3), 463–470.
- Coucheney, F., Gal, L., Beney, L., Lherminier, J., Gervais, P., & Guzzo, J. (2005b). A small HSP, Lo18, interacts with the cell membrane and modulates lipid physical state under heat shock conditions in a lactic acid bacterium. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1720*(1-2), 92–98.
- Couto, J. A., Campos, F. M., Figueiredo, A. R., & Hogg, T. A. (2006). Ability of lactic acid bacteria to produce volatile phenols. *American Journal of Enology and Viticulture*, *52*, 166–171.
- Da Silveira, M., Vitoria San Romao, M., 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*(12), 6087–6093.
- 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. *Applied and Environmental Microbiology*, *69*(10), 5826–5832.
- Davis, C., Silverira, N. F. A., & Fleet, G. H. (1985). Occurrence and properties of bacteriophages from *Leuconostoc oenos* in Australian wines. *Applied and Environmental Microbiology*, *50*, 872–876.
- Davis, C. R., Wibowo, D., Fleet, G. H., & Lee, T. H. (1988). Properties of wine lactic acid bacteria: their potential enological significance. *American Journal of Enology and Viticulture*, *39*, 137–142.
- De las Rivas, B., Marcobal, Á., & Muñoz, R. (2004). Allelic diversity and population structure in *Oenococcus oeni* as determined from sequence analysis of housekeeping. *Applied and Environmental Microbiology*, *70*(12), 7210–7219.
- De Man, J. C., Rogosa, M., & Sharpe, M. E. (1960). A medium for the cultivation of lactobacilli. *J. Appl. Bacteriol.*, *23*, 130–135.
- Delaherche, A., Claisse, O., & Lonvaud-Funel, A. (2004). Detection and quantification of *Brettanomyces bruxellensis* and “ropy” *Pediococcus damnosus* strains in wine by real-time polymerase chain reaction. *Journal of Applied Microbiology*, *97*(5), 910–915.

- Delaherche, A., Bon, E., Dupé, A., Lucas, M., Arveiler, B., De Daruvar, A., & Lonvaud-Funel, A. (2006). Intraspecific diversity of *Oenococcus oeni* strains determined by sequence analysis of target genes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 73(2), 394–403.
- Delfini, C. (1983). Studio sull'attività biologica della schizoflora lattica nei mosti e nei vini. I. Isolamento e identificazione tassonomica di stipiti di batteri lattici dotati dell'atitudine a svolgere la fermentazione malolattica nei vini acidi. *Vignevini*, 10, 67–74.
- Delfini, C. (1989). Ability of wine malolactic bacteria to produce histamine. *Sciences Des Aliments*, 9, 413–416.
- Deepak, S. A., Kottapalli, K. R., Rakwal, R., Oros, G., Rangappa, K. S., Iwahashi, H., Masuo, Y. & Agrawal, G. K. (2007). Real-time PCR: revolutionizing detection and expression analysis of genes. *Current Genomics*, 8, 234–251.
- Desroche, N., Beltramo, C., & Guzzo, J. (2005). Determination of an internal control to apply reverse transcription quantitative PCR to study stress response in the lactic acid bacterium *Oenococcus oeni*. *Journal of Microbiological Methods*, 60(3), 325–233.
- Dick, K. J., Molan, P. C., & Eschenbruch, R. (1992). The isolation from *Saccharomyces cerevisiae* of two antibacterial cationic proteins that inhibit malolactic bacteria. *Vitis*, 31, 105–116.
- Dicks, L. M. T., van Vuuren, H. J. J., & Dellaglio, F. (1990). Taxonomy of *Leuconostoc* species, particularly *Leuconostoc oenos*, as revealed by numerical analysis of total soluble cell protein patterns, DNA base compositions, and DNA-DNA hybridizations. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 40, 83–91.
- Dicks, L. M. T., Fantuzzi, L., González, F. C., Du Toit, M., & Dellaglio, F. (1993). *Leuconostoc argentinum* sp. nov., isolated from argentine raw milk. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 43, 347–351.
- Dicks, L. M. T., Dellaglio, F., & Collins, M. D. (1995). Proposal to reclassify *Leuconostoc oenos* as *Oenococcus oeni* [corrig.] gen. nov., comb. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 45, 395–397.
- D'Incecco, N., Bartowsky, E., Kassara, S., Lante, A., Spettoli, P., & Henschke, P. (2004). Release of glycosidically bound flavour compounds of Chardonnay by *Oenococcus oeni* during malolactic fermentation. *Food Microbiology*, 21(3), 257–265.

- Dimopoulou, M., Hazo, L., & Dols-Lafargue, M. (2012). Exploration of phenomena contributing to the diversity of *Oenococcus oeni* exopolysaccharides. *International Journal of Food Microbiology*, 153(1-2), 114–122.
- Dimopoulou, M., Vuillemin, M., Campbell-Sills, H., Lucas, P. M., Ballestra, P., Miot-Sertier, C., Favier, M., Coulon, J., Moine, V., Doco, T., Roques, M., Williams, P., Petrel, M., Gontier, E., Moulis, C., Remaud-Simeon, M. & Dols-Lafargue, M. (2014). Exopolysaccharide (EPS) synthesis by *Oenococcus oeni*: from genes to phenotypes. *PloS One*, 9(6), e98898.
- 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 Appl Microbiol*, 94(4), 738–746.
- Drici-Cachon, Z., Guzzo, J., Cavin, J. F., & Diviès, C. (1996). Acid tolerance in *Leuconostoc oenos*. Isolation and characterization of an acid-resistant mutant. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 44, 785–789.
- Edwards, C. G., Jensen, K. A., Spayd, S. E., & Seymour, B. J. (1991). Isolation and characterization of native strains of *Leuconostoc oenos* from Washington state wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 42, 219–226.
- Endo, A., & Okada, S. (2006). *Oenococcus kitaharae* sp. nov., a non-acidophilic and non-malolactic-fermenting oenococcus isolated from a composting distilled shochu residue. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56, 2345–2348.
- Ercolini, D., Moschetti, G., Blaiotta, G., & Coppola, S. (2001). Behavior of variable V3 region from 16 rDNA of lactic acid bacteria in denaturing gradient gel electrophoresis. *Current Microbiology*, 42, 199–202.
- Esparcia, A. (2002). Selección de cepas de *Oenococcus oeni* iniciadoras de la fermentación maloláctica, resistentes a fagos. *Tesis Doctoral*. Universidad de Valencia.
- Etievant, P. (1991). Wine. In *Volatile compounds in food and beverage*. H. Maarse (Ed.), (pp. 483–546). New York: Marcel Dekker, Inc.
- Farber, J. M. (1996). An introduction to the hows and whys of molecular typing. *Journal of Food Protection*, 59, 1091–1101.
- Feuillat, M., Bidan, P., & Rosier, Y. (1977). Croissance des bactéries lactiques à partir des principaux constituants azotés du vin. *Annales de Technologie Agricole*, 19, 141–154.

- Fleet, G. H. (2003). Yeast interactions and wine flavour. *International Journal of Food Microbiology*, 86, 11–22.
- Fontana, C., Cocconcelli, S. P., & Vignolo, G. (2005). Monitoring the bacterial population dynamics during fermentation of artisanal Argentinean sausages. *International Food Microbiology*, 103, 131–142.
- Fornachon, J. C. M. (1968). Influence of different yeasts on the growth of lactic acid bacteria in wine. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 19, 374–378.
- Fortier, L.-C., Tourdot-Maréchal, R., Diviès, C., Lee, B. H., & Guzzo, J. (2003). Induction of *Oenococcus oeni* H⁺-ATPase activity and mRNA transcription under acidic conditions. *FEMS Microbiology Letters*, 222, 165–169.
- Fugelsang, K., & Edwards, C. (2007). *Wine microbiology. Practical applications and procedures*. K. Fugelsang & C. Edwards (Eds.) (2nd edi., p. 408). New York, USA: Springer Science+Business Media LLC.
- Frayne, R. F. (1986). Direct analysis of the major organic components in grape must and wine using high performance liquid chromatography. *American Journal Enology and Viticulture*, 37, 281–287.
- Gagné, S., Lucas, P. M., Perello, M. C., Claisse, O., Lonvaud-Funel, A., & de Revel, G. (2010). Variety and variability of glycosidase activities in an *Oenococcus oeni* strain collection tested with synthetic and natural substrates. *Journal of Applied Microbiology*, 110(1), 218–228.
- Gagnon, R., & Peterson, J. (1998). Estimation of confidence intervals for area under the curve from destructively obtained pharmacokinetic data. *Journal Pharmacokinetic Pharmacodyn*, 26, 87–102.
- Galland, D., Tordot-Maréchal, R., & Abraham, M. (2003). Absence of malolactic activity is a characteristics of H⁺ATPase-deficient mutants of the lactic acid bacterium *Oenococcus oeni*. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 1973–1979.
- Garai, G., Dueñas, M. T., Irastorza, A., & Moreno-Arribas, M. V. (2007). Biogenic amine production by lactic acid bacteria isolated from cider. *Letters in Applied Microbiology*, 45, 473–478.
- García-Alegría, E., López, I., Ruiz, J. I., Sáenz, J., Fernández, E., Zarazaga, M., Dizy, M., Torres, C. & Ruiz-Larrea, F. (2004). High tolerance of wild *Lactobacillus plantarum* and *Oenococcus oeni* strains to lyophilisation and stress environmental conditions of acid pH and ethanol. *FEMS Microbiology Letters*, 230(1), 53–61.

- García-Moruno, E., & Muñoz, R. (2012). Does *Oenococcus oeni* produce histamine? *International Journal of Food Microbiology*, *157*(2), 121–129.
- García-Ruiz, A., Tabasco, R., Requena, T., Claisse, O., Lonvaud-Funel, A., Bartolomé, B., & Moreno-Arribas, M. V. (2013). Genetic diversity of *Oenococcus oeni* isolated from wines treated with phenolic extracts as antimicrobial agents. *Food Microbiology*, *36*(2), 267–274.
- Gardini, F., Zaccarelli, A., Belletti, N., Faustini, F., Cavazza, A., Martuscelli, M., Mastrola, D., & Suzzi, G. (2005). Factors influencing biogenic amine production by a strain of *Oenococcus oeni* in a model system. *Food Control*, *16*(7), 609–616.
- Garvie, E. I. (1960). The genus *Leuconostoc* and its nomenclature. *Journal of Dairy Research*, *27*, 283–292.
- Garvie, E. I. (1967a). *Leuconostoc oenos* sp. nov. *Journal of Genetic and Microbiology*, *48*, 431–438.
- Garvie, E. I. (1967b). The growth factor and amino acid requirements of species of the genus *Leuconostoc*, including *Leuconostoc paramesenteroides* (sp. nov.) and *Leuconostoc oenos*. *Journal of General Microbiology*, *48*, 439–447.
- Garvie, E. I. (1969). Lactic dehydrogenases of strain of the genus *Leuconostoc*. *Journal of Genetic and Microbiology*, *58*, 85–94.
- Garvie, E. I. (1980). Bacterial lactate dehydrogenases. *Microbiological Reviews*, *44*, 106–139.
- Garvie, E. I., & Farrow, J. A. (1980). The differentiation of *Leuconostoc oenos* from non acidophilic species of *Leuconostoc* and the identification of five strains from the American Type Culture Collection. *American Journal of Enology and Viticulture*, *31*, 154–157.
- Garvie, E. I. (1981). Sub-divisions within the genus *Leuconostoc* as shown by RNA/DNA hybridization. *Journal of Genetic and Microbiology*, *127*, 209–212.
- Garvie, E. I. (1986). Genus *Leuconostoc* van Tieghem 1878, 198^{AL} emend mut. char. Hucker and Pederson 1930, 66^{AL}. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe, & J. G. Holt (Eds.), (vol. 2, pp. 1071–1075). Williams & Wilkins, Baltimore, Md.
- Gasser, F., Monlel, M.-C., Talon, R., & Champomier, M. (1994). Application de la taxonomie moléculaire à la classification des bactéries lactiques. In *Bactéries Lactiques*. H. Roissart & F. M. Luquet (Eds.), (Vol. I, pp. 117–140). Loric. France.

- González-Arenzana, L., Santamaría, P., López, R., & López-Alfaro, I. (2014). *Oenococcus oeni* strain typification by combination of multilocus sequence typing and pulsed field gel electrophoresis analysis. *Food Microbiology*, 38, 295–302.
- Grandvalet, C., Coucheney, F., Beltramo, C., & Guzzo, J. (2005). CtsR is the master regulator of stress response gene expression in *Oenococcus oeni*. *Journal of Bacteriology*, 187(16), 5614–5623.
- Grandvalet, C., Assad-García, J. S., Chu-Ky, S., Tollot, M., Guzzo, J., Gresti, J., & Tourdot-Maréchal, R. (2008). Changes in membrane lipid composition in ethanol- and acid-adapted *Oenococcus oeni* cells: characterization of the *cfa* gene by heterologous complementation. *Microbiology (Reading, England)*, 154, 2611–2619.
- Gregersen, T. (1978). Rapid method for distinction of Gram-negative from Gram-positive bacteria. *European Journal of Applied Microbiology*, 5, 123–127.
- Grimaldi, A., McLean, H., & Jiranek, V. (2000). Identification and partial characterization of glycosidic activities of commercial strains of the lactic acid bacterium *Oenococcus oeni*. *American Journal of Enology and Viticulture*, 51, 362–364.
- Grimaldi, A., Jiranek, V., & Bartowsky, E. (2005). A survey of glycosidase activities of commercial wine strains of *Oenococcus oeni*. *International Journal of Food Microbiology*, 105, 233–244.
- Guerrini, S., Mangani, S., Granchi, L., & Vincenzini, M. (2002). Biogenic amine production by *Oenococcus oeni*. *Current Microbiology*, 44(5), 374–378.
- Guerrini, S., Bastianini, A., Blaiotta, G., Granchi, L., Moschetti, G., Coppola, S., Romano, P., & Vincenzini, M. (2003). Phenotypic and genotypic characterization of *Oenococcus oeni* strains isolated from Italian wines. *International Journal of Food Microbiology*, 85(1), 1–14.
- Guija, A. (2011). Caracterización de la biodiversidad existente en cepas de *Oenococcus oeni* de la colección ENOLAB: Bases para la búsqueda racional de cepas eficaces y seguras para su utilización en la vinificación. *Tesis de Máster Biología Molecular Celular y Genética. Universidad de Valencia*.
- Guilloux-Benatier, M., & Feuillat, M. (1993). Incidence de la clarification des moûts de raisin sur les fermentiscibilités alcoolique et malolactique. *Journal International Des Sciences de La Vigne et Du Vin*, 27, 299–311.

- Guilloux-Benatier, M., Guerreau, J., & Feuillat, M. (1995). Influence of initial colloid content on yeast macromolecule production and oil the metabolism of wine microorganisms. *American Journal of Enology and Viticulture*, *46*, 486–492.
- Guilloux-Benatier, M., Pageault, O., Man, A., & Feuillat, M. (2000). Lysis of yeast cells by *Oenococcus oeni* enzymes. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, *25*, 193–197.
- Guzzo, J., Cavin, J. F., & Diviès, C. (1994). Induction of stress proteins in *Leuconostoc oenos* to perform direct inoculation of wine. *Biotechnology Letters*, *16*, 1189–1194.
- Guzzo, J., Delmas, F., Pierre, F., Jobin, M. P., Samyn, B., Van Beeumen, J., Cavin, J. F., & Diviès, C. (1997). A small heat shock protein from *Leuconostoc oenos* induced by multiple stresses and during stationary growth phase. *Letters in Applied Microbiology*, *24*, 394–396.
- Guzzo, J., Jobin, M. P., & Diviès, C. (1998). Increase of sulfite tolerance in *Oenococcus oeni* by means of acidic adaptation. *FEMS Microbiology Letters*, *160*, 43–47.
- Guzzo, J., Jobin, M. P., Delmas, F., Fortier, L. C., Garmyn, D., Tourdot-Maréchal, R., Lee, B. & Diviès, C. (2000). Regulation of stress response in *Oenococcus oeni* as a function of environmental changes and growth phase. *International Journal of Food Microbiology*, *55*(1-3), 27–31.
- Guzzo, J., & Desroche, N. (2009). Physical and chemical stress factors in lactic acid bacteria. In *Biology of microorganisms on grapes, in must and in wine*. H. König, G. Unden, & J. Fröhlich (Eds.), (pp: 293–306). Berlin-Heidelberg: Springer-Verlag.
- Guzzon, R., Poznanski, E., Conterno, L., Vagnoli, P., Krieger-Weber, S., & Cavazza, A. (2009). Selection of a new highly resistant strain for malolactic fermentation under difficult conditions. *South African Journal for Enology and Viticulture*, *30*(2), 133–141.
- Henick-Kling, T., Sandine, W. E., & Heatherbell, D. A. (1989). Evaluation of malolactic bacteria isolated from Oregon wines. *Applied and Environmental Microbiology*, *55*(8), 2010–2016.
- Henick-Kling, T. (1993). Malolactic Fermentation. In *Wine Microbiology and Biotechnology*. G. H. Fleet (Ed.), (pp. 289–326). Chur, Switzerland: Hardwood Academic Publisher.

- Herbers, P. M., Elder, D. A., & Woo, J. (2011). Area Under a Curve: Calculation and visualization. *Paper DG12-2011*. Cincinnati, OH: Cincinnati Children's Hospital Medical Center.
- Herraiz, T. (1993). Amino acids and ethyl esters of amino acids in sparkling and “sur lie” wines. *Italian Journal of Food Science*, 5, 11–20.
- Holzapfel, W. H., Haberer, P., Geisen, R., Björkroth, J., & Schillinger, U. (2001). Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 73, 365S–373S.
- Holt, J. G., Krieg, N. R., Sneath, P. H. A., Staley, J. T., & Williams, S. T. (1994). *Bergey's manual of determinative bacteriology* (9th ed.). Baltimore: Williams & Wilkins.
- Hunter, P. R., & Gaston, M. A. (1988). Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *Journal of Clinical Microbiology*, 26(11), 2465–2466.
- Ibarburu, I., Soria-Díaz, M. E., Rodríguez-Carvajal, M. A., Velasco, S. E., Tejero-Mateo, P., Gil-Serrano, A. M., Irastorza, A. & Dueñas, M. T. (2007). Growth and exopolysaccharide (EPS) production by *Oenococcus oeni* I4 and structural characterization of their EPSs. *Journal of Applied Microbiology*, 103(2), 477–486.
- Ibarburu, I., Aznar, R., Elizaquível, P., García-Quintáns, N., López, P., Munduate, A., Irastorza, A., & Dueñas, M. T. (2010). A real-time PCR assay for detection and quantification of 2-branched (1,3)-beta-D-glucan producing lactic acid bacteria in cider. *International Journal of Food Microbiology*, 143(1-2), 26–31.
- Irwin, O. R., Subden, R. R., Lautensach, A., & Cunningham, J. P. (1983). Genetic heterogeneity in lactobacilli and leuconostocs of enological significance. *Canadian Journal of Institute of Food Science and Technology*, 16, 79–81.
- Izquierdo, P. M., García, E., Martínez, J., & Chacón, J. L. (2004). Selection of lactic bacteria to induce malolactic fermentation in red wine of cv. Cencibel. *VITIS*, 43(2), 149–153.
- Izquierdo Cañas, P. M., Ruiz Pérez, P., Seseña Prieto, S., & Palop Herreros, M. LL. (2009a). Ecological study of lactic acid microbiota isolated from Tempranillo wines of Castilla-La Mancha. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 108(3), 220–224.
- Izquierdo Cañas, P. M., García Romero, E., Ruiz Pérez, P., Seseña Prieto, S., & Palop Herreros, M. L. (2009b). Biogenic amine production by *Oenococcus oeni* isolates

- from malolactic fermentation of Tempranillo wine. *Journal of Food Protection*, 72, 907–910.
- Izquierdo Cañas, P. M., Pérez-Martín, F., García Romero, E., Seseña Prieto, S., & Palop Herreros, M. LL. (2012). Influence of inoculation time of an autochthonous selected malolactic bacterium on volatile and sensory profile of Tempranillo and Merlot wines. *International Journal of Food Microbiology*, 156(3), 245–254.
- Izquierdo Cañas, P. M., García Romero, E., Pérez Martín, F., Seseña Prieto, S., Heras Manso, J. M., & Palop Herreros, M. LL. (2013). Behaviour during malolactic fermentation of three strains of *Oenococcus oeni* used as direct inoculation and acclimatisation cultures. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 34(1), 1–9.
- Jay, J. M. (2000). Fermentation and fermented dairy products. In *Modern food microbiology* (6th ed.). Inc. Gaithersburg, USA: An Aspen Publication, Aspen Publishers.
- Jensen, K. A., & Edwards, C. G. (1991). Modification of the API rapid CH system for characterization of *Leuconostoc oenos*. *American Journal of Enology and Viticulture*, 42, 274–277.
- Jobin, M. P., Garmyn, D., Diviès, C., & Guzzo, J. (1999). Expression of the *Oenococcus oeni* *trxA* gene is induced by hydrogen peroxide and heat shock. *Microbiology (Reading, England)*, 145, 1245–1251.
- Kandler, O. (1983). Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 49, 209–224.
- Knoll, C., Divol, B., & du Toit, M. (2008). Genetic screening of lactic acid bacteria of oenological origin for bacteriocin-encoding genes. *Food Microbiology*, 25, 983–991.
- Konings, W. N. (2006). Microbial transport: adaptations to natural environments. *Antonie van Leeuwenhoek*, 90, 325–342.
- König, H., & Fröhlich, J. (2009). Lactic acid bacteria. In *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine*. H. König, G. Uden, & J. Fröhlich (Eds.), (pp. 3–29). Berlin-Heidelberg: Springer-Verlag.
- Krieger-Weber, S. (2009). Application of yeast and bacteria as starter culture. In *Biology of microorganisms on grapes, in must and in wine*. H. König, G. Uden, & J. Fröhlich (Eds.), (pp. 489–511). Berlin-Heidelberg: Springer-Verlag.
- Kubista, M., Andrade, J. M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonák, J., Lind, K., Sindelka,

- R, Sjöback, R., Sjögreen, B., Strömbom, L., Stahlberg, A., & Zoric, N. (2006). The real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine*, 27, 95–125.
- Lafon-Lafourcade, S., & Peynaud, E. (1974). Sur l'action antibactérienne de l'anhydride sulfureux sous forme libre et sous forme combinée. *Connaissance de La Vigne et Du Vin*, 8, 187–203.
- Lafon-Lafourcade, S., Carre, E., & Ribéreau-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.
- Landete, J. M., Ferrer, S., & Pardo, I. (2005). Which lactic acid bacteria are responsible of histamine production in wine? *Journal of Applied Microbiology*, 99, 580–586.
- Landete, J. M., Pardo, I., & Ferrer, S. (2006). Histamine, histidine, and growth-phase mediated regulation of the histidine decarboxylase gene in lactic acid bacteria isolated from wine. *FEMS Microbiology Letters*, 260, 84–90.
- Landete, J. M., Pardo, I., & Ferrer, S. (2007). Tyramine and phenylethylamine production among lactic acid bacteria isolated from wine. *International Journal of Food Microbiology*, 115, 364–368.
- Larisika, M., Claus, H., & König, H. (2008). Pulsed-field gel electrophoresis for the discrimination of *Oenococcus oeni* isolates from different wine-growing regions in Germany. *International Journal of Food Microbiology*, 123(1-2), 171–176.
- 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. *Systematic and Applied Microbiology*, 29(5), 375–381.
- Leitão, M. C., Teixeira, H. C., Barreto Crespo, M. T., & San Romão, M. V. (2000). Biogenic amines occurrence in wine. Amino acid decarboxylase and proteolytic activities expression by *Oenococcus oeni*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(7), 2780–2784.
- Liu, S. Q. (1993). Arginine metabolism in malolactic wine lactic acid bacteria and its oenological implications. *Ph D Thesis, Massey University (AUS)*. Massey University (Australia).
- Liu, S., 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 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*(3), 315–327.
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. *Methods*, *25*, 402–408.
- Lonvaud-Funel, A., Joyeux, A., & Dessens, C. (1988). Inhibition of malolactic fermentation of wines by products of yeast metabolism. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *44*, 183–191.
- Lonvaud-Funel, A., & Joyeux, A. (1994). Histamine production by wine lactic acid bacteria: isolation of a histamine-producing strain of *Leuconostoc oenos*. *Journal Applied Bacteriology*, *77*, 401–407.
- Lonvaud-Funel, A. (1999). Lactic acid bacteria in the quality improvement and depreciation of wine. *Antonie van Leeuwenhoek*, *76*, 317–331.
- Lonvaud-Funel, A. (2001). Biogenic amines in wines: role of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, *199*(1), 9–13.
- Lopes, J., Ribeyre, C., & Nicolas, A. (2006). Complex minisatellite rearrangements generated in the total or partial absence of Rad27/hFEN1 activity occur in a single generation and are Rad51 and Rad52 dependent. *Molecular and Cellular Biology*, *26*, 6675–6689.
- López, I., Tenorio, C., Zarazaga, M., Dizy, M., Torres, C., & Ruiz-Larrea, F. (2007). Evidence of mixed wild populations of *Oenococcus oeni* strains during wine spontaneous malolactic fermentations. *European Food Research and Technology*, *226*(1-2), 215–223.
- López, I., Torres, C., & Ruiz-Larrea, F. (2008). Genetic typification by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) and randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) of wild *Lactobacillus plantarum* and *Oenococcus oeni* wine strains. *European Food Research and Technology*, *227*(2), 547–555.
- López, I., Santamaría, P., Tenorio, C., Garijo, P., Gutiérrez, A. R., & López, R. (2009). Evaluation of lysozyme to control vinification process and histamine production in Rioja wines. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, *19*(9), 1005–1012.

- Maicas, S., Pardo, I., & Ferrer, S. (1999). Continuous malolactic fermentation in red wine using free *Oenococcus oeni*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *15*(6), 737–739.
- Maicas, S., Ferrer, S., & Pardo, I. (2002). NAD(P)H regeneration is the key for heterolactic fermentation of hexoses in *Oenococcus oeni*. *Microbiology*, *148*, 325–332.
- Maitre, M., Weidmann, S., Dubois-Brissonnet, F., David, V., Covès, J., & Guzzo, J. (2014). Adaptation of the wine bacterium *Oenococcus oeni* to ethanol stress: role of the small heat shock protein Lo18 in membrane integrity. *Applied and Environmental Microbiology*, *80*(10), 2973–2980.
- Manca de Nadra, M. C., Farías, M. E., Moreno-arribas, M. V., Pueyo, E., & Polo, M. C. (1997). Proteolytic activity of *Leuconostoc oenos*. Effect on proteins and polypeptides from white wine, *150*, 135–139.
- Manca de Nadra, M. C., Farias, M. E., Moreno-Arribas, M. V., Pueyo, E., & Polo, M. C. (1999). A proteolytic effect of *Oenococcus oeni* on the nitrogenous macromolecular fraction of red wine. *FEMS Microbiology Letters*, *147*, 41–47.
- Mangani, S., Guerrini, S., Granchi, L., & Vincenzini, M. (2005). Putrescine accumulation in wine: role of *Oenococcus oeni*. *Current Microbiology*, *51*(1), 6–10.
- Mansfield, A. K., Zoecklein, B. W., & Whiton, R. S. (2002). Quantification of glycoside activity in selected strains of *Brettanomyces bruceellensis* and *Oenococcus oeni*. *American Journal of Enology and Viticulture*, *53*, 303–307.
- Makarova, K., Slesarev, A., Wolf, Y., Sorokin, A., Mirkin, B., Koonin, E. y col. (2006). Comparative genomics of the lactic acid bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA*, *103*(42), 15611–15616.
- Makarova, K. S., & Koonin, E. V. (2007). Evolutionary genomics of lactic acid bacteria. *Journal of Bacteriology*, *189*(4), 1199–1208.
- Mangani, S., Guerrini, S., Granchi, L., & Vincenzini, M. (2005). Putrescine accumulation in wine: role of *Oenococcus oeni*. *Current Microbiology*, *51*(1), 6–10.
- Marcobal, A., de las Rivas, B., 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.

- Marcobal, A. M., Sela, D. A., Wolf, Y. I., Makarova, K. S., & Mills, D. A. (2008). Role of hypermutability in the evolution of the genus *Oenococcus*. *Journal of Bacteriology*, *190*(2), 564–570.
- Marcobal, A. M., & Mills, D. A. (2009). Genomics of *Oenococcus oeni* and other lactic acid bacteria. In *Biology of microorganisms on grapes, in must and in wine*. H. König, G. Uden, & Fröhlich (Eds.), (pp: 351–336). Berlin- Heidelberg: Springer-Verlag.
- Maret, R., & Sozzi, T. (1977). Flore malolactique de moûts et de vins du Canton du Valais (Suisse. I. Lactobacilles et pédiocoques. *Annales de Technologie Agricole*, *27*, 255–273.
- Marques, A. P., Leitão, M. C., & San Romão, M. V. (2008). Biogenic amines in wines: Influence of oenological factors. *Food Chemistry*, *107*(2), 853–860.
- Marques, A. P., Zé-Zé, L., San-Romão, M. V., & Tenreiro, R. (2010). A novel molecular method for identification of *Oenococcus oeni* and its specific detection in wine. *International Journal of Food Microbiology*, *142*(1-2), 251–255.
- Marques, A. P., Duarte, A. J., Chambel, L., Teixeira, M. F., Romão, M. V. S., & Tenreiro, R. (2011). Genomic diversity of *Oenococcus oeni* from different winemaking regions of Portugal. *International Microbiology*, *14*, 155–162.
- Martínez-Murcia, A. J., & Collins, M. D. (1991). A phylogenetic analysis of an atypical leuconostoc: description of *Leuconostoc fallax* sp. nov. *FEMS Microbiology Letters*, *82*(1), 55–60.
- Matthews, A., Grimaldi, A., Walker, M., Bartowsky, E., Grbin, P., & Jiranek, V. (2004). Lactic acid bacteria as a potential source of enzymes for use in vinification. *Applied and Environmental Microbiology*, *70*(10), 5715–5731.
- Matthews, A., Grbin, P. R., & Jiranek, V. (2006). A survey of lactic acid bacteria for enzymes of interest to oenology. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, *12*(3), 235–244.
- Matthews, A., Grbin, P., & Jiranek, V. (2007). Biochemical characterisation of the esterase activities of wine lactic acid bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *77*(2), 329–337.
- McDonald, L. C., Fleming, H. P., & Hassan, H. M. (1990). Acid tolerance of *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactobacillus plantarum*. *Applied and Environmental Microbiology*, *56*(7), 2120–2124.

- McMahon, H., Zoecklein, B. W., Fugelsang, K., & Jasinski, Y. (1999). Quantification of glycosidase activities in selected yeasts and lactic acid bacteria. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 23(3), 198–203.
- Mesas, J. M., Rodríguez, M. C., & Alegre, M. T. (2004). Tolerancia de *Oenococcus oeni* RS1 a las condiciones de estrés del vino. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 4, 278–282.
- Mills, D. A., Rawsthorne, H., Parker, C., Tamir, D., & Makarova, K. (2005). Genomic analysis of *Oenococcus oeni* PSU-1 and its relevance to winemaking. *FEMS Microbiology Reviews*, 29, 465–475.
- Moreno-Arribas, V., Torlois, S., Joyeux, A., Bertrand, A., & Lonvaud-Funel, A. (2000). Isolation, properties and behaviour of tyramine-producing lactic acid bacteria from wine. *Journal of Applied Microbiology*, 88, 584–593.
- Moreno-Arribas, M. V., Polo, M. C., Jorganes, F., & Muñoz, R. (2003). Screening of biogenic amine production by lactic acid bacteria isolated from grape must and wine. *International Journal of Food Microbiology*, 84(1), 117–123.
- Moreno-Arribas, M. V., & Polo, M. C. (2005). Winemaking biochemistry and microbiology: current knowledge and future trends. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45, 265–286.
- Moreno-Arribas, M. V., & Polo, M. C. (2009). Amino acids and biogenic amines. In *Wine chemistry and biochemistry*. M. V. Moreno-Arribas & M. C. Polo (Eds.), (pp. 163–189). New York: Springer Science+Business Media
- Moreno, J. J., & Peinado, R. A. (2010). *Química enológica* (p. 520). Madrid: Mundi-Prensa.
- Nakamoto, H., & Vigh, L. (2007). The small heat proteins and their clients. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 64, 294–306.
- Navarro, L., Zarazaga, M., Sáenz, J. S., Ruiz-Larrea, F., & Torres, C. (2000). Bacteriocin production by lactic acid bacteria isolated from Rioja red wines. *Journal of Applied Microbiology*, 88, 44–51.
- Olguín, N., Bordons, A., & Reguant, C. (2009). Influence of ethanol and pH on the gene expression of the citrate pathway in *Oenococcus oeni*. *Food Microbiology*, 26(2), 197–203.
- Olguín, N., Bordons, A., & Reguant, C. (2010). Multigenic expression analysis as an approach to understanding the behaviour of *Oenococcus oeni* in wine-like conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 144(1), 88–95.

- Pardo, I., García, M. J., Zuñiga, M., & Uruburu, F. (1988). Evaluation of the API 50 CHL system for identification of *Leuconostoc oenos*. *American Journal of Enology and Viticulture*, *39*, 347–350.
- Pardo, I., Rodas, A. M., & Ferrer, S. (1998). Study on population dynamics of *Oenococcus oeni* in wines by using RFLP-PFGE. In *The management of malolactic fermentation and quality of wine* (pp. 93–96). Vérone: Les Entrepreneurs Scientifiques Lallemand.
- Peña-Gallego, A., Hernández-Orte, P., Cacho, J., & Ferreira, V. (2009). Biogenic amine determination in wines using solid-phase extraction: a comparative study. *Journal of Chromatography A*, *1216*(15), 3398–3401.
- Pérez-Martín, F., Seseña, S., Izquierdo, P. M., & Palop, M. L. (2013). Esterase activity of lactic acid bacteria isolated from malolactic fermentation of red wines. *International Journal of Food Microbiology*, *163*(2-3), 153–158.
- Peynaud, E., & Domercq, S. (1968). Étude de quatre cents souches de coques hétérolactiques isolés de vins. *Annales Institut Pasteur-Lille*, *19*, 159–170.
- Pilone, G. J., Clayton, M. G., & van Duivenboden, R. J. (1991). Characterization of wine lactic acid bacteria: single broth culture for tests of heterofermentation, mannitol from fructose, and ammonia from arginine. *American Journal of Enology and Viticulture*, *42*, 153–157.
- Pinzani, P., Bonciani, L., Pazzagli, M., Orlando, C., Guerrini, S., & Granchi, L. (2004). Rapid detection of *Oenococcus oeni* in wine by real-time quantitative PCR. *Letters in Applied Microbiology*, *38*(2), 118–124.
- Pozo-Bayón, M. A., G-alegría, E., Polo, M. C., Tenorio, C., Martín-Álvarez, P. J., Calvo de la Banda, M. T., Ruiz-Larrea, F. & Moreno-Arribas, M. V. (2005). Wine volatile and amino acid composition after malolactic fermentation: effect of *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus plantarum* starter cultures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *53*, 8729–8735.
- Pramateftaki, P. V., Metafa, M., Karapetrou, G., & Marmaras, G. (2012). Assessment of the genetic polymorphism and biogenic amine production of indigenous *Oenococcus oeni* strains isolated from Greek red wines. *Food Microbiology*, *29*(1), 113–120.
- Pretorius, I. S. (2000). Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast*, *16*, 675–729.

- Radler, F., & Bröhl, K. (1984). The metabolism of several carboxylic acids by lactic acid bacteria. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*, 179, 228–231.
- Radler, F., & Yannissis, C. (1972). Weinsäureabbau bei milchsäurebakterien. *Archives of Microbiology*, 82, 219–238.
- Rapp, A., & Versini, G. (1991). Influence of nitrogen compounds in grapes on aroma compounds of wines. In *Proceeding of International Symposium on Nitrogen in Grapes and Wine* (pp. 156–164). Seattle, Washington, USA.
- Reguant, C., & Bordons, A. (2003). Typification of *Oenococcus oeni* strains by multiplex RAPD-PCR and study of population dynamics during malolactic fermentation. *Journal of Applied Microbiology*, 95(2), 344–353.
- Reguant, C., Carrete, R., Ferrer, N., & Bordons, A. (2005). Molecular analysis of *Oenococcus oeni* population dynamics and the effect of aeration and temperature during alcoholic fermentation on malolactic fermentation. *International Journal of Food Science and Technology*, 40(4), 451–459.
- Remize, F., Gaudin, A., Kong, Y., Guzzo, J., Alexandre, H., Krieger, S., & Guilloux-Benatier, M. (2006). *Oenococcus oeni* preference for peptides: qualitative and quantitative analysis of nitrogen assimilation. *Archives of Microbiology*, 185(6), 459–469.
- Renouf, V., Delaherche, A., Claisse, O., & Lonvaud-Funel, A. (2008). Correlation between indigenous *Oenococcus oeni* strain resistance and the presence of genetic markers. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 35(1), 27–33.
- Renouf, V., Vayssieres, L., Claisse, O., & Lonvaud-Funel, A. (2009). Genetic and phenotypic evidence for two groups of *Oenococcus oeni* strains and their prevalence during winemaking. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 83(1), 85–97.
- Ribéreau-Gayon, J., Glories, Y., Maujean, A., & Dubordieu, D. (2000). Glucids. In *Handbook of Enology* (Vol. 2). Baffins Lane, Chichester, West Sussex, England: John Wiley & Sons Ltd.
- Ribéreau-Gayon, J., Dubordieu, D., Donèche, B., & Lonvaud, A. (2006). The microbiology of wine and vinifications. In *Hand-book of enology*. P. Ribereau-Gayon (Ed.), (Vol. 1). Chichester, UK: Wiley.

- 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(3), 412–22.
- Rodas, A. M., Ferrer, S. & Pardo, I. (2005). Polyphasic study of wine *Lactobacillus* strains: taxonomic implications. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55, 197–207.
- Rojo-Bezares, B. S. Y., Navarro, L., Zarazaga, M., Ruiz-Larrea, F., & Torres, C. (2007). Coculture-inducible bacteriocin activity of *Lactobacillus plantarum* strain J23 isolated from grape must. *Food Microbiology*, 24, 482–491.
- Ruiz, P., Izquierdo, P. M., Seseña, S., & Palop-Llanos, M. (2008). Intraspecific genetic diversity of lactic acid bacteria from malolactic fermentation of Cencibel wines as derived from combined analysis of RAPD-PCR and PFGE patterns. *Food Microbiology*, 25(7), 942–948.
- Ruiz, P., Izquierdo, P. M., Seseña, S., & Palop, M. L. (2010). Selection of autochthonous *Oenococcus oeni* strains according to their oenological properties and vinification results. *International Journal of Food Microbiology*, 137(2-3), 230–235.
- Ruiz, P., Izquierdo, P. M., Seseña, S., García, E., & Palop, M. L. (2012). Malolactic fermentation and secondary metabolite production by *Oenococcus oeni* strains in low pH wines. *Journal of Food Science*, 77(10), M579–M585.
- Saguir, F. M., Loto Campos, I. E., Maturano, C., & Manca de Nadra, M. C. (2009). Identification of dominant lactic acid bacteria isolated from grape juices. Assessment of its biochemical activities relevant to flavor development in wine. *International Journal of Wine Research*, 1, 175–185.
- Salema, M., Capucho, I., Poolman, B., San Romao, M. V, & Dias, M. C. (1996). *In vitro* reassembly of the malolactic fermentation pathway of *Leuconostoc oenos* (*Oenococcus oeni*). *Journal of Bacteriology*, 178, 5537–5539.
- Sánchez, I., Seseña, S., & Palop, L. L. (2004). Polyphasic study of the genetic diversity of lactobacilli associated with “Almagro” eggplants spontaneous fermentation, based on combined numerical analysis of randomly amplified polymorphic DNA and pulsed-field gel electrophoresis patterns. *Journal of Applied Microbiology*, 97(2), 446–458.

- Sauvageot, N., Gouffi, K., Laplace, J. M., & Auffray, Y. (2000). Glycerol metabolism in *Lactobacillus collinoides* productions of 3-hydroxypropionaldehyde, a precursor of acrolein. *International Journal of Food Microbiology*, *55*, 167–170.
- Sato, H., Yanagida, F., Shinohara, T., Suzuki, M., Suzuki, K., & Yokotsuka, K. (2001). Intraspecific diversity of *Oenococcus oeni* isolated during red wine-making in Japan. *FEMS Microbiology Letters*, *202*(1), 109–114.
- Schwartz, D. C., & Cantor, C. R. (1984). Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell*, *37*, 67–75.
- Semedo, M. T. (1995). Variabilidade genómica em espécies do género *Leuconostoc* e identificação de marcadores moleculares diagnosticantes para a espécie *Leuc. mesenteroides*. Relatio de estágio da Licenciatura. Universidad de Lisboa.
- Severiano, A., Pinto, F. R., Ramirez, M., & Carriço, J. A. (2011). Adjusted Wallace coefficient as a measure of congruence between typing methods. *Journal of Clinical Microbiology*, *49*(11), 3997–4000.
- Sharpe, M. E. (1979). Identification of the lactic acid bacteria. In *Identification methods for microbiologists*. F. A. Skinner & D. W. Lovelock (Eds.), (pp. 233–259). Academic Press.
- Sico, M. A., Bonomo, M. G., & Salzano, G. (2008). Isolation and characterization of *Oenococcus oeni* from Aglianico wines. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *24*(9), 1829–1835
- Sieuwerts, S., de Bok, F. A. M., Hugenholtz, J., & Hylckama, J. E. T. (2008). Unraveling microbial interactions in food fermentations: from classical to genomics approaches. *Applied and Environmental Microbiology*, *74*, 4977–5007.
- Silveira, M. G., Baumgärtner, M., Rombouts, F. M., & Abee, T. (2004). Effect of adaptation to ethanol on cytoplasmic and membrane protein profiles of *Oenococcus oeni*. *Applied and Environmental Microbiology*, *70*(5), 2748–2755.
- Smibert, R. M., & Krieger, N. R. (1981). General characterization. In *Manual of methods for general bacteriology*. P. Gerhardt, R. G. E. Murray, R. N. Costilow, E. W. Nester, W. A. Wood, N. R. Krieg, & G. B. Phillips (Eds.), (pp. 409–443). Washington DC: American Society of Microbiology.
- Sponholz, W. R. (1993). Wine spoilage by microorganisms. In *Wine microbiology and biotechnology*. G. H. Fleet (Ed.), (pp. 395–420). Switzerland: Harwood Academic.
- Solieri, L., Genova, F., De Paola, M., & Giudici, P. (2010). Characterization and technological properties of *Oenococcus oeni* strains from wine spontaneous

- malolactic fermentations: a framework for selection of new starter cultures. *Journal of Applied Microbiology*, 108(1), 285–298.
- Sozzi, T., Maret, R., & Poulin, J. J. (1976). Mise en évidence de bactériophages dans le vin. *Experientia*, 32, 568–569.
- Sozzi, T., Gnaegi, F., D'Amico, N., & Hose, H. (1982). Difficultés de fermentation malolactique du vin dues à des bactériophages de *Leuconostoc oenos*. *Revue Suisse Vitic. Arboric. Hortic.*, 14, 17–23.
- Stahl, M., Pettersson, B., Molin, G., Uhlén, M., & Ahrné, S. (1994). Restriction fragment length polymorphism of *Lactobacillus reuteri* and *Lactobacillus fermentum*, originating from intestinal mucosa based on 16 rRNA genes. *Systematic and Applied Microbiology*, 17, 108–115.
- Stendid, J., Karlsson, J. O., & Hogberg, N. (1994). Intraspecific genetic variation in *Heterobasidium annosum* revealed by amplification of minisatellite DNA. *Mycology Research*, 98, 57–63.
- Strasser de Saad, A. M., & Manca de Nadra, M. C. (1993). Characterization of bacteriocin produced by *Pediococcus pentosaceus* from wine. *Journal of Applied Bacteriology*, 74, 406–410.
- Suárez, J. A., & Íñigo, B. (2004). Inducción de la fermentación maloláctica. Aplicaciones prácticas en bodegas. In *Microbiología enológica: fundamentos de vinificación*. (3th ed., p: 384–410). Madrid: Ed. Mundiprensa.
- Sumby, K. M., Grbin, P. R., & Jiranek, V. (2010). Microbial modulation of aromatic esters in wine: current knowledge and future prospects. *Food Chemistry*, 121(1), 1–16.
- Sumby, K. M., Jiranek, V., & Grbin, P. R. (2013). Ester synthesis and hydrolysis in an aqueous environment, and strain specific changes during malolactic fermentation in wine with *Oenococcus oeni*. *Food Chemistry*, 141(3), 1673–80.
- Teixeira, H., Gonçalves, M. G., Rozès, N., Ramos, A., & San Romão, M. V. (2002). Lactobacillic acid accumulation in the plasma membrane of *Oenococcus oeni*: a response to ethanol stress? *Microbial Ecology*, 43, 146–153.
- Tenreiro, R., Santos, M. A., Paveia, H., & Vieira, G. (1994). Inter-strain relationships among wine leuconostocs and their divergence from other *Leuconostoc* species, as revealed by low frequency restriction fragment analysis of genomic DNA. *Journal Applied Bacteriology*, 77, 271–280.

- Tenreiro, R. (1995). Análise taxonómica em *Leuconostoc oenos*. Uma perspectiva polifásica. *Tesis Doctoral*. Universidad de Lisboa.
- Terrade, N., & Mira de Orduña, R. (2009). Determination of the essential nutrient requirements of wine-related bacteria from the genera *Oenococcus* and *Lactobacillus*. *International Journal of Food Microbiology*, 133(1-2), 8–13.
- Theillin, O., Zorzi, W., Lakaye, B., De Borman, B., Coumans, B., Hennen, G., Grisar, T., Igout, A., & Heinen, E. (1999). Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *Journal of Biotechnology*, 75, 291–295.
- Torriani, S., Felis, G. E., & Fracchetti, F. (2011). Selection criteria and tools for malolactic starters development: an update. *Annals of Microbiology*, 61(1), 33–39.
- Tourdot-Maréchal, R., Cavin, J. F., Drici-Cachon, Z., & Diviès, C. (1993). Transport of malic acid in *Leuconostoc oenos* strains defective in malolactic fermentation: a model to evaluate the kinetic parameters. *Applied and Environmental Microbiology*, 39, 499–505.
- Tourdot-Maréchal, R., Fortier, L.-C., Guzzo, J., Lee, B., & Diviès, C. (1999). Acid sensitivity of neomycin-resistant mutants of *Oenococcus oeni*: a relationship between reduction of ATPase activity and lack of malolactic activity. *FEMS Microbiology Letters*, 178, 319–326.
- Tourdot-Maréchal, R., Gaboriau, D., Beney, L., & Diviès, C. (2000). Membrane fluidity of stressed cells of *Oenococcus oeni*. *International Journal of Food Microbiology*, 55, 269–273.
- Tracey, R. P., & Britz, T. J. (1987). A numerical taxonomic study of *Leuconostoc oenos* strains from wine. *Journal Applied Bacteriology*, 63, 523–532.
- Ugliano, M., Genovese, A., & Moio, L. (2003). Hydrolysis of wine aroma precursors during malolactic fermentation with four commercial starter cultures of *Oenococcus oeni*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(17), 5073–5078.
- Uden, G., & Zaunmüller, T. (2009). Metabolism of sugar and organic acids by lactic acid bacteria from wine and must. In *Biology of microorganism on grape, must and wine*. H. König, G. Uden, & J. Fröhlich (Eds.), (pp. 135–147). Berlin-Heidelberg: Springer-Verlag.
- Vandecasteele, S. J., Peetermans, W. E., Merckx, R., & Van Eldere, J. (2001). Quantification of expression of *Staphylococcus epidermidis* housekeeping genes

- with Taqman quantitative PCR during in vitro growth and different conditions. *Journal of Bacteriology*, 183, 7094–7101.
- Van der Heide, T., & Boolman, B. (2000). Osmoregulated ABC transport system of *Lactococcus lactis* senses water stress via changes in the physical state of membrane. *Biochemistry*, 97, 7102–7106.
- Van Rensburg, P., & Pretorius, I. S. (2000). Enzymes in winemaking, harnessing natural catalyst for efficient biotransformations – a review. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 21, 52–73.
- Van Vuuren, H. J. J., & Dicks, L. M. T. (1993). *Leuconostoc oenos*: a review. *American Journal of Enology and Viticulture*, 44, 99–112.
- Vaquero, I., Marcobal, A., & Muñoz, R. (2004). Tannase activity by lactic acid bacteria isolated from grape must and wine. *International Journal of Food Microbiology*, 96, 199–204.
- Vincenzini, M., Guerrini, S., Mangani, S., & Granchi, L. (2009). Amino acid metabolisms and production of biogenic amines and ethyl carbamate. In *Biology of microorganisms on grapes, in musts and in wine*. H. König, G. Uden, & J. Fröhlich (Eds.), (pp. 167–180). Berlin-Heidelberg: Springer-Verlag.
- Vigentini, I., Picozzi, C., Tirelli, A., Giugni, A., & Foschino, R. (2009). Survey on indigenous *Oenococcus oeni* strains isolated from red wines of Valtellina, a cold climate wine-growing Italian area. *International Journal of Food Microbiology*, 136(1), 123–128.
- Vivas, N., Lonvaud-Funel, A., & Glories, Y. (1997). Effect of phenolic acids and anthocyanins on growth, viability and malolactic activity of a lactic acid bacterium. *Food Microbiology*, 14, 291–300.
- Volschenk, H., van Vuuren, H. J. J., & Viljoen-Bloom, M. (2006). Malic acid in wine: origin, function and metabolism during vinification. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 27, 123–136.
- Vos, P., Garrity, G., Jones, D., Krieg, N. R., Ludwig, W., Rainey, F. A., Schleifer, K-H., & Whitman, W. B. (2011). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: The Firmicutes* (2nd ed., Vol. 3). New York: Springer Dordrecht Heidelberg.
- Welsh, J., & McClelland, M. (1990). Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research*, 18, 7213–7218.

- 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.
- Williams, J. G. K., Kubelic, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A., & Tingei, S. V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, *18*, 6531–6535.
- Wong, M. L., & Medrano, J. F. (2005). Real-time PCR for mRNA quantitation. *BioTechniques*, *39*, 75–85.
- Yang, D., & Woese, C. R. (1989). Phylogenetic structure of the “*Leuconostocs*”: an interesting case of a rapidly evolving organism. *Systematic and Applied Microbiology*, *12*, 145–149.
- Zapparoli, G., Reguant, C., Bordons, A., Torriani, S., & Dellaglio, F. (2000). Genomic DNA fingerprinting of *Oenococcus oeni* strains by Pulsed-Field gel electrophoresis and randomly amplified polymorphic DNA-PCR. *Current Microbiology*, *40*, 351–355.
- Zapparoli, G., Fracchetti, F., Stefanelli, E., & Torriani, S. (2012). Genetic and phenotypic strain heterogeneity within a natural population of *Oenococcus oeni* from Amarone wine. *Journal of Applied Microbiology*, *113*(5), 1087–1096.
- Zavaleta, A. I., Martínez-Murcia, A. J., & Rodríguez-Valera, F. (1996). 16S-23S rDNA intergenic sequences indicate that *Leuconostoc oenos* is phylogenetically homogeneous. *Microbiology*, *142*, 2105–2114.
- Zavaleta, A. I., Martínez-Murcia, A. J., & Rodríguez-Valera, F. (1997). Intraspecific genetic diversity of *Oenococcus oeni* as derived from DNA fingerprinting and sequence analyses. *Applied and Environmental Microbiology*, *63*, 1261–1267.
- Zé-Zé, L., Tenreiro, R., Brito, L., Santos, M. a, & Paveia, H. (1998). Physical map of the genome of *Oenococcus oeni* PSU-1 and localization of genetic markers. *Microbiology (Reading, England)*, *144*(1998), 1145–1156.
- Zé-Zé, L., Tenreiro, R., & Paveia, H. (2000). The *Oenococcus oeni* genome: physical and genetic mapping of strain GM and comparison with the genome of a “divergent” strain, PSU-1. *Microbiology (Reading, England)*, *146 Pt 12*, 3195–3204.
- Zhao, G., & Zhang, G. (2009). Influence of freeze-drying conditions on survival of *Oenococcus oeni* for malolactic fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, *135*(1), 64–67.

- Zhao, W., & Kang, Z. (2013). Advanced progress on adaptive stress response of. *Journal of Northeast Agricultural University*, 20(1), 91–96.
- Zhou, K., Aertsen, A., & Michiels, C. W. (2014). The role of variable DNA tandem repeats in bacterial adaptation. *FEMS Microbiology Reviews*, 38(1), 119–141.
- Zúñiga, M., Pardo, I., & Ferrer, S. (1993). An improved medium for distinguishing between homofermentative and heterofermentative lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 18, 37–42.



ANEXO

1. Medios de cultivo

1.1 Agar Sacarosa (Garvie, 1967a)

| | |
|--------------------------------------|----------|
| Triptona | 10 g/L |
| Extracto de levadura | 5 g/L |
| K ₂ HPO ₄ | 5 g/L |
| MgSO ₂ .7H ₂ O | 0.2 g/L |
| MnSO ₄ .H ₂ O | 0.05 g/L |
| Citrato diamónico | 0.5 g/L |
| Sacarosa | 50 g/L |
| Agar | 20 g/L |
| Agua destilada | 1 L |

El pH se ajustó a 5.5 con HCl 10 N, y se autoclavó a 115 °C durante 30 minutos.

1.2 GPYA

| | |
|-------------------------------|--------|
| Glucosa | 25 g/L |
| Peptona micológica | 5 g/L |
| Extracto de levadura | 5 g/L |
| Agar (sólo para medio sólido) | 20 g/L |
| Agua destilada | 1 L |

Se autoclavó a 115 °C durante 30 minutos.

1.3 Medio HFA (Pilone y col., 1991)

| | |
|-------------------|--------|
| Triptona | 5 g/L |
| Extracto levadura | 5 g/L |
| Peptona | 5 g/L |
| Glucosa | 5 g/L |
| L-arginina | 6 g/L |
| Tween 80 | 1 mL |
| Agua | 999 mL |

El pH se ajustó a 5.5 con HCl 10 N y se autoclavó a 120°C durante 20 minutos

1.4 MLO (Zúñiga y col., 1993)

| | |
|--------------------------------------|----------|
| Triptona | 10 g/L |
| Extracto de levadura | 5 g/L |
| Glucosa | 10 g/L |
| Fructosa | 5 g/L |
| MgSO ₄ .7H ₂ O | 0.2 g/L |
| MnSO ₄ .H ₂ O | 0.05 g/L |
| Citrato diamónico | 3.5 g/L |
| Zumo de tomate* | 100 ml/L |
| L-cisteína | 0.5 g/L |
| Tween 80 | 1 mL/L |

| | |
|--------------------------|-----------|
| Natamicina** | 0.075 g/L |
| Agar (para medio sólido) | 20 g/L |
| Agua destilada | 1 L |

El pH se ajustó a 4.8 con HCl 10 N y se autoclavó a 115 °C durante 30 minutos. Para la preparación del medio sólido, se disolvió todos los ingredientes para un litro, excepto el agar, en 500 mL de agua destilada y el agar correspondiente a 1 L se esterilizó por separado y tras el autoclavado ambos se mezclaron.

***Zumo de tomate**

| | |
|----------------|----|
| Zumo de tomate | 1L |
| Agua destilada | 2L |

Macerado a 4 °C por 16 horas y centrifugado a 14000 rpm durante 20 minutos, filtrado con papel filtro y conservado a -20 °C hasta su uso

****Natamicina**

Sólo se utilizó para evitar el crecimiento de las levaduras durante el aislamiento primario de las muestras de mosto y se añadió la cantidad de 0.15 g/L de Actistab (correspondiente a 0.075 g/L del antibiótico Natamicina) y se disolvió en 10 mL de dimetil sulfóxido y se añadió al medio de cultivo MLO tras el autoclavado del mismo.

1.5 Medio MBFC (Garvie, 1967a)

| | |
|-----------------------|-----------|
| Peptona de carne | 10 g/L |
| Extracto de levadura | 2.5 g/L |
| Tween 80 | 0.1 g/L |
| Agar | 5 g/L |
| Pantotenato de calcio | 0.1 µL/mL |
| Verde de bromocresol* | 0.004 % |
| Agua destilada | 1 L |

El pH se ajustó a 5.2 con HCl 10 N y tras autoclavar a 120°C durante 20 minutos se añadieron las soluciones estériles de pantotenato de calcio y por separado se añadió 0.5 mL de cada uno de los carbohidratos correspondientes a una concentración del 2 %.

1.6 Medio MBFC modificado para la determinación de la actividad β-glicosidasa

| | |
|---------------------------|-----------|
| Peptona de carne | 10 g/L |
| Extracto de levadura | 2.5 g/L |
| Tween 80 | 0.1 g/L |
| Arbutina o esculina | 5 o 2 g/L |
| Citrato de amonio férrico | 0.5 % |
| Agar | 5 g/L |
| Pantotenato de calcio | 0.1 µL/mL |
| Verde de bromocresol* | 0.004 % |
| Agua destilada | 1 L |

El pH se ajustó a 4.8 con HCl 10 N y tras autoclavar a 120°C durante 20 minutos se añadieron soluciones estériles de pantotenato de calcio, 0.5 mL de un solución de arbutina o de esculina y de citrato de amonio férrico.

*Sólo se añadió en el caso de la esculina.

1.7 Medio para determinar la actividad lipasa

Se utilizó el medio MLO sólido al que le añadió 1.5 g/L de agar y tributirina al 1 %.

1.8 Medio para determinar la actividad β -glucanasa

| | |
|-----------------------|---------|
| Triptona | 5 g/L |
| Extracto de levadura | 2.5 g/L |
| Glucosa | 1 g/L |
| Fructosa | 0.5 g/L |
| B-glucano de levadura | 0.2 g/L |
| Agar | 20 g/L |
| Agua destilada | 1 L |

El pH se ajustó a 4.8 con HCl 10 N y se autoclavó a 115 °C durante 30 minutos.

1.9 Medio para determinar la actividad celulasa

| | |
|----------------------|---------|
| Triptona | 5 g/L |
| Extracto de levadura | 2.5 g/L |
| Glucosa | 1 g/L |
| Fructosa | 0.5 g/L |
| Carboximetilcelulosa | 10 g/L |
| Agar | 20 g/L |
| Agua destilada | 1 L |

El pH se ajustó a 4.8 con HCl 10 N y se autoclavó a 115 °C durante 30 minutos.

1.10 MRS

| | |
|-------------------------------|---------|
| MRS BROTH Oxoid CM 359 | 52 g/L |
| L-cisteína | 0.5 g/L |
| Agar (solo para medio sólido) | 20 g/L |

El pH se ajustó a 6.5 y se autoclavó a 115 °C durante 30 minutos.

1.11 MDB modificado (Medio para detección y cuantificación de aminas biógenas)

Medio previamente descrito por Landete y col., (2005) y que se ha modificado en este trabajo de la siguiente manera:

| | |
|-------------------|-------|
| Extracto de carne | 8 g/L |
| Triptona | 5 g/L |

| | |
|--------------------------------------|----------|
| Extracto de levadura | 4 g/L |
| Glucosa | 1.5 g/L |
| Fructosa | 1 g/L |
| Tween 80 | 0.5 mL/L |
| MgSO ₄ ·7H ₂ O | 0.2 g/L |
| MnSO ₄ ·H ₂ O | 0.05 g/L |
| FeSO ₄ | 0.04 g/L |
| CaCO ₄ | 0.1 g/L |
| Piridoxal fosfato | 0.25 g/L |
| L-histidina | 10 mM |
| L-tirosina | 10 mM |
| L-arginina | 10 mM |
| L-ornitina | 10 mM |
| L-lisina | 10 mM |
| Agua destilada | 1 L |

El pH se ajustó a 4.8 con HCl 10 N, y se autoclavó a 115 °C durante 30 minutos.

2. Vino

2.1 Vino natural

| | |
|---|-------|
| Mosto comercial “Don Simón” | 1 L |
| Se inoculó con 0.25 g/L de la levadura <i>S.cerevisiae</i> var. <i>bayanus</i> BY (Agrovin) y tras la FA se ajustó: | |
| Etanol | 11 % |
| L-málico | 3 g/L |
| Glucosa | 1 g/L |
| El pH se ajustó a 3.5. | |

2.2 Vino sintético

| | |
|---------------------------|----------|
| Glucosa | 100 g/L |
| Fructosa | 100 g/L |
| L- Acido tartárico | 2 g/L |
| Ácido D-málico | 5 g/L |
| YNB (Yeast Nitrogen Base) | 11.7 g/L |

El pH se ajustó a 3.5 y se autoclavó a 115 °C durante 30 minutos. El YNB incorporó previamente filtrado y se inoculó con una levadura comercial, tras la FA se añadió:

| | |
|-------------------------------|--------|
| Extracto de levadura | 5 g/L |
| Triptona | 10 g/L |
| Solución de vitaminas (1000X) | 1 mL/L |
| Glucosa | 3 g/L |
| Fructosa | 3 g/L |

Diferentes lotes de este vino sintético se ajusta a diferentes valores de pH (2.9, 3.2, 3.5, 3.7 y 4.0), diferentes concentraciones de etanol (10, 12, 14 y 15 %) y de SO₂ total (30, 40, 50, 60 y 70 mg/L).

3. Soluciones

3.1 Solución de vitaminas (Liu, 2003)

| | |
|-------------------------------|-----------|
| Piridoxina | 1.5 mg/L |
| Ácido pantoténico | 5 mg/L |
| Vitamina C (ácido nicotínico) | 2 mg/L |
| Clorhidrato de tiamina | 1 mg/L |
| Riboflavina | 1 mg/L |
| Cianocobalamina (Vit. B12) | 0.07 mg/L |
| Biotina | 0.05 mg/L |
| Ácido <i>p</i> -aminobenzoico | 0.05 mg/L |
| Ácido fólico | 0.05 mg/L |
| myo Inositol | 20 mg/L |

Se esterilizó por filtración y se conservó a - 20 °C.

3.2 Suero fisiológico

| | |
|----------------|-------|
| NaCl | 9 g/L |
| Agua destilada | 1 L |

Se autoclavó a 115 °C durante 30 minutos.

3.2 Solución NaCl 1 M

| | |
|----------------|-----------|
| NaCl | 58.44 g/L |
| Agua destilada | 1 L |

Se autoclavó a 115 °C durante 30 minutos.

4. Reactivos

4.1 Reactivo Nessler

| | |
|------------------|--------|
| KI | 7 % |
| HgI ₂ | 10 % |
| NaOH | 10 % |
| Agua destilada | 100 mL |

Se disuelven ambos ioduros en 40 mL de agua destilada y el NaOH en 50 mL de agua destilada, luego se mezclan las 2 soluciones y se completa hasta 100 mL. Se deja sedimentar, se decanta y descarta el precipitado

4.2 Rojo Congo

| | |
|------------|-------|
| Rojo Congo | 0.1 % |
|------------|-------|

Se disuelve en 100 mL de alcohol al 20 %.

