



IDENTIFICACIÓN DE MICRIBIOTA BACTERIANA RELACIONADA CON PROCESOS ENOLÓGICOS EN CHILE

Carolina Ilabaca Díaz

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

WARNING. Access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.

CAROLINA ALAJENDRA ILABACA DÍAZ

**IDENTIFICACIÓN DE MICROBIOTA BACTERIANA
RELACIONADA CON PROCESOS ENOLÓGICOS EN
CHILE**

TESIS DOCTORAL

Dirigida por los Dres. Jaime Romero Ormazabal y Albert Bondons de Porrata-Doria

Departamento de Bioquímica i Biotecnología



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Tarragona

2015

I



Departament de Bioquímica i Biotecnologia
Facultat d'Enologia
C. Marcel·lí Domingo, 1, Campus Sescelades N4, E-43007 Tarragona
Tel. +34 977 55 95
21

Los abajo firmantes, el Dr. Jaime Romero Ormazábal, Profesor de la Universidad de Chile, y el Dr. Albert Bordons de Porrata-Doria, Catedrático Emérito de la Universidad Rovira i Virgili

HACEN CONSTAR

Que el presente trabajo, con el título "Identificación de microbiota bacteriana relacionada con procesos enológicos en Chile", que presenta la Sra. Carolina Alejandra Ilabaca Díaz para optar al grado de Doctor por la Universidad Rovira i Virgili, ha sido realizado bajo nuestra dirección y que todos los resultados son fruto de los experimentos llevados a cabo por la mencionada doctoranda.

Y para que se tome conocimiento y tenga los efectos que corresponda, firmamos este certificado.



Jaime Romero Ormazábal



Albert Bordons de Porrata-Doria

Tarragona, 27 de noviembre de 201

Agradecimientos

Al momento de escribir estas palabras, se me vienen muchas personas a las que me gustaría agradecer. En primer lugar a mis directores de tesis Dr. Jaime Romero y Dr. Albert Bordons y a la beca doctoral enmarcada en el proyecto Tecnovid- Innova (N°OTCTE02-09). A todas las personas que se fueron, están y seguirán en las dependencias del Laboratorio de biotecnología del INTA y del Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Chile. Gracias por todo.

Agradecer a todos las personas que han pasado por este laaaargo camino, a los que ayudaron con ideas o que simplemente estuvieron, nombrarlos sería un error, pero no puedo dejar de mencionar a mis grandes amigos Gastón Higuera y Mauricio Valdés... Gracias por todos y cada uno de nuestros momentos juntos, de verdad que los quiero mucho! Y a todos los integrantes del “Día de la Felicidad”, gracias chicos por la buena onda y todos los buenos momentos vividos.

Por último, pero no por eso menos importante, a mi amada familia. Luchi, Mamita, Paula, Cristian, Jeanette y niños sin su amor, apoyo y fuerza, no sería la persona que soy. Mamita... eres la mejor!!!. También a mi naciente familia... Jorge, gracias por tu amor, atenciones y apoyo.

Si no los he nombrado o no se han sentido identificados con mis palabras, mil disculpas! créanme que están presentes en mis infinitas gracias....

A mí amada familia

A los que están y especialmente a los que ya no están

A mi nueva familia

A los que están y a los que vienen...

Índice

Índice

Justificación, Hipótesis y Objetivos	1
Introducción	.6
1. Microorganismos del vino	6
2. Bacterias lácticas del vino	6
2.1 Identificación de bacterias lácticas	10
2.2 Fermentación Maloláctica	13
2.3 Aminas biógenas	14
2.3.1 Problemática asociada a la presencia de aminas biógenas	15
2.3.2 Causa de aparición de aminas biógenas en los vinos	16
2.3.3 Aspectos legales de las aminas biógenas	18
3. Bacterias acéticas	19
3.1 Clasificación taxonómica de las bacterias acéticas	19
3.2 Aislamiento de bacterias acéticas	20
3.3 Métodos moleculares de identificación de bacterias acéticas	22
3.4 Acetificación o elaboración de vinagre de vino	24
3.5 Métodos de elaboración de vinagre	25
4. Referencias	26

Capitulo 1	35
Rápida identificación de bacterias lácticas en procesos de vinificación Chilena usando análisis independientes de cultivo	
Capitulo 2	50
Efecto de la dosis de fosfato diamonio en los niveles de histamina y las poblaciones de bacterias durante la fermentación maloláctica	
Capitulo 3	64
Aplicación de métodos moleculares en cultivos independientes para evaluar bacterias acéticas en el proceso de elaboración de vinagre	
Discusión general	84
Conclusiones	99

Justificación

Hipótesis y

Objetivos

La presente tesis doctoral ha sido realizada en las dependencias de la Facultad de Ciencias Agronómicas como en el Laboratorio de Biotecnología del Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos (INTA), ambas pertenecientes a la Universidad de Chile (Santiago, Chile). Inicialmente, el trabajo realizado fue una colaboración entre el INTA y el grupo de Investigación en biotecnología enológica de la Universitat Rovira i Virgili (URV). Como resultado de esta colaboración se obtuvo un trabajo en bacterias acéticas presentado para obtener el grado de Master en enología, otorgado por la URV, el año 2008 y así continuar con los estudios de doctorado. La continuidad de la investigación en el doctorado se relacionó con el estudio de las bacterias lácticas presentes en el vino. Todo dentro del marco de la investigación de un proyecto Tecnovid-Innova (N°OTCTE02-09). Esta tesis doctoral fue dirigida en Chile por el Dr. Jaime Romero, Profesor asociado del INTA y en España por el Dr. Albert Bordons, Catedrático Emérito de la Universidad Rovira i Virgili.

La producción de vinos en Chile ha ido en aumento en los últimos 10 años, lo que ha generado un gran interés en la investigación de este producto, para mejorar su calidad y entender de mejor manera sus procesos de elaboración, mejorando así la calidad del producto final y por lo tanto su precio. Dentro de este interés generado, el área de la microbiología enológica, ha sido poco explorada en Chile, tanto para los microorganismos positivos que se relacionan en el proceso fermentativo (levaduras y bacterias lácticas vínicas) como para los microorganismos negativos presentes en el vino (bacterias acéticas).

Al ser el proceso de fermentación vínica, un proceso realizado casi exclusivamente por microorganismos, se hace de suma importancia saber cuál de estos está presente en cada etapa del proceso de vinificación, ya que se pueden evitar pérdidas considerables en la calidad y en la producción de los vinos. Al saber si los microorganismos presentes en el proceso son beneficiosos o lo están entorpeciendo, se pueden generar medidas en el control microbiológico que pueden evitar dichas pérdidas.

Es por esto que la presente investigación se centra principalmente en la identificación de bacterias presentes en el proceso de vinificación. Las bacterias lácticas (BL), responsables de la fermentación maloláctica (FML) en el vino y las bacterias acéticas (BA), responsables del picado acético en el vino. Si bien, las bacterias acéticas son negativas en la producción

de vino, su utilización en la creciente industria del vinagre, hacen interesante su investigación.

Es por esto que se planteó como **Hipótesis** de esta tesis que un mejor conocimiento de cuales son y qué papel tienen las especies bacterianas implicadas en los procesos enológicos en Chile, puede llevar a una mejor en el rendimiento de estos procesos y calidad de los productos.

Objetivo general:

- Identificar la microbiota bacteriana, relacionada con procesos enológicos en Chile.

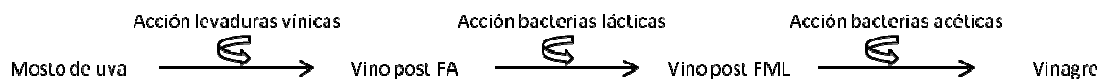
Objetivos específicos:

- Determinación de un método de identificación de bacterias lácticas, con técnicas independientes de cultivo.
- Aplicación de método de identificación de bacterias lácticas, en microvinificaciones espontaneas de vinos chilenos, con aplicación de fosfato diamonio y su incidencia en la producción de histamina.
- Analizar distintos sistemas de identificación y/o cuantificar bacterias acéticas usando diferentes métodos moleculares independientes de cultivo.

Introducción

1. Microorganismos del vino

El vino, es el resultado de la interacción de microorganismos con el jugo de la uva (mosto), específicamente de levaduras vínicas y algunas especies de bacterias lácticas. Si el vino no es tratado para finalizar su proceso, lo más probable es que los microorganismos presentes continúen con los procesos bioquímicos y se genere un subproducto o producto final como es el vinagre, esto gracias a la acción de las bacterias acéticas. En concreto sucede lo siguiente:



2. Bacterias lácticas del vino

A modo general, las bacterias lácticas (BL) son un grupo heterogéneo, que presenta características generales como son: gran positivas, catalasa negativa, no esporuladas, microaerófilas o anaerobias facultativas y fermentadoras de azúcares en condiciones diversas, respondiendo a dos tipos de morfología: cocos y bacilos (Suárez e Iñigo, 2004).

Las BL están ampliamente distribuidas en la naturaleza y han sido aisladas desde diferentes ambientes y alimentos, por lo que pueden ser encontradas en diversos alimentos de origen lácteo, tierra, tracto digestivo de animales y peces, así como también en uvas, mostos y vinos.

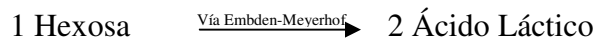
Desde un punto de vista taxonómico actual (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/taxonomy>), las BL se corresponden con el orden *Lactobacillales*, dentro de la clase *Bacilli*, del phylum Firmicutes del reino Bacteria. En el vino las BL que se pueden encontrar son de dos familias: *Lactobacillaceae* con los géneros *Lactobacillus* (con numerosas especies) y *Pediococcus*, y la familia *Leuconostocaceae* con los géneros *Leuconostoc*, *Oenococcus* y *Weissella* (Dicks y Endo, 2009). Hace 20 años, gracias a Dicks et al. (1995) y con la información aportada por investigadores de la época y mediante el uso de biología

molecular, se demostró que *Leuconostoc oenos* constituía un taxón diferenciado con respecto al resto de las bacterias del género *Leuconostoc*, apareciendo una de las especies más importantes en la enología: *Oenococcus oeni*.

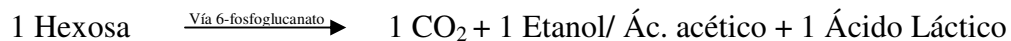
Según el libro Microbiología del vino (Carrascoza et al, 2005), en el vino y en el mosto de uva se desarrollan un número limitado de especies debido principalmente al bajo pH, los escasos elementos nutritivos y el contenido de etanol. Es así como BL pertenecientes a los géneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Oenococcus* son las encontradas en los vinos (Ilabaca et al, 2014).

Las bacterias lácticas presentan 2 tipos de metabolismo con respecto a la fermentación de hexosas: homofermentativa y heterofermentativa. El metabolismo homofermentativo se caracteriza porque las BL toman las hexosas y las transforman exclusivamente en ácido láctico. Y el metabolismo heterofermentativo origina desde las hexosas consumidas CO₂, etanol y/o ácido acético y ácido láctico (Pardo, 2003)

Metabolismo homofermentativo:



Metabolismo heterofermentativo:



En un ambiente en donde las hexosas se encuentran en concentraciones limitadas, la formación de ácido acético puede llegar a dominar, pudiendo así cambiar el metabolismo de bacterias homofermentativas a heterofermentativas facultativas (Pardo, 2003). Es así como las bacterias lácticas que podemos encontrar en el vino serán las mostradas en la tabla 1.

Para lograr una identificación de las BL desde mostos y vinos es necesario tener un medio de crecimiento adecuado. El cultivo de estas bacterias, requieren medios complejos que contengan diversos factores de crecimiento como vitaminas del grupo B, aminoácidos y péptidos entre otros, lo que los hacen poco selectivos. Además deberán incorporar moléculas capaces de entregar grandes cantidades de energía, como son los azúcares. Los

medios más utilizados son el Man Rogosa Sharpe medium (MRS) y el Medio *Leuconostoc oeno* (MLO) (Ruiz, 2009).

Tabla 1. Bacterias lácticas en el vino

Género	Metabolismo de hexosas	Especies
<i>Pediococcus</i>	Homofermentativo	<i>P. damnosus</i>
		<i>P. parvulus</i>
		<i>P. pentosaceus</i>
<i>Leuconostoc</i>	Heterofermentativo	<i>Leu. mesenteroides</i>
<i>Oenococcus</i>	Heterofermentativo	<i>O. oeni</i>
<i>Lactobacillus</i>	Homofermentativo	<i>L. mali</i>
	Heterofermentativo facultativo	<i>L. casei</i>
	Heterofermentativo	<i>L. plantarum</i>
		<i>L. brevis</i>
		<i>L. buchneri</i>
		<i>L. fermentum</i>
		<i>L. fructivorans</i>
<i>L. hilgardii</i>		

Extraído de Muñoz et al, 2011

Durante muchos años los métodos clásicos para identificar y clasificar bacterias se basaban en características fenotípicas. Importantes avances en el campo de la biología molecular se han hecho en los últimos años, usándose ahora éstas para revelar la diversidad genética de una especie en particular y para estudiar poblaciones de microorganismos en el vino sin la necesidad de un aislamiento o cultivo previo (Muñoz et al, 2011).

2.1. Identificación de bacterias lácticas

Como ya es sabido, existen métodos que llamamos clásicos para identificar y clasificar a las BL, como también existen los métodos moleculares.

Métodos clásicos:

Se basan inicialmente en las pruebas de tinción Gram y la prueba de catalasa, para realizarlas previamente se requiere de un aislamiento y purificación de las bacterias en un

cultivo sólido. Las bacterias que resultan Gram positivas y catalasa negativa se clasifican con BL (Muñoz et al, 2011).

Para identificar los aislados a nivel de género, se necesita realizar pruebas como observación al microscopio, para observar morfología celular, la que puede ser o esférica o en forma de bastón. Luego se ve la vía de producción del ácido láctico, generalmente a través del metabolismo de las hexosas, para esto es necesario ver la producción de gas (metabolismo heterofermentativo) o la ausencia de este (metabolismo homofermentativo). Con esta información mínima se puede realizar una identificación presuntiva a nivel de género (Carrazcosa et al, 2005). Adicionalmente, existen otras pruebas que pueden confirmar la identificación presuntiva, como son: el tipo de isómero de ácido láctico formado a partir de la hexosa, la hidrólisis de arginina a amoníaco, producción de manitol a partir de la fructosa entre otras.

El uso de estos métodos clásicos de identificación, siguen siendo útiles y se emplean de forma rutinaria, pero muchas veces los resultados ambiguos obtenidos no permiten tener la certeza de la identificación realizada. Los criterios morfológicos y bioquímicos usados en la identificación de las BL son a menudo ambiguos, porque la mayoría de estas bacterias tienen requerimientos nutricionales y de crecimiento bajo condiciones ambientales muy similares, lo que hace difícil su diferenciación (Carrazcosa et al, 2005; Muñoz et al, 2011).

Métodos moleculares:

En la actualidad, el gran avance en el área de la biología molecular, ha entregado una serie de técnicas que se aplican en la identificación y caracterización de las BL de interés en el mundo vitivinícola.

Es así como técnicas basadas en el polimorfismo que presentan los patrones de restricción el ADN cromosómico (RFLP) (Zaparolli et al, 2000), electroforesis en campo pulsado (PFGE) (Guindreau et al, 1997), hibridación ADN- ADN (Sato et al, 2001; Lonvaud-Funel et al, 1991; Dicks et al, 1995), las que se basan en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Groisillier y Lonvaud-Funel, 1999; Le Jeune et al, 1995; Lonvaud-Funel 1993) y

RAPD-PCR (*Randomly amplified polymorphic DNA*) (Zavaleta et al 1997) entre otras se han descrito para la identificación de las BL.

También se han descrito técnicas que permiten la identificación rápida y fiable de las principales BL presentes en el proceso de vinificación. Es así como está el trabajo de Rodas *et al.* (2003), que describe la identificación de BL de mostos y vinos a través de la amplificación por PCR del 16S rDNA y la digestión con enzimas de restricción (PCR-RFLP). La técnica multiplex RAPD de Reguant y Bordons (2003) es una mejora del método RAPD-PCR, que genera de forma más reproducible perfiles de DNA únicos y discriminantes para identificar *Oenococcus oeni*.

Otra técnica rápida para identificación de BL presentes en una vinificación, es la que usa el análisis de fragmentos de ADN ribosómico mediante amplificación por PCR y su posterior separación mediante electroforesis desnaturizante en geles de gradiente (DGGE), en donde se puede saber la diversidad y a su vez monitorear la evolución de las poblaciones de BL durante la vinificación (López et al, 2003; Ruiz et al, 2010)

El uso de secuencias de genes específicos como el RpoB, de Claisse *et al.* (2007) quien realiza un análisis de PCR-RFLP de las secuencias del RpoB para identificar especies de BL comúnmente aisladas de vino.

También se han aplicado una mezcla de técnicas moleculares para analizar la diversidad de BL presentes en vinificaciones, como lo descrito por Ruiz et al. (2008) en donde se utilizan tres técnicas: RAPD-PCR, electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE, por su nombre en inglés pulsed field gel electrophoresis), y PCR de visualización diferencial (DD-PCR por su nombre en inglés differential display PCR).

La técnica de PCR tiempo real, también ha sido usada para enumerar poblaciones de BL, como también poblaciones de *Oenococcus oeni* y BL no *Oenococcus* en mostos y vinos (Neeley et al, 2005; Cho et al, 2011).

Como vemos existe una gran variedad de técnicas moleculares para lograr la clasificación, identificación y cuantificación de las BL presentes en una vinificación. Cada una de estas técnicas presenta sus ventajas y limitaciones, pero claramente pueden ser utilizadas como

una herramienta, para saber lo que ocurre con la microbiota láctica en las etapas de elaboración de vinos, en donde ésta actúa, específicamente durante la fermentación maloláctica (FML).

2.2.Fermentación maloláctica

La FML en el vino es, por definición, la conversión enzimática de ácido L-málico a ácido L-láctico, siendo un proceso secundario, que por lo general sigue a la fermentación alcohólica (FA) del vino, pero también pueden ocurrir al mismo tiempo. Esta reducción de ácido málico a ácido láctico no es una verdadera fermentación, sino más bien una reacción enzimática realizada por las bacterias lácticas (BL) después de su fase de crecimiento exponencial. La principal especie que realiza la FML es *Oenococcus oeni*, ya que puede soportar bajos pH (< 3,5), altas concentraciones de etanol (>10%) y altos niveles de SO₂ que se pueden encontrar en el vino (Costantini et al 2009).

La población de BL durante una vinificación varía durante todo el proceso. Es así, como acabada la FA, la población de BL alcanza solo entre 10¹ a 10³ UFC/mL. Se deberá activar el crecimiento y la multiplicación de las BL para lograr una población mínima de 10⁶ UFC/mL para tener un buen desarrollo de la FML (Suarez e Iñigo, 2004). La FML puede ocurrir de forma espontánea, sin saber a ciencia cierta cuál será el resultado final de este proceso, o bien ser inducida por la inoculación de cultivos iniciadores de bacterias comerciales, que cumplan con los requerimientos de la producción de un vino.

En general se considera que la FML ayuda a mejorar la calidad del vino ya que: disminuye la acidez, entrega una estabilidad microbiana y le entrega una complejidad sensorial al vino (Knoll et al, 2011). En países de clima frío, el principal aporte de la FML es la desacidificación del vino, mientras que el cambio en el perfil aromático es la principal transformación en países de clima cálido (Lerm et al, 2010)

Según Carrazcosa et al (2005), los estudios realizados en los últimos años han demostrado que otros metabolismos ocurren durante este proceso, pudiendo afectar positiva o negativamente a la calidad del vino. Es así, como el impacto en la calidad organoléptica del

vino está ampliamente reconocida, aun no existe suficiente información sobre otros mecanismo bioquímicos diferentes a la disminución de la acidez.

Varios estudios de variaciones en el perfil aromático del vino, en una disminución de la intensidad colorante o la liberación de polisacáridos durante la FML, se han realizado. Todos estos estudios, nos llevan a pensar que si bien la FML es un proceso importante que se debe desarrollar durante la elaboración de los vinos, el desarrollo de esta fermentación debe ser controlado, ya que al ser realizado por microorganismos, como son las BL, el resultado puede ser completamente adverso, ya que si bien la principal transformación que se realiza en esta fermentación es la transformación del ácido málico a láctico, existen otras actividades enzimáticas durante la FML, que dan lugar, en la mayoría de los casos, a alteraciones o enfermedades, que incluso pueden disminuir la calidad del vino.

En este sentido, algunas BL son capaces de metabolizar aminoácidos presentes en el vino y dan lugar a la formación de aminas biógenas y a precursores del carbamato de etilo, ambos considerados peligrosos para la salud humana.

2.3. Aminas biógenas

Las aminas biógenas son bases orgánicas dotadas de actividad biológica que provienen esencialmente de la descarboxilación de los aminoácidos. Están presentes en diversos alimentos y bebidas de forma natural, como consecuencia de un proceso de fermentación o de una alteración microbiana (Flanzy, 2000; Zoecklein *et al.* 2001; Hidalgo, 2003; Suárez e Iñigo, 2004; Carrascoza *et al.*, 2005; Polo y Moreno-Arribas, 2005).

Las aminas biógenas pueden tener una estructura alifática (putrescina, cadaverina, espermina, espermidina y agmadina), aromática (tiramina, feniletilamina) y heterocíclica (histamina y triptamina). Las aminas alifáticas se relacionan con condiciones de deficiencia sanitaria, mientras que las de estructura aromática y heterocíclica se relacionan con efectos toxicológicos (Mafra *et al.*, 1999, Polo y Moreno-Arribas, 2005).

2.3.1. Problemática asociada a la presencia de aminas biógenas

Efectos en la salud humana

Cuando los alimentos que contienen aminas biógenas son ingeridos, se pueden producir efectos adversos en el organismo cuya gravedad depende de la cantidad ingerida. La sintomatología asociada a la ingesta de aminas biógenas va desde dolores de cabeza, sofocos y taquicardia, si se han ingerido dosis bajas, hasta vómitos, bronco-constricción, hiper e hipotensión, daños renales y vasculares, etc., cuando la ingesta ha sido elevada. (Rivas-Gonzalo y Mariné, 1983; Taylor, 1986; Silla Santos, 1996).

Entre las aminas biógenas, la histamina es la más tóxica y por ello la más comúnmente buscada en alimentos, aunque sus efectos pueden verse potenciados por la presencia de otras aminas como espermina, spermidina, putrescina o agmatina (Chu y Bejdanes, 1981; Bauza y Teissedre, 1995). Asimismo, los resultados de Bauza y Teissedre (1995), demuestra que la sensibilidad de los individuos frente a las aminas biógenas varía en función de la capacidad individual de detoxificación. En este sentido, la actividad de enzimas implicadas en el metabolismo de las aminas biógenas, como la monoaminoxidasa (MAO) y diaminoxidasa (DAO), puede ser inhibida por diversos medicamentos (algunos antidepresivos, por ejemplo), por el etanol e incluso por otras aminas que se encuentren presentes en los propios alimentos, disminuyendo así la eficacia de la detoxificación. Por tanto, cuando se consideran efectos tóxicos de las aminas biógenas, debe de tenerse en cuenta, además de la concentración total de aminas, la ingesta conjunta de etanol y/o de determinados medicamentos. Es así como en vinos, la ingesta de 3 mg puede ser suficiente para que se presenten efectos adversos (Sandler y Reynolds, 1976; Rivas-Gonzalo y Mariné, 1983; Bauza y Teissedre, 1995, Gloria et al., 1998).

Efectos sensoriales

Según Palacios et al. (2005), las aminas biógenas, y especialmente las que son volátiles, pueden resultar negativas cuando se encuentran en concentraciones elevadas, principalmente porque modifican el equilibrio aromático y gustativo del vino, incluyendo la fase retronasal del mismo. Estudios realizados en vino, por el mismo autor, demuestran que

un consumidor bien informado acerca de posibles problemas fermentativos en la vinificación es capaz de detectar defectos organolépticos presentes en el vino asociados a ciertos compuestos químicos originados por una fermentación maloláctica sin control, como es el caso de la putrescina y la cadaverina. A la vez, los consumidores habituales de vino, cuando son sometidos a una disciplina de cata concentrándose en las sensaciones olfativas percibidas, son capaces de discriminar y distinguir entre vinos correctos y vinos defectuosos por la presencia de los compuestos añadidos, encontrándose aromas impropios causados por problemas microbianos que pueden hacer aumentar la presencia de aminas biógenas volátiles.

2.3.2. Causas de aparición de aminas biógenas en vinos

Según Lehtonen (1996) se han encontrado al menos 24 aminas biógenas diferentes en vinos.

El contenido en el vino difiere por diversos factores, entre los cuales destacan las condiciones sustrato – microorganismo – medio ambiente que puedan afectar el vino. El contenido de aminoácidos (sustrato), el cual a la vez depende de la materia prima y las prácticas de elaboración; microorganismos presentes, ya sean de la fermentación o de contaminación y por último las condiciones que favorezcan el crecimiento de los microorganismos (Ordoñez, 1999). Además, en el vino, existen distintas influencias por parte de las distintas operaciones de elaboración del producto, como por ejemplo, las cepas utilizadas en la elaboración y la ubicación geográfica de la materia prima.

Factores que afectan la presencia de aminas biógenas en vino

Contenido de aminoácidos: Los primeros trabajos de investigación acerca de aminoácidos muestran que los mostos de uva encierran una veintena de aminoácidos del reino vegetal, los cuales representan del 20 al 30% del nitrógeno total (Poux y Ournac, 1979). La variación de su contenido depende según las fuentes que interactúan en los distintos procesos de elaboración del vino:

Materia prima: La concentración y composición de aminoácidos puede variar de acuerdo a variedad de uva, portainjerto, sitio y condiciones de la temporada y nivel de madurez.

Además, las prácticas vitícolas como: cantidad y frecuencia de aplicaciones de nitrógeno, sistema de conducción, manejo del suelo y hasta infecciones de *Botrytis* son importantes para la cantidad y composición de aminoácidos en la baya. (Bell y Henschke, 2005). Cabe destacar que algunas aminos son constituyentes habituales de la uva, siendo la putrescina y espermidina las más abundantes (20 y 45 mg/Kg de fruta fresca, respectivamente), mientras etanolamina, agmatina, cadaverina, espermidina, histamina y tiramina han sido encontradas en bajas cantidades (Ough, 1971; Rivas-Gonzalo y Mariné., 1983; Broquedis et al., 1989; Radler y Fäth, 1991).

Prácticas de elaboración: Según Ferrer y Pardo (2005) existen procesos y aplicaciones que influyen en la aparición de aminos biógenos por incorporar fuentes de aminoácidos, estos pueden ser: aplicación de nutrientes en forma aminoacídica o nitrógeno inorgánico, maceración del mosto con hollejos y semillas que puedan transferir compuestos nitrogenados, aplicación de enzimas comercial que produzcan hidrólisis de proteínas y péptidos y por último crianza sobre lías que liberen aminoácidos.

Microbiota: La presencia de aminos biógenos está relacionada con la actividad descarboxilasa de un microorganismo (Maijala y Eerola, 1993). Es por esta razón que se le atribuye a las bacterias lácticas la presencia de aminos biógenos, por tener actividad monodescarboxilasa específica (Perez, 2006). Por otra parte el mosto y el vino son un medio muy selectivo, donde solo pueden crecer algunas especies de bacterias lácticas. Por lo cual sólo cuatro géneros están representados: *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* y *Oenococcus* (Lonvaud-Funel, 1999).

Condiciones ambientales: Todos aquellos factores que afectan al crecimiento de los microorganismos del vino, especialmente a aquellos que presentan actividad descarboxilasa, van a influir en la concentración de aminos presentes en el vino. Así, pH bajos, concentraciones elevadas de SO₂ o de etanol en el vino y la inoculación de cultivos seleccionados seguros va a limitar el desarrollo de estos microorganismos. Por el contrario, temperaturas elevadas, presencia de nutrientes en el mosto o vino (azúcares, aminoácidos, ácidos orgánicos metabolizables), y deficientes prácticas higiénicas potencian el crecimiento microbiano y aumentan el riesgo de elevadas concentraciones de aminos (Landete et al., 2005)

Operaciones de elaboración: Se puede llegar a cierto acuerdo de que existe mayor presencia de aminas biógenas en vinos tintos, que en vinos blancos y rosados, consecuencia de su fermentación maloláctica (Vázquez Lasa et al, 1998). Así también lo confirman estudios en vinos portugueses, donde Leitão et al. (2005) encontró que la concentración de aminas biógenas en vinos blancos nunca excedió los 17 mg/L, en cambio en vinos tintos alcanzaron niveles de 28 mg/L. Sin embargo Soufleros et al. (2007) no encontró diferencias significativas entre vinos tintos, blancos y rosados griegos. En tanto, Mafra et al. (1999) cuantificaron las aminas biógenas en vinos resultantes de varios procesos de vinificación usados en Portugal: vinos verdes, blancos y tintos, encontrando que los diferentes procesos de vinificación influían en la concentración de aminas biógenas. Los vinos tintos son los que presentaban la mayor concentración de aminas biógenas, mientras que los vinos fortificados presentan una concentración relativamente baja.

2.3.3. Aspectos legales de las aminas biógenas

Según Leitão *et al.* (2005) el interés por el estudio de la presencia y origen de aminas biógenas en vinos responde tanto a criterios de seguridad alimentaria como económicos. En lo que aspecto económico se refiere, si bien hasta el presente no existe legislación concerniente a los límites máximos de aminas biógenas en vinos, el hecho de que en muchos países se haya establecido una recomendación sobre los niveles máximos admisibles de histamina (Alemania 2 mg/L, Bélgica 5-6 mg/l, Francia 8 mg/L, Suiza y Austria 10 mg/L, Holanda 3 mg/L, por ejemplo) hace que la presencia de aminas biógenas en vinos pueda llegar a suponer una barrera no arancelaria que ponga freno a la exportación a esos mercados.

La Organización Internacional de la Viña y El Vino, en su Codex Enológico Internacional (2005) señala que las bacterias lácticas no deben producir aminas biógenas, a menos que sea en cantidades mínimas y no debe transmitir gusto extraño ni producir sustancias nocivas para la salud humana.

3. Bacterias acéticas

Las bacterias acéticas, junto con las bacterias lácticas, son los dos grandes grupos de bacterias acidófilas de los alimentos (Carrascosa et al, 2005).

A modo general se puede decir que las bacterias acéticas (BA) son Gram negativas o Gram variables, de forma elipsoidal o cilíndrica, pueden encontrarse solas, en parejas o formando cadenas. Son aerobias, presentando exclusivamente un metabolismo respiratorio con el oxígeno como aceptor final de electrones. Son catalasa positiva y oxidasa negativa. Son móviles por la presencia de flagelos. Su temperatura óptima de crecimiento está entre 25-30°C y su pH óptimo entre 5-6, aunque crecen bien en pH inferiores a 4. Estas bacterias se encuentran sobre sustratos azucarados y/o con presencia de alcohol tales como zumos de frutas, vino, sidra, cerveza y vinagre. Sobre estos sustratos llevan a cabo una oxidación incompleta de los azúcares y los alcoholes, produciendo una acumulación de ácidos orgánicos como productos finales. Cuando el sustrato es etanol, se produce ácido acético; de ahí deriva el nombre corriente con el que se conocen estas bacterias (Guillamón et al., 2003).

Las BA se encuentran usualmente en sustratos que contienen azúcar y/o etanol, tales como alimentos fermentados, zumos de fruta, vino, cidra, cerveza y vinagre (Thompson et al., 2001; Nielsen et al., 2007; Yamada y Yukphan, 2008).

3.1. Clasificación taxonómica de las bacterias acéticas

Las BA se encuentran clasificadas dentro de la familia *Acetobacteraceae*, dentro del orden *Rhodospirillales*, que pertenece a la clase *Alphaproteobacteria*, del phylum *Proteobacteria*. La familia *Acetobacteraceae* cuenta con 39 géneros, de los cuales los más relevantes son: *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Acidomonas*, *Gluconacetobacter*, *Asaías*, *Kozakia*, *Swaminathania*, *Saccharibacter*, *Neoasaia*, *Granulibacter*, *Tanticharoenia*, *Ameyamaea* y *Neokomagataea*. Dentro de estos, los géneros con mayor diversidad de especies son *Acetobacter*, *Gluconacetobacter* y *Gluconobacter* con 20, 17 y 13 especies, respectivamente (Hidalgo, 2012)

La taxonomía bacteriana desde sus inicios ha estado basada principalmente en criterios morfológicos, bioquímicos y fisiológicos. Es así como Visser't Hooft en 1925, propuso una clasificación inicial basándose en estos criterios. Así en 1935, propuso clasificar las BA en dos géneros, *Acetobacter* y *Gluconobacter*. Posteriormente en 1950, Frateur propuso una clasificación en base a pruebas de catalasa, producción de ácido glucónico a partir de glucosa, oxidación de ácido acético a CO₂ y agua, oxidación del ácido láctico en CO₂ y agua y la oxidación del glicerol en dihidroxiacetona. Basándose en esta clasificación propuso la subdivisión del género *Acetobacter* en peroxydans, oxydans, mexosydans y suboxydan (revisado por Barja et al, 2003).

A medida que avanza el tiempo, se realizan nuevas pruebas para la clasificación e identificación de las BA, es así como en 1997, se realizó una reclasificación por Yamada et al, en donde se reclasificó algunas especies del género *Acetobacter* al género *Gluconacetobacter*.

Como podemos ver, la taxonomía tradicional de los microorganismos, basada fundamentalmente en criterios morfológicos y fisiológicos se ha visto sometida a continuos cambios y reordenaciones. Esto se debe fundamentalmente a aplicaciones de técnicas moleculares tales como métodos de hibridación de DNA y rRNA (Urakami et al., 1989) o análisis de secuencias o varios métodos de PCR (Ruiz et al., 2000; Treck y Teuber, 2002; Bartowsky et al., 2003; Treck 2005; González et al., 2005; González et al., 2006a; González et al., 2006b; Gullo et al., 2006; Prieto et al., 2007). En la actualidad las, BA que se pueden encontrar en distintos ambientes se describen en la tabla 2.

3.2. Aislamiento de bacterias acéticas

Las BA son generalmente considerados organismos fastidiosos, ya que presentan una baja cultivabilidad, esta condición se presenta sobre todo en muestras con alto contenido de ácido acético, como por ejemplo el vinagre (Carrascosa et al, 2005; Hidalgo, 2012). En el caso particular de las BA, se han reportado que los recuentos en placas fueron considerablemente más bajos que los recuentos ópticos de células microbianas viables desde vinos (Mollet y Lonvaud-Funel, 2000) o acetificadores industriales (Mesa et al., 2003), indicando la posibilidad del estatus de viabilidad pero no cultivable (VPNC).

Tabla 2. Géneros y especies de bacterias acéticas descritas en diferentes sustratos.

Género	Especie		
<i>Acetobacter</i> Con 20 especies	<i>A. aceti</i>	<i>A. malorum</i>	<i>A. peroxydans</i>
	<i>A. cerevisiae</i>	<i>A. nitrogenifigens</i>	<i>A. syzygii</i>
	<i>A. cibirongensis</i>	<i>A. oeni</i>	<i>A. fabarum</i>
	<i>A. estunensis</i>	<i>A. orientalis</i>	<i>A. ghanaensis</i>
	<i>A. indonesiensis</i>	<i>A. orleanensis</i>	<i>A. senegalensis</i>
	<i>A. lovaniensis</i>	<i>A. pasteurianus</i>	<i>A. farinalis</i>
	<i>A. pomorum</i>	<i>A. tropicalis</i>	
<i>Gluconobacter</i> Con 13 especies	<i>G. albidus</i>	<i>G. oxydans</i>	<i>G. kanchanaburiensis</i>
	<i>G. cerinus</i>	<i>G. roseus</i>	<i>G. uchimurae</i>
	<i>G. frateurii</i>	<i>G. sphaericus</i>	<i>G. nephelii</i>
	<i>G. japonicus</i>	<i>G. thailandicus</i>	
	<i>G. kondonii</i>	<i>G. wancherniae</i>	
<i>Gluconacetobacter</i> Con 17 especies	<i>Ga. azotocaptans</i>	<i>Ga. entanii a</i>	<i>Ga. rhaeticus</i>
	<i>Ga. diazotrophicus</i>	<i>Ga. europaeus</i>	<i>Ga. saccharivorans</i>
	<i>Ga. sacchari</i>	<i>Ga. hansenii</i>	<i>Ga. swingsii</i>
	<i>Ga. johanna</i>	<i>Ga. sucrofermentans</i>	<i>Ga. nataicola</i>
	<i>Ga. liquefaciens</i>	<i>Ga. intermedius</i>	<i>Ga. oboediens</i>
	<i>Ga. xylinus</i>	<i>Ga. kombuchae a</i>	
<i>Asaia</i> Con 5 especies	<i>As. bogorensis</i>	<i>As. siamensis</i>	<i>As. krungthrpensis</i>
	<i>As. lannensis</i>	<i>As. spathodeae</i>	
<i>Neokomagataea</i> Con 2 especies	<i>Nk. thailandica</i>	<i>Nk. tanensis</i>	
<i>Acidomonas</i>	<i>Ac. methanolica</i>		
<i>Neoasaia</i>	<i>N. chiangmaiensis</i>		
<i>Swaminathania</i>	<i>Sw. salitolerans</i>		
<i>Kozakia</i>	<i>Kz. baliensis</i>		
<i>Granulibacter</i>	<i>Gr. bethesdensis</i>		
<i>Saccharibacter</i>	<i>S. florícola</i>		
<i>Tanticharoenia</i>	<i>T. sakaeratensis</i>		
<i>Ameyamaea</i>	<i>Am. chiangmaiensis</i>		

Extraído de Hidalgo (2012)

Se han descrito numerosos medios de cultivo para el aislamiento de las BA. Es así, que para el aislamiento desde uva, mostos y vinos el medio GYC agar (Glucosa 5%, extracto de levadura 1%, carbonato de calcio 0,5% y agar 2%) descrito en 1979 por Carr y Pasmore, ha presentado buenos resultados, al igual que el medio Manitol (Manitol 2,5%, extracto de

levadura 0,5%, peptona 0,3% y agar 2%) (Du Toit y Lambrechts, 2002; Bartowsky et al., 2003; González et al., 2004; Gullo et al., 2006; Vegas et al., 2010; Valera et al., 2011). Es recomendable la aplicación de antifúngicos y antibióticos a los medios de cultivo, como son cicloheximida o piramicina para evitar el crecimiento de hongos y levaduras o penicilina para evitar el crecimiento de BL. La incubación de las BA es en ambiente aeróbico a temperaturas que rondan entre los 28°C y los 30°C.

3.3.Métodos moleculares de identificación de bacterias acéticas

El principal objetivo de cualquier esquema de clasificación microbiano es identificar un aislado hasta el nivel de especie, que es la unidad básica del agrupamiento taxonómico. La tipificación de las diferentes cepas o genotipos de una determinada especie tiene cada vez un papel más relevante desde el punto de vista industrial. Por lo que hoy en día se cuenta con distintas técnicas moleculares para distinguir entre la posibilidad de identificar a nivel de especie y más específico aún, a nivel de cepa (Guillamón et al., 2003). La mayoría de taxónomos microbianos han aceptado que las pruebas moleculares, especialmente aquellos métodos basados en el análisis de los ácidos nucleicos, son la opción más fiable para la designación e identificación de especies y para determinar las relaciones entre los diferentes organismos. Algunas de estas técnicas moleculares basadas en el análisis del DNA y aplicadas a la taxonomía bacteriana son: Análisis de restricción o Restriction Fragment Length Polymorphisms (RFLPs) del DNA ribosomal, de la zona intergénica entre los genes 16S y 23S rRNA (Internally Transcribed Spacer o ITS) y análisis de secuencias, entre otros (Guillamón et al., 2003). Estas técnicas moleculares pueden clasificarse en dos grupos dependiendo del grado de polimorfismo obtenido: las que discriminan a nivel de especie y las que discriminan a nivel de cepa.

Identificación a nivel de especie:

PCR-RFLP 16S rRNA gene: consiste en amplificar el gen ribosomal 16S y después digerir el fragmento amplificado con diversas enzimas de restricción. La combinación de diferentes enzimas permite la identificación de prácticamente todas las especies de bacterias acéticas (González et al., 2006a). Las ventajas de esta técnica son que es un método rápido y fiable para la identificación a nivel de género y especie. Ha sido utilizada

para caracterizar bacterias acéticas en viñedos, vino y vinagre (Ruiz et al., 2000; González et al., 2004; González et al., 2005; González et al., 2006a, Prieto et al., 2007; Ilabaca et al., 2008).

PCR-RFLP Internally Transcribed Spacer (ITS) 16S-23S rRNA gene: esta técnica consiste en amplificar la región intergénica (ITS) comprendida entre los genes ribosomales 16S y 23S. Luego se digieren los amplificadores con diversas endonucleasas de restricción. Aunque las secuencias intergénicas se caracterizan por presentar alta variabilidad y permitir distinguir a nivel de cepa (Navarro et al., 1992), en los estudios realizados con bacterias acéticas (Ruiz et al., 2000; Trcek y Teuber, 2002; González et al., 2006a) la discriminación se ha limitado a nivel de especie.

Identificación a nivel de cepa:

Random amplified polymorphic DNA-PCR (RAPD-PCR): esta técnica consiste en la utilización de oligonucleótidos cortos (9-10 nucleótidos) que hibridan con secuencias al azar del genoma bacteriano produciendo un número de fragmentos amplificados y de tamaño diferente para cada cepa (Guillamón y Mas, 2005). El principal problema que presenta esta técnica es su baja reproducibilidad, la cual es inherente a la técnica, y que es la causa de la aparición de algunos fragmentos poco reproducibles. Esta técnica es útil para realizar estudios de diversidad genética y para tener una estimación de la relación genética entre diferentes cepas. Fue utilizada por primera vez en bacterias acéticas por Trcek et al. (1997) y luego por Nanda et al. (2001) para caracterizar bacterias acéticas en vinagre de arroz. Posteriormente, Bartowsky et al. (2003) usó esta técnica para la diferenciación de cepas de bacterias acéticas en un vino deteriorado.

Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus-PCR (ERIC-PCR) y Repetitive Extragenic Palindromic-PCR (REP-PCR): los elementos ERIC y REP son secuencias consenso derivadas de regiones repetidas altamente conservadas que se encontraron en bacterias entéricas (Pooler et al, 1996). Sin embargo, estas secuencias también pueden encontrarse en los genomas de la mayoría de los grupos bacterianos. Esta técnica se basa en amplificar las secuencias que se encuentran entre dichas zonas repetidas mediante partidores que hibridan sobre estos elementos. La utilización de estos oligonucleótidos

produce un alto grado de polimorfismo que permite obtener patrones únicos a nivel de cepa. Dichas técnicas han sido utilizadas para la tipificación de BA tanto de vino (González et al., 2005) como en vinagre (Nanda et al., 2001). Dentro de la técnica REP-PCR se encuentra (GTG)₅-REP-PCR, que es una técnica similar a las anteriores, y se basa en realizar una amplificación entre secuencias repetitivas distribuidas a lo largo del genoma, utilizando, en este caso, el primer (GTG)₅ (Versalovic et al., 1994; Gevers et al., 2001). De Vuyst et al. (2007) fueron los primeros en aplicar esta técnica en BA, y la han aplicado para la tipificación de cepas de bacterias acéticas en cacao (Camu et al., 2007) y además se ha mejorado y estandarizado para aplicar esta técnica como herramienta para clasificar e identificar las BA de forma rápida y precisa (Papalexandratou et al., 2009).

3.4.Acetificación o elaboración de vinagre de vino

Si bien las BA están relacionadas con alteraciones en el vino, la más común conocida ampliamente como picado acético, también pueden ser de interés en la industria biotecnológica, con aplicaciones como producción de sorbosa a partir del sorbitol o la producción de celulosa, junto con la más conocida y tradicional producción de vinagre (Guillamón et al., 2003; Carrascosa et al, 2005; Ilabaca et al, 2008).

Según la FAO/OMS (Codex Alimentarius,1985) el vinagre es un líquido apto para el consumo humano, producido exclusivamente con productos idóneos que contengan almidón y/o azúcares, producido por una fermentación alcohólica y una posterior acetificación y debe contener una cantidad específica de ácido acético (40 g/L). El vinagre puede contener ingredientes facultativos en las cantidades necesarias para conferir al producto un aroma característico tales como, plantas aromáticas, frutas, suero, zumo de frutas, azúcares, miel y sal de calidad.

En Chile, según la ley 18.455 (MINAGRI, 1985), se define como vinagre o vinagre de vino al producto obtenido por la acetificación del vino y también señala que los vinagres elaborados sobre la base de sidra, productos alcohólicos de vides híbridas, hidromiel y alcohol etílico potable se denominaran con la palabra “vinagre”, acompañada con la palabra de la materia prima de la cual proceden. También se puede considerar dentro de esta ley a

los vinagres de frutas. Según el Decreto N° 78 de la ley 18.455 (MINAGRI, 1986), los vinagres en general deberán reunir los siguientes requisitos de composición:

- Un contenido de ácido acético mínimo de 40 g/L y un contenido de alcohol no superior a 1 % v/v.
- Deben estar libres de anguñulas y de enfermedades criptogámicas.
- No deben contener sustancias extrañas a la materia prima de origen, no aceptándose que sean adicionados de ácidos minerales ni orgánicos, materias acres, irritantes o tóxicas, colorantes de cualquier naturaleza como tampoco de otras sustancias destinadas a aumentar artificialmente las propiedades características de los vinagres genuinos.

3.5. Métodos de elaboración del vinagre

Los métodos artesanales y, en gran parte, familiares, que consisten, básicamente, en dejar los residuos de un buen vino en un tonel de madera durante bastante tiempo, en presencia de la vieja madre del vinagre (Guzmán, 1998). La madre del vinagre es una masa más o menos gelatinosa en la que están presentes bacterias acéticas de distinto poder acetificante (Llaguno y Polo, 1991). La transformación procede lentamente y se detiene cuando ha alcanzado una acidez total de 4-5 % (Guzmán, 1998). El lento proceso y la presencia de alcohol residual favorecen la formación de ésteres y otros compuestos volátiles que confieren aroma y sabor peculiares a estos vinagres artesanales (Llaguno y Polo, 1991).

Los métodos de elaboración industriales, según Guzmán (1998) se basan, esencialmente, en el aumento de la superficie de contacto entre el líquido y el aire. Se puede hacer una diferenciación entre las dos formas de acetificación empleadas usualmente: acetificación en cultivo superficial (lenta) y acetificación en cultivo sumergido (rápida).

4. Referencias

- Bartowsky EJ, Xia D, Gibson RL, Fleet GH, Henschke PA.(2003). Spoilage of bottled red wine by acetic acid bacteria. *Letters in Applied Microbiology*, 36, 307-314.
- Bauza T, Teissedre P. (1995). Les amines biògenes du vin. *Métabolisme et toxicité. Bulletin l'OIV*, 68: 42-67.
- Broquedis M, Dumery B, Boucard, J. (1989). Ise en evidence de polyamines (putrescine, cadaverine, nor-spermidine et spermine) dans les feuilles et les grappes de *Vitis vinifera* L. *Connaissance de la Vigne et du Vin*, 23: 1-6.
- Camu N, De Winter T, Verbrugghe K, Cleenwerck I, Vandamme P, Takrama JS, Vancanneyt M, De Vuyst L. (2007). Dynamics and biodiversity of populations of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria involved in spontaneous heap fermentation of cocoa beans in Ghana. *Applied and Environmental Microbiology*, 73: 1809-1824.
- Carrascosa A, Muñoz R, González R. (2005). *Microbiología del vino*, 1º edición. AMV, Ed. España
- Cho GS, Krauss S, Huch M, Du Toit M, Franz CMAP. (2001). Development of a quantitative PCR for detection of *Lactobacillus plantarum* starters during wine malolactic fermentation. *Journal of Microbiology And Biotechnology*, 21 (12): 1280-1286
- Chu C, Bejdanes L. (1981). Effects of diamines, polyamines and tuna fish extracts on the binding of histamine to mucin in vitro. *Journal of Food Science*, 47: 79.
- Claisse O, Renouf , Lonvaud-Funel A. (2007). Differentiation of wine lactic acid bacteria species based on RFLP analysis of a partial sequence of *rpoB* gene. *Journal of microbiological methods*, 69(2), 387-390.
- Codex alimentarius Mundi. Decisión de la 16ª sesión de la comisión del Codex Alimentarius. (1985). Ginebra.
- Costantini A, García-Moruno E, Moreno-Arribas MV. (2009). Biochemical transformations produced by malolactic fermentation. In *Wine chemistry and biochemistry*, pp. 27-57. Springer New York.

- Dicks L M, Endo A. (2009). Taxonomic status of lactic acid bacteria in wine and key characteristics to differentiate species.
- Dicks LMT, Dellaglio F, Collins MD. (1995). Proposal To Reclassify *Leuconostoc oenos* as *Oenococcus oeni* [corrig.] gen. nov., comb. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 45(2), 395-397.
- Du Toit, W. J., Pretorius, I. S. (2002). The occurrence, control and esoteric effect of acetic acid bacteria in winemaking. *Annals of Microbiology*, 52: 155-179.
- Ferrer, S. y Pardo, I. (2005). Prevención de la aparición de aminas biógenas en vino. Disponible en: http://www.acenologia.com/ciencia70_3.htm.
- Flanzy, C. *Enología: Fundamentos científicos y tecnológicos*. (2000). Mundi Prensa Libros SA.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). The importance of food quality and safety for developing countries. 2001. Disponible en: http://www.fao.org/trade/docs/LDC-foodqual_en.htm.
- Gevers D, Huys G, Swings J. (2001). Applicability of rep-PCR fingerprinting for differentiation of *Lactobacillus* species. *FEMS Microbiology Letters*, 205, 31-36.
- Gloria, M.; Watson, B.; Simon-Sarkadi, L. y Daeschel, M. (1998). A survey of biogenic amines in Oregon Pinot noir and Cabernet Sauvignon wines. *American Journal of Enology and Viticulture*. 49: 279-281.
- Gonzalez A, Guillamon JM, Mas A, Poblet M. (2006a). Application of molecular methods for routine identification of acetic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 108, 141-146.
- González A, Hierro N, Poblet M, Mas A, Guillamon JM. (2006b). Enumeration and detection of acetic acid bacteria by real-time and nested polymerase chain reactions. *FEMS Microbiology Letters*, 254, 123-128.
- González A, Hierro N, Poblet M, Rozes N, Mas A, Guillamon JM. (2005). Application of molecular methods to demonstrate species and strain evolution of acetic acid bacteria population during a wine production. *International Journal of Food Microbiology*, 102, 295-304.
- Groisillier A, Lonvaud-Funel A. (1999). Comparison of partial malolactic enzyme gene sequences for phylogenetic analysis of some lactic acid bacteria species and

- relationships with the malic enzyme. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 49(4), 1417-1428.
- Guillamón JM, González, N, Hierro N, Rizés N, Mas A, Poblet M. Técnicas de identificación de bacterias acéticas: 9-15. In: Mas, A (ed). *Primeras Jornadas de I+D+i en la elaboración de Vinagres de vno*. Tarragona, España, (Octubre 2003). Edició de la Facultat d'Enologia de Tarragona. Universitat Rovira i Virgili. Tarragona, España. 92 p.
 - Guillamón JM, Mas A. Bacterias acéticas: 273-297. In: Carrascosa, A, Muñoz R, González R. (2005). *Microbiología del Vino*. Primera Edición. A. Madrid Vicente ediciones. Madrid, España, 398 p
 - Gullo M, Caggia C, De Vero L, Giudici P. (2006). Characterisation of acetic acid bacteria in "traditional balsamic Vinegar". *International Journal of Food Microbiology*, 106, 209-212.
 - Guzmán M. (1998). *Vinagre: Características, atributos y control de calidad*. Editorial Díaz de Santos, S.A., Madrid, España. 133 p.
 - Hidalgo, J. *Tratado de enología. Vol. I y II. (2003). Madrid: Mundi-Prensa. 1423p.*
 - Hidalgo CE. (2012). Microbiological analysis and control of the fruit vinegar production process.
 - Ilabaca C, Jara C, Romero J. (2014). The rapid identification of lactic acid bacteria present in Chilean winemaking processes using culture-independent analysis. *Annals of Microbiology*, 64(4), 1857-1859.
 - Ilabaca C, Naverrete P, Mardones P, Romero J, Mas A. (2008). Application of cultura cultura-independent molecular biology based method to evaluate acetic acid bacteria diversity during vinegar processing. *International Journal of Food Microbiology*, 126: 245-249.
 - Knoll C, Fritsch S, Schnell S, Grossmann M, Rauhut D, Du Toit M. (2001). Influence of pH and ethanol on malolactic fermentation and volatile aroma compound composition in white wines. *LWT-Food Science and Technology*, 44(10), 2077-2086.
 - Landete M, Ferrer S, Polo L, Pardo I. (2005). Biogenic amines in wines from three spanish regions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 119-1124.

- Lehtonen P. (1996). Determination of amines and amino acid in wine - A review. *American Journal of Enology and Viticulture*, 47: 127-133.
- Leitão M, Marques A, Romão M. (2005). A survey of biogenic amines in commercial Portuguese wines. *Food Control*, 16: 199-204.
- Lerm E, Engelbrecht L, Du Toit M. (2010). Malolactic fermentation: the ABC's of MLF.
- Llaguno C, Polo C. (1991). *El vinagre de vino*. Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Madrid, España, 238p.
- Lonvaud-Funel A, Joyeux A, Ledoux O. (1991). Specific enumeration of lactic acid bacteria in fermenting grape must and wine by colony hybridization with non-isotopic DNA probes. *Journal of Applied Bacteriology*, 71(6), 501-508.
- Mafra I, Herbert P, Santos L, Barros P, Alves A. (1999). Evaluation of biogenic amines in some Portuguese quality wines by HPLC fluorescence detection of OPA derivatives. *American Journal of Enology and Viticulture*, 50: 128–132.
- Maijala R, Eerola S. (1993). Contaminant lactic acid bacteria of dry sausages produce histamine and tyramine. *Meat Science*, 35: 387-395.
- Mesa MM, Macias M, Cantero D, Barja F. (2003). Use of the direct epifluorescent filter technique for the enumeration of viable and total acetic acid bacteria from vinegar fermentation. *Journal of Fluorescence*, 13, 261-265.
- Millet V, Lonvaud-Funel A. (2000). The viable but non-culturable state of wine microorganisms during storage. *Letters in Applied Microbiology*, 30, 126-141.
- MINAGRI, Chile. Ley N° 18.455, Fija normas sobre producción, elaboración, y comercialización de alcoholes etílicos, bebidas alcohólicas y vinagres. Decreto de Agricultura N° 78. Diario oficial de la República de Chile N° 32.604. 1986. Disponible en:
<http://www.sag.cl/common/asp/pagAtachadorVisualizador.asp?argCryptedData=GP1TkTXdhRJAS2Wp3v88hBm9NIt6W3AjklmI9EkwRPIU%3D&argModo=&argOrigen=BD&argFlagYaGrabados=&argArchivoId=27755>.
- Muñoz R, Moreno-Arribas M, de las Rivas B. (2011) *Lactic acid bacteria. Molecular Wine Microbiology*, 1st ed. Elsevier, Academic Press, London, UK, 191-226.

- Nanda K, Taniguchi M, Ujike S, Ishihara N, Mori H, Ono H, Murooka Y. (2001). Characterization of acetic acid bacteria in traditional acetic acid fermentation of rice vinegar (komesu) and unpolished rice vinegar (kurosu) produced in Japan. *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 986-990.
- Navarro E, Simonet P, Normand P, Bardin R. (1992). Characterisation of natural populations of *Nitrobacter* spp. using PCR/RFLP analysis of the ribosomal intergenic spacer. *Archives of Microbiology*, 157, 107-115.
- Neeley ET, Phister TG, Mills DA. (2005). Differential real-time PCR assay for enumeration of lactic acid bacteria in wine; *Appl Environ Microbiol*, 71(12): 8954-8957.
- Nielsen DS, Teniola OD, Ban-Koffi L, Owusu M, Andersson TS, Holzapfel WH. (2007). The microbiology of Ghanaian cocoa fermentations analysed using culture-dependent and culture-independent methods. *International Journal of Food Microbiology*, 114, 168-186.
- Ordoñez J, Hierro E, Bruna J, de la Hoz L. (1999). Changes in the components of dry-fermented sausages during ripening. *Critical Review in Food Science and Nutrition*, 39:329-367.
- Organización Internacional de la Viña y el Vino (OIV). (2005). Codex Enológico Internacional. Disponible en: http://news.reseau-concept.net/images/oiv_es/Client/CODEX_2006_ES.pdf.
- Ough CS. (1971). Measurement of histamine in California wines. *Journal of Agricultural Food and Chemistry*, 19(2): 241-244.
- Palacios A, Suárez C, Krieger S, Theodore D, Otaño L, Laucirica A, Peña F. (2005). Influencia organoléptica de las aminos biógenas producidas durante la fermentación maloláctica del vino. Disponible en: http://www.acenologia.com/ciencia70_3.htm.
- Papalexandratou Z, Cleenwerck I, De Vos P, De Vuyst L. (2009). (GTG)-PCR reference framework for acetic acid bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 301: 44-49.
- Pardo I. (2003). Metabolismo de sustratos del mosto y vino por bacterias lácticas y sus implicaciones en la calidad del vino. *Ace: Revista de Enología*, 36.

- Polo, M.C. y Moreno-Arribas, M. (2005). Origen de aminas biógenas del vino y métodos de cuantificación. Disponible en: http://www.acenologia.com/ciencia70_3.htm.
- Pooler MR, Ritchie DF, Hatung JS. (1996). Genetic relationships among strains of *Xanthomonas fragariae* based on Random Amplified Polymorphic DNA PCR, Repetitive Extragenic Palindromic PCR and Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus PCR data and generation of multiplexed PCR primers useful for the identification of this phytopathogen. *Applied and Environmental Microbiology*, 62: 3121-3127.
- Poux et Ournac. (1970). Acides amines libres et polypeptides du vin. *Ann. Technol. Agric*, 19: 217-237.
- Prieto C, Jara C, Mas A, Romero J. (2007). Application of molecular methods for analysing the distribution and diversity of acetic acid bacteria in Chilean vineyards. *International Journal of Food Microbiology*, 115, 348-355.
- Radler F, Fäth KP. (1991). Histamine and other biogenic amines in wines. In: *International Symposium on Nitrogen in Grapes and Wine*. Davis, California, EEUU, Pp. 185-195
- 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.
- Rivas-Gonzalo J, Mariné A. (1983). Migrañas de orden alimentario: Aspectos relacionados con la tiramina. *Circular Farmacéutica*, 278: 1-6.
- Rodas, A.M.; Ferrer, S.; Pardo, I. (2003). 16S-ARDRA, a Tool for Identification of Lactic Acid Bacteria Isolated from Grape Must and Wine. *Syst Appl Microbiol*. 26(3):412-22.
- Ruiz A, Poblet M, Mas A, Guillamon JM. (2000). Identification of acetic acid bacteria by RFLP of PCR-amplified 16S rDNA and 16S-23S rDNA intergenic spacer. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50: 1981-1987.
- Ruiz P, Seseña S, Izquierdo PM, Palop ML. (2010). Bacterial biodiversity and dynamics during malolactic fermentation of Tempranillo wines as determined by a

- culture-independent method (PCR-DGGE). *Applied microbiology and biotechnology*, 86(5), 1555-1562.
- Ruiz P, Izquierdo PM, Seseña S, Palop ML. (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): 942-8
 - Sandler M, Reynolds G. (1976). Does phenylethylamine cause schizophrenia. *The Lancet*, 1: 70-71.
 - Sato H, Yanagida F, Shinohara T, Suzuki M, Suzuki KI, Yokotsuka. (2001). Intraspecific diversity of *Oenococcus oeni* isolated during red wine-making in Japan. *FEMS microbiology letters*, 202(1), 109-114.
 - Silla Santos M. (1996). Biogenic amines: their importance in foods. *International Journal Food Microbiology*, 29: 213–231.
 - Soufleros EH, Bouloumpasi E, Zotou A, Loukou Z. (2007). Determination of biogenic amines in Greek wines by HPLC and ultraviolet detection after dansylation and examination of factors affecting their presence and concentration. *Food Chemistry*, 101: 704-716.
 - Suárez JA, Iñigo B. (2004). *Microbiología Enológica, Fundamentos de vinificación*. 3º edición. Ed Mundi-Prensa. España.
 - Taylor S. (1986). Histamine food poisoning: toxicity and clinical aspects. A review. *Critical Review in Toxicology*, 17: 91-128.
 - Thompson FL, Hoste B, Vandemeulebroecke K, Swings J. (2001). Genomic diversity amongst *Vibrio* isolates from different source determined by fluorescent amplified fragment length polymorphism. *Systematic and Applied Microbiology*, 24: 520-538.
 - Trcek J. (2005). Quick identification of acetic acid bacteria based on nucleotide sequences of the 16S-23S rRNA gene internal transcribed spacer region and of the PQQ-dependent alcohol dehydrogenase gene. *Systematic and Applied Microbiology*, 28,735-745.

- Trcek J, Teuber M. (2002). Genetic restriction analysis of the 16S-23S rRNA gene internal transcribed spacer regions of the acetic acid bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 19, 69-75.
- Trcek J, Ramus J, Raspor P. (1997). Phenotypic characterization and RAPDPCR profiling of *Acetobacter* sp. isolated from spirit vinegar production. *Food Technology and biotechnology*, 35: 63-67.
- Urakami T, Tamaoka J, Suzuki K, Komagat K. (1989). *Acidomonas* gen. nov., incorporating *Acetobacter methanolicus* as *Acidomonas methanolica* comb. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 39, 50-55.
- Valera MJ, Laich F, González SS, Torija MJ, Mateo E, Mas A. (2011). Diversity of acetic acid bacteria present in healthy grapes from the Canary Islands. *International Journal of Food Microbiology*, 151: 105-112.
- Vázquez Lasa MB, Iñiguez M, Gonzalez-Guerrero A. (1998). Biogenic amines in Rioja wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 49: 229.
- Vegas C, Mateo E, González A, Jara C, Guillamón JM, Poblet M, Torija MJ, Mas A. (2010). Population dynamics of acetic acid bacteria during traditional wine vinegar production. *International Journal of Food Microbiology*, 138: 130-136.
- Versalovic J, Schneider M, De Bruijn FJ, Lupski JR. (1994). Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods in Molecular and Cellular Biology*, 5: 25-40.
- Yamada Y, Yukphan P. (2008). Genera and species in acetic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 125: 15-24.
- 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(6), 351-355.
- Zavaleta AI, Martinez-Murcia AJ, Rodriguez-Valera F. (1997). Intraspecific genetic diversity of *Oenococcus oeni* as derived from DNA fingerprinting and sequence analyses. *Applied and environmental microbiology*, 63(4), 1261-1267.
- Zoeklein B, Kenneth FB gump, F. nury. (2001). *Análisis y producción de vino*. Editorial Acribia. *Zaragoza, España*.

Capítulo 1

Rápida identificación de bacterias lácticas en procesos de vinificación Chilena usando análisis independientes de cultivo

The rapid identification of lactic acid bacteria present in Chilean winemaking processes using culture-independent analysis

Carolina Ilabaca, Carla Jara, Jaime Romero

Annals of Microbiology (2014) 64:1857–1859

ABSTRACT

A polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) analysis of 16S ribosomal RNA (rRNA) genes was developed to identify lactic acid bacteria (LAB) that are commonly present in winemaking processes (*Oenococcus*, *Pediococcus*, *Lactobacillus*, and *Leuconostoc*). This culture-independent approach revealed the presence of *Oenococcus* in the spontaneous malolactic fermentation in industrial Chilean wines.

Keywords: Malolactic fermentation, *Oenococcus oeni*, lactic acid bacteria, wine, Chile.

In Chile, the production of wines has sharply increased in recent years, reaching 12.500.000hL per year (Servicio Agrícola y Ganadero, Chile 2012). In most Chilean wineries, the malolactic fermentation (MLF) stage of winemaking largely occurs in a spontaneous manner; thus, at present, limited knowledge exists regarding the bacterial populations involved in this process. MLF is an important stage impacting the wine quality, in which lactic acid bacteria (LAB) transform malic acid into lactic acid and CO₂, decreasing the overall acidity of a wine and providing microbiological stability. Hence, this study aimed to develop a rapid molecular method to describe LAB populations during spontaneous MLF.

A succession of LAB is observed during spontaneous MLF. In particular, LAB belonging to the genera *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, and *Pediococcus* have been found in wine (Lonvaud-Funel 1999; Reguant and Bordons 2003; Ruiz *et al.* 2010). *Lactobacillus*, *Pediococcus*, and *Leuconostoc* species gradually disappear as vinification proceeds. In contrast, *Oenococcus oeni* becomes increasingly apparent during the course of MLF (Spano *et al.* 2007). This dynamic of bacterial populations present during MLF have been studied using culture-dependent techniques (Reguant and Bordons 2003). These bacteria grow slowly in artificial media; as a result, the isolation of these bacteria requires long incubation times (>5 days), and the biochemical identification of these bacteria is tedious because it depends on the growth of the cultured strains. Therefore, these methods are unsuitable for the practical monitoring of bacteria during industrial vinification. Furthermore, it is challenging to utilize these methods to obtain an accurate picture of the dynamics of LAB during MLF because these bacteria generally exhibit low cultivability (Amann *et al.* 1995; Hugenholtz *et al.* 1998).

More recently, molecular methods based on analyzing DNA extracted from a sample (culture-independent methods) have been employed to circumvent this issue. Renouf *et al.* (2006) and Spano *et al.* (2007) applied denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) to the analysis of bacterial populations during MLF. This method is difficult to routinely utilize because the achievement of reproducible gradients using DGGE requires relatively sophisticated equipment and trained personnel. In this work, a culture-independent analytical approach is proposed that requires only simple equipment and can provide

rapid results regarding the composition of bacterial populations present during industrial-level MLF. In this method, *Oenococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, and *Lactobacillus* bacteria are identified using a polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) approach that involves two restriction enzymes. This approach allows for the simultaneous determination of the presence or absence of the four most prevalent winemaking LAB genera in MLF during vinification.

The design of this MLF tracking method involved approximately 500 bp of the 16S ribosomal RNA (rRNA) gene sequences of the *Oenococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, and *Lactobacillus* genera; in particular, numbering base pairs based on the *E. coli*. 16S rRNA gene, the region between base pairs 341 and 788 was examined (Figure S1). These sequences were aligned with ClustalW (Larkin *et al.* 2007) and subjected to an entropy analysis to determine regions that differentiated the examined genera. Four such regions, located approximately at base pairs 456 - 461, 616 - 621, 651 - 656, and 766 - 771, were identified through this analysis; these regions are useful for using 16S rRNA gene analysis to distinguish among these four winemaking LAB genera. The *in silico* design for the MLF tracking 1 approach required the identification of restriction endonucleases that recognized sites within these regions. This search was performed using the BioEdit software program, version 7.1.3 (Hall 1999). Finally, two enzymes, *XmnI* and *TspRI*, were selected. The simultaneous use of both enzymes produced distinctive restriction patterns that differentiate among the examined winemaking LAB. Comparing the *in silico* with the experimental restriction profiles of reference strains, allowed the validation of the method to distinguish LAB populations. The reference strains from different collections: *Oenococcus oeni* JCM (Japan Collection of Microorganisms) 6125; *Leuconostoc mesenteroides* LMG (Laboratorium voor Microbiologie) 8159; *Pediococcus parvulus* NBRC (NITE Biological Research Center) 100673; and *Lactobacillus brevis* ATCC (American Type Culture Collection) 14687. To perform these comparisons, reference strains were grown in defined culture media, and DNA was extracted in accordance with Romero *et al.* (2002). The 16S rRNA gene was then amplified by PCR in accordance with Ilabaca *et al.* (2008). A combination of the restriction enzymes *XmnI* (Thermo Scientific) and *TspRI* (Thermo Scientific), which were chosen based on the *in silico* analysis, was used for amplicon digestion. Amplicons were incubated with these restriction enzymes for 2 hours at 37°C

and 16 hours at 65°C. The obtained restriction profiles were visualized using 90 minutes of electrophoresis at 80 volts on 10% polyacrylamide gels followed by staining with SYBR Green (Invitrogen).

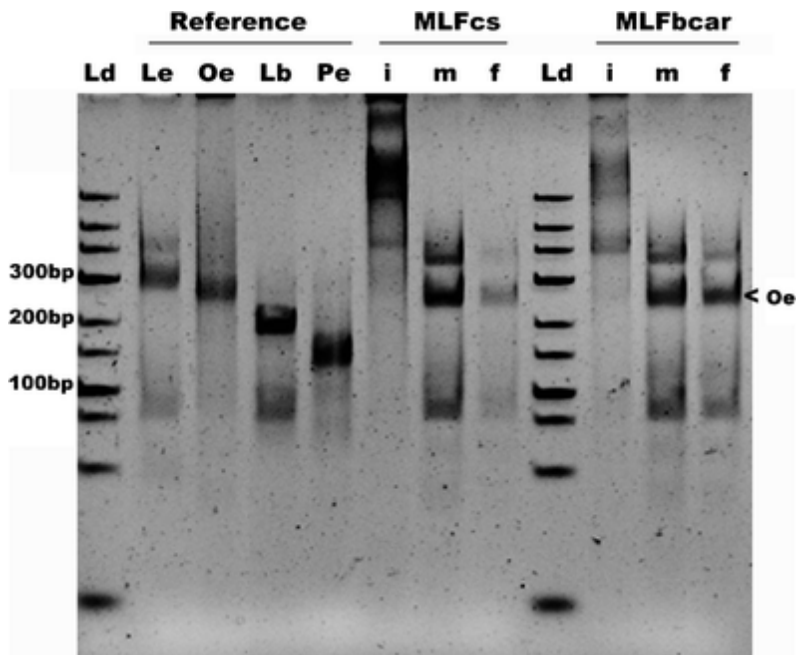


Figure 1. RFLP profiles derived from reference strains and illustrating the identification of LAB during the MLF stages of the production of Cabernet Sauvignon (cs) and Carmenere (car). The reference strains (Reference) correspond to *Leuconostoc mesenteroides* LMG 8159 (Le), *Oenococcus oeni* JCM 6125 (Oe), *Lactobacillus brevis* ATCC 14687 (Lb), and *Pediococcus parvulus* NBRC 100673 (Pd). The analyzed samples correspond to the following MLF stages: the initial stage (i), the middle stage (m), and the final stage (f). Ld represents the O'GeneRuler Low Range DNA Ladder.

The results obtained from these analyses are depicted in Figure 1. The reference strains exhibit different profiles following digestion with the tested enzymes. These restriction enzymes, *XmnI* and *TspRI*, provide results that are easy to visualize. In particular, a ladder pattern of restriction fragments is observed, with bands appearing at approximately 300 bp for *Leuconostoc*, 250 bp for *Oenococcus*, 200 bp for *Lactobacillus*, and 150 bp for *Pediococcus*. The exact sizes of the fragments are described in Table S1, it also describes that same genus always shows the same RFLP pattern. The developed method was applied to wine samples during the MLF process. Spontaneous industrial MLF was monitored for *Vitis vinifera* cv. Cabernet Sauvignon and cv. Carmenere (10,000 L).

Different stages of the MLF process were examined: the initial stage of MLF (the iMLF lanes; this stage coincides with the end stage of alcoholic fermentation); the middle stage of MLF (the mMLF lanes), and the final stage of MLF (the fMLF lanes). For Cabernet Sauvignon, the initial stage of MLF was May 7; the middle stage of MLF was Jun 13, and the final stage of MLF was Jun 28. For Carmenere, the initial stage of MLF was May 30; the middle stage of MLF was Jun 20, and the final stage of MLF was Jul 14. In the iMLF lanes (Figure 1), the bands produced from samples of both cultivars do not correspond to bands produced by the LAB that are reportedly associated with MLF. This phenomenon may reflect the fact that only a limited LAB population is present during the initial stages of MLF; thus, this population may be below detection limits (Ruiz *et al.* 2010). In contrast, at the midpoint of MLF, the mMLF lanes for the examined cultivars exhibited bands indicative of the presence of *Oenococcus*. The presence of *Oenococcus* was also observed during the final stage of MLF (the fMLF lanes) for the examined cultivars. To confirm the identity of *Oenococcus* band, specific primers (F: GCTAAATACGTGCCAGCAGC; R: TCCACTTGCCTCTATCGCAC) were design and the band was eluted and sequenced; the resulting sequence corresponded to *Oenococcus* with 100% of identity as derived from Blast analysis (see Figure S2). In summary, the profiles revealed the prevalence of *Oenococcus* during the MLF process, and bacteria 1 from this genus were readily differentiable from the other genera involved in MLF.

Based on the aforementioned results, the designed 16S rRNA PCR-RFLP strategy constitutes a fast, easy, informative and reliable tool for the identification and differentiation of winemaking LAB strains isolated during MLF processes. The proposed approach can distinguish among LAB genera reported to be present during MLF (Lonvaud-Funel *et al.* 1991; Bon *et al.* 2009; Ruiz *et al.* 2010). Consequently, the 16S rRNA PCR-RFLP approach using *XmnI* and *TspRI* allows for the simultaneous parallel observation of the presence or absence of the four genera (*Oenococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, and *Lactobacillus*) of LAB that are most prevalent during the middle and final stage of MLF. This strategy can be used in both spontaneous MLF and MLF induced with commercial starter cultures. Thus, this qualitative method allows the genera of LAB involved in spontaneous MLF to be determined. In the case of MLF inoculated with commercial starter cultures, the introduction of the inoculated bacteria can be controlled, and any

contamination by other winemaking LAB strains, which could alter the organoleptic characteristics of a wine, can be monitored.

Acknowledgements

This was funded by grants from FONDEF Idea CA12I10123, Inserción a la Academia 791100011 and FONDECYT 1121329 from CONICYT; INNOVA 12IDL2-13145 from Corfo.

References

Amann RI, Ludwig W, Schleifer KH (1995) Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev* 59:143- 169.

Bon E, Delaherche A, Bilhère E, De Daruvar A, Lonvaud-Funel A, Le Marrec C (2009) *Oenococcus oeni* genome plasticity is associated with fitness. *App Environ Microbiol* 75: 2079–2090.

Hall T (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Series* 41: 95-98.

Hugenholtz P, Goebel BM, Pace NR (1998) Impact of culture independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *J Bacteriol* 180: 4765-4774.

Ilabaca C, Navarrete P, Mardones P, Romero J, Mas A (2008) Application of culture culture-independent molecular biology based methods to evaluate acetic acid bacteria diversity during vinegar processing. *Int J Food Microbiol* 126: 245–249.

Larkin M, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23: 2947–2948.

Lonvaud-Funel A, Joyeux A, Ledoux O (1991) Specific enumeration of lactic acid bacteria in fermenting grape must and wine by colony hybridization with no- isotopic DNA probes. *J Appl Bacteriol* 71: 501-508.

Lonvaud-Funel A (1999) Lactic acid 1 bacteria in the quality improvement and depreciation of wine. *J Anton Leeuw Int* 76: 317–331.

Reguant C, Bordons A (2003) Typification of *Oenococcus oeni* strains by multiplex RAPD-PCR and study of population dynamics during malolactic fermentation. *J Appl Microbiol* 95: 344-353

Renouf V, Claisse O, Lonvaud-Funel A (2006) Lactic acid bacteria evolution during winemaking: Use of *rpoB* gene as a target for PCR-DGGE analysis. *Food Microbiol* 23: 136-145.

Ruiz P, Izquierdo PM, Sesena S, Palop ML (2010) Analysis of lactic acid bacteria populations during spontaneous malolactic fermentation of Tempranillo wines at five wineries during two consecutive vintages. *Food Control* 21: 70-75.

Romero J, Garcia-Varela M, Laclette JP, Espejo RT (2002) Bacterial 16S rRNA gene analysis revealed that bacteria related to *Arcobacter spp.* constitute an abundant and common component of the oyster microbiota (*Tiostrea chilensis*). *Microbial Ecol* 44: 365–371.

Servicio Agrícola y Ganadero (S.A.G.) (2012) Informe Ejecutivo Producción de Vinos Chilenos. http://www.sag.cl/sites/default/files/informe_ejecutivo_produccion_vinos_2012.pdf Accessed 26 June 2013.

Spano G, Lonvaud-Funel A, Claisse O, Massa S (2007) In vivo PCR-DGGE analysis of *Lactobacillus plantarum* and *Oenococcus oeni* populations in red wine. *Curr Microbiol* 54: 9-13.

Supplementary material

Figure S2.- Alignment of the sequence of Oe bands reamplified using specific primers

```

    ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
           10      20      30      40      50
Banda Oeni  CGAGCGTTAT CCGGATTTAT TGGGCGTAAA GCGAGCGCAG ACGGTTTATT
Banda CS m  CGAGCGTTAT CCGGATTTAT TGGGCGTAAA GCGAGCGCAG ACGGTTTATT
banda CS f  CGAGCGTTAT CCGGATTTAT TGGGCGTAAA GCGAGCGCAG ACGGTTTATT
Banda CR m  CGAGCGTTAT CCGGATTTAT TGGGCGTAAA GCGAGCGCAG ACGGTTTATT
Banda CR f  CGAGCGTTAT CCGGATTTAT TGGGCGTAAA GCGAGCGCAG ACGGTTTATT

    ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
           60      70      80      90     100
Banda Oeni  AAGTCTGATG TGAAATCCCG AGGCCCAACC TCGGAACTGC ATTGGAAGT
Banda CS m  AAGTCTGATG TGAAATCCCG AGGCCCAACC TCGGAACTGC ATTGGAAGT
banda CS f  AAGTCTGATG TGAAATCCCG AGGCCCAACC TCGGAACTGC ATTGGAAGT
Banda CR m  AAGTCTGATG TGAAATCCCG AGGCCCAACC TCGGAACTGC ATTGGAAGT
Banda CR f  AAGTCTGATG TGAAATCCCG AGGCCCAACC TCGGAACTGC ATTGGAAGT

    ....|....| ....|....| ....|....| .
           110     120     130
Banda Oeni  GATTTACTTG AGTGCATAG AGGCAAGTGG A
Banda CS m  GATTTACTTG AGTGCATAG AGGCAAGTGG A
banda CS f  GATTTACTTG AGTGCATAG AGGCAAGTGG A
Banda CR m  GATTTACTTG AGTGCATAG AGGCAAGTGG A
Banda CR f  GATTTACTTG AGTGCATAG AGGCAAGTGG A
    
```

Figure S1: Alignment of the compared 16SrRNA region of reference strains (ClustalW)

```

      ....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      10          20          30          40          50
Oenococcus CCTACGGGAG GCTGCAGTAG GGAATTTTCC GCAATGCACG AAAGTGTGAC
Pediococcus CCTACGGGAG GCAGCAGTAG GGAATCTTCC ACAATGGACG AAAGTCTGAT
Leuconosto CCTACGGGAG GCTGCAGTAG GGAATCTTCC ACAATGGGCG AAAGCCTGAT
Lactobacil  CCTACGGGAG GCAGCAGTAG GGAATCTTCC ACAATGGACG AAAGTCTGAT

      ....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      60          70          80          90         100
Oenococcus GGAGCGACGC CGCGTGTGTG ATGAAGGCTT TCGGGTCGTA AAGCACTGTT
Pediococcus GGAGCAACGC CGCGTGTGTG ATGAAGGCTT TAGGGTCGTA AAACCTCTGTT
Leuconosto GGAGCAACGC CGCGTGTGTG ATGAAGGCTT TCGGGTCGTA AAGCACTGTT
Lactobacil  GGAGCAATGC CGCGTGTGTG AAGAAGGTT  TCGSCTCGTA AAACCTCTGTT

      ....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      110         120         130         140         150
Oenococcus GTAAGGGGAA AATAACTGAA TTCAGAGAAA GTTTTTCAGCT TGACGGTACC
Pediococcus GTTGGAGAAG AACGTGTGTG AGAGTAACTG CTCATGCAGT GACGGTATCC
Leuconosto GTATGGGAAG AACAGCTAGA ATAGGAAATG ATTTTAGTTT GACGGTAGCA
Lactobacil  GTTAAAGAAG AACACCTTTG AGAGTAACTG TTCAAGGTTT GACGGTATTT

      ....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      160         170         180         190         200
Oenococcus TTACCAGAAA GGGATGGGTA AATACGTGCC AGCAGCCGCG GTAATACGTA
Pediococcus AACCAGAAAG CCACGGCTAA CTACGTGCCA GCAGCCGCGG TAATACGTAG
Leuconosto TACCAGAAAG GGACGGCTAA ATACGTGCCA GCAGCCGCGG TAATACGTAT
Lactobacil  AACCAGAAAG CCACGGCTAA CTACGTGCCA GCAGCCGCGG TAATACGTAG

      ....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      210         220         230         240         250
Oenococcus TGTCCCGAGC GTTATCCGGA TTTATTGGGC GTAAGCGGAG CGCAGACGGT
Pediococcus GTGGCAAGCG TTATCCGGAT TTATTGGGCG TAAAGCGAGC GCAGGCCGTC
Leuconosto GTCCCGAGCG TTATCCGGAT TTATTGGGCG TAAAGCGAGC GCAGACGGTT
Lactobacil  GTGGCAAGCG TTGTCCGGAT TTATTGGGCG TAAAGCGAGC GCAGGCCGTT

      ....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      260         270         280         290         300
Oenococcus TTATTAAGTC TGATGTGAAA TCCCAGAGCC CAACCTCGGA ACTGCATTGG
Pediococcus TTTTAAGTCT AATGTGAAAG CCTTCGGCTT AACCGAAGAA GTGCATTGGA
Leuconosto TATTAAGTCT GATGTGAAAG CCCGGAGCTC AACTCCGGAA TGGCATTGGA
Lactobacil  TTTTAAGTCT GATGTGAAAG CCTTCGGCTT AACCGGAGAA GTGCATCGGA

      ....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      310         320         330         340         350
Oenococcus AAACCTGATT ACTTGAGTGC GATAGAGGCA AGTGGAACTC CATGTGTAGC
Pediococcus AAACGGAAAG CTTGAGTGCA GAAGAGGACA GTGGAACTCC ATGTGTAGCG
Leuconosto AAACGGTTAA CTTGAGTGCA GTAGAGGTAA GTGGAACTCC ATGTGTAGCG
Lactobacil  AAACGGGAGA CTTGAGTGCA GAAGAGGACA GTGGAACTCC ATGTGTAGCG

      ....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      360         370         380         390         400
Oenococcus GGTGAAATGC GTAGATATGT GGAAGAACAC CAGTGGCGAA AGCGGCTTGC
Pediococcus GTGAAATGCG TAGATATATG GAAGAACACC AGTGGCGAAG GCGGCTGTCT
Leuconosto GTGGAATGCG TAGATATATG GAAGAACACC AGTGGCGAAG GCGGCTTACT
Lactobacil  GTGGAATGCG TAGATATATG GAAGAACACC AGTGGCGAAG GCGGCTGTCT

      ....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      410         420         430         440         450
Oenococcus TAGATCGTAA CTGACGTTGA GGCTCGAAAG TATGGGTAGC AAACGGGATT
Pediococcus GGTCTGTAACT TGACGCTGAG GCTCGAAAGC ATGGGTAGCG AACAGSATT
Leuconosto GGACTGCAAC TGACGTTGAG GCTCGAAAGT GTGGGTAGCA AACAGSATT

```

```
Lactobacil  AGTCTGTAAC TGACGCTGAG GCTCGAAGC ATGGGTAGCG AACAGGATTA  
  
          ....|....| ....|..  
          460  
Oenococcus  AGATACCCCG GTAGTCC  
Pediococcus GATACCCTGG TAGTCC.  
Leuconoste  GATACCCTGG TAGTCC.  
Lactobacil  GATACCCTGG TAGTCC.
```


Capítulo 2

Efecto de la dosis de fosfato diamonio en los niveles de histamina y las poblaciones de bacterias durante la fermentación maloláctica

Effect of dosage of diammonium phosphate on histamine levels and bacterial populations during malolactic fermentation

Carolina Ilabaca, Carla Jara, Álvaro Peña-Neira, Jaime Romero

Artículo enviado a Annals of Microbiology (ANMI-D-15-01126)

Abstract

Diammonium phosphate (DPA) is used as a nutrient for yeast in wine making process. The aim of this study was to evaluate the effect of three doses of DPA (20, 40 and 80 mg/L) on histamine levels and bacterial populations during malolactic fermentation. Only the high dosis showed an important level of histamine (127 mg/L) and the associated bacteria corresponded to *Leuconostoc* and *Oenococcus*.

Keywords

Malolactic fermentation, *Oenococcus oeni*, histamine, biogenic amines, wine, Chile.

Biogenic amines (BA) are compounds of aliphatic or cyclic structure, they are formed mostly by bacterial decarboxylation of free amino acids and its presence is a typical indicator of spoilage of food and beverages (Suárez e Iñigo, 2004; Carrascosa et al, 2005). The main BA encountered in foods and beverages include histamine, tyramine, phenylalanine, putrescine and cadaverine. Histamine has been the most studied because it might produce important adverse effects, i.e. hypotension, hypertension, nausea, vomit, diarrhea, migraines (Garcia-Moruno & Muñoz, 2012). In the case of wine, these effects could be potentiated due to the concomitant intake of ethanol, which reduce the activity of enzymes responsible of biogenic amines metabolism (Moreno Arribas, 2007).

Biogenic amines content in wines depends on several factors but it is generally accepted that the biogenic amines formation is highly dependent on the nature of lactic acid bacteria responsible of malolactic fermentation (MLF) due to bacterial decarboxylase capacity (Lovaud-Funel, 2001). *Oenococcus oeni* has been reported as the dominant bacteria during MLF, therefore, it has been proposed as the responsible of histamine production in wine process (Ruiz et al, 2010, García-Moruno & Muñoz 2012).

Biogenic amines are derived from the nitrogen metabolism. The nitrogen compounds of must are essential for growth and development of yeasts during the wine alcoholic fermentation. The amino acids and ammonium are the main sources of nitrogen for *Saccharomyces cerevisiae* (Casalta et al, 2013). In this context, the content of nitrogen in musts may be limited in terms to support yeast growth and subsequently the alcoholic fermentation (AF). Therefore, adding diammonium phosphate to musts before AF is a common practice in wine making (Aleixandre, 1999). Addition of nitrogen (DPA) increases the concentration of free amino acids in wine (Bell y Henscke, 2005), and these could be

decarboxiled by bacteria producing biogenic amines; in the case of histamine, it is derived from histidine decarboxylase activity (Beneduce et al, 2010).

The aim of this study was to evaluate the effect of three doses of DPA (20, 40 and 80 mg/L) on histamine levels and bacterial populations during malolactic fermentation. To test this, healthy grapes from Carmemere were used for vinification. The content of nitrogen (yeast promptly assimilable nitrogen, YAN) in Carmenere is around 220mg/L (González. 2000), hence, 40mg/L of DPA was used as recommended dosis and 20 and 80 mg/L were experimental doses of DPA.

The obtained must was separated in stainless steel tanks (60L each). DPA (20, 40 and 80 mg/L) doses were added previous to fermentation. AF and MLF were carried out occurred spontaneously (no yeast or bacteria were inoculated). No antimicrobial treatment was used except for stopping AF by adding sulfur dioxide. For analytical and microbiological examination, samples were taken at three stages of MLF (beginning, middle, final) depending of the estimation of the presence of malic acid by layer chromatography (Bordeu & Scarpa, 1998). Histamine was quantified by high-performance liquid chromatography (HPLC) with fluorescence detection and 6 amino-quinolil-N-hidroxynimidil carbamat (AQC) derivatization as described by Hernandez Orte et al, 2006. Identification of bacterial populations present of each MLF stages was determined following the PCR-RFLP strategy described by Ilabaca et al, 2014.

The monitoring of histamine concentration during the MLF revealed no significant differences (13 mg/L aprox) among the three doses of DPA at the beginning and middle stages. A tendency towards increased levels of histamine was observed at the final stage of MLF for the lower DPA doses 20 and 40 mg/L, showing 21 y 27 mg/L of histamine, respectively. However, the histamine concentrations were notably high at 80 mg/L of DPA,

reaching 127mg/L, a 5-fold increase compared to lower doses of DPA (Fig 1). This observation is coincident with recent report by Smit et al (2014), showed that fertilization increases amino acid and biogenic amines concentrations in musts and wines. The histamine content in these spontaneous fermentations were notably higher than those recommended in customer guidelines from countries such as Germany (< 2mg/L) or Belgium (5mg/L) (Lehtonen, 1996). However, histamine contents in this study were coincident to levels previously reported in other European countries, averaging 26mg/L of histamine (Laitão et al, 2005, Marcobal et al, 2006). These data contrast to low levels of histamine (1,1 to 10,5 mg/L) reported by (Pineda et al, 2012) in varietal Carmenere produced in Chile. Nevertheless, those data corresponded to studies focused on bottled wine, instead of monitoring the wine making process. Furthermore, those studies showed no information about the associated bacterial populations in those wines.

It has been assumed or suggested that lactic acid bacteria (LAB) are involved in the production of biogenic amines, mainly, *Oenococcus oeni*, because is the dominant bacteria during middle and final stages of MLF (Carrascosa et al, 2005, Ruiz et al, 2010, Ilabaca et al 2014). In LAB the production of histamine is coded by histidine decarboxylase gene (*hdc*). The presence of this gene has been reported *Lactobacillus* and *Oenococcus* (Lucas et al 2005; Lucas et al, 2008). The monitoring of LAB in this study showed *Lactobacillus* in the middle and final stages of MLF of lower DPA doses; however, it was non-detected on the high doses of DPA 80mg/L (Fig 1). *Oenococcus* was observed in the final stage of MLF included the high DPA doses. Interestingly, the monitoring also showed that *Leuconostoc* was the most common LAB in the three doses of DPA (Figure S1). In contrast, *Pediococcus* was infrequently detected.

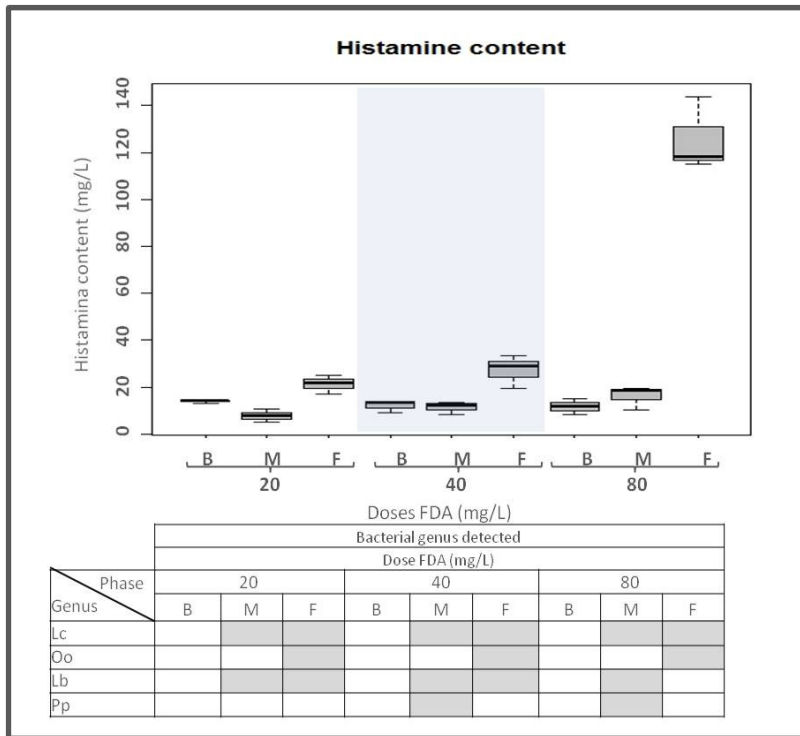


Figure 1. Representation of levels of histamine and lactic acid bacteria identified during MLF performed at different doses of DPA. Stages of MLF are described as beginning (B), middle (M) and final (F). LAB populations are described as *Leuconostoc* (Lc), *Oenococcus* (Oo), *Lactobacillus* (Lb) and *Pediococcus* (Pd).

Previous report has showed that in Chile most of the MLF are spontaneously performed (without starters) and the most dominant bacteria middle and final stages of MLF of cultivar Carmenere y Cabernet Sauvignon corresponded to *Oenococcus* (Ilabaca et al 2014). However, the examination of genome sequences of *Oenococcus oeni* strains isolated from Chilean valleys revealed the absence of histidine decarboxylase gene (Jara & Romero, 2015). Several studies of LAB in wine, especially *Oenococcus oeni*, have reported contradictory results about the ability of these bacteria to produce histamine. Some studies report decarboxylase activity in most of the tested isolates (Landete et al, 2005, Lopez et al,

2009), in contrast, other studies remark that this property is less frequent in strains retrieved from wineries (Beltramo et al, 2006; Ruiz et al, 2010). The absence of *hdc* in *Oenococcus oeni* strains isolated in Chile suggested that this LAB is not responsible for the generation of histamine in our study. However, it has been reported that some LAB may harbor plasmids encoding *hdc* (Lucas et al. 2005) and this plasmid may be lost when those isolates were sub-cultivated in complex media rich in nutrients. Furthermore, there are a number of studies reporting production of biogenic amines by species belonging to *Lactobacillus* and *Pediococcus* retrieved from wineries (Landete et al, 2005; Lucas et al, 2005). These studies generally that those bacteria have capacity of histamine production, but their decarboxylase activity rely on each strain and it is not a property of a species (Lonvaud-Funel, 2001). In our study, the presence of these genera was not associated to high levels of histamine. Interestingly, the ability of *Leuconostoc* to produce biogenic amines has not been well established.

This study remarks the importance the addition of nitrogen in terms of excessive supplementation can be detrimental for wine quality and safety, because of high levels of histamine can be obtained. Furthermore, the presence of *Oenococcus oeni* concomitant with the higher levels of histamine, suggest that these bacteria may have a role in the production of biogenic amines in MLF.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants FONDEF iDeA CA12I10123, FONDECYT 1121329 and Tecnovid-Innova (N°OTCTE02-09). Authors gratefully acknowledge the technical support of Mauricio Valdés.

References

- Aleixandre, J L (1999). Vinos y bebidas alcohólicas. Ed Univ. Politéc de Valencia. España.
- Bell SJ, Henschke PA (2005) Implications of nitrogen nutrition for grapes, fermentation and wine. *Aus J of grape and wine res*, 11(3) 242-295.
- 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. *Res in microb*, 157(3), 267-274
- Beneduce L, Romano A, Capozzi V, Lucas P, Barnavon L, Bach B, Spano G (2010). Biogenic amine in wines. *Ann of microb*, 60(4), 573-578.
- Bordeu E, Scarpa J (1998). Análisis químico del vino. Impresos Universitaria SA, Santiago, Chile.
- Carrascosa A, Muñoz R, González R (2005) *Microbiología del vino*, 1 edición. AMV, Ed. España
- Casalta E, Cervi MF, Salmon JM, Sablayrolles JM (2013) White wine fermentation: interaction of assimilable nitrogen and grape solids. *Aus J of grape and wine Res*, 19 (1), 47-52.
- Farias ME, Manca de Nadra MC, Rollan GC, Strasser de Saad AM (1993) Histidine decarboxylase activity in lactic acid bacteria from wine. *J Int des Sc de la vigne et du vin (France)*
- Garcia-Moruno E, Muñoz R (2012) Does *Oenococcus oeni* produce histamine? *Int J Food Microbiol* 157(2): 121- 129
- González A (2000) Nitrógeno fácilmente aprovechable para las levaduras. Dep de fruticultura y enología. Proyecto de título

Hernandez-Orte P, Peña-Gallego A, Ibarz MJ, Cacho J, Ferreira V (2006) Determination of the biogenic amines in musts and wines before and after malolactic fermentation using 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate as the derivatizing agent. *J of chrom A*, 1129: 160–164

Ilabaca C, Jara C, Romero J (2014) The rapid identification of lactic acid bacteria present in Chilean winemaking processes using culture-independent analysis. *Ann of Microbiol*, 64(4), 1857-1859.

Jara C, Romero J (2015) Genome sequences of three **Oenococcus oeni** strains isolated from Maipo Valley, Chile. *Genome Announ* 3(4):e00866-15

Landete JM, Ferrer S, Pardo I (2005) Which lactic acid bacteria are responsible for histamine production in wine? *J of Appl Microbiol* 99: 580–586

Lehtonen P (1996) Determination of Amines and Amino Acids in Wine- A review. *Am J Enol Vitc* 47 (2): 127-133

Leitao MC, Marques AP, San Romao MV (2005) A survey of biogenic amines in commercial Portuguese wines. *Food Control*, 16(3), 199-204

Lonvaud- Funel A (2001) Biogenic amines in wine: role of lactic acid bacteria. *Mini Review. FEMS Microb Lett* 199: 9-13

López I, Santamaría P, Tenorio C, Garijo P, Gutiérrez AR, López R (2009) Evaluation of lysozyme to control vinification process and histamine production in Rioja wines. *J Microbiol Biotechnol*, 19(9), 1005-1012

Lucas PM, Wolken WA, Claisse O, Lolkema JS, Lonvaud-Funel A (2005) Histamine-producing pathway encoded on an unstable plasmid in *Lactobacillus hilgardii* 0006. *App and Enviro Microb*, 71(3), 1417-1424.

Lucas PM, Claisse O, Lonvaud-Funel A (2008). High frequency of histamine-producing bacteria in the enological environment and instability of the histidine decarboxylase production phenotype. *Applied and Environ Microb*, 74(3), 811-817.

Marcobal A, De las Rivas B, Muñoz R (2006) Methods for the detection of bacteria producing biogenic amines on foods: a survey. *J für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit*, 1(3), 187-196

Moreno Arribas MV (2007) Control de la formación de aminas biógenas durante la elaboración y crianza del vino. *Int Symposium Microb and Food Safety of Wine “Microsafetywine” Vilafranca del Penedès, Spain. 20-21 Nov*

Pineda A, Carrasco J, Peña-Farfal C, Henríquez-Aedo K, Aranda M (2012) Preliminary evaluation of biogenic amines content in Chilean young varietal wines by HPLC *Food Control* 23: 251-257

Ruiz P, Izquierdo PM, Seseña S, Palop ML (2010). Selection of autochthonous *Oenococcus oeni* strains according to their oenological properties and vinification results. *Int J of Food Microb*, 137(2), 230-235.

Smit I, Pflieginger M, Binner A, Großmann M, Horst WJ, Löhnertz O (2014). Nitrogen fertilisation increases biogenic amines and amino acid concentrations in *Vitis vinifera* var. Riesling musts and wines. *J of the Scien of Food and Agric*, 94(10), 2064-2072.

Suárez JA, Iñigo B (2004) *Microbiología Enológica, Fundamentos de vinificación*. 3° ed. . Ed Mundi-Prensa. España

Supplementary material

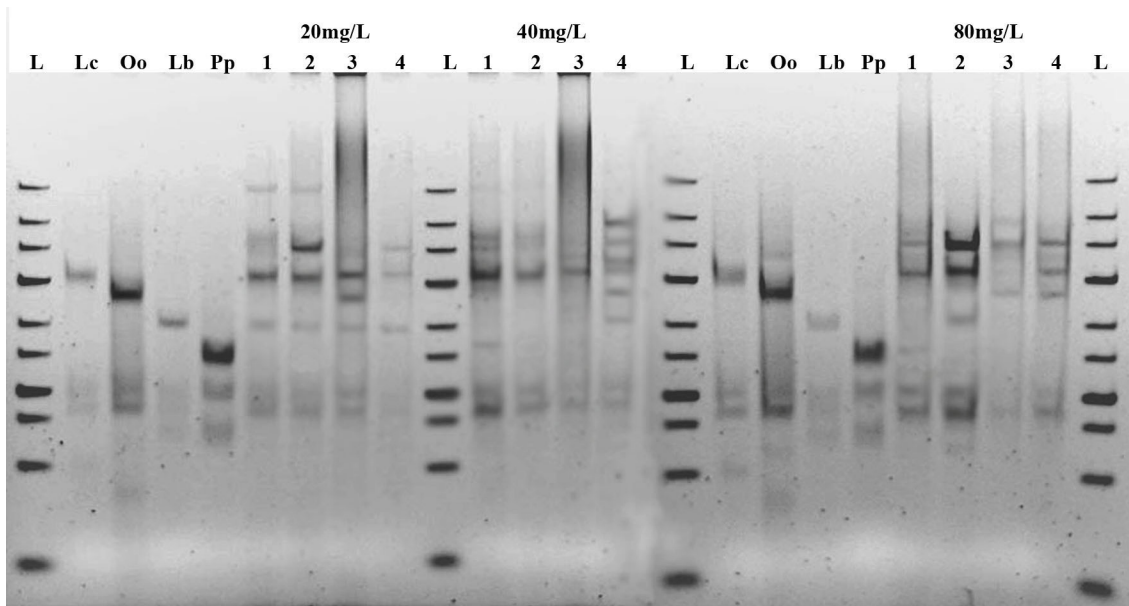


Fig. S1: Monitoring of bacterial populations during MLF. Lane description as follows, L: O'GeneRuler Low Range DNA Ladder; Lc: *Leuconostoc* reference strain; Oo: *Oenococcus* reference strain; Lb: *Lactobacillus* reference strain; Pp: *Pediococcus* reference strain. Sample lanes: 1 y 2: middle stages MLF; 3 y 4: final stages MLF; 20, 40 y 80mg/L: DPA dose supplementation

Capítulo 3

Aplicación de métodos moleculares en cultivos independientes para evaluar bacterias acéticas en el proceso de elaboración de vinagre

Application of culture independent molecular biology based methods to evaluate acetic acid bacteria diversity during vinegar processing

Carolina Ilabaca; Paola Navarrete; Pamela Mardones; Jaime Romero; Albert Mas

International Journal of Food Microbiology 126 (2008): 245-249

ABSTRACT

Acetic acid bacteria (AAB) are considered fastidious microorganisms because they are difficult to isolate and cultivate. Different molecular approaches were taken to detect AAB diversity, independently of their capacity to grow in culture media. Those methods were tested in samples originated during traditional vinegar production. Bacterial diversity was assessed by analysis of 16S rRNA gene, obtained by PCR amplifications of DNA extracted directly from the acetification container. Bacterial composition was analyzed by RFLP-PCR of 16S rRNA gene, Temporal Temperature Gradient Gel Electrophoresis (TTGE) separation of amplicons containing region V3-V5 of 16S rRNA gene and cloning of those amplicons. TTGE bands and clones were grouped based on their electrophoretic pattern similarity and sequenced to be compared with reference strains. The main microorganism identified in vinegar was *Acetobacter pasteurianus*, which at the end of the acetification process was considered to be the only microorganism present. The diversity was the highest at 2% acetic acid, where indefinite species of *Gluconacetobacter xylinus/europaeus/intermedius* were also present.

Keywords: Chilean vinegar, 16S rRNA gene, TTGE, Cloning

INTRODUCTION

Acetic acid bacteria (AAB) are the main microorganisms responsible for the elaboration of vinegar through the oxidation of ethanol into acetic acid by an obligatory aerobic metabolism with oxygen as the terminal electron acceptor (De Ley et al., 1984). They are also the main spoilage microorganisms in some food products, especially those that may contain ethanol or sugar. AAB species have traditionally been identified by testing physiological and homotaxonomic abilities (De Ley et al., 1984), but these methods are not completely reliable and are time consuming. These phenotypic properties have now been complemented or replaced by such molecular techniques as DNA and rRNA hybridization methods (Urakami et al., 1989), sequence analysis or various PCR methods (Ruiz et al., 2000, Treck and Teuber, 2002, Bartowsky et al., 2003, Treck, 2005, Gonzalez et al., 2005, 2006a, 2006b, Gullo et al., 2006, Prieto et al., 2007). It has to be emphasized that a greater diversity has been observed when some of these molecular techniques have been combined with culture-independent methods and used to study the whole bacterial community in complex natural habitats or ecosystems. Food ecosystems have been shown to be no exception to this diversity, and culture-independent analyses have been applied to wines, sausage, cheese, sourdough, and other foods, as reviewed by Fleet (1999) and Giraffa (2004). In the particular case of acetic acid bacteria, it has been reported that conventional plate counts were considerably lower than the optical counts of viable microbial cells from wines (Millet and Lonvaud-Funel, 2002) or industrial acetators (Mesa et al., 2003), indicating the possibility of viable but not culturable (VBNC) status. Some approaches to identify AAB by culture-independent methods have used systems that include quantitative PCR (González et al., 2006b) and Denaturing Gel Gradient Electrophoresis (DGGE) analysis in wines (Lopez et al., 2003), traditional rice vinegar (Haruta et al., 2006), Aceto Balsamico tradizionale (de Vero et al., 2006, De Vero and Giudici, 2008), or traditional fermented foods (Nielsen et al., 2007).

The aim of the present work was to analyze several systems for identifying AAB using different culture independent methods. These methods were applied to samples obtained from different acetification phases in traditional vinegar production in Chile. It should

be emphasized that while Chile has fully consolidated its position in the wine industry, no tradition or relevant production of Chilean vinegar exists and, thus, this marks the first attempt to characterize AAB in Chilean vinegar.

MATERIALS AND METHODS

Samples collection and processing

Mother of vinegar was generated by exposing Chilean wine to air in plastic trays whilst protected by cheese cloth. The vinegar mothers were maintained by addition of small quantities of wine. An appropriate mixture of wine and mother was adjusted to 14 g acetic acid l⁻¹ and 80 g ethanol l⁻¹. The mixtures were maintained at 32°C. Samples were taken for microbiological analysis at 20 (acetification start), 40 and 60 g acetic acid l⁻¹, when acetification was considered to have finished. Wine, mother and the mixture were also analyzed.

DNA Extraction and Purification

DNA from the acetification samples, the wine and the mixtures was obtained from homogenates by using a PowerSoil™ DNA Isolation Kit from MoBio following the manufacturer's instructions. For reference strains, 1 ml of an overnight bacterial culture was centrifuged and the DNA of the pelleted cells was extracted using the Genomic DNA Purification kit from Promega (Madison, WI, USA).

PCR Amplification and Analysis of the Products by RFLP and TTGE

The almost complete 16S rRNA gene was amplified as described by Romero et al. (2002) and amplicons were analyzed by gel electrophoresis as described by Espejo and Escanilla (1993). To obtain profiles of different samples PCR amplification of V3-V5 region of 16S rRNA gene was carried out as described Magne et al. (2006) using directly extracted DNA. Temporal temperature gradient electrophoresis (TTGE) was performed as described by Romero and Navarrete (2006). Restriction fragment length

polymorphism (RFLP) was performed to analysis of amplicons of the 16S rRNA gene or eluted TTGE bands using *AluI* and *TaqI* or *HaeIII* as described by Romero and Navarrete (2006).

Cloning

Amplicons were cloned using TOPO TA cloning kit according to the manufacturer's protocol (Invitrogene). Plasmids containing an insert were digested with *AluI* for separation of the different clones.

Sequence analysis

The intense bands and some weak bands in each TTGE pattern and were excised from the gel and eluted (see Fig 3). Intense bands could represent the most abundant or dominant bacterial population in the sample, so we called dominant bands. The 16S rRNA gene amplicons from the reamplified bands or from cloning library were sequenced as described Romero and Navarrete (2006). Sequences were deposited in GenBank (EU077240- EU077262) and analyzed in Ribosomal Database Project II Web site (Cole et al., 2007). Phylogenetic analysis was performed using the TREECON program with neighbor-joining method (vandePeer and DeWachter 1997) as described (Romero and Navarrete 2006).

Bacterial Counts and Cultivation

Total bacterial counts present in vinegar were performed by light microscopy using a Petroff Hausser counting chamber. Triplicate samples of vinegar were plated using an automatic spiral plater in GYC solid medium (De Ley et al., 1984). Colonies were counted after 3 days.

RESULTS AND DISCUSSION

Bacterial enumeration

The starting of the acetification process was considered when the mixture of wine and vinegar reached 20 g acetic acid l⁻¹ and was analysed to a concentration of 60 g acetic acid l⁻¹. The bacterial enumeration under the microscope gave values ranging from 1.3 to 1.8 x 10⁸ cells ml⁻¹ in the main production phase (20-40 g acetic acid l⁻¹) to 8 x 10⁷ cells ml⁻¹ at the end. However the number of colonies recovered after plating was much smaller, ranging from 2 – 4 x 10⁵ ufc ml⁻¹. Thus, a significant reduction of recovery was found in plating, similar to that reported by others (Mesa et al, 2005). The reason could be related to an inappropriate culture medium, VBNC status (Millet and Lonvaud Funel, 2002), or the agglomeration of cells and the difficulty in isolating or separating them to form single-cell colonies. In fact, a combination of the three factors may explain the final result. The culture medium is a generic, rich medium where normally many bacteria are able to grow and it is a recommended medium for AAB isolation (de Ley et al, 1984). Although several good media have been proposed for AAB cultivation (Entani et al., 1985, Sievers et al., 1992, Sokollek et al., 1998), there are still recovery limitations. The VBNC status might be a real possibility given that observation under the microscope reveals on the one hand the absence of growth, and on the other the survival of AAB in the vinegar medium due to the acetic acid concentration. Surviving cells may not be able to grow as they need to form colonies. Finally, it is evident that AAB form cell groupings of variable numbers which, in the case of forming a colony, may come from as bunch of AAB cells instead of as a single cell. Vigorous shaking or treatments with cellulases or similar glucanases did not improve the recovery in solid medium (results not shown).

Analysis of RFLP-PCR 16S rRNA gene Profiles

Amplicons including almost the entire 16S rRNA gene were obtained after DNA extraction and PCR amplification from vinegar and wine samples, digested with

AluI and *TaqI* and compared with profiles derived from reference strains including

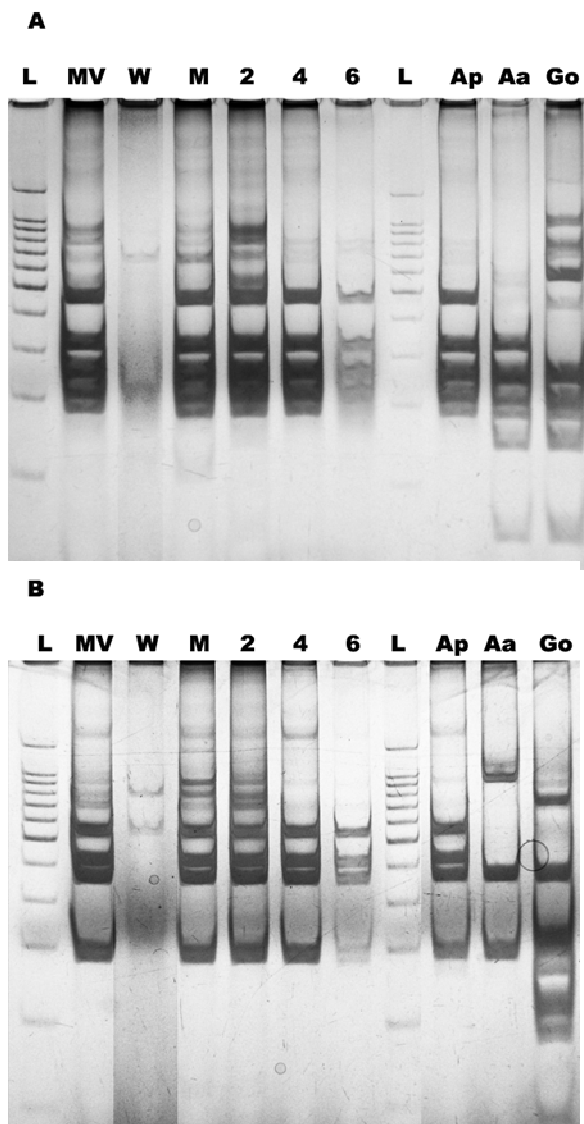


Figure 1: Electrophoretic profiles of the RFLP-PCR of 16S rDNA of the different samples. Lanes: MV vinegar mother, W wine, M mix of wine and vinegar mother, 2, 4, 6 acetification samples containing 20, 40 and 60 g acetic acid l-1, L Ladder 100bp Invitrogen, Ap *A. pasteurianus*, Aa *A. aceti*, Go *G. oxydans*. A: Digested with *AluI*, B: Digested with *TaqI*.

Acetobacter pasteurianus, *Acetobacter aceti*, *Gluconobacter oxydans*(Fig.1). The results of the RFLP analysis of the 16S rRNA gene AAB type strains were very similar to those reported by Ruiz et al. (2000) and Gonzalez et al. (2006a) also using 16S rRNA gene amplicons. The RFLP profiles from the vinegar mother and the early

vinegar samples showed a mixture of bands that can indicate the coexistence of different microorganisms. However, as the acidity increases in the vinegar process, the number of bands reduces progressively to find a single profile at 60g acetic acid l⁻¹, which is identical to that of *Acetobacter pasteurianus* type strain. These electrophoretic bands were observed in all the vinegar or acetification samples. However, in the wine samples faint and limited bands were found, indicating a very low microbial population. It is evident that this technique is very limited when used with mixed cultures where more than two species are present, yet it might be resolute when applied to single species cultures.

Analysis of TTGE Profiles

The amplicons, including V3-V5 regions of 16S rRNA gene from vinegar and wine samples, were also separated using TTGE (Figure 2). The observed profiles showed in general one dominant band as well as the presence of some other minor bands. The main dominant band showed the same migration both in mother vinegar and the rest of the vinegar samples. This band was only absent in the starting wine. After elution and sequencing, the main band of all the vinegar samples could be grouped within *Acetobacter pasteurianus* with an identity range from 99.2 to 100%. Other weak bands migrating near to this dominant band were identified as *Acetobacter sp.*, and could correspond to heteroduplexes formed in the last cycle of the PCR amplification (Espejo et al., 1998). A faint band containing greater electrophoretic migration (higher %GC) was observed only in the 20 g acetic acid l⁻¹ sample. After sequencing this band was associated with a group which had, along with strains from *Gluconacetobacter xylinus/europaeus/intermedius* species, 99.5% homology. In the wine sample, a unique and dominant band was also observed and was identified as *Pediococcus spp.* With 100% identity. The *Pediococcus spp.* band was also detected in the mixture of wine and vinegar mother. The presence of *Acetobacter pasteurianus* and *Gluconacetobacter xylinus* in vinegar produced by traditional methods has been previously reported by Gullo et al. (2006). These authors, however, found more *Gluconacetobacter xylinus* colonies growing on a solid medium. On similar samples and using DGGE, De Vero et al. (2006) identified a

main microorganism that was identified as belonging to the *A. pasteurianus/A. aceti* group. On the other hand, *Pediococcus spp.* is regularly present in wine, being one of the most frequent Lactic Acid Bacteria in wines (Ribereau Gayon et al., 2002)

Analysis of 16S rRNA gene cloning

One way to avoid culturing, whilst being able to enumerate the individuals of the different species, is to clone the sample DNA into competent microorganisms by means of incorporating it into a plasmid and cloning it in a microorganism which is easier to cultivate. The cloning was done using the microbiologically more complex vinegar sample (20 g acetic acid l⁻¹) and thus more than 100 clones were obtained. Of these, 60 clones with the insert were analysed by RFLP with *AluI*. Three different groups were set according those patterns; the most abundant group was represented by 53 clones and showed the same restriction pattern as the main TTGE band. The sequencing of eleven of these clones allowed us to identify them as *Acetobacter pasteurianus*, which agreed with the results seen in both RFLP-PCR 16S rRNA gene and TTGE. The second group was represented by 6 clones and clustered with *Gluconacetobacter xylinus/europaeus/intermedius*. It is well known that these species have very limited variation in their 16S rRNA gene and the grouping methods based on the variability of this sequence are not able to discriminate them properly (Ruiz et al, 2000, Gonzalez et al, 2006a, De Vero et al, 2007). Finally, one clone was grouped with a *Gluconacetobacter* – like microorganism.

Phylogenetic analysis of bacterial populations obtained by TTGE and cloning

We compared partial 16S rRNA gene sequences of approximately 370 bases obtained from bands detected in TTGE (bands V2,V4,V6 Figure 2) and 16S rRNA gene clones with sequences available in the RDP II database (Table 1, Figure 4). Our results indicated that all the microorganisms represented by the main bands in all the vinegar samples were AAB. The main species found were *Acetobacter pasteurianus*, as seen in the three methods used. Using the sequences available in the RDP II database, the strains considered as *Acetobacter pasteurianus* showed differences of up to 1,4% in their 355

bp 16S rRNA gene sequences with respect to other *Acetobacter pasteurianus* strains. The other cluster observed was *Gluconacetobacter* genus. Due to the sequence similarity, several related species described in vinegars were included, such as *Gluconacetobacter xylinus*, *Gluconacetobacter europaeus* and *Gluconacetobacter intermedius*. After comparison the differences among these sequences were less than 1% (Table 1). The exact species could not be defined because of the limited variation in the sequenced region within the genus *Gluconacetobacter*. However, it can be seen that the sequence variability is higher than in the database strains and, thus, the possibility of different *Gluconacetobacter* species cannot be ruled out. Overall the results suggest the presence of a diversity of strains in the vinegar samples, with *Acetobacter pasteurianus* probably

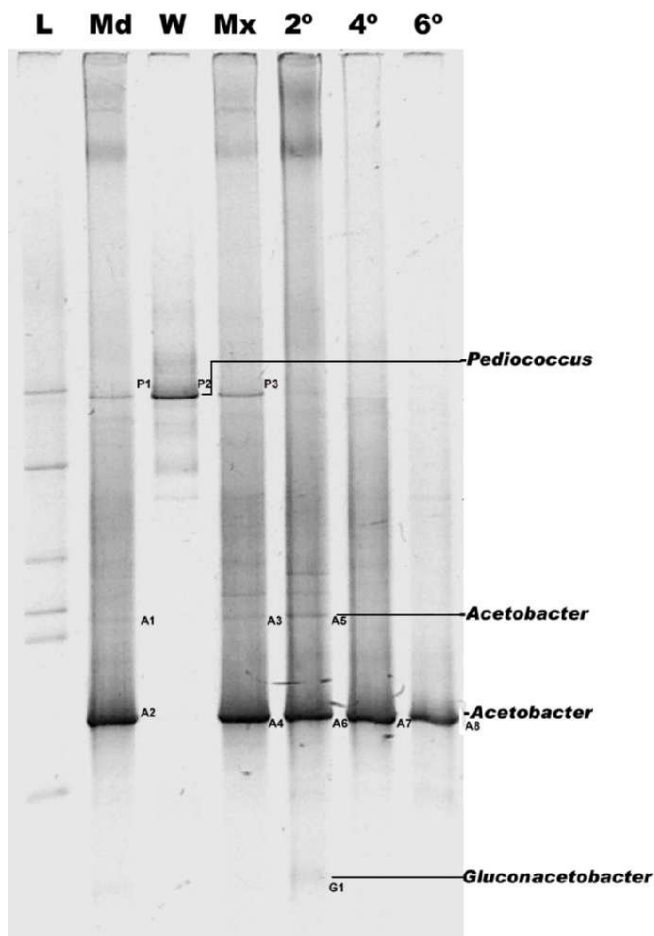


Figure 2: TTGE Electrophoretic profile of the different samples. Lanes: MV vinegar mother, W wine, M mix of wine and vinegar mother, 2, 4, 6 acetification samples containing 20, 40 and 60 g acetic acid l-1, L ladder with different GC %. Bands elute and sequenced were marked.

being the better adapted species as it is able to survive in a more acidic environment.

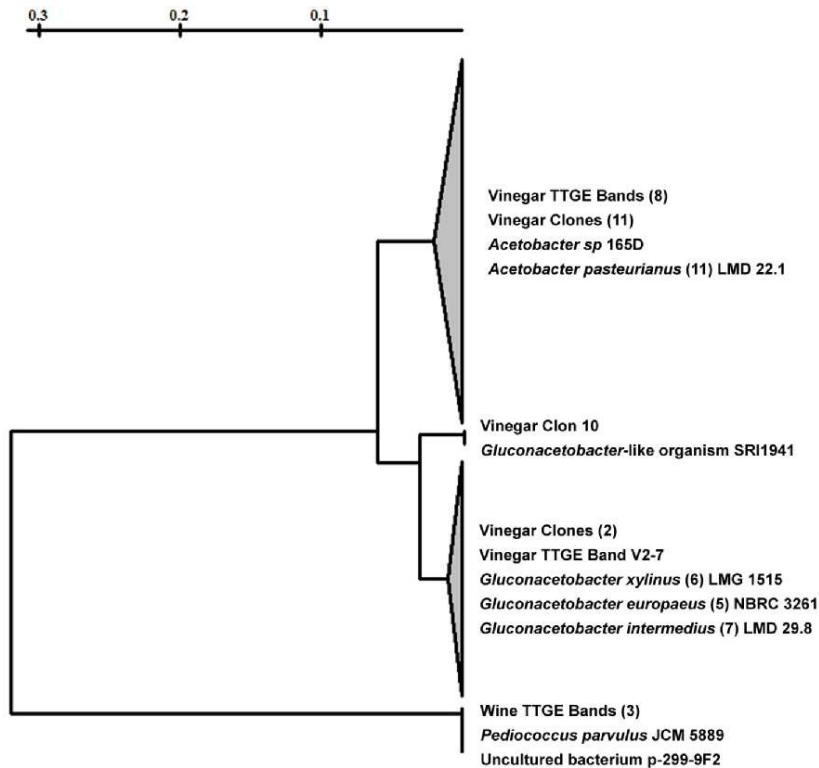


Figure 3: Neighbor-joining phylogenetic tree showing the relationship between sequences retrieved from the TTGE profiles, clones and their closest relative sequences deposited in the RDP II. The tree was based on the 341–907 region of the 16S rDNA genes. Distance matrices were constructed from the aligned sequences and corrected for multiple base changes at single nucleotide positions by the method of Jukes and Cantor using Treecon.

This study shows that using rapid molecular methods for identifying AAB species still yields inconclusive identification. Thus, some more work has to be done in order to have a reliable, quick and easy-to-use method. However, a clear advantage of these molecular quick methods is that they allow groupings of different microorganisms into definite clusters where representative individuals can be chosen for further analysis using more reliable and complete methods (16S rRNA gene sequencing), and thus they can be identified definitely. Several culture-independent methods can be used yielding very similar results, as seen in the present study. TTGE allows a quick insight into overall and rough diversity, while cloning allows enumeration of different species and observation of fine molecular diversity. Thus,

both methods complement each other in offering a view of quantitative microbial diversity. Finally, the present paper analyzes for first time the presence of AAB in Chilean vinegars, and it is evident that the main species producing vinegar are the same as those previously described in other countries, that is *Acetobacte pasteurianus* and members of the *Gluconacetobacter xylinus/europaeus/intermedius* cluster.

Acknowledgements:

This work is the result of joint collaboration agreements funded by AECI travel bursaries and grant number AGL2004-07494-C02-02/ALI from the government of Spain and partially by FONDECYT 1061121 from Chile. The authors thank the Language Service of the Rovira i Virgili University for revising the manuscript

References:

Bartowsky, E.J., Xia, D., Gibson, R.L., Fleet, G.H., Henschke, P.A., 2003. Spoilage of bottled red wine by acetic acid bacteria. *Letters in Applied Microbiology* 36, 307-314.

Cole, J.R., Chai, B., Farris, R.J. Wang, Q., Kulam-Syed-Mohideen, A. S., McGarrell, D. M., Bandela, A.M., Cardenas, E., Garrity, G.M., Tiedje. J.M., 2007. The ribosomal database project (RDP-II): introducing myRDP space and quality controlled public data. *Nucleic Acids Research* 35, D169-D172.

De Ley, J., Gillis, M., Swings, J., 1984. Family VI. *Acetobacteraceae*. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 1. Williams & Wilkins, Baltimore. 267- 278.

De Vero, L., Gala, E., Gullo, M., Solieri, L., Landi, S., Giudici, P., 2006. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) analysis to evaluate acetic acid bacteria in traditional balsamic vinegar. *Food Microbiology* 23, 809-813.

De Vero, L., Giudici, P., 2008. Genus-specific profile of acetic acid bacteria by 16S Rna gene PCR-DGGE, *International Journal of Food Microbiology* doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2007.02.029

Entani, E., Ohmori, S., Masai, H., Suzuki, K., 1985. *Acetobacter polyoxogenes* sp. nov., a new species of an acetic acid bacterium useful for producing vinegar with high acidity. *Journal of General and Applied Microbiology* 31, 475-490.

Espejo, R. T., Feijoo, C. G., Romero, J., Vasquez M., 1998. PAGE analysis of the heteroduplexes formed between PCR-amplified 16S rRNA genes: estimation of sequence similarity and rRNA gene complexity. *Microbiology* 144:1611-1617.

Espejo, R.T., Escanilla, D., 1993. Detection of HIV1 DNA by a simple procedure of polymerase chain reaction, using primer-dimer formation as an internal control of amplification. *Research in Virology* 144, 243-46.

- Fleet, G. H. 1999. Microorganisms in food ecosystems. *International Journal of Food Microbiology* 50, 101-117.
- Giraffa, G. 2004. Studying the dynamics of microbial populations during food fermentation. *FEMS Microbiology Reviews* 28, 251-260.
- Gonzalez, A., Hierro, N., Poblet, M., Rozes, N., Mas, A., Guillamon, J.M., 2005. Application of molecular methods to demonstrate species and strain evolution of acetic acid bacteria population during a wine production. *International Journal of Food Microbiology* 102, 295-304.
- Gonzalez, A., Guillamon, J.M., Mas, A., Poblet, M., 2006a. Application of molecular methods for routine identification of acetic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology* 108, 141-146.
- Gonzalez, A., Hierro, N., Poblet, M., Mas, A., Guillamon, J.M., 2006b. Enumeration and detection of acetic acid bacteria by real-time and nested polymerase chain reactions. *FEMS Microbiology Letters* 254, 123-128.
- Gullo, M., Caggia, C., De Vero, L., Giudici, P., 2006. Characterisation of acetic acid bacteria in “traditional balsamic Vinegar”. *International Journal of Food Microbiology* 106, 209-212.
- Haruta, S., Ueno, S., Egawa, I., Hashiguchi, K., Fujii, A., Nagano, M., Ishii, M., Igarashi, Y., 2006. Succession of bacterial and fungal communities during a traditional pot fermentation of rice vinegar assessed by PCR-mediated denaturing gradient gel electrophoresis. *International Journal of Food Microbiology* 109, 79-89.
- Lopez, I., Ruiz-Larrea, F., Cocolin, L., Orr, E., Phister, T., Marshall, M., VanderGheynst, J., Mills, D.A., 2003. Design and evaluation of PCR primers for analysis of bacterial populations in wine by denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 6801-6807.
- Magne, F., Hachelaf, W., Suau, A., Boudraa, G., Mangin, I., Touhami, M., Bouziane- Nedjadi, K., Pochart, P. 2006. A longitudinal study of infant faecal

microbiota during weaning. *FEMS Microbiology Ecology* 58, 563-571.

Mesa M.M., Macias M., Cantero D., Barja F. 2003. Use of the direct epifluorescent filter technique for the enumeration of viable and total acetic acid bacteria from vinegar fermentation. *Journal of Fluorescence* 13, 261-265.

Millet, V., Lonvaud-Funel, A., 2000. The viable but non-culturable state of wine microorganisms during storage. *Letters in Applied Microbiology* 30, 126-141.

Nielsen, D.S., Teniola, O.D., Ban-Koffi, L., Owusu, M., Andersson, T.S., Holzapfel W.H., 2007. The microbiology of Ghanaian cocoa fermentations analysed using culture- dependent and culture-independent methods. *International Journal of Food Microbiology* 114, 168-186.

Prieto, C., Jara, C., Mas, A., Romero, J., 2007. Application of molecular methods for analysing the distribution and diversity of acetic acid bacteria in Chilean vineyards. *International Journal of Food Microbiology* 115, 348-355, 2007

Ribereau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B., Lonvaud-Funel, A., 2000. *Handbook of Enology, vol. 1. The Microbiology of Wine and Vinifications*. Wiley & Sons Ltd: West Sussex, England

Romero, J., Navarrete, P., 2006. 16S rDNA-based analysis of dominant bacterial populations associated with early life stages of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Microbial Ecology* 51, 422-430.

Romero, J., Gonzalez, N., Espejo, R.T., 2002. Marine *Pseudoalteromonas sp* composes most of the bacterial population developed in oysters (*Tiostrea chilensis*) spoiled during storage. *Journal of Food Science* 67, 2300-2303.

Ruiz, A., Poblet, M., Mas, A., Guillamon, J.M. 2000. Identification of acetic acid bacteria by RFLP of PCR-amplified 16S rRNA gene and 16S-23S rRNA gene intergenic spacer. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50, 1981-1987.

Sievers, M., Sellmer, S., Teuber, M., 1992. *Acetobacter europaeus* sp-nov a main component of industrial vinegar fermenters in Central-Europe. *Systematic and Applied Microbiology* 15, 386-392.

Sokollek, S.J., Hertel, C., Hammes, W.P. 1998. Cultivation and preservation of vinegar bacteria. *Journal of Biotechnology* 60, 195-206.

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

Trcek, J., Teuber, M., 2002. Genetic restriction analysis of the 16S-23S rRNA gene internal transcribed spacer regions of the acetic acid bacteria. *FEMS Microbiology Letters* 19, 69-75.

Urakami, T., Tamaoka, J., Suzuki, K., Komagat, K., 1989. *Acidomonas* gen. nov., incorporating *Acetobacter methanolicus* as *Acidomonas methanolica* comb. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 39, 50-55.

Van de Peer, Y., De Wachter, R., 1997. Construction of evolutionary distance trees with TREECON for Windows: accounting for variation in nucleotide substitution rate among sites. *Computer Applications in the Biosciences* 13, 227-230

Supplementary material

Table1. Sequence variability in the sequenced bands and clones.

	Sequence Variability % 16S fragment 355	Nº sequences compared
<i>Acetobacter pasteurianus</i>		
Clones	0-1.4	11
Bands	0-0.8	8
Reference sequences RDPII <i>A. pasteurianus</i> (LMD 22.1, IFO 13755, CICCHLJ Q40, CICCHLJ Q61, LMG 1633, LMG 1629, MHM 10-1, OR56-1, A74, CWBI/B-419, NCI 1193).	0-1.7	11
<i>Gluconacetobacter</i> cluster		
Clones	0.9	2
Bands	NA	1
Reference sequences RDPII <i>Ga. xylinus</i> (BPR2001, LMG1515, JCM 10150, JCM 7644, JCM 9730, NBRC 15237).	0-0.6	6
<i>Gluconacetobacter</i> sp.		
Clones	NA	1

NA: Not applicable

Discusión

General

Los microorganismos son responsables de las transformaciones que ocurren en el mosto y vino, son capaces de transformar distintos sustratos presentes en estos y generar un producto diferente, como pueden ser el vino y el vinagre, con cualidades que pueden variar dependiendo de cuál es el microorganismo que actúa durante dichas transformaciones. Con el fin de obtener un producto con cualidades distintivas, se hace de vital importancia conocer que microorganismos están actuando en los procesos biotecnológicos de elaboración, para así dirigir dichos procesos y obtener como resultado un producto de calidad y que mantenga las características a través del tiempo.

Es sabido que la fermentación maloláctica (FML), desarrollada principalmente por las bacterias lácticas (BL), es un proceso muchas veces deseado en la elaboración de vinos, pero sus resultados pueden ser completamente negativos, afectando su calidad (Costantini et al, 2009). Así, podemos obtener vinos con color reducido, con reducción de aromas varietales, con un aumento de la acidez volátil, con una aparición de olores y sabores anómalos y la no deseada aparición del carbamato de etilo y las aminas biógenas, pudiendo estos últimos dos afectar la seguridad alimentaria y por lo tanto afectar la salud humana (Suárez e Iñigo, 2004). Por lo tanto es de vital importancia conocer y poder controlar a tiempo la población bacteriana presente en la FML, ya que cambios inesperados en los microorganismos o un desbalance en las poblaciones microbianas pueden traducirse en importantes alteraciones en los vinos

Por otra parte la acetificación, realizada principalmente por las bacterias acéticas (BA), es un proceso no deseado en el vino, pero buscado en la elaboración de vinagres. En Chile, si bien la industria del vino está absolutamente consolidada, la industria de elaboración de vinagre es casi nula, por lo que la identificación de las BA que están realizando el proceso a nivel nacional, marca un importante precedente.

El objetivo de este estudio fue identificar la microbiota bacteriana relacionada con los procesos enológicos, ya sea las bacterias relacionadas con la FML (BL) o las relacionadas con la acetificación o la elaboración de vinagres (BA).

Existen diversos trabajos que caracterizan e identifican las BL, no solo las presentes en el vino, sino también en distintos ambientes como leche, yogurt, encurtidos, etc. En estos estudios se plantea la identificación de estas bacterias, basándose la mayoría en el análisis de una zona específica del DNA, ya sea para distintos géneros, (Rodas et al, 2003) como para una especie específica (Reguant y Bordons, 2003). Los métodos planteados en estas investigaciones, se basan principalmente en el análisis de aislados provenientes desde muestra vínicas, lo que retrasa el proceso de identificación, ya que estas bacterias crecen lentamente en medios artificiales (> 5 días) y tienen una baja cultivabilidad (Amann et al, 1995; Hugenholtz et al, 1998). Por lo tanto, estos métodos no son adecuados para el control práctico de bacterias durante la vinificación industrial, ya que no se puede tener una imagen precisa de la dinámica de BL durante la FML, esto entorpece la toma de decisiones para el control de algún cambio en la microbiota láctica.

La estrategia de identificación de BL diseñada en esta investigación, constituye una herramienta rápida, fácil de implementar, confiable e informativa. Es una técnica independiente de cultivo, por lo que se puede tener una visión general de lo que pasa con las BL en una FML, ya sea ésta espontánea o inoculada. El método de identificación se basó en la amplificación de una zona del 16S rADN, de alrededor de 500bp, y su posterior análisis de restricción con 2 endonucleasas (PCR-RFLP). Los patrones de restricción generados, hacen posible la identificación de *Oenococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus* y *Leuconostoc* en forma independiente o conjunta dentro de una misma muestra. Esta técnica requiere un equipamiento sencillo y además proporciona resultados rápidos, identificando los 4 géneros de BL descritos como presentes durante cualquier FML. Si bien existen otros métodos, también independientes de cultivo para la identificación de BL, como es el DGGE (por sus siglas en inglés Denaturing Gradient Gel Electrophoresis), este método es difícil de utilizar de forma rutinaria debido a que el logro de la reproducibilidad de las gradientes usadas en DGGE, requiere un equipo relativamente sofisticado y personal capacitado (Renouf et al, 2006; Spano et al, 2007).

Ya se ha discutido que la presencia de ciertas especies de BL durante la FML, pueden ser perjudiciales para el desarrollo del proceso, ya sea porque entregan características sensoriales negativas como la disminución de color o de aromas varietales (Costantini et al,

2009; Abrahamse y Bartowsky, 2012; Coatelo et al, 2012) o porque generan sustancias que afectan la seguridad alimentaria y por lo tanto la salud de los consumidores (Ancin-Azpilicueta et al, 2008; Coton et al, 2010). En este último punto, se encuentran las aminas biógenas (AB), y la más buscada dentro de ellas, por su toxicidad, es la histamina.

Las AB son compuestos orgánicos dotados de actividad biológica, alifáticas o cíclicas, que provienen de la descarboxilación de aminoácidos. La histamina se genera a partir de la descarboxilación de histidina mediante el gen histidina descarboxilasa (*hdc*) (Beneduce et al, 2010). Estas derivan del metabolismo del nitrógeno ya que al ser este metabolizado se liberan más aminoácidos al medio y por lo tanto existiría una mayor producción de AB. Los compuestos de nitrógenados en el mosto son esenciales para el crecimiento y el desarrollo de las levaduras durante la fermentación alcohólica (FA) del vino. Los aminoácidos y amonio son las principales fuentes de nitrógeno para *Saccharomyces cerevisiae* (Casalta et al, 2013). En este contexto, que el contenido de nitrógeno en los mostos puede estar limitando el crecimiento de la levadura y posteriormente, el desarrollo de la FA. Por lo tanto, la adición de fosfato diamónico (FDA) en mostos antes de la FA es una práctica común en la elaboración del vino (Aleixandre, 1999). La adición de FDA y por lo tanto de compuestos nitrogenados, aumenta la concentración de aminoácidos libres en el vino (Bell y Henscke, 2005), y estos podrían ser descarboxilados por bacterias productoras de AB.

Si bien la histamina se encuentra en diferentes productos fermentados, su presencia en vinos cobra importancia ya que en presencia de etanol la acción tóxica se potencia. La histamina se metaboliza en el hígado y el intestino por la acción de dos complejos enzimáticos, la monoamino oxidasa (MAO) y diamina oxidasa (DAO). El etanol, compuesto que se encuentra en el vino, es inhibidor de la MAO y DAO, en consecuencia, aumentan el efecto tóxico de esta amina (Ancin-Azpilicueta et al, 2008).

En esta investigación se analizó el efecto en la producción de histaminas con la aplicación de dosis diferentes de FDA a mostos del cultivar Carmenere y además se utilizó la técnica PCR-RFLP desarrollada inicialmente, para identificar la población de BL presentes durante las microvinificaciones espontáneas. Las aplicaciones de FDA generaron concentraciones de histamina muy superiores a los niveles recomendados en países como Alemania (<2 mg/L) o Bélgica (5 mg / L) (Lehtonen, 1996), alcanzando para las dosis baja y recomendada

niveles promedio cercanos a los 21 y 27mg/L respectivamente. Estas concentraciones ya habían sido reportadas en investigaciones en países europeos donde los niveles de histamina alcanzados promediaron los 26mg/L (Laitão et al, 2005, Marcobal et al, 2006). La dosis superior de FDA alcanzó concentraciones muy altas, llegando a 127mg/L, esto fue casi 5 veces el nivel encontrado en las otras dosis. Esto coincidiría con el reciente informe de Smit et al (2014), en donde se demostró que la fertilización nitrogenada aumenta la concentración de aminoácidos y de aminos biógenas en mostos y vinos. O como la revisión de Bell y Henschke (2005), en donde se reporta que mostos con altos contenidos de nitrógeno, presentan un aumento en el contenido de histaminas, por lo tanto existe una disminución de la calidad del vino.

Por otro lado, las BL encontradas en estas FML espontáneas, fueron principalmente las del género *Leuconostoc* y *Oenococcus* y particularmente esta última se encontró asociada a las etapas finales de estas FML. Esto concuerda con lo reportado por nuestro grupo de investigación el año 2014, analizando FML espontáneas realizadas en Chile, se encontró que *Oenococcus* está presente en las etapas medias y finales de la FML en vinos del cultivar Carmenere y Cabernet sauvignon (Ilabaca et al 2014). *Oenococcus oeni* ha sido la BL mas culpada de generar histamina, ya que es la especie más abundante durante las etapas medias y finales de la FML (Carrascosa et al, 2005, Ruiz et al, 2010)

Varios estudios de BL de vino y especialmente de *Oenococcus oeni*, han generado resultados contradictorios con respecto a su capacidad de producción de histamina, mientras unos determinan que han encontrado la actividad descarboxilasa en una alta proporción en cepas vínicas (Coton et al, 1998; Guerrini et al, 2002, Landete et al, 2005, Lopez et al, 2009) otros dicen que esta característica es muy poco frecuente en estas cepas (Moreno Arribas et al, 2003; Beltramo et al, 2006; Ruiz et al, 2010). Al revisar genomas de *Oenococcus oeni* autóctonos de Chile, obtenidos desde FML espontáneas (Jara y Romero, 2015), no se encontró la presencia del gen *hdc* en los aislados chilenos. La ausencia del gen *hdc* en cepas de *Oenococcus oeni* aisladas en Chile sugiere que esta BL no es responsable de la generación de la histamina en nuestro estudio. Sin embargo, se ha informado que algunas BL pueden presentar el plásmido que codifican para el gen *hdc* (Lucas et al. 2005)

y este plásmido puede perderse cuando los aislados fueron sub-cultivados en medio complejo rico en nutrientes.

Por otro lado, las BA, son las responsables de la elaboración del vinagre, por acetificación del etanol a ácido acético por su metabolismo aerobio obligatorio con el oxígeno como aceptor final de electrones (De Ley et al., 1984). Ellas también son el principal microorganismo en algunos productos alimenticios, especialmente en los que pueden contener etanol o azúcar. El vinagre ha sido usado por siglos como un sazón (aliño) y como agente preservante. El uso de determinados vinagres se ha ampliado para incluir su consideración como un alimento sano, rico en aminoácidos, vitaminas y polifenoles; y el vinagre ha sido incluso considerado como una potencial medicina (Adams, 1985). El vinagre de vino es el principal producto en países con tradición enológica como es el vinagre balsámico en Italia o el vinagre de Jerez en España. Chile no tiene tradición en la elaboración de vinagres, por lo que este estudio marcó un importante avance en la caracterización de las BA presentes en una elaboración de vinagre de vino tradicional.

Los recuentos bacterianos obtenidos desde el medio de cultivo GYC, fueron significativamente menores a los obtenidos por recuento en microscopio, en cámara de Petroff-Hausser, disminuyendo alrededor de 3 órdenes de magnitud, resultado similar a lo reportado en otros estudios (Mesa et al, 2005, Vegas et al 2010). La razón podría relacionarse a un inapropiado medio de cultivo, estado VPNC (Mollet y Lonvaud-Funel, 2002), o la aglomeración de células y su dificultad de aislarlas o separarlas para originar una colonia de una célula. De hecho, una combinación de los tres factores puede explicar el resultado final.

Para mejorar la caracterización de las BA presentes en la elaboración del vinagre, se realizaron pruebas independientes de cultivo, obteniéndose muestras desde el vino, la madre del vinagre, la mezcla de ambas y desde distintos puntos de acetificación. Al realizar el PCR-RFLP de las muestras se comparó los perfiles de restricción obtenidos con perfiles de cepas de referencia que incluyeron a *Acetobacter (A.) pasteurianus*, *A. aceti* y *Gluconobacter (G.) oxydans*. Los perfiles de restricción obtenidos para las cepas de referencia fueron muy similares a aquellos reportados por Ruiz et al. (2000) y González et

al (2006) que también usaron amplificadores del 16S rADN. Los perfiles de RFLP de muestras provenientes de la madre del vinagre y del vinagre inicial muestran una mezcla de bandas que puedan indicar la coexistencia de diferentes microorganismos. Sin embargo, como la acidez aumenta en el proceso de acetificación, el número de bandas disminuye progresivamente, encontrando un perfil de restricción único en el último punto de acetificación (60 g/L de ácido acético), que es idéntico al de la cepa tipo *A. pasteurianus*. Estas bandas de electroforesis fueron observadas en todas las muestras. Sin embargo, en la muestra de vino una tenue y limitada banda fue encontrada, indicando una muy baja población de BA. Esto indica que esta técnica puede ser resolutiva cuando se aplica en especies de cultivos únicos y pero puede ser difícil para diferenciar bandas muy intensas originadas desde varios microorganismos.

Cuando se realizó el TTGE (Temporal temperature gradient gel electrophoresis) los perfiles observados presentaron en general una banda dominante e intensa, tanto como la presencia de algunas otras bandas de intensidad más débil o tenue. La banda principal presenta la misma migración tanto en la madre del vinagre como en el resto de las muestras, salvo en la de vino. Tras la identificación mediante secuenciación, la banda dominante en las muestras de vinagre, se agruparon dentro de la especie *A. pasteurianus* con un rango de identificación entre 99 y 100%. Otra débil banda que migra junto a la banda dominante fue identificada como *Acetobacter sp*, y podría corresponder a heteroduplex formado en el último ciclo de la amplificación de PCR (Espejo et al., 1998). Una ligera banda que contenía un alto %GC, fue observada solamente en la muestra de 20 g/L de ácido acético. Tras la secuenciación esta banda fue asociada con un grupo que tenía, solo cepas de las especies *Gluconoacetobacter (Ga.) xylinus/europaesus/intermedia*, con un 99,5% de homología. En la muestra de vino se observó una única banda identificada como *Pediococcus*, con 100% de identidad. La banda de *Pediococcus* fue también detectada en la mezcla de vino y madre de vinagre. La presencia de *A. pasteurianus* y *Ga. xylinus* en vinagre producidos por métodos tradicionales fue previamente reportado por Gullo et al. (2006). Otro estudio que utilizó DGGE (De Vero et al, 2006) identifican un microorganismo principal que pertenece al grupo de los *A. pasteurianus* y *A. aceti*. Por otro lado *Pediococcus* esta regularmente presente en el vino siendo una de las más frecuentes BL del vino (Ribereau-Gayon et al., 2002).

En el clonaje, se evaluó la proporción de cada una de las especies presentes en la acetificación. La muestra de vinagre microbiológicamente más compleja fue la de 20g/L de ácido acético. Al analizar los clones por RFLP con *AluI*, tres grupos diferentes fueron clasificados según su perfil de restricción. El grupo más abundante presentó el mismo patrón de restricción que la principal banda del TTGE. La identificación por secuenciación de estos clones nos permitió asociarlo a la especie *A. pasteurianus*, coincidiendo con los resultados entregados mediante los análisis iniciales de PCR-RFLP y TTGE. El segundo grupo fue agrupado con *Ga. xylinus/europaeus/intermedius*. Es bien sabido que esta especie tiene una muy limitada variación en su 16S rADN y muchos de los métodos de identificación basados en la variabilidad de esta secuencia no permiten discriminarlo apropiadamente (Ruiz et al., 2000; González et al 2006a; De Vero et al., 2007). Finalmente el último grupo de clones fue agrupado con un microorganismo similar a *Gluconacetobacter*.

El análisis filogenético de las especies BA del vinagre, entregó la variabilidad entre las cepas de las especies encontradas. *A. pasteurianus*, encontrada por los tres métodos usados en este estudio, presentó un 1,4% de diferencias entre sus secuencias, mientras que para *Gluconacetobacter* la diferencia encontrada fue menor al 1%, no se pudo definir la especie exacta, esto se explica por la limitada variación en la región secuenciada dentro del género *Gluconoacetobacter*. Al comparar estos porcentajes de variabilidad con secuencias de estas especies disponibles en bases de datos web, puede verse que la variabilidad de secuencia es tan alta como en las cepas de la base de datos. En general los resultados sugieren la presencia de una diversidad de cepas en las muestras de vinagre, con *A. pasteurianus* siendo la cepa mejor adaptada a sobrevivir en el ambiente más ácido.

Referencias

- Abrahamse, C. E., & Bartowsky, E. J. (2012). Timing of malolactic fermentation inoculation in Shiraz grape must and wine: influence on chemical composition. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(1), 255-265.
- Adams MR. (1985). Vinegar. In: *Microbiology of Fermented Foods*. Elsevier Applied Science Publisher, London, pp. 1-47.
- Aleixandre J L. (1999). *Vinos y bebidas alcohólicas*. Ed Univ. Politéc de Valencia. España.
- Amann RI, Ludwig W, Schleifer KH. (1995). Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev*, 59:143-169.
- Ancín-Azpilicueta C, González-Marco A, Jiménez-Moreno N. (2008). Current knowledge about the presence of amines in wine. *Critical reviews in food science and nutrition*, 48(3), 257-275.
- Bell SJ, Henschke PA. (2005). Implications of nitrogen nutrition for grapes, fermentation and wine. *Aus J of grape and wine res*, 11(3) 242-295.
- 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. *Res in microb*, 157(3), 267-274
- Beneduce L, Romano A, Capozzi V, Lucas P, Barnavon L, Bach B, Spano G. (2010). Biogenic amine in wines. *Ann of microb*, 60(4), 573-578.
- Carrascosa A, Muñoz R, González R. (2005). *Microbiología del vino*, 1º edición. AMV, Ed. España.
- Casalta E, Cervi MF, Salmon JM, Sablayrolles JM. (2013). White wine fermentation: interaction of assimilable nitrogen and grape solids. *Aus J of grape and wine Res*, 19 (1), 47-52.
- Costantini A, García-Moruno E, Moreno-Arribas MV. (2009). Biochemical transformations produced by malolactic fermentation. In *Wine chemistry and biochemistry*, pp. 27-57. Springer New York.

- 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(2), 199-204.
- Coton M, Romano A, Spano G, Ziegler K, Vetrana C, Desmarais C, Coton E. (2010). Occurrence of biogenic amine-forming lactic acid bacteria in wine and cider. *Food microbiology*, 27(8), 1078-1085.
- De Ley J, Gillis M, Swings J. (1984). Family VI. Acetobacteraceae. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 1. Williams & Wilkins, Baltimore. 267- 278.
- De Vero L, Gala E, Gullo M, Solieri L, Landi S, Giudici P. (2006). Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) analysis to evaluate acetic acid bacteria in traditional balsamic vinegar. *Food Microbiology* 23, 809-813.
- De Vero L, Giudici P. (2008). Genus-specific profile of acetic acid bacteria by 16S Rna gene PCR-DGGE, *International Journal of Food Microbiology* doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2007.02.029
-
- Espejo RT, Feijoo CG, Romero J, Vasquez M. (1998). PAGE analysis of the heteroduplexes formed between PCR-amplified 16S rRNA genes: estimation of sequence similarity and rRNA gene complexity. *Microbiology* 144:1611-1617.
- Gonzalez A, Guillamon JM, Mas A, Poblet M. (2006a). Application of molecular methods for routine identification of acetic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 108, 141-146.
- González A, Hierro N, Poblet M, Mas A, Guillamon JM. (2006b). Enumeration and detection of acetic acid bacteria by real-time and nested polymerase chain reactions. *FEMS Microbiology Letters*, 254, 123-128.
- Guerrini, S., Mangani, S., Franci, O., & Vincenzini, M. (2010). Biogenic amine producing capability of bacterial populations isolated during processing of different types of dry fermented sausages. *Italian Journal of Animal Science*, 6(1s), 688-690.

- Gullo M, Caggia C, De Vero L, Giudici P. (2006). Characterisation of acetic acid bacteria in “tradicional balsamic Vinegar”. *International Journal of Food Microbiology*, 106, 209-212.
- Hugenholtz P, Goebel BM, Pace NR. (1998). Impact of culture independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *J Bacteriol* 180: 4765-4774.
- Ilabaca C, Jara C, Romero J. (2014). The rapid identification of lactic acid bacteria present in Chilean winemaking processes using culture-independent analysis. *Annals of Microbiology*, 64(4), 1857-1859.
- Jara C, Romero J. (2015). Genome sequences of three **Oenococcus oeni** strains isolated from Maipo Valley, Chile. *Genome Announ* 3(4):e00866-15
- Landete M, Ferrer S, Polo L, Pardo I. (2005). Biogenic amines in wines from three spanish regions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 119-1124.
- Lehtonen P. (1996). Determination of amines and amino acid in wine - A review. *American Journal of Enology and Viticulture*, 47: 127-133.
- Leitão M, Marques A, Romão M. (2005). A survey of biogenic amines in commercial Portuguese wines. *Food Control*, 16: 199-204.
- Lonvaud-Funel A, Joyeux A, Ledoux O. (1991). Specific enumeration of lactic acid bacteria in fermenting grape must and wine by colony hybridization with non-isotopic DNA probes. *Journal of Applied Bacteriology*, 71(6), 501-508.
- López I, Santamaría P, Tenorio C, Garijo P, Gutiérrez AR, López R. (2009). Evaluation of lysozyme to control vinification process and histamine production in Rioja wines. *J Microbiol Biotechnol*, 19(9), 1005-1012.
- Lucas PM, Wolken WA, Claisse O, Lolkema JS, Lonvaud-Funel A. (2005). Histamine-producing pathway encoded on an unstable plasmid in *Lactobacillus hilgardii* 0006. *App and Enviro Microb*, 71(3), 1417-1424.
- Marcobal A, De las Rivas B, Muñoz R. (2006). Methods for the detection of bacteria producing biogenic amines on foods: a survey. *J für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit*, 1(3), 187-196

- Mesa MM, Macias M, Cantero D, Barja F. (2003). Use of the direct epifluorescent filter technique for the enumeration of viable and total acetic acid bacteria from vinegar fermentation. *Journal of Fluorescence*, 13, 261-265.
- Millet V, Lonvaud-Funel A. (2000). The viable but non-culturable state of wine microorganisms during storage. *Letters in Applied Microbiology*, 30, 126-141.
- Moreno-Arribas MV, Polo MC, 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.
- 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.
- Renouf V, Claisse O, Lonvaud-Funel A. (2006). Lactic acid bacteria evolution during winemaking: Use of *rpoB* gene as a target for PCR-DGGE analysis. *Food Microbiol* 23: 136-145.
- Ribereau-Gayon P, Dubourdieu D, Donèche B, Lonvaud-Funel A. (2000). *Handbook of Enology*, vol. 1. *The Microbiology of Wine and Vinifications*. Wiley & Sons Ltd: West Sussex, England
- Rivas-Gonzalo J, Mariné A. (1983). Migrañas de orden alimentario: Aspectos relacionados con la tiramina. *Circular Farmacéutica*, 278: 1-6.
- Rodas, A.M.; Ferrer, S.; Pardo, I. (2003). 16S-ARDRA, a Tool for Identification of Lactic Acid Bacteria Isolated from Grape Must and Wine. *Syst Appl Microbiol*. 26(3):412-22.
- Ruiz P, Seseña S, Izquierdo PM, Palop ML. (2010). Bacterial biodiversity and dynamics during malolactic fermentation of Tempranillo wines as determined by a culture-independent method (PCR-DGGE). *Applied microbiology and biotechnology*, 86(5), 1555-1562.
- Smit I, Pflieginger M, Binner A, Großmann M, Horst WJ, Löhnertz O. (2014). Nitrogen fertilisation increases biogenic amines and amino acid concentrations in *Vitis vinifera* var. Riesling musts and wines. *J of the Scien of Food and Agric*, 94(10), 2064-2072.

- Spano G, Lonvaud-Funel A, Claisse O, Massa S. (2007). In vivo PCR-DGGE analysis of *Lactobacillus plantarum* and *Oenococcus oeni* populations in red wine. *Curr Microbiol* 54: 9-13.
- Suárez JA, Iñigo B. (2004). *Microbiología Enológica, Fundamentos de vinificación*. 3° edición. Ed Mundi-Prensa. España.
- Taylor S. (1986). Histamine food poisoning: toxicity and clinical aspects. A review. *Critical Review in Toxicology*, 17: 91-128.
- Trcek J. (2005). Quick identification of acetic acid bacteria based on nucleotide sequences of the 16S-23S rRNA gene internal transcribed spacer region and of the PQQ-dependent alcohol dehydrogenase gene. *Systematic and Applied Microbiology*, 28,735-745.
- Vegas C, Mateo E, González A, Jara C, Guillamón JM, Poblet M, Torija MJ, Mas A. (2010). Population dynamics of acetic acid bacteria during traditional wine vinegar production. *International Journal of Food Microbiology*, 138: 130136.

Conclusiones

- Se diseñó una estrategia de PCR-RFLP para la identificación de BL presentes en una fermentación maloláctica en vino. Esta estrategia constituye una herramienta rápida, fácil, informativa y fiable para la identificación y diferenciación.
- La estrategia diseñada, permite la identificación de los géneros *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* y *Oenococcus*, en muestras que provienen de fermentaciones malolácticas espontaneas como de las inoculadas.
- Se puede identificar en el momento lo que sucede en el estanque de fermentación, ya que es una estrategia rápida. Además permite identificar la presencia de uno o más géneros presentes en una misma muestra.
- La suplementación de mostos con compuestos nitrogenados, en dosis superiores a las necesarias para el desarrollo de las levaduras y la fermentación alcohólica, generan vinos con altos contenidos de histamina.
- Los principales géneros de bacterias lácticas identificadas en las fermentaciones malolácticas realizadas, fueron *Leuconostoc* y *Oenococcus*, identificándose esta última en la etapa final del proceso.
- Si bien *Oenococcus* ha sido culpada de la producción de histamina, en esta investigación no existe evidencia de que ésta bacteria fue la que generó los contenidos finales de esta amina.
- En relación a las bacterias acéticas, en este estudio se presentaron resultados coincidentes aplicando tres de las más comunes técnicas moleculares.
- Además de ser rápido y fácil, el RFLP tiene varias ventajas como cepas de referencia disponibles usando diferentes enzimas.
- El TTGE permite una rápida visión general y aproximada de la diversidad, mientras que el clonamiento permite estimar la abundancia relativa de las diferentes especies presentes. Ambos métodos se complementan entre sí ofreciendo una vista cuantitativa de la diversidad microbiana.
- El presente trabajo analiza por primera vez la presencia de bacterias acéticas en vinagre realizado en Chile, siendo evidente que las principales especies productoras de vinagre son *Acetobacter pasteurianus* y miembros del género *Gluconacetobacter*

