

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y ECOLOGÍA

ESTUDIO Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LA
PRODUCCIÓN DE AMINAS BIÓGENAS POR PARTE DE
BACTERIAS LÁCTICAS DE ORIGEN ENOLÓGICO

JOSÉ MARÍA LANDETE IRANZO

UNIVERSITAT DE VALENCIA
Servei de Publicacions
2005

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 26 de Juliol de 2005 davant un tribunal format per:

- D. José Antonio Suárez Lepe
- D. Tomás Huerta Grau
- D. Abel Maripé Font
- D. Albert Bordons de Porrata-Doria
- D. José María Guillamón Navarro

Va ser dirigida per:

D^a. Isabel Pardo Cubillos

D. Sergi Ferrer Soler

©Copyright: Servei de Publicacions
José María Landete Iranzo

Depòsit legal:

I.S.B.N.:84-370-6279-9

Edita: Universitat de València
Servei de Publicacions
C/ Artes Gráficas, 13 bajo
46010 València
Spain
Telèfon: 963864115

VNIVERSITAT VALÈNCIA

Facultat de CC. Biològiques



Estudio y caracterización molecular de la producción de aminas
biógenas por parte de bacterias lácticas de origen enológico

José María Landete Iranzo

Tesis Doctoral

Valencia, 2005

La presente tesis doctoral ha sido dirigida por la Dra. Isabel Pardo Cubillos y por el Dr. Sergi Ferrer Soler, Profesores Titulares del Departamento de Microbiología y Ecología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Valencia.

Burjassot, Abril 2005

Fdo. Dra. Isabel Pardo Cubillos

Fdo. Dr. Sergi Ferrer Soler

Esta tesis doctoral
quiero dedicarla a
Asun y a Lucía Polo

Hay mucha gente a la que debo dar mis más sinceros agradecimientos tanto por aportaciones a nivel científico como por su apoyo, amistad y cariño.

En primer lugar me gustaría agradecer a mis directores de Tesis, Isabel Pardo y Sergi Ferrer el haberme dado la oportunidad de realizar la tesis doctoral en su grupo de investigación y por el apoyo mostrado durante la realización de la tesis.

Agradezco a la Conselleria de Cultura, Educación y Ciencia la beca predoctoral concedida y al Ministerio de Ciencia y Tecnología por ser la entidad financiadora del proyecto con el que he realizado la tesis (CICYT AGL2000-0827-C02-01).

A Lucía Polo, la persona que ha sufrido esta tesis durante los más de cinco años que he estado en el laboratorio. Aunque hay muchas cosas que me gustaría agradecerle quiero destacar su inestimable apoyo en todo momento y el aguantarme en los momentos difíciles, pero sobretodo me gustaría agradecerle su gran amistad.

Continuando con la gente del labo, me gustaría mostrar mis más sinceros agradecimientos a Palmira y Amparo, con las que me une una gran amistad, a Lucía Blasco una buena amiga e inmejorable compañera de trabajo, a Ana Rodas por su ayuda y consejos durante la tesis, a Rosario, por mostrar siempre una sonrisa y aspecto desenfadado, a Lourdes con la que he coincidido en el laboratorio en estos últimos meses, por su apoyo. También mis agradecimientos para todos los colaboradores que durante estos años de tesis han pasado por el laboratorio.

No me puedo olvidar de Chimo, Cris y Mariaje con los que compartí buenos momentos dentro y fuera del laboratorio y con los que me une una buena amistad.

A los “enemigos”, Gabi, Angel Medina, Paco Valle y Juanma por compartir laboratorio y comedor durante una buena parte de mi tesis.

Agradezco la ayuda desinteresada de todos los miembros del Departamento de Microbiología y Ecología de la Facultad de Ciencias Biológicas y gracias a la gente de secretaria por solucionarme los problemas administrativos.

Agradezco al Laboratoire de Microbiologie Appliquée de la Faculté D'Enologie de la Universite Victor Segalen de Bordeaux el trato recibido y los conocimientos científicos enseñados que me han servido a lo largo de la tesis. A Aline Lonvaud-Funel por haberme dado la oportunidad de realizar la estancia en su laboratorio y a Patrick Lucas por su constante ayuda.

A mis padres Alberto y Emilia y a mis hermanos Alberto y Rebeca por su apoyo, cariño y comprensión desde que tengo uso de razón, y sobretodo por haber confiado siempre en mí.

A mis amigos por haber estado ahí siempre que los he necesitado.

Y por supuesto, a Asun, mi novia, quien conocí en este último año de tesis y con la que estoy desde entonces, una persona muy importante en mi vida gracias a la cual el tramo final de esta tesis se ha echo mucho más fácil, estando a mi lado apoyándome en todo momento y siempre mostrándome su comprensión y cariño.

INTRODUCCIÓN

1. Las aminas biógenas: definición y efectos fisiológicos.	1
1.1 Histamina	1
1.2 Tiramina	3
1.3 Feniletilamina	4
1.4 Putrescina	5
1.5 Otras aminas biógenas	5
2. Aminas biógenas en vinos	6
2.1 Enzimas que intervienen en la formación de aminas biógenas	8
3. Origen de las aminas biógenas en vinos	10
4. Las bacterias lácticas en el vino	13
4.1 Definición y ecología	13
4.2 Metabolismo de sustratos del vino por las bacterias lácticas	15
4.2.1 Metabolismo de azúcares	15
4.2.2 Metabolismo de ácidos orgánicos	15
4.2.3 Metabolismo de aminoácidos	16
4.3. Producción de aminas biógenas en vino por bacterias lácticas	18
4.4 Factores que influyen sobre la producción de histamina y tiramina por parte de las bacterias lácticas	19
4.5 Métodos de análisis de la capacidad productora de aminas por parte de microorganismos: Detección y cuantificación	21

OBJETIVOS 25

CAPÍTULOS

1. Landete, J.M., Ferrer, S. y Pardo, I. 2004. Improved enzymatic method for the rapid determination of histamine in wine. *Food Add. Contam.* 21, 1149-1154. 27
2. Landete, J.M., Ferrer, S., Polo, L. y Pardo, I. 2005a. Biogenic amines in wines from three Spanish regions. *J. Agri. Food. Chem.* 53, 1119-1124. 33

3. Landete, J.M., Ferrer, S. y Pardo, I. 2005b. Which are the lactic acid bacteria responsible for histamine production in wine?. J. Appl. Microbiol. (aceptado). 39
4. Landete, J.M., Pardo, I. y Ferrer, S. 2005c. Tyramine and phenylethylamine synthesis among lactic acid bacteria isolated from wine. Int. J. Food. Microbiol. (enviado). 45
5. Lucas, P., Landete, J., Coton, M., Coton, E. and Lonvaud-Funel, A. 2003. The tyrosine decarboxylase operon of *Lactobacillus brevis* IOEB 9809: characterization and conservation in tyramine-producing bacteria. FEMS Microbiol. Lett. 229, 57-65. 71
6. Landete, J.M., Pardo, I. y Ferrer, S. 2005d. Regulation of *hdc* expression and HDC activity by enological factors in lactic acid bacteria. J. Appl. Microbiol. (enviado). 79
7. Landete, J.M., Pardo, I. y Ferrer, S. 2005e. Histamine, histidine and growth phase mediated regulation of histidine decarboxylase gene in lactic acid bacteria. 105

RESUMEN DE RESULTADOS 109

DISCUSIÓN GENERAL 117

CONCLUSIONES 127

BIBLIOGRAFÍA 129

BAPM	Medio de producción de aminas biógenas / Biogenic Amine Production Medium
cols.	Colaboradores
cfu	Unidades formadora de colonia / Colony-forming units
DAB	3,3-diaminobenzidina / 3,3-diaminobenzidine
DAO	Diamino oxidasa / Diamine oxydase
DNA	Ácido desoxirribonucleico / Deoxyribonucleic Acid
D.O.	Denominación de Origen
FISH	Hibridación fluorescente <i>in situ</i> / Fluorescent <i>In Situ</i> Hibridation
H-MDBmod	Medio para la producción de histamina modificado / Histidine- Medium Decarboxylation Broth.
HDC	Enzima histidina descarboxilasa / Histidine Decarboxylase Enzyme
<i>hdc</i>	Gen histidina descarboxilasa / Histidine Decarboxylase Gene
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución / High Performance Liquid Chromatography
HRP	Peroxidasa / Peroxidase
Kb	Kilobases
LAB	Bacteria del ácido láctico / Lactic Acid Bacteria
LOD	Límite de detección / Limit Of Detection
OPA	o-phthaldialdehído / o-phthaldialdehyde
ORF	Fragmento abierto de lectura / Open Reading Frames
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa / Polymerase Chain Reaction
pb / bp	Pares de bases / Base pairs
PVP	Polyvinyl-pyrrolidone / Polyvinyl-pyrrolidone
PVPP	Polyvinyl-polypyrrolidona / polyvinyl-polypyrrolidone
RACE	Rápidas amplificaciones de los extremos cDNA / Rapid Amplification of cDNA Ends
RAPD	Amplificación al azar de fragmentos polimórficos de ADN / Random Amplified Polymorphic DNA
RNA	Ácido ribonucleico / Ribonucleic Acid
RT-PCR	Transcripción Reversa PCR / Reverse Transcriptase PCR
TDC	Enzima tirosina descarboxilasa / Tyrosine Decarboxylase Enzyme
<i>tdc</i>	Gen tirosina descarboxilasa / Tyrosine Decarboxylase Gene
TLC	Cromatografía en capa fina / Thin Layer Chromatography.
TPM	Medio de producción de tiramina / Tyramine Production Medium
16S-ARDRA	Análisis de restricción del ADN ribosómico 16S amplificado / Amplified 16S rDNA Restriction Analysis

Introducción

1. Las aminas biógenas: definición y efectos fisiológicos

Las aminas biógenas son compuestos orgánicos (bases nitrogenadas) de bajo peso molecular, encontradas frecuentemente en alimentos fermentados como vino, queso, salchichas, etc.

Las características químicas y funciones biológicas de las aminas son muy diversas, pudiendo tener efectos beneficiosos o perjudiciales en los seres humanos. Así, algunas aminas como la putrescina, parecen que ser esenciales para el crecimiento y la proliferación celular en organismos vivos. Sin embargo, otras aminas biógenas como la histamina y tiramina tienen efectos perjudiciales sobre la salud de los humanos ya que pueden producir náuseas, calor súbito, sudoración, dolor de cabeza e hiper o hipotensión.

Por ello, y porque también tienen influencia sobre las características organolépticas de los alimentos, el contenido de éstas debería ser muy bajo. Así, la mayor parte de los estudios sobre las aminas biógenas en alimentos tiene como principal objetivo el disminuir la concentración de éstas. Por tanto, todos los elementos que favorecen la seguridad nutricional de cualquier producto alimentario estimulan la labor de la investigación, a su vez, la investigación en los productos alimentarios pretende mejorar la formación e información del consumidor, sobre todo hoy en día en el que nos enfrentamos a un mercado de alta competitividad.

Aunque existe un elevado número de aminas biógenas, en este trabajo nos centraremos en el estudio de la histamina, tiramina, feniletilamina y putrescina; algunas otras aminas como cadaverina y triptamina también serán contempladas en este trabajo.

1.1 Histamina

La histamina o β -aminoetilimidazol, amina heterocíclica, es una molécula hidrófila compuesta de un anillo imidazol y un grupo amino unidos por dos grupos metileno (Figura 1).

La histamina exógena es ingerida a través de los alimentos que la contienen como el pescado, quesos y vinos o embutidos. La sintomatología que más frecuentemente produce en el hombre es una ligera hipotensión arterial, picor, enrojecimiento facial, dolor de cabeza, e incluso diarrea. La aparición de estos síntomas varía entre algunos minutos y varias horas (no más de tres) desde la ingestión. Normalmente, todos los síntomas remiten entre las 12 y las 24 horas sin dejar secuelas. En los casos más graves puede producir

Introducción

calambres, náuseas sin vómitos y diarrea, así como espasmos bronquiales, sofoco y trastornos respiratorios graves que suelen confundirse con una crisis alérgica.

La cefalea producida por la ingesta de vino tinto está relacionada con la concentración de histamina y tiramina y es de mecanismo vascular y de tipo migrañosa, Se produce por una dilatación de los vasos sanguíneos (vasodilatación) que provoca un aumento de la presión en la cabeza lo cual ocasiona el dolor. Las personas normales se defienden de los efectos de la histamina ingerida mediante sistemas de destoxificación naturales que posteriormente comentaremos. Los individuos que padecen cefaleas tras el consumo de vino o de alimentos con histamina presentan una especial sensibilidad a las aminas por una baja actividad de estos sistemas de destoxificación, lo que lleva a un exceso de absorción de histamina.

Además de la histamina exógena que hemos comentado, la histamina es producida también por los mamíferos desempeñando importantes actividades fisiológicas como la regulación de la secreción del ácido en el estomago, la actuación como neurotransmisor en el sistema nervioso central y como mediador en los fenómenos alérgicos. Dado que es uno de los mediadores preformados almacenados en las células cebadas, su liberación como consecuencia de la interacción del antígeno con los anticuerpos IgE en la superficie de dicha célula interviene decisivamente en las respuestas de hipersensibilidades inmediatas y alérgicas. Las acciones de la histamina en músculo liso de bronquios y de vasos sanguíneos explican en parte los síntomas de la reacción alérgica como el asma y el enrojecimiento. Además, algunos fármacos de utilidad clínica tienen como efecto secundario la liberación de histamina por las células cebadas, explicándose algunos de sus efectos adversos.

Se conocen dos vías importantes del catabolismo de la histamina en seres humanos, la más generalizada incluye la metilación del anillo que es catalizada por la enzima histamina-N-metiltransferasa (Hirata y cols. 1999). Gran parte de la N-metilhistamina producida es transformada por la monoaminoxidasa (MAO) a ácido N-metilimidazol acético; dicha reacción puede ser bloqueada por los inhibidores de la MAO. Por ello, los individuos que toman ciertos tipos de medicamentos inhibidores de la MAO o que por causas genéticas son incapaces de producirlas tienen menor capacidad de destoxificar la histamina y tienen mayores riesgos de padecer trastornos si consumen ciertos tipos de alimentos que contienen histamina (quesos, vino, cerveza, pasas, higos envasados, bananas, etc.). El etanol es un inhibidor la MAO, por lo que la ingestión de alimentos con alto contenido en histamina combinada con el consumo de bebidas alcohólicas puede tener efectos perjudiciales para la salud (Scheyder, 1973; Stratton y cols. 1991). En la otra vía

catabólica, la histamina es sometida a desaminación oxidativa, reacción que es catalizada por la diaminoxidasa (DAO), el producto intermediario de esta reacción es el ácido imidazol acético y el final su ribósido. Los catabolitos poseen poca o nula actividad sobre el hombre y son excretados por la orina.

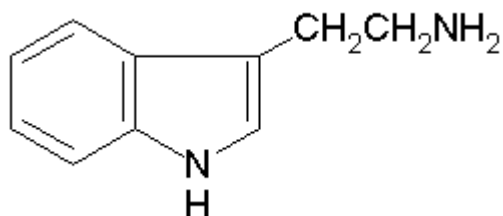


Figura 1. Histamina

1.2 Tiramina

La tiramina es una monoamina aromática, se trata de una molécula con un grupo benceno que posee un radical nitrogenado (-NH₂) y un grupo (-OH) en posición 4 (Figura 2).

Esta amina se encuentra frecuentemente en alimentos fermentados como vino, cerveza, embutidos y quesos, siendo en este último donde se han encontrado los niveles más altos de esta amina biógena. La tiramina tiene efectos vasoconstrictivos sobre los vasos cerebrales y sistémicos. Los síntomas aparecen en un intervalo de pocos minutos a pocas horas tras la ingesta de alimentos que contengan tiramina e incluyen palpitaciones, dolores fuertes de cabeza, hipertensión, sofocos, transpiración abundante, cuello rígido, náuseas, vómitos y postración. Los más típicos son los dolores de cabeza y la hipertensión. La duración de los síntomas usualmente varía de 10 minutos a 6 horas.

La tiramina produce además la liberación de noradrenalina, que estimula la producción de histamina y de prostaglandinas, mediadores inflamatorios de muchos procesos (Thoenen y cols. 1967; Collier y cols. 1976). La mayoría de los individuos pueden ingerir importantes cantidades de tiramina y no sufrir efectos adversos. No es peligrosa para la mayoría porque es destoxificada en el tracto gastrointestinal por la enzima MAO. Al igual que en el caso de la histamina, la MAO convierte la tiramina en productos menos tóxicos. Si la actividad de la MAO está inhibida y/o es reducida por causas genéticas tendrá las mismas consecuencias que las comentadas antes para la histamina.

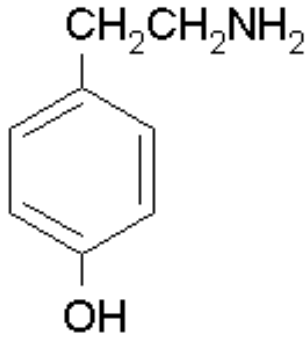


Figura 2. Tiramina

1.3 Feniletilamina

La feniletilamina es otra monoamina aromática que a diferencia de la tiramina no posee un grupo (-OH) (Figura 3). También se encuentra en alimentos fermentados, aunque normalmente en cantidades inferiores a la tiramina (Inocente y D'Agostin, 2002; Jiménez-Moreno y cols. 2003; Novella-Rodríguez y cols. 2004).

Al igual que la tiramina, la feniletilamina es capaz de dilatar el calibre de los vasos sanguíneos y, especialmente el de las arterias. Entre los síntomas más frecuentes que produce la ingestión de feniletilamina puede causar síntomas similares a los anteriormente comentados para la tiramina y la detoxificación de esta amina es producida también por la MAO. Además de los efectos que comparte con la tiramina la feniletilamina estimula la liberación de otro neuroquímico llamado dopamina, que libera la oxitocina, hormona involucrada en la lactancia y en el parto. Los científicos tienen ahora evidencia de que esta hormona es expelida tanto por el hombre como la mujer en la primera atracción, y llega a su máximo nivel durante el orgasmo, de manera que desde hace unos años la feniletilamina se le ha relacionado con el enamoramiento.

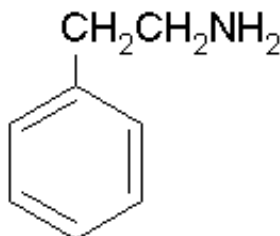


Figura 3. Feniletilamina

1.4 Putrescina

La putrescina, amina alifática al igual que la cadaverina, la espermidina y espermina, es una poliamina, ya que posee un grupo (NH₂) en cada extremo de la cadena (Figura 4). Se trata de una molécula de gran importancia a nivel fisiológico. La putrescina al igual que otras poliaminas son compuestos relacionados con el crecimiento y diferenciación celular. El efecto de las poliaminas sobre el crecimiento se debe a que estimulan la replicación del DNA y favorecen la síntesis de proteínas (Bitonti y cols. 1984).

Además de estos efectos a nivel molecular, la putrescina reduce la presión arterial en humanos y puede potenciar los efectos negativos sobre la salud humana causados por las aminas biógenas anteriormente comentadas. Además, la presencia de ciertos niveles de putrescina en alimentos está relacionada con olores y sabores desagradables. Así Woller (2005) comentó que cantidades de 10 a 15 mg/L de putrescina en vinos blancos producen un sabor desagradable, mientras que 10 a 20 mg/L de esta amina pueden redondear el sabor de los tintos; no obstante, concentraciones superiores a 30 mg/L comunican a estos vinos un aroma maloliente o pútrido.

En mamíferos se ha observado el catabolismo de la putrescina y otras poliaminas por la DAO (Siatkin y Galaev, 1977), enzima que hemos comentado anteriormente. Los productos del catabolismo de la putrescina por la DAO son: 4-aminobutanal, H₂O₂ y NH₃.

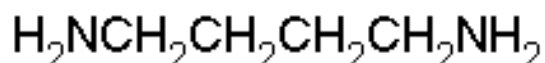


Figura 4. Putrescina

1.5 Otras aminas biógenas

Entre ellas podemos citar la cadaverina: amina alifática, similar a la putrescina que presenta un carbono más en su cadena hidrogenocarbonada (Figura 5). La agmatina (Figura 6) es otra amina alifática que sirve de intermediario para la formación de putrescina. Otra amina que aparece con frecuencia en alimentos es la triptamina (Figura 7), se trata de una amina que al igual que la tiramina y la feniletilamina posee un anillo aromático.

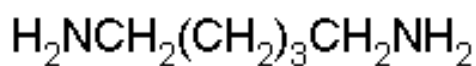


Figura 5. Cadaverina



Figura 6. Agmatina

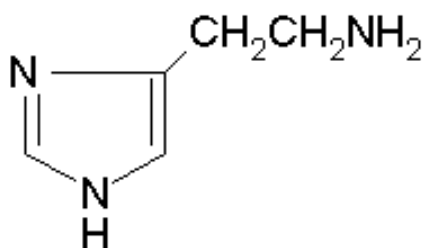


Figura 7. Triptamina

1. Aminas biógenas en vinos

Según Lehtonen (1996) se han encontrado al menos 24 aminas biógenas diferentes en vinos (Tabla 1).

La presencia de aminas biógenas en vinos ha despertado bastante interés desde hace años, así Ough en 1971 determinó la presencia de histamina en vinos de California y desde entonces han sido bastantes los trabajos publicados sobre la presencia de este tipo de compuestos en vino. Gloria y cols. (1998) estudiaron la concentración de aminas biógenas en vinos de Oregon (USA) procedentes de las variedades de uva Pinot Noir y Cabernet Sauvignon, encontrando que la putrescina era la amina más abundante seguida de la histamina y tiramina respectivamente en ambos vinos. Herbert y cols. (2005) estudiaron la concentración de aminoácidos y aminas biógenas en mostos y vinos de la región de Alentejo (Portugal). En este trabajo también analizaron la evolución de las aminas durante la fermentación alcohólica y la existencia de relaciones entre la concentración de aminoácidos y aminas y la variedad de uva, la zona geográfica y la añada. Estos autores encuentran que todos los factores comentados influyen en la concentración de aminoácidos del mosto y de aminas biógenas en el vino; además encuentran que las variedades con un

nivel más alto de aminas biógenas eran también las que presentaban un mayor contenido en aminoácidos libres en el mosto. Mafra y cols. (1999) cuantificaron las aminas biógenas en vinos resultantes de varios procesos de vinificación usados en Portugal: vinos de Oporto y Madeira, Moscatel, 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. A pesar de las diferencias encontradas, Mafra y cols. (1999) afirman que las concentraciones de aminas en los vinos Portugueses son bajas, y por ello no representan un peligro toxicológico.

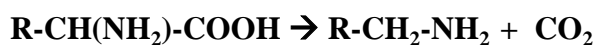
Vázquez-Lasa y cols. (1998) realizaron un estudio sobre la presencia de aminas en vinos de la Rioja (blancos, rosados y tintos jóvenes, de crianza y reserva) encontrado que los vinos tintos tenían una concentración de histamina significativamente superior a la encontrada en vinos blancos y rosados, sin embargo, no encontraron diferencias significativas entre los vinos jóvenes y los vinos de crianza y reserva. Los trabajos de Vidal-Carou y cols. (1990) y Soufleros y cols. (1998) muestran que la formación de histamina y tiramina es más pronunciada durante la fermentación maloláctica que durante la fermentación alcohólica. Jiménez-Moreno y cols. (2003) realizaron un estudio sobre la variación de concentración de aminas biógenas durante el envejecimiento del vino tinto en barricas de roble. Los resultados que obtuvieron fueron que las concentraciones de histamina y tiramina aumentaban durante el periodo inicial de estancia en barrica pero posteriormente disminuían, debido probablemente a su degradación. No observaron, sin embargo, disminución en los contenidos de putrescina y cadaverina.

TABLA 1. Aminas encontradas en vinos (Lethonen y cols. 1996)

Butilamina	Metilamina
Cadaverina	2-Metilbutilamina
1,5- Diaminopentano	Morfolina
Dietilamina	Pentilamina
Dimetilamina	Fenentilamina
Etanolamina	Piperidina
Etilamina	Propilamina
Hexylamina	Putrescina
Histamina	Pirrolidina
Indol	2-Pirrolidone
Isopentilamina	Serotonina
Isopropilamina	Tiramina

2.1 Enzimas que intervienen en la formación de aminas biógenas

La histamina se produce por la descarboxilación del aminoácido histidina por la histidina descarboxilasa. La tiramina se forma por la descarboxilación de la tirosina por la tirosina descarboxilasa. La feniletilamina por la descarboxilación de la fenilalanina por la fenilalanina descarboxilasa y también por la tirosina descarboxilasa (Tabla 2), que tiene afinidad por este sustrato aunque menor que por la tirosina (Boeker y Snell, 1972).



La biosíntesis de las poliaminas comienza por la conversión de ornitina en putrescina por acción de la ornitina descarboxilasa (ODC). Esta enzima es fundamental en la regulación de la síntesis de poliaminas. Una vía alternativa para la síntesis de putrescina implica a la arginina descarboxilasa (ADC), cuyo sustrato es el aminoácido arginina. Este enzima fue inicialmente descrito en plantas y bacterias y recientemente se ha encontrado en ciertos tejidos de mamíferos. La descarboxilación de la arginina produce agmatina que puede ser transformada directamente a putrescina en bacterias por la agmatina deiminasa o

indirectamente mediante la formación del intermediario N-carbamilputrescina y la acción secuencial de la agmatinasa y de la N-carbamilputrescina hidrolasa.

Otras aminas como la cadaverina se originan por descarboxilación de la lisina por la lisina descarboxilasa. La triptamina se produce por la descarboxilación del triptófano por la triptófano descarboxilasa.

Es posible que la propia vid pueda producir estos enzimas; se ha descrito la presencia del enzima arginina descarboxilasa en *Vitis vinifera* (Primikirios y Roubelakis-Angelakis, 1999) lo cual explicaría la presencia de agmatina y putrescina en el mosto. Además, muchas de estas aminas descarboxilasas (Tabla 2) se encuentran en los microorganismos asociados al proceso de vinificación, así los posibles productores de tales enzimas podrían ser en principio los microorganismos presentes en el vino. Torrea y Ancin (2002) encontraron como la isoamilamina y etilamina se ha producido durante la fermentación alcohólica, atribuyéndose a las levaduras su formación. Caruso y cols. también observaron en 2002 la influencia de las levaduras en la formación de aminas biógenas en vino, algunas cepas de *Kloeckera apiculata*, *Brettanomyces bruxellensis* y *Metschnikowia pulcherrima* formaban agmatina y β -feniletilamina con una variabilidad considerable, mientras que *Saccharomyces cerevisiae* produce etanolamina, también en cantidades variables (desde trazas hasta 16 mg/L). Torrea y Ancin ya en el 2001 habían observado una interrelación entre las levaduras, las aminas biógenas y la utilización de aminoácidos durante la fermentación. Sin embargo, las bacterias lácticas son el grupo microbiano que más se ha relacionado con la generación de aminas biógenas y más ampliamente se ha estudiado, más tarde nos centraremos en las bacterias lácticas como productoras de aminas biógenas.

Además de la formación de aminas biógenas por microorganismos vivos en el vino, debemos de considerar que, aunque la localización de las enzimas amino descarboxilasas es intracelular, cuando las células se lisan son vertidas fuera de la célula y son capaces de seguir produciendo la amina correspondiente durante el envejecimiento del vino (Coton y cols. 1998).

TABLA 2. Aminas biógenas, precursores y enzimas responsables de la producción de esa amina.

Amina biogénica	Precursor	Enzima
Histamina	Histidina	Histidina descarboxilasa
Tiramina	Tirosina	Tirosina descarboxilasa
Feniletilamina	Fenilalanina	Fenilalanina/Tirosina descarboxilasa
Putrescina	Ornitina	Ornitina descarboxilasa
Agmatina	Arginina	Arginina descarboxilasa
Putrescina	Agmatina	Agmatina deiminasa
Cadaverina	Lisina	Lisina descarboxilasa
Triptamina	Triptófano	Triptófano descarboxilasa

3. Origen de las aminas biógenas en vinos

Las aminas biógenas pueden estar presentes en la materia prima (uva) o producirse durante el proceso de vinificación.

Algunas aminas 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 cols. 1983; Broquedis y cols. 1989; Radler y Fäth 1991; Baucom y cols. 1996). Se han encontrado diferencias en las concentraciones de aminas en diferentes variedades de uva, así se han detectado altos niveles de putrescina y espermidina en el pericarpo de las uvas de la variedad Cabernet-Sauvignon (Broquedis y cols. 1989). En otras plantas como eucaliptos, se ha encontrado que la capacidad de producción de putrescina está relacionada con el contenido en potasio (Vaz de Arruda Silveira y cols. 2001).

Para que se produzcan aminas biógenas en vino es necesaria la presencia de aminoácidos, la de microorganismos que posean enzimas amino-descarboxilasas capaces de descarboxilar esos aminoácidos y la de unas condiciones ambientales adecuadas (pH, Temperatura, O₂, SO₂, etc.). En este apartado comentaremos cada uno de estos factores en el contexto de la fabricación del vino.

Los mostos de uva contienen una veintena de aminoácidos del reino vegetal, los cuales representan del 20 al 30% del nitrógeno total (Poux y Ournac, 1970). Los dos aminoácidos más abundantes son la prolina y la arginina sea cual sea la variedad de uva y el origen geográfico. Un aminoácido bastante específico de la uva, el ácido γ -aminobutírico ha sido identificado por varios autores (Feuillat, 1974).

La variedad de uva tiene influencia sobre la composición cualitativa y cuantitativa de los aminoácidos presentes en mostos. Es por esto que varios autores han utilizado el espectro de los aminoácidos libres para diferenciar variedades (Ough, 1968; Millery y cols. 1986 y Spayd y Andersen-Bagge, 1996), e incluso para determinar el origen del vino (Ooghe y cols. 1981).

Millery y cols. en 1986 analizaron la composición de aminoácidos libres en las bayas de las variedades Chardonnay, Pinot Noir y Pinot Meunier en el momento de la cosecha en dos años sucesivos (1983 y 1984). Tal como había sido señalado en trabajos anteriores (Flanzy y Poux, 1965; Feuillat, 1974), observaron grandes diferencias en los valores de los aminoácidos libres de los mostos entre las tres variedades de uva y entre las dos cosechas. Las uvas más maduras en el momento de su recolección presentaban un menor contenido en aminoácidos.

Además de la variedad, otros factores como las condiciones climato-geopedológicas, es decir el efecto clima, zona de procedencia y tipo de suelo influyen en la diferente composición de aminoácidos (Sponholz, 1991; Spayd y Andersen-Bagge, 1996). Adams (1991) comprobó igualmente como la composición en aminoácidos precursores en las uvas también depende del tipo de suelo en el que se han cultivado.

Los procesos de vinificación también influyen en la concentración de precursores. En la Tabla 3 se pueden observar los valores máximos, mínimos y medios de los aminoácidos responsables de la formación de las aminas biógenas estudiadas en este trabajo en mostos, vinos tintos y vinos blancos (Cabanis y cols. 2000). Podemos observar como las concentraciones varían, encontrándose por lo general que la concentración de aminoácidos en mostos es superior a la de los vinos tintos y blancos, posiblemente debido a que parte de ellos son consumidos por los microorganismos que intervienen en la vinificación. Sin embargo hay aminoácidos cuya concentración aumenta tras la vinificación, como por ejemplo la ornitina. Prácticas como la maceración, la adición de pectinasas o proteasas, el contacto con lías y el envejecimiento tienden a aumentar el contenido en aminoácidos. Por el contrario, los trasegados tempranos o la filtración del vino tienden a disminuirlos, ya que limitan la liberación al vino de aminoácidos procedentes de la lisis de levaduras, además los trasegados eliminan microorganismos potencialmente capaces de descarboxilar esos aminoácidos. Sin embargo, la filtración no elimina las aminas ya presentes, ni los enzimas libres que catalizan la formación o destrucción de aminas y que proceden de la lisis de los microorganismos existentes antes de la filtración. La clarificación con

TABLA 3 .Concentraciones de aminoácidos (g/L) de interés para la producción de aminas biógenas en mostos, vinos tintos y vinos blancos (Cabanis y cols. 2000)

AMINOÁCIDO	MOSTOS			TINTOS			BLANCOS		
	MÍNIMO	MÁXIMO	MEDIA	MÍNIMO	MÁXIMO	MEDIA	MÍNIMO	MÁXIMO	MEDIA
Arginina	$55 \cdot 10^{-3}$	1.20	0.35	$18 \cdot 10^{-3}$	0.42	$45 \cdot 10^{-3}$	$15 \cdot 10^{-3}$	0.18	$32 \cdot 10^{-3}$
Histidina	$8 \cdot 10^{-3}$	$26 \cdot 10^{-3}$	$12 \cdot 10^{-3}$	$3 \cdot 10^{-3}$	$14 \cdot 10^{-3}$	$5 \cdot 10^{-3}$	$2 \cdot 10^{-3}$	$12 \cdot 10^{-3}$	$5 \cdot 10^{-3}$
Lisina	$5 \cdot 10^{-3}$	$63 \cdot 10^{-3}$	$28 \cdot 10^{-3}$	$5 \cdot 10^{-3}$	$72 \cdot 10^{-3}$	$25 \cdot 10^{-3}$	ND	$62 \cdot 10^{-3}$	$20 \cdot 10^{-3}$
Ornitina	ND	$5 \cdot 10^{-3}$	ND	$1 \cdot 10^{-3}$	$80 \cdot 10^{-3}$	$6 \cdot 10^{-3}$	$55 \cdot 10^{-3}$	$9 \cdot 10^{-3}$	$1 \cdot 10^{-3}$
Fenilalanina	$4 \cdot 10^{-3}$	$62 \cdot 10^{-3}$	$15 \cdot 10^{-3}$	$5 \cdot 10^{-3}$	$34 \cdot 10^{-3}$	$10 \cdot 10^{-3}$	$4 \cdot 10^{-3}$	$22 \cdot 10^{-3}$	$6 \cdot 10^{-3}$
Tirosina	$2 \cdot 10^{-3}$	$75 \cdot 10^{-3}$	$15 \cdot 10^{-3}$	$2 \cdot 10^{-3}$	$58 \cdot 10^{-3}$	$6 \cdot 10^{-3}$	$2 \cdot 10^{-3}$	$17 \cdot 10^{-3}$	$9 \cdot 10^{-3}$
Triptofano	$5 \cdot 10^{-3}$	0.31	0.31	$1 \cdot 10^{-3}$	$45 \cdot 10^{-3}$	$5 \cdot 10^{-3}$	ND	$36 \cdot 10^{-3}$	$7 \cdot 10^{-3}$

bentonita también ayuda a disminuir la concentración de aminas biógenas ya que la bentonita produce una precipitación de las proteínas y aminoácidos e incluso de las aminas si éstas ya están cuando se aplica el tratamiento (Peynaud, 1989).

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 aminas presentes en el vino. Así, pH bajos, concentraciones elevadas de SO₂ o de etanol en el vino y la inoculación de cultivos seleccionados seguros van 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 aminas.

Según hemos apuntado previamente las bacterias lácticas parecen ser los principales responsables en la formación de aminas biógenas en vinos, es por ello que vamos a profundizar en el estudio de las mismas.

4. Las bacterias lácticas en el vino

4.1 Definición y ecología

Las bacterias lácticas se caracterizan por su carácter Gram (+) y catalasa negativo, por poseer una morfología bacilar, cocoide o cocobacilar y dar agrupaciones tales como parejas, cadenas o tétradas. Son anaerobios facultativos y producen ácido láctico a partir de la glucosa por vía homo o heterofermentativa.

Las bacterias lácticas relacionadas con el proceso de vinificación se encuentran ya presentes en la uva en una concentración de unas 100 células/gramo (Lafon – Lafourcade y cols. 1983), inferior a la de bacterias acéticas y levaduras. A lo largo de la fermentación la concentración de las bacterias lácticas disminuye como consecuencia de la competencia con levaduras y la sensibilidad al SO₂ y al etanol. Generalmente, tras la fermentación alcohólica el número de bacterias lácticas puede aumentar hasta 10⁷-10⁸ ufc/mL y, como consecuencia, se produce la fermentación maloláctica. Varios autores han demostrado que en mostos recién estrujados y durante los primeros momentos de la fermentación alcohólica, se encuentran especies homofermentativas, como *Lactobacillus mali*, y heterofermentativas facultativas o estrictas, tales como *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum* y *Leuconostoc mesenteroides* (Chalfan y cols. 1977; Maret

Introducción

y Sois, 1977 y 1979; Costello y cols. 1983; Lafon-Lafourcade y cols. 1983; Davis y cols. 1986; Pardo, 1987; Rodas y cols. 2003). Conforme la fermentación progresa los lactobacilos homofermentativos van cediendo paso a especies de lactobacilos heterofermentativos estrictos tales como *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus hilgardii*, *Lactobacillus fructivorans*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus cellobiosus*, y a cocos tales como *Pediococcus parvulus*, *Pediococcus damnosus* y *Oenococcus oeni* (Pan y cols. 1982; Davis y cols. 1986; Pardo y Zúñiga, 1992). La especie más frecuentemente aislada en vinos acabados es esta última, y generalmente es la responsable de la fermentación maloláctica. Sin embargo, en algunos casos se ha observado que *Lactobacillus plantarum* y *Pediococcus* se desarrollan en esta etapa y por tanto son las que transforman el ácido málico en ácido láctico (Pan y cols. 1982; Chalfan y cols. 1977; Costello y cols. 1986a y 1986b; Calero, 1993). Otras especies se han aislado con menos frecuencia durante el proceso de vinificación: *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus leichmannii* (Fornachon, 1957; Amerine y Kunkee, 1968). Recientemente se han descrito dos nuevas especies de lactobacilos que se han aislado de vinos parcialmente fermentados: *Lactobacillus kunkee* (Edwards y cols. 1998) y *Lactobacillus nagelii* (Edwards y cols. 2000) (Tabla 4).

TABLA 4. Principales bacterias lácticas de mostos y vinos.

Géneros	Naturaleza de la fermentación	Especies	Naturaleza del ácido láctico
<i>Pediococcus</i>	Homofermentativo	<i>P. damnosus</i>	L(+) D(-)
		<i>P. parvulus</i>	L(+) D(-)
		<i>P. pentosaceus</i>	L(+) D(-)
		<i>P. acidilactici</i>	L(+) D(-)
<i>Leuconostoc</i>	Heterofermentativo	<i>L. mesenteroides</i>	D(-)
<i>Oenococcus</i>	Heterofermentativo	<i>O. oeni</i>	D(-)
<i>Lactobacillus</i>	Homofermentativo	<i>Lb. mali</i>	L(+) ó L(+) D(-)
	Heterofermentativo facultativo	<i>Lb. casei</i>	L (+)
	Heterofermentativo	<i>Lb. plantarum</i>	L(+) D(-)
		<i>Lb. brevis</i>	L(+) D(-)
		<i>Lb. buchneri</i>	L(+) D(-)
		<i>Lb. fermentum</i>	L(+) D(-)
		<i>Lb. fructivorans</i>	L(+) D(-)
		<i>Lb. hilgardii</i>	L(+) D(-)
		<i>Lb. delbrueckii</i>	L(+) D(-)
		<i>Lb. trichodes</i>	L(+) D(-)
		<i>Lb. nageli</i>	L(+) D(-)
<i>Lb. kunkee</i>	L(+) D(-)		

4.2 Metabolismo de sustratos del vino por las bacterias lácticas

Las bacterias lácticas pueden ser beneficiosas o perjudiciales para los vinos dependiendo del momento en el que se desarrollan y de los sustratos a los que atacan.

Las bacterias lácticas son capaces de utilizar una gran cantidad de sustratos presentes en mostos y vinos, tales como azúcares, ácidos orgánicos, aminoácidos, proteínas, etc., dando lugar a compuestos beneficiosos desde el punto de vista organoléptico pero también a alteraciones importantes.

4.2.1 Metabolismo de azúcares

Los azúcares son la principal fuente de carbono y energía para las bacterias lácticas y éstos son catabolizados por la vía fermentativa. En el mosto de uva se encuentran principalmente glucosa y fructosa y también pequeñas cantidades de disacáridos y pentosas (Ribéreau-Gayon, 2000).

Las bacterias lácticas pueden exhibir dos tipos de metabolismo respecto a las hexosas: homofermentativo y heterofermentativo: El metabolismo homofermentativo se caracteriza porque las hexosas son fermentadas vía Embden-Meyerhof, dando lugar, exclusivamente, a dos moles de ácido láctico por cada mol de hexosas metabolizadas. El metabolismo heterofermentativo supone el catabolismo de las hexosas mediante la vía del 6-fosfogluconato, dando lugar a 1 mol de CO₂, 1 mol de etanol (o ácido acético) y 1 mol de ácido láctico.

Cuando las bacterias lácticas se desarrollan en mosto o en vino donde quedan azúcares ocurre una alteración denominada acidificación, que se caracteriza por un incremento significativo de la concentración de ácido láctico y de ácido acético. Además, las bacterias heterolácticas tienen la capacidad de transformar la fructosa presente en el vino en manitol dando lugar a una alteración llamada vuelta manítica que se caracteriza por conferir al vino un gusto agridulce.

4.2.2 Metabolismo de ácidos orgánicos

Los principales ácidos orgánicos presentes en los mostos son ácido tartárico (2-6 g/L), ácido málico (1-6.5 g/L), ácido cítrico (0.5-1 g/L) y ácido ascórbico y glucónico en cantidades inferiores a las anteriores. Como consecuencia de la actividad microbiana

Introducción

durante la fermentación de los mostos, otros ácidos pueden aparecer, como el pirúvico, L o D-láctico, succínico, acético, citramálico, oxalacético, y fumárico. Las bacterias lácticas degradan mayoritariamente el ácido málico y el ácido cítrico y, con mucho menor frecuencia, el ácido tartárico. La capacidad para degradar los dos primeros ácidos está extendida entre las especies que proliferan tras la fermentación alcohólica y esta degradación provoca numerosos e importantes cambios organolépticos en el vino.

La fermentación maloláctica consiste en la descarboxilación del L-málico dando lugar a ácido láctico. Al enzima que cataliza esta reacción se le denominó enzima maloláctico y que está presente en todas las especies de bacterias lácticas de vino (Henick-Kling 1993).

El ácido cítrico se escinde en una molécula de oxalacetato y otra de acetato mediante la citrato liasa. El oxalacetato da lugar a piruvato que es fuente de compuestos acetoínicos tales como: diacetilo, acetoína, y 2, 3-butanodiol, siendo el primero de ellos particularmente importante desde el punto de vista organoléptico, dando aroma a mantequilla. Este aroma es beneficioso en los vinos siempre y cuando no sobrepase determinados límites.

Aunque la capacidad de degradar ácido tartárico no está muy extendida entre las bacterias lácticas, el metabolismo de este ácido siempre es perjudicial para el vino porque hace disminuir la acidez fija y aumentar la acidez volátil (vuelta tartárica).

4.2.3 Metabolismo de aminoácidos

Algunas bacterias lácticas también son capaces de metabolizar los aminoácidos que hay en el mosto o en el vino y de dar lugar a aminas biógenas o a precursores del carbamato de etilo, ambos productos son considerados peligrosos para la salud humana. La presencia de aminas biógenas es indeseable en los alimentos como ya hemos visto anteriormente. Por otro lado, el carbamato de etilo es considerado como un compuesto cancerígeno.

El catabolismo de aminoácidos por descarboxilación o desaminación por microorganismos anaerobios-fermentativos tiene gran importancia en la obtención de energía metabólica en medios pobres de nutrientes.

La descarboxilación de un aminoácido para dar su correspondiente amina y dióxido de carbono genera energía metabólica y regula el pH intracelular, gracias a un mecanismo común a una variedad de descarboxilasas, como por ejemplo la descarboxilación del

aspartato (Abe y cols. 1996; Konings y cols. 1995) y la de la histidina (Molenaar y cols. 1993). En el citoplasma, la descarboxilación de un aminoácido consume un protón. El transporte de la correspondiente amina fuera de la célula provocaría una extrusión protónica indirecta (Maloney y cols. 1992), la cual puede ser usada para regular el pH intracelular. Además, el transporte de la amina genera un gradiente electroquímico que puede ser utilizado por la célula para realizar reacciones que consumen energía tales como el transporte de nutrientes o la generación de ATP vía una F_1F_0 ATPasa (Konings y cols. 1997). Otras aminas como tiramina, feniletilamina, cadaverina y triptamina se generan de manera similar y provocan los mismos efectos que las dos anteriores (Rice y cols. 1976), por tanto la generación de energía metabólica por el antiporte precursor/producto y la descarboxilación aparece con frecuencia en el catabolismo de aminoácidos.

De entre los aminoácidos presentes en el vino, la arginina es el aminoácido más abundante, hasta hace poco solo se conocían dos vías implicadas en el catabolismo de la arginina. Una de ellas es la encontrada en cepas de *Lactobacillus fermentum* en la que ha sido demostrada la producción de óxido nítrico desde arginina. Morita y cols. (1997) postulan que esta reacción es catalizada por una óxido nítrico sintetasa que puede también producir citrulina como un subproducto. Una vía más común para el catabolismo de bacterias lácticas es la de la arginina deiminasa (ADI) (Manca de Nadra y cols. 1982; Cunin y cols. 1986; Konings y cols. 1995, Liu y cols. 1995). Esta vía resulta en la conversión de arginina en el interior celular a citrulina y amonio mediante el enzima arginina deiminasa, posteriormente la citrulina es transformada en carbamilfosfato y ornitina; la ornitina sale al exterior celular a través de un antiportador arginina/ornitina situado en la membrana plasmática. El carbamilfosfato mediante la actividad de la carbamatoquinasa da lugar a la formación de amonio y dióxido de nitrógeno con la consiguiente generación de energía en forma de ATP. La ornitina se transforma en putrescina mediante una reacción de descarboxilación llevada a cabo por la ornitina descarboxilasa. El catabolismo de arginina por bacterias lácticas del vino se ha relacionado con la producción de etilcarbamato, una sustancia cancerígena que se forma a partir de la citrulina o de la urea (Liu y cols. 1995). Además de estas dos vías se ha descrito una tercera vía de catabolismo de la arginina. Ésta consiste en la transformación de arginina en agmatina vía la arginina descarboxilasa, la agmatina a su vez puede seguir dos rutas, una de ellas es la transformación en putrescina directamente mediante la agmatina deiminasa y la otra es la formación de N-carbamoilputrescina y posteriormente en putrescina por la acción secuencial de la agmatinasa y la N-carbamoilputrescina hidrolasa.

4.3. Producción de aminas biógenas en vino por bacterias lácticas

A pesar de que Lafon-Lafourcade (1975) y Ough y cols. (1987) negaron la posibilidad de que fueran las bacterias lácticas los microorganismos que generaban histamina en el vino, al no observar un aumento de esta amina tras la fermentación maloláctica, otros autores han demostrado lo contrario. Así, Aerny (1985) y Cilliers y van Wyk (1985) sí observaron un aumento de la concentración de histamina durante la fermentación maloláctica, por lo que dedujeron que eran las especies responsables de esta fermentación las que producen esta amina. Delfini (1989) relacionó los altos niveles de histamina en vinos con la contaminación con *Pediococcus*. Normalmente los *Pediococcus* están presente en vino en un bajo número, por lo que era de esperar que no fueran los únicos responsables de la presencia de histamina en vino. Posteriormente se han descrito cepas de *Oenococcus* productoras de histamina (Lonvaud-Funel y Joyeux 1994; Le Jeune y cols. 1995; Coton y cols. 1998 y Guerrini y cols. 2002), aunque otros autores como Moreno-Arribas y cols. (2003), no encuentran cepas de esta especie en sus estudios que presenten esta capacidad.

También se ha estudiado la capacidad de producir otras aminas, como la tiramina por los microorganismos del vino y se ha observado que *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus hilgardii* y *Leuconostoc mesenteroides* son capaces de producir esta amina (Moreno-Arribas y cols. 2000 y 2003). En otro substrato, Choudhury y cols. (1990) encontraron que una cepa de *Oenococcus oeni* era la responsable de la producción de tiramina en zanahorias fermentadas, sin embargo no hay ninguna referencia de que esta especie la produzca en vinos u otros productos alimentarios. Masson y cols. (1996) encontraron cepas productoras de tiramina en productos cárnicos pertenecientes a las especies de *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus sakei* y *Pediococcus pentosaceus*. Una amina menos estudiada hasta el momento, ha sido la feniletilamina. En los trabajos de Moreno-Arribas y cols. (2000), Bover-Cid y cols. (2001) y González del Llano y cols. (2003) se evidenció la producción de esta amina simultáneamente a la de tiramina en *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus brevis* y *Lactobacillus hilgardii*.

Guerrini y cols. (2002) y Moreno-Arribas y cols. (2003) encontraron en vino cepas de *Oenococcus oeni* y *Lactobacillus buchneri* respectivamente, capaces de producir putrescina. Arena y cols. (2001) también han detectado la producción de putrescina a partir de agmatina y ornitina por la cepa de *Lactobacillus hilgardii* X₁B aislada de vino. En

productos cárnicos también se han encontrado bacterias lácticas productoras de putrescina, así Bover-Cid y cols. (2001) encontraron una cepa de *Lactobacillus brevis* y tres de *Lactobacillus curvatus* productoras de esta amina.

La producción de cadaverina y triptamina por parte de bacterias lácticas de origen enológico ha sido mucho menos estudiada que las anteriores. Guerrini y cols. (2002) encuentran cepas de *Oenococcus oeni* productoras de cadaverina. Otros trabajos han tratado la producción de triptamina y cadaverina por bacterias lácticas aisladas de alimentos fermentados diferentes al vino, destacaremos entre ellos los de Bover-Cid y Holzapfel (1999) y Bover-Cid y cols. (2001), en los que describen cepas de *Lactobacillus curvatus* productoras de triptamina y cepas de *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus curvatus* y *Lactobacillus sp.* productoras de cadaverina.

4.4 Factores que influyen sobre la producción de histamina y tiramina por parte de las bacterias lácticas

Como ya dijimos antes, todos los factores que influyen sobre el crecimiento de las bacterias lácticas van a influir también en la producción de aminas biógenas. Además de este efecto sobre el crecimiento muchos de estos factores influyen directamente sobre el proceso de producción de aminas. Los estudios de este tipo se han desarrollando fundamentalmente en la histidina descarboxilasa y la tirosina descarboxilasa.

Lonvaud-Funel y Joyeux (1994) estudiando la producción de histamina por cepas de *Leuconostoc oenos* (*Oenococcus oeni*) observaron que los niveles de histamina encontrados en vinos dependían de la concentración de precursor libre en el mosto y también de la lisis de las levaduras, que enriquecía al medio en histidina. Estos autores también aislaron la cepa de *Leuconostoc oenos* 9204 (*Oenococcus oeni*) y analizaron su habilidad para producir histamina en medio sintético, observando que producía mayores cantidades de histamina en los medios nutricionalmente más pobres (sin glucosa, ni ácido málico). Rollan y cols. (1995) observaron que la producción de histamina aumentaba con dosis de etanol inferiores al 12%, a partir de aquí disminuía. Estos autores también observaron que el ácido láctico y ácido cítrico disminuían la producción de histamina por bacterias lácticas.

Se pudo profundizar más en la influencia de factores físico-químicos sobre la actividad histidina descarboxilasa una vez que se purificó y caracterizó el enzima, ambas cosas fueron llevadas a cabo por Coton y cols. (1998). Se trata de un enzima alostérico,

Introducción

con un alto grado de cooperatividad que presentaba un motivo fosfato de piridoxal como grupo prostético anclado de forma covalente. La purificación total hasta su homogeneidad electroforética demostró que se trata de un enzima constituido por dos subunidades α y β con un peso molecular de 28000 y 11000 Da respectivamente. El peso molecular de la enzima nativa es de 190000 Da, consistente de una estructura hexamérica $(\alpha \beta)_6$. A pH 4.8 se encuentra su pH óptimo siguiendo una cinética de Michaelis-Menten, la afinidad del enzima por la histidina varía en función del pH, así a pH 7.6 la actividad es menor y el enzima sigue una cinética sigmoideal. Los parámetros cinéticos de este enzima son muy parecidos al de otros enzimas HDC bacterianos descritos. No se han encontrado actividades descarboxilasas secundarias con otros aminoácidos tales como lisina, triptófano, fenilalanina, tirosina y ornitina. Coton y cols. (1998) encontraron que la histamina era un inhibidor competitivo de la HDC, también observaron que el ácido cítrico y el ácido láctico tenían un efecto inhibitorio sobre la actividad HDC en extractos celulares, siendo mucho más importante la inhibición por el ácido cítrico. Coton y cols. (1998) observaron que el enzima HDC era muy estable, estos autores pudieron comprobar cómo la actividad HDC se mantenía en vinos donde las bacterias habían muerto y liberado al medio el enzima HDC. Farías y cols. (1993) encontraron que la máxima actividad del enzima ocurría a 37°C y a pH 4, que el SO₂ y el etanol inhibían y que el ácido málico y cítrico aumentaban esta actividad. Por el contrario, Rollan y cols. (1995) no observaron ningún efecto del etanol sobre la actividad del HDC pero sí comprobaron que el ácido láctico y ácido cítrico disminuían la producción de histamina por bacterias lácticas.

En referencia a la producción de tiramina por bacterias lácticas Moreno-Arribas y Lonvaud-Funel (1999) observaron cómo la tiramina, el ácido cítrico, el ácido láctico y las concentraciones de 12% de etanol o superiores inhibían la producción de esta amina. También observaron cómo la mayor producción de tiramina ocurría a pH 5. Masson y cols. (1997) estudiaron los efectos de factores físico-químicos y de la fase de crecimiento de la bacteria sobre la producción de tiramina por parte de *Carnobacterium divergens* aislado desde carne de cerdo, llegando a las conclusiones de que la máxima producción de tiramina ocurría durante la fase estacionaria, y que un pH inicial inferior a 5, la glucosa y las temperaturas en torno a los 23 °C favorecían la producción de esta amina. Mientras que una concentración del 10% de cloruro sódico la inhibía. Sin embargo, la producción de tiramina no se vio afectada por el nitrato potásico ni por el oxígeno libre. Moreno-Arribas y Lonvaud-Funel (1999) también estudiaron las principales características del enzima tirosina descarboxilasa sobre extractos celulares de *Lactobacillus brevis*. La actividad TDC

era dependiente del piridoxal 5-fosfato y mostraba un pH óptimo de 5, una mayor afinidad por la tirosina que por otros sustratos como la L-DOPA y su actividad era inhibida por el glicerol, L-mercaptoetanol, tiramina, ácido cítrico y ácido láctico. Posteriormente la tirosina descarboxilasa de *Lactobacillus brevis* IOEB 9809 fue parcialmente purificada y caracterizada (Moreno-Arribas y Lonvaud-Funel, 2001) confirmándose los datos anteriores hallados en extractos celulares. Previamente Borresen y cols. (1989) ya habían hecho lo mismo sobre *Enterococcus faecalis*, encontrando que ambas enzimas requieren el cofactor piridoxal-fosfato para su actividad, que muestran parámetros cinéticos similares y que aparecen como dímeros de 70-75 KDa.

4.5 Métodos de análisis de la capacidad productora de aminas por parte de microorganismos: Detección y cuantificación

Hasta el momento se han descrito varias metodologías para detectar y cuantificar la capacidad de producir aminas por bacterias lácticas aisladas de alimentos fermentados. Entre estos métodos de detección se encuentran los de detección en placa y los de detección molecular. El método de cuantificación que se ha empleado para el estudio de la capacidad aminobiogénica de las bacterias lácticas es la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y también un método enzimático para evaluar la capacidad de producción de histamina por bacterias aisladas de pescado (López-Sabater y cols. 1994).

Moller, (1954), Niven y cols. (1981), Choudhury y cols. (1990), Joosten y Northold, (1989), Maijala, (1993) y Bover-Cid y Holzapfel, (1999) han desarrollado varios métodos de detección de cepas productoras de histamina y tiramina procedentes de carne, zanahorias fermentadas y queso. Estos métodos se basan en un ensayo de tipo bioquímico que implica el uso de un medio sólido que contiene el precursor de la amina a investigar y un indicador de pH. Dado que la formación de aminas a partir de aminoácidos supone una elevación del pH del medio, esto quedará reflejado en un cambio de color del indicador de pH.

Los métodos de detección molecular se basan en el diseño de cebadores específicos para las secuencias de los genes que codifican para las descarboxilasas responsables de la formación de aminas. Hasta el momento se han desarrollado tres, uno que permite detectar la presencia del gen *hdc* codificante para la histidina descarboxilasa (Le Jeune y cols. 1995), otro del gen *tyrDC* codificante para la tirosina descarboxilasa (Lucas y Lonvaud-

Introducción

Funel, 2002 y Coton y cols. 2004) y otro del gen *odc* codificante para la ornitina descarboxilasa (Marcobal y cols. 2004).

Le Jeune y cols. (1995) compararon la secuencia de nucleótidos del gen *hdcA* de la cepa de *Lactobacillus* sp.30A (Vanderslice y cols. 1986) y de *Clostridium perfringens* (Van Poelje y Snell, 1985) y la secuencia de aminoácidos de la histidina descarboxilasa de estos dos microorganismos junto con la de *Lactobacillus buchneri* (Huynh y Snell, 1985) y *Micrococcus* (Prozoraski y Jornvall 1975). Estos estudios de alineamientos mostraron la existencia de un alto grado de similaridad entre los genes *hdc* y de las proteínas de las diferentes bacterias lácticas, lo que les permitió diseñar cebadores específicos para la detección de este gen.

Lucas y Lonvaud-Funel, (2002) a partir de la microsecuenciación del enzima tirosina descarboxilasa de *Lactobacillus brevis* diseñaron cebadores para la detección del gen *tyrDC* de *Lactobacillus brevis*. Posteriormente Connil y cols. (2002) a partir de una librería de mutantes consiguieron secuenciar el operon *tdc* de *Enterococcus faecalis*. Coton y cols. (2004) secuenciaron el *tyrDC* de *Carnobacterium divergens* y con las secuencias ya conocidas del gen *tyrDC* de *Enterococcus faecalis* y de *Lactobacillus brevis* diseñaron cebadores específicos para la detección de este gen en bacterias lácticas.

En lo referente a la detección molecular de cepas de bacterias lácticas portadoras del gen de la ornitina descarboxilasa citaremos el trabajo de Marcobal y cols. (2004) que identificaron el gen de la ornitina descarboxilasa en una cepa de *Oenococcus oeni* y desarrollaron cebadores específicos para la detección de este gen. Sería necesario encontrar cepas de diferentes géneros de bacterias lácticas portadoras de este gen con la finalidad de demostrar la aplicabilidad de los cebadores desarrollados por Marcobal y cols. (2004), aunque este carácter parece poco frecuente entre las bacterias lácticas.

Es importante poseer métodos precisos de análisis que nos permitan determinar la concentración de aminas biógenas en vinos y también en otros alimentos, además estos métodos van a poder ser utilizados para cuantificar la capacidad de producción de aminas biógenas por parte las bacterias lácticas.

La mayor parte de los métodos de cuantificación de aminas se han centrado en la histamina porque se le ha considerado la amina más perjudicial para la salud humana y porque es la única para la que se han establecido límites de concentración máximos. Guraya y Koehler en 1991 presentaron el método de cromatografía en capa fina (TLC) para la determinación de histamina en comida de gatos. Posteriormente, Lerke y cols. (1983) presentaron un método enzimático, modificado posteriormente por López-Sabater

(1993, 1994) y Rodríguez-Jerez (1994) que se utilizó para la determinación de histamina en pescado y para evaluar en medio sintético la capacidad de producción de histamina por bacterias aisladas de pescado. En los últimos años han aparecido métodos ELISA comerciales para el análisis de histamina en vino.

Para la cuantificación de la tiramina en vino, Rivas-Gonzalo y cols. en 1979 utilizaron la técnica de espectrofluorimetría para cuantificar esta amina revelada en cromatografía en capa fina.

Las dos aminas mencionadas, así como el resto de aminas existentes, pueden ser cuantificadas mediante HPLC (Busto, 1996; Lethonen, 1996; Mafra, 1999; Romero y cols. 2000; Kutlán y Molnár-Perl, 2003; Paleólogos y Kontominas 2004). Aunque la técnica de HPLC es la más utilizada y la que ofrece mayores niveles de sensibilidad y de precisión, debemos considerar que se trata de una técnica que no permite analizar simultáneamente un amplio número de muestras en cortos periodos de tiempo, que requiere personal especializado y supone una elevada inversión en el equipo. El HPLC también puede ser utilizado para la cuantificación para cuantificar la producción de aminas biógenas en vinos o medios sintéticos por parte de las bacterias.

Suiza ha establecido una concentración máxima de 10 mg/L de histamina en vino (OSEC, 2002) como valores tolerables para la salud humana, mientras que otros países recomiendan valores máximos inferiores como Alemania (2 mg/L) (Millies y Zimlich 1988), Belgica (5-6 mg/L) y Francia (8 mg/L) (Millies y Zimlich 1988 y Biodyn AG/SA); aunque de momento son solo recomendaciones podrían convertirse en un futuro próximo en valores máximos legalmente establecidos.

No se han impuesto límites máximos permitidos sobre el resto de aminas biógenas, aunque dada la importancia que presenta la tiramina sobre la salud, es más que probable la pronta aparición de recomendaciones o reglamentaciones sobre valores máximos permitidos.

Objetivos

- 1. Desarrollo de un método enzimático para la cuantificación de aminas biógenas en vinos.**
- 2. Estudio de la incidencia de aminas biógenas en vinos y de los factores que influyen en su concentración.**
- 3. Caracterización de la capacidad de producción de histamina por bacterias lácticas de origen enológico.**
- 4. Caracterización molecular del operón de la tirosina descarboxilasa y estudio de la incidencia de la producción de tiramina y feniletilamina por bacterias lácticas origen enológico.**
- 5. Determinación de los factores que intervienen en la producción de histamina.**

Landete, J.M., Ferrer, S. y Pardo, I. 2004. Improved enzymatic method for the rapid determination of histamine in wine. Food Add. Contam. 21, 1149-1154.

Capítulo 1

Improved enzymatic method for the rapid determination of histamine in wine

J. M. Landete, S. Ferrer and I. Pardo*

ENOLAB — Laboratori de Microbiologia Enològica, Departament de Microbiologia i Ecologia, Facultat de Biologia, Universitat de València, c/ Dr. Moliner 50, E-46100 Burjassot-València, Spain

(Received 22 July 2004; revised 20 October 2004; accepted 22 October 2004)

Fermented foods are frequently contaminated by histamine generated by microorganisms possessing histidine decarboxylase activity. The ingestion of large amounts of histamine can cause serious toxicological problems in man. Thus, it becomes important to set a reliable method for rapid histamine quantification in foods. The detection of bacteria exhibiting histidine decarboxylase activity is also important to estimate the risk of contamination of food. Previous enzymatic methods used to quantify histamine in fish gave erroneously high values due to interference when applied to wine. A new enzymatic method is described that allows the direct determination of histamine concentrations in this type of sample. It can be used for the detection of histamine in synthetic media, grape must or wine (white, rosé, red) without polyphenols or sugar interferences. This new enzymatic method shows a good correlation ($R^2=0.996$, $p<0.001$) between the histamine concentrations and absorbances in the interval 0.4–160 mg l⁻¹. Comparison between this enzymatic method and a high-performance liquid chromatography method showed a high correlation ($R^2=0.9987$, $p<0.001$). A miniaturized enzymatic method is also proposed, which is particularly useful when high numbers of samples must be analysed.

Keywords: histamine, enzymatic method, high-performance liquid chromatography (HPLC), wine and grape must

Introduction

Biogenic amines are basic nitrogenous compounds formed mainly by decarboxylation of the corresponding amino acid through substrate-specific enzymes present in microorganisms (Ten Brink *et al.* 1990). Several toxicological problems (nausea, respiratory distress, hot flush, sweating, heart palpitations, headache, bright red rash, oral burning, and hyper- or hypotension) resulting from the ingestion of food containing relatively high levels of biogenic amines have been reported (Ten Brink *et al.* 1990, Mariné-Font *et al.* 1995).

Histamine levels above 500–1000 mg kg⁻¹ food are considered potentially dangerous to human health. This statement is based on the concentration found in food products involved in histamine poisoning (Taylor 1983). Although the toxicity of individual biogenic amines in general is beyond all doubt, it is very difficult to determine the exact toxicity threshold of these compounds. For instance, toxic dose is strongly dependent on the efficiency of detoxification systems present in man, which vary considerably among individuals, and on the presence of other compounds present in food (Taylor 1983), including other biogenic amines and ethanol (Sessa *et al.* 1984). A maximum limit of 100 mg histamine kg⁻¹ in food and 2 mg l⁻¹ in alcoholic beverage have been suggested. The consumption of alcoholic beverages results in an increased sensitivity towards histamine because ethanol diminishes the efficiency of the natural detoxification system in human (Sessa *et al.* 1984). Switzerland has established 10 mg l⁻¹ as a tolerable value of histamine in wine. Thus, it becomes important to establish a method for accurate and rapid histamine quantification in foods.

In addition to the quantification of this amine, it is also important in food processing to detect spoiling bacteria able to produce amines in order to establish the potential risk of histamine generation. Several groups of microorganisms, mainly Enterobacteriaceae,

*To whom correspondence should be addressed.
e-mail: Isabel.Pardo@uv.es

Pseudomonas spp., enterococci and other lactic acid bacteria have been reported as biogenic amine producers (Halász *et al.* 1994). The most common idea was that *Pediococcus* spp. are responsible for histamine production in wine, and the presence of these bacteria was related to a bad wine-making control. However, some *Oenococcus*, *Leuconostoc* and *Lactobacillus* strains have also been reported as histamine producers (Coton *et al.* 1988, Lonvaud-Funel 2001).

Histamine is measured mainly by means of HPLC (Lehtonen 1996, Mafra *et al.* 1999), spectrofluorimetry (López-Sabater *et al.* 1994), ELISA (Ruby *et al.* 2002), and thin layer chromatography (TLC) (Guraya and Koehler 1991). A previous enzymatic method to quantify histamine in fish was reported by Lerke *et al.* (1983) and modified by López-Sabater *et al.* (1993) and Rodríguez-Jerez *et al.* (1994). When these enzymatic methods were applied to quantification of histamine in our samples (musts and wines), many false-positives were recorded, and the observed correlation between absorbances and standard histamine concentrations was very low. The objective of this work was to establish what conditions could improve the accuracy and sensitivity of the quantifications and to adapt these conditions to quantify histamine in musts and wines.

Materials and methods

Wines, buffer and synthetic medium used

The wines used came from white Macabeo (average pH 3.35), rosé Bobal (average pH 3.6) and red

Tempranillo (average pH 3.65) varieties from Utiel-Requena, Spain. The grape must samples came from Macabeo (white grape must) and Bobal (red grape must).

The buffer pH 6.8 showed in table 1 was a phosphate buffer (0.15 M KH_2PO_4 and Na_2HPO_4 , pH 6.8). The medium proposed by Maijala (1993) (H-MDB) for histamine production by lactic acid bacteria was also used by the histamine determination. This medium was supplemented with 0.25% pyridoxal 5-phosphate (H-MDBmod) included as a codocarboxylase factor for its enhancing effect on the amino acid decarboxylase activity (Snell *et al.* 1990).

Enzymatic determinations of histamine concentration

The enzymatic test was based on the sequential activity of two enzymes: diamine oxydase (DAO), that catalyses the breakdown of histamine in imidazole acetaldehyde, ammonia, and hydrogen peroxide; and peroxidase (HRP) that, in the presence of hydrogen peroxide, produces a change of colour in the chromogen: colourless in the reduced form and coloured in the oxidated form. Both reactions proceed at 37°C in a thermostatic water bath. Incubation times from 1 to 7 h and wavelengths ranging from 350 to 800 nm in a DU-7 spectrophotometer (Beckman Instruments, Inc., Palo Alto, CA, USA) were tested to set the best conditions for histamine quantification. Once these conditions were established, routine readings of absorbances were made by a colorimeter (BIO-RAD SmartSpec™ 3000, Hercules, CA, USA). The concentrations of DAO (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA) and HRP

Table 1. Optimized conditions for histamine enzymatic quantification in buffer, H-MDBmod medium, grape must, white wine and red wine pre-treated with 800 mg l⁻¹ PVP.

	Buffer pH 6.8	H-MDBmod	Must	White wine	Red wine
[DAO] (UI ml ⁻¹)	0.35	0.35	0.70	0.70	0.70
[HRP] (UI ml ⁻¹)	17.25	17.25	34.50	34.50	34.50
[DAB] (mg ml ⁻¹)	0.21	0.21	0.21	0.21	0.21
Phosphate buffer (M)	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15
Incubation time (h)	1.33	3	4	5	5
λ (nm)	400	400	400	400	400
Linearity range (mg l ⁻¹)	0.3–240	0.4–160	0.4–160	0.5–150	0.5–160
R ²	0.996	0.995	0.997	0.993	0.994
LOD (mg l ⁻¹)	0.3	0.4	0.5	0.5	0.5

R², squared correlation coefficient; LOD, limit of detection.

Table 2. Differences between the method of López-Sabater *et al.* (1993) and the conventional and miniaturized enzymatic methods proposed in the present paper.

	López-Sabater <i>et al.</i> (1993)	Present work	Miniplates
Chromogen	LCV	DAB	DAB
False-positives	Yes	No	No
Maximum sensitivity (mg l^{-1})	3	0.5	1.4
Linearity range (mg l^{-1})	3–30	0.5–200	1.4–150
Must and wine [HRP] (UI ml^{-1})	Not possible	Possible	Possible
Incubation time (h)	0.7	0.7 or 1.4	1.4
Type of regression	2	1.33–5.5	1–4
	Linear	logarithmic	logarithmic

(Merck, Darmstadt, Germany) and the buffer phosphate for the analysis of histamine in synthetic media were prepared in bi-distilled water, according to López-Sabater *et al.* (1994). The concentrations of DAO and HRP used for grape must and wine analysis ranged from 0.17 to 0.95 UI ml^{-1} and from 8.6 to 43.1 UI ml^{-1} , respectively. The original chromogen used by Lerke *et al.* (1983), leucocrystal violet (LCV), was substituted by 3,3-diaminobenzidine (DAB) (Sigma) (table 2). A concentration of 0.21 mg ml^{-1} DAB was prepared in bi-distilled water.

The reaction mixture consisted of 0.4 ml buffer pH 6.8, 0.2 ml DAO (0.35 or 0.7 UI ml^{-1}), 0.2 ml HRP (17.25 or 34.5 UI ml^{-1}), 0.09 ml DAB (0.21 mg ml^{-1}) (table 1) and 0.2 ml of samples. The DAO and HRP concentrations depend on the used media (table 1).

Appropriate amounts of histamine dihydrochloride (Sigma) were weighed and dissolved in phosphate buffer pH 6.8, H-MDBmod, grape must and wine to obtain standard concentrations ranging from 0.2 to 300 mg l^{-1} . The wines used for the optimization of the enzymatic method were a white Macabeo, a rosé Bobal and a red Tempranillo, and the grape musts came from Macabeo (white must) and Bobal (red must). To evaluate the repeatability of the method, five independent enzymatic reactions of each histamine concentration were performed, and then the repeatability standard deviation was calculated.

In order to reduce the high background coloration produced by addition of red wines samples to the reaction mixture, we treated these wines with polyvinyl-pyrrolidone (PVP) and polyvinyl-polypyrrolidone (PVPP). We tested two concentrations of PVP and PVPP (800 and 1600 mg l^{-1}) to choose the best conditions.

The enzymatic method described above can be adapted to a miniaturized miniplate (96 wells) reaction system. The concentrations of DAO, HRP, phosphate buffer and DAB were the same, as described in table 1. The volumes per well were 40 μl DAO, 40 μl HRP, 80 μl buffer pH 6.8, 22.5 μl DAB and 40 μl sample. The incubation times were 1 h for buffer pH 6.8, 2 h H-MDBmod, 3 h for must, and 3.5 h for white and red wines at 37°C. Miniplates were read at 400 nm wavelength in a Multiskan Ascent (Labsystems, Helsinki, Finland) spectrophotometer.

To verify that the enzymatic method proposed was robust, the histamine concentration was analysed in 150 different wines (white, rosé and red) and 70 grape musts (white and red).

Quantification of histamine by HPLC

Samples of wine, grape musts and synthetic media were centrifuged (13 000 rpm, 8 min), filtered through a membrane (regenerate cellulose, 0.45- μm pore size) and derivatized with orthophthaldehyde (OPA). Samples were then injected into an HPLC system (Merck) equipped with a L-Intelligent pump, AS-2000A Autosampler, T-6300 column thermostat and a L-7485 LaChrom fluorescence spectrophotometer (all Merck-Hitachi, Berlin, Germany). An excitation wavelength of 335 nm and an emission wavelength of 450 nm were used. OPA reagent was prepared as follows: 50 mg OPA were dissolved in 2.25 ml methanol; 0.25 ml borate buffer 0.4 M (pH 10) and finally 0.05 ml mercaptoethanol were added. A gradient of solvents A and B was applied to a 100 RP-18 column (Merck-Hitachi) (25 cm \times 4 mm) as follows: 0–20 min, 40% B isocratic, 1.1 ml min^{-1} ; 20–

45 min, 40–85% linear gradient, 1.1 ml min^{-1} . Solvent A consisted of 2.268 g KH_2PO_4 and 14 968 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ adjusted to pH 5.8 with H_3PO_4 and filled with deionized water to 1 litre. Solvent B was 100% methanol.

Results

Optimization of factors for histamine quantification by an enzymatic method

The enzymatic method proposed by Sumner and Taylor (1989), then modified by López-Sabater *et al.* (1993) and Rodríguez-Jerez *et al.* (1994) used LCV. At the beginning of this work, LCV was used and it was observed that it was fast and easily oxidated in complex media. Therefore, we replaced the LCV by DAB, which did not show interference with the components of the culture broth, must or wine. The concentration of DAB was optimized to 0.21 mg ml^{-1} , where a better r^2 and a wider linearity range of the response were observed.

We could determine the best conditions to maximize sensitivity to obtain high linear correlation between optical density and histamine concentration and to cover a wide range of concentrations. It was observed that different concentrations of DAO, HRP and different incubation times are applied to different kinds of samples to obtain the optimum results (table 1).

Incubation times shorter than those presented in table 1 produced a diminution in r^2 , and a lower sensitivity of the method. Longer incubation times than those proposed produced colour saturation for the higher histamine concentrations, and thus the linearity remained only for the lower concentrations.

DAO and HRP concentrations lower than those shown in table 1 produced a diminution in r^2 , in the linearity range, and in the limit detection. Higher DAO and HRP concentrations allowed detecting very low histamine concentrations ($< 0.5 \text{ mg l}^{-1}$), though r^2 was bad (≤ 0.9) and the linearity range was narrow.

Phosphate buffer concentrations lower than 0.15 M affected negatively to the r^2 , the detection limit and the linearity range. Concentrations slightly higher than 0.15 M did not affect the results, but high

phosphate concentrations ($> 0.5 \text{ M}$) yielded turbidity in the reaction samples.

The optimal wavelength was set to 400 nm, as the maximum sensitivity was observed there. The use of wavelengths different to 400 nm, higher or lower, yielded poorer results. PVP and PVPP were shown to reduce the background absorbances obtained when samples of red wines were measured. The most efficient was PVP, which used at a concentration of 800 mg l^{-1} , achieves a similar decrease in absorbance to PVPP at higher concentration (1600 mg l^{-1}). The sensitivity of the enzymatic method for red wines depends on the product used for reduction of wine colour intensity: the sensitivity level is 0.5 mg l^{-1} histamine when PVP is used and 1 mg l^{-1} when PVPP is added. We observed linearity between concentrations and optical densities in the range $0.5\text{--}160 \text{ mg l}^{-1}$ histamine in red wine treated with PVP, and the calculated correlation, r^2 , was 0.994. Thus, a concentration of 800 mg l^{-1} PVP was chosen to reduce red wine colour. Neither PVP nor PVPP diminished histamine in control experiments.

As can be seen in table 1, when grape must and wine samples are analysed, the concentrations of DAO, HRP and the incubation times must be increased because the alcohol of wine inhibits the activity of DAO and HRP. In figure 1, the regression lines for standard histamine concentration prepared in buffer pH 6.8, H-MDBmod and wine can be observed. The linearity range and correlation (r^2) for phosphate buffer pH 6.8, H-MDBmod, must, red wine and white wine are showed in table 1.

The repeatability standard deviation of measurements was 1.0% for synthetic media and 2.7% for wine. The limit of detection (LOD) of the method was calculated using the equation proposed by Miller and Miller (1988). LOD is defined as the lowest concentration level of the element that an analyst can determine to be statistically different from an analytical blank. The LOD obtained for different media are shown in table 1.

The miniaturized enzymatic method allows one to analyse a high number of samples, at least 96 samples in a time less than 4 h. The sensitivity of this method for wines is slightly lower (1.4 mg l^{-1}) and the linearity range is slightly narrower (1.4 and 150 mg l^{-1}) than those of the conventional method (table 2). However, its main advantage is speed of analysis.

The HPLC method allows the quantification of the presence of histamine at levels lower than 0.1 mg l^{-1}

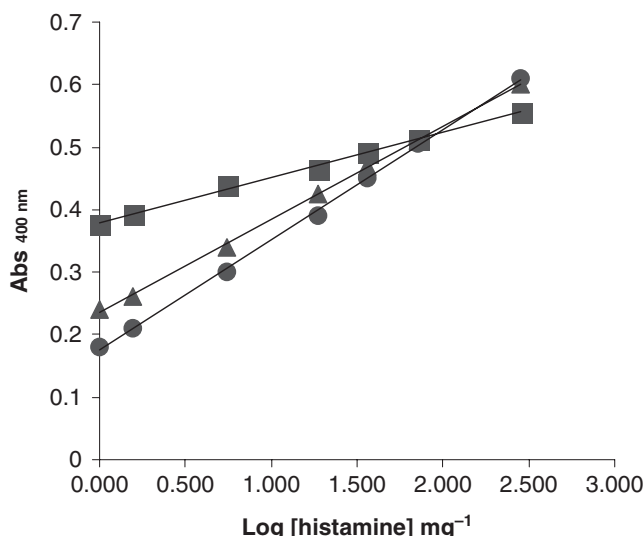


Figure 1. Regression lines obtained after plotting the logarithms of standard histamine concentration versus optical density from standard solutions prepared in phosphate buffer (●), H-MDBmod (▲) and wine (■).

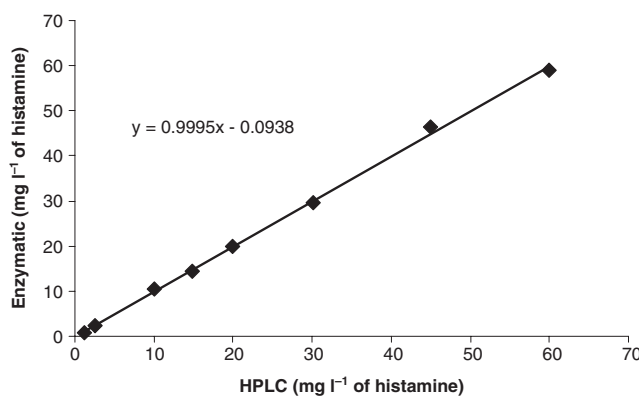


Figure 2. Comparison between the HPLC and enzymatic quantifications of histamine in H-MDBmod ($r^2 = 0.9987$).

in both synthetic media and wine as its sensitivity is slightly lower than that of the enzymatic method. Comparison of results obtained by HPLC and enzymatic methods shows a good correlation ($r^2 = 0.9984$, $p < 0.001$), as can be seen in figure 2.

A total of 150 different wines (white, rosé and red) and 70 grape musts (white and red) were analysed to check the reliability of this enzymatic method. Histamine was found in ranges from < 0.5 to 12 mg l^{-1} , depending on each wine or grape must.

Discussion

Previous works on an enzymatic method for the quantification of histamine in food have already been published (Lerke *et al.* 1983, Sumner and Taylor 1989, López-Sabater *et al.* 1993 and Rodríguez-Jerez *et al.* 1994). As the methodology developed until now was not useful to quantify histamine in wine, a new modified enzymatic method has been proposed here to analyse this biogenic amine directly in must and wines. The enzymatic method has been shown to be a simple, accurate, sensitive and fast technique to quantify histamine in grape must and wine samples. The enzymatic method proposed offers a larger linearity range than previously (table 2). Another advantage of this method is that in the case of histamine concentrations higher than 160 mg l^{-1} , a good quantification can be achieved by lowering HRP and DAO concentrations.

The enzymatic method has important advantages over HPLC for histamine quantification: it is easy to perform, it does not require costly and sophisticated equipment, and it does not require specially trained staff or sample preparation before analysis. In addition, if the miniaturized method is used, it is possible to analyse a high number of samples in a short time, at least 96 samples in 4 h, while 45 min are necessary to analyse one sample by HPLC.

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge support for this work from the Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (CICYT), Ministerio de Educación y Ciencia, Spain (Project No. AGL2000-0827-C02-01). The authors are grateful to Ana Rodas for the isolation of lactic acid bacteria from wine, and to Lucía Polo and Lucía Blasco for providing assistance in the laboratory work.

References

- COTON, E., ROLLAN, G. C., and LONVAUD-FUNEL, A., 1998, Histidine decarboxylase of *Leuconostoc oenos* 9204: purification, kinetic properties, cloning and nucleotide sequence of the *hdc* gene. *Journal of Applied Microbiology*, **84**, 143–151.

- GURAYA, H. S. and KOEHLER, P. E., 1991, Histamine in cat foods: survey and comparison of methodologies. *Veterinary Human and Toxicology*, **33**, 124–128.
- HALÁSZ, A., BARÁTH, A., SIMON-SARKADI, L., and HOLZAPFEL, W. H., 1994, Biogenic amines and their production by microorganisms in food. *Trends in Food Science and Technology*, **5**, 42–49.
- LEHTONEN, P., 1996, Determination of amines and amino acid in wine — a review. *American Journal Enology and Viticulture*, **47**, 127–133.
- LERKE, P. A., PORCUNA, M. N., and CHIN, H. B., 1983, Screening test for histamine in fish. *Journal of Food Science*, **48**, 155–157.
- LONVAUD-FUNEL, A., 2001, Biogenic amines in wines: role of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, **199**, 9–13.
- LÓPEZ-SABATER, E. I., RODRÍGUEZ-JEREZ, J. J., HERNÁNDEZ-HERRERO, M., and MORA-VENTURA, M. T., 1994, Evaluation of histidine decarboxylase activity of bacteria isolated from sardine (*Sardine pilchardus*) by an enzymic method. *Letters in Applied Microbiology*, **19**, 70–75.
- LÓPEZ-SABATER, E. I., RODRÍGUEZ-JEREZ, J. J., ROIG-SAGUÉS, A. X., and MORA-VENTURA, M. T., 1993, Determination of histamine in fish using an enzymatic method. *Food Additives and Contaminants*, **10**, 593–602.
- MAFRA, I., HERBERT, P., SANTOS, L., BARROS, P., and 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. L., 1993, Formation of histamine and tyramine by some lactic acid bacteria in MRS-broth and modified decarboxylation agar. *Letters in Applied Microbiology*, **17**, 40–43.
- MARINÉ-FONT, A., VIDAL-CAROU, M. C., IZQUIERDO-PULIDO, M., VECIANA-NOGUÉS, M. T., and HERNÁNDEZ-JOVER, T., 1995, Les amines biogènes dans les aliments: leur signification, leur analyse. *Annales des Falsifications et de l'Expertise Chimique*, **88**, 119–140.
- MILLER, J. C., and MILLER, J. N., (editors) 1988, *Statistics for Analytical Chemistry*, 2nd edn (Chichester: Ellis Horwood Ltd.).
- RODRÍGUEZ-JEREZ, J. J., GRAS, M. A., and CIVERA, T., 1994, A modification of Lerke enzymic test for histamine quantification. *Journal of Food Protection*, **57**, 1019–1021.
- RUBY, K. W., GRIFFITH, R. W., and KAEBERLE, M. L., 2002, Histamine production by *Haemophilus somnus*. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, **25**, 13–20.
- SESSA, A., DESIDERIO, M. A., and PERIN, A., 1984, Effect of acute ethanol administration on diamine oxidase activity on the upper gastrointestinal tract of rat. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, **8**, 185–190.
- SNELL, E. E., 1990, Vitamin B6 and decarboxylation of histidine. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **585**, 1–12.
- SUMNER, S. S., and TAYLOR, S. L., 1989, Detection method for histamine-producing, dairy-related bacteria using diamine oxidase and leucocrystal violet. *Journal of Food Protection*, **52**, 105–108.
- TAYLOR, S. L., 1985, *Histamine Poisoning Associated with Fish, Cheese and Other Foods*. FAO/WHO Monograph VPH/F05/85.1, pp. 1–47.
- TEN BRINK, B., DAMINK, C., and JOOSTEN, H. M. L. J., 1990, Occurrence and formation of biologically active amines in foods. *International Journal of Food Microbiology*, **11**, 73–84.

*Landete, J.M., Ferrer, S., Polo, L. y Pardo, I. 2005.
Biogenic amines in wines from three Spanish regions. J.
Agri. Food. Chem. 53, 1119-1124.*

Capítulo 2

Biogenic Amines in Wines from Three Spanish Regions

JOSÉ M. LANDETE, SERGI FERRER, LUCÍA POLO, AND ISABEL PARDO*

ENOLAB, Laboratori de Microbiologia Enològica, Departament de Microbiologia i Ecologia,
Facultat de Biologia, Universitat de València, c/ Dr. Moliner 50, E-46100 Burjassot, València, Spain

One hundred and sixty-three wines from La Rioja, Utiel-Requena, and Tarragona were analyzed to determine if there were any differences in the concentrations of six biogenic amines that are found in these three regions. The influence of grape variety, type of vinification, wine pH, malolactic fermentation, and storage in bottle on biogenic amine concentrations was studied. Results show important differences in putrescine and histamine concentrations among regions, varieties of grape, and type of wine; differences were less appreciable for the remaining biogenic amines studied. Low pH prevented biogenic amine formation. Malolactic fermentation and short storage periods in bottle (3–6 months) showed increases in histamine concentration, whereas longer periods of storage led to a general decrease in histamine. Several strains of lactic acid bacteria were isolated in this work, and their ability to form biogenic amines was assayed in synthetic media, grape must, and wine. Grape varieties, different types of winemaking, pH, and lactic acid bacteria may be responsible for the differences observed in the biogenic amine concentrations of the wines analyzed.

KEYWORDS: Biogenic amines; wine; malolactic fermentation; storage; grape variety; lactic acid bacteria; histamine; tyramine; phenylethylamine; putrescine

INTRODUCTION

Biogenic amines are organic bases endowed with biological activity that are frequently found in fermented foods and beverages. They are produced mainly as a consequence of the decarboxylation of amino acids. High concentrations of biogenic amines can cause undesirable physiological effects in sensitive humans, especially when alcohol and acetaldehyde are present (1, 2). More specifically, histamine is known to cause headaches, low blood pressure, heart palpitations, edema, vomiting, and diarrhea (1, 3). Tyramine and phenylethylamine can produce hypertension through the release of noradrenaline and norephedrine, respectively, which are vasoconstrictor substances (4). Putrescine and cadaverine, although not toxic themselves, aggravate the adverse effects of histamine, tyramine, and phenylethylamine, as they interfere with the enzymes that metabolize them (5, 6).

Some amines, such as putrescine, may already be present in grapes (7), whereas others can be formed and accumulated during winemaking. Low potassium concentrations in soil have been reported to be responsible for high putrescine concentrations in plants (8, 9). The main factors affecting its formation during vinification are free amino acid concentrations and the presence of microorganisms able to decarboxylate these amino acids. Amino acid concentration in grapes can be affected by fertilization treatments (10) and that in wines by winemaking treatments, such as time of maceration with skins, addition of nutrients, and racking protocols (1, 11–15). The concentration

of biogenic amines in wines depends on the presence and the concentration of yeast and lactic acid bacteria with decarboxylating activity (11, 16) in addition to the precursors. The concentration of microorganisms is affected by physicochemical factors of wine such as pH, temperature, or SO₂ addition (18).

Many authors have implicated yeast and lactic acid bacteria as responsible for the formation of amines in wine (12, 14, 15, 18, 19). However, data are complex and contradictory, which suggest that more defined studies are necessary to elucidate which kind of microorganism is the major contributor. Several researchers have demonstrated that the amine content increases with microbial growth, specifically with that of bacteria, with biogenic amine content suggested as an index of quality or of poor manufacturing practices (12, 15, 18, 19).

Biogenic amine content in wines may be regulated in the future following the newly implemented regulations by the U.S. Food and Drug Administration (FDA) for scombroid fish (20). Upper limits for histamine in wine have been recommended in Germany (2 mg/L), Belgium (5–6 mg/L), and France (8 mg/L) (3). Switzerland has established a limit of 10 mg/L as a tolerable value for histamine in wine (21).

To establish if there were differences in the biogenic amine contents of different Spanish wine-producing regions, Tempranillo wines from La Rioja, Tarragona, and Utiel-Requena were investigated. To discern if different grape varieties (Bobal, Garnacha, and Tempranillo) generate different amine concentrations, wines from three grape varieties of the same region (Utiel-Requena) were analyzed. To study the influence of the type of winemaking on biogenic amine concentration, white, rosé, and red wines from these regions were analyzed. In this work, we

* Corresponding author (telephone +34963544390; fax +3496 3544372; e-mail Isabel.Pardo@uv.es).

Table 1. Origins of Samples Analyzed in This Work

no. of wines analyzed	wine origin	grape variety	type of wine	time of sampling
35	La Rioja	Tempranillo	red	MLF ^a finished
2	La Rioja	Tempranillo	red	MLF completed by unknown commercial starter
5	La Rioja	Macabeo	white	MLF finished
8	La Rioja	Tempranillo	red	MLF in course
32	Utiel-Requena	Tempranillo	red	MLF finished
12	Utiel-Requena	Tempranillo	red	MLF in course
2	Utiel-Requena	Tempranillo	red	MLF completed by unknown commercial starter
16	Utiel-Requena	Bobal	red	MLF finished
2	Utiel-Requena	Bobal	red	MLF completed by unknown commercial starter
10	Utiel-Requena	Bobal	rosé	MLF in course
8	Utiel-Requena	Garnacha	red	MLF finished
8	Utiel-Requena	Macabeo	white	MLF in course
5	Utiel-Requena	Chardonnay	white	MLF in course
12	Tarragona	Tempranillo	red	MLF finished
6	Tarragona	Macabeo	white	MLF in course

^a Malolactic fermentation.

also studied the influence of malolactic fermentation, storage in bottle, wine pH, and lactic acid bacteria.

MATERIALS AND METHODS

Origins of Wines Analyzed. The origins of the 163 samples analyzed are reported in **Table 1**. Samples originated from La Rioja, Utiel-Requena, and Tarragona. The wines were obtained from Tempranillo, Bobal, Garnacha, Macabeo, and Chardonnay grape varieties. The majority of wines were analyzed during or just after malolactic fermentation.

Evolution of Biogenic Amines after Alcoholic Fermentation and Storage. The evolution of biogenic amine content was investigated by sampling 12 young bottled wines from the Utiel-Requena region that originated from Bobal, Tempranillo, and Garnacha grapes. Samples were taken at different stages of vinification: before and after malolactic fermentation and at 3, 6, and 12 months during storage at a controlled temperature of 15 °C in the laboratory.

Isolation and Identification of Lactic Acid Bacteria. Lactic acid bacterium strains were isolated from wines reported in **Tables 4** and **5** by plating decimal dilutions on MRS (Scharlau Chemie S.A., Barcelona, Spain) plates supplemented with 0.5% L-cysteine and on MLO plates (22), which were incubated at 28 °C. Lactic acid bacteria were identified by means of fluorescence in situ hybridization (FISH) (23).

Determination of Biogenic Amines in Wines by HPLC. Histamine, tyramine, putrescine, cadaverine, phenylethylamine, and tryptamine were the six biogenic amines analyzed.

Samples of wine were centrifuged (13000 rpm or 10000g, 8 min), filtered through a membrane (regenerate cellulose, 0.45 μm pore size), and derivatized with orthophthalaldehyde (OPA). Samples were injected into the HPLC system (Merck, Darmstadt, Germany) equipped with an L-Intelligent pump (Merck-Hitachi), an AS-2000A autosampler (Merck-Hitachi), a T-6300 column thermostat, and an L-7485 LaChrom fluorescence spectrophotometer (Merck-Hitachi). An excitation wavelength of 335 nm and an emission wavelength of 450 nm were used. OPA reagent was prepared as follows: 50 mg of OPA was dissolved in 2.25 mL of methanol; 0.25 mL of borate buffer 0.4 M (pH 10) and finally 0.05 mL of mercaptoethanol were added. A gradient of solvent A and solvent B was applied to a 100 RP-18 column (Merck-Hitachi) (25 cm × 5 μm) as follows: 0–20 min, 40% B isocratic, 1.1 mL/min; 20–45 min, 40–85% linear gradient, 1.1 mL/min. Solvent A consisted of 2.268 g of KH₂PO₄ and 14.968 g of Na₂HPO₄·12H₂O adjusted to

Table 2. Average Concentrations and Standard Deviations of Biogenic Amines Found in Tempranillo Red Wines from La Rioja, Utiel-Requena, and Tarragona^a

wine origin ^a	histamine (mg/L)	tyramine (mg/L)	putrescine (mg/L)	phenylethylamine (mg/L)
La Rioja (45)	8.2 ± 5.5	1.9 ± 1.1	47.3 ± 12.1	0.9 ± 0.4
Utiel-Requena (46)	2.4 ± 1.1	2.3 ± 0.8	7.5 ± 1.3	1.0 ± 0.4
Tarragona (12)	4.5 ± 3.1	1.8 ± 0.9	34.1 ± 10.5	0.8 ± 0.3

^a The number of wines analyzed is given in parentheses. Wines with malolactic fermentation finished.

pH 5.8 with H₃PO₄ and made up with deionized water to 1 L. Solvent B was 100% methanol.

To evaluate the repeatability of the method, five independent analyses of biogenic amine concentrations in wine were performed, and the standard deviation was calculated.

The limit of detection (LD) of the method was calculated using the equation proposed by Miller and Miller (24). The LD is defined as the lowest concentration level of the element that an analyst can determine to be statistically different from an analytical blank. The repeatability standard deviation of measurements was 1.0%, and the LD was 0.1 mg/L.

Analyses of Biogenic Amines Produced by Lactic Acid Bacteria in Synthetic Medium, Wine, and Grape Must.

The ability to produce different biogenic amines was analyzed in lactic acid bacteria isolated from wines (**Tables 4** and **5**). To do this, two synthetic media, wine and must, were used. Synthetic media are named biogenic amine production medium (BAPM) and modified histidine-decarboxylation medium (H-MDBmod). BAPM consists of the following (per liter): meat extract, 8 g; tryptone, 5 g; yeast extract, 4 g; glucose, 1.5 g; fructose, 1 g; Tween 80, 0.5 g; MgSO₄, 0.2 g; FeSO₄, 0.04 g; MnSO₄, 0.05 g; CaCO₃, 0.1 g; tyrosine, 2 g; histidine, 2 g; phenylalanine, 2 g; ornithine, 2 g; lysine, 2 g; tryptophan, 2 g; and pyridoxal phosphate, 0.25, pH 5.5. H-MDBmod contains the following (per liter): meat extract, 8 g; tryptone, 5 g; yeast extract, 4 g; glucose, 1.5 g; fructose, 1 g; Tween 80, 0.5 g; MgSO₄, 0.2 g; FeSO₄, 0.04 g; MnSO₄, 0.05 g; CaCO₃, 0.1 g; histidine, 20 g; and pyridoxal phosphate, 0.25 g, pH 5.2. Inoculation was performed by adding 0.1 mL of a mid-log phase MRS preculture medium into 10 mL of these media, which were left to grow at 28 °C until an OD_{600nm} of 0.5. This OD_{600nm} of 0.5 corresponds to 3.7 × 10⁸ colony-forming units (cfu)/mL for *Lactobacillus hilgardii*, 4 × 10⁸ cfu/mL for *Lactobacillus brevis*, 4.7 × 10⁸ cfu/mL for *Pediococcus*, and 1.2 × 10⁹ cfu/mL for *Oenococcus*.

BAPM contains a mixture of six amino acids, whereas H-MDBmod contains only histidine. When only the quantification of histamine is required, this last medium is preferred because the chromatographic analysis of this amine is enabled; the histamine peak partially overlaps with some of the other amino acids present in BAPM.

The confirmation of the ability to produce biogenic amines was performed in red wine (Bobal, Utiel-Requena, pH 3.5) and commercial grape must, supplemented with tyrosine, histidine, phenylalanine, ornithine, lysine, and tryptophan, 1 g/L each. These substrates were inoculated as described for synthetic media and incubated at 28 °C until the number of viable cells reached 10⁷ cfu/mL.

To quantify the amines produced in the synthetic and natural media, samples were collected, centrifuged (13000 rpm or 10000g, 8 min), filtered through a membrane (regenerate cellulose, 0.45 μm pore size), and derivatized with OPA. The samples were then injected into the HPLC system as described above.

RESULTS

Quantification of Biogenic Amines in Tempranillo Wines from Different Wine-Producing Regions. The average biogenic amine concentrations of Tempranillo wines from Utiel-Requena, La Rioja and Tarragona are shown in **Table 2**. Putrescine was the most prominent biogenic amine in all of the

Table 3. Average Concentrations and Standard Deviations of Biogenic Amines in Wines from Three Grape Varieties with Malolactic Fermentation Finished Cultured in Utiel-Requena^a

grape variety ^a	histamine (mg/L)	tyramine (mg/L)	putrescine (mg/L)	phenylethylamine (mg/L)
Tempranillo (46)	2.5 ± 1.2	2.6 ± 1.1	7.6 ± 2.1	1.2 ± 0.5
Bobal (18)	2.3 ± 1.0	2.0 ± 0.8	3.5 ± 1.4	0.8 ± 0.3
Garnacha (8)	1.1 ± 0.3	0.8 ± 0.2	7.4 ± 2.1	0.6 ± 0.3

^a The number of wines analyzed is given in parentheses.

analyzed wines. Histamine, tyramine, and phenylethylamine were also detected in decreasing concentration order. Important differences in putrescine concentration were observed among the three regions, with concentrations 7- and 5-fold higher in La Rioja and Tarragona, respectively, than in Utiel-Requena. A higher histamine concentration was also observed in La Rioja and Tarragona: 3 of 12 Tarragona wines and 16 of 45 La Rioja wines had a histamine concentration of >10 mg/L, but only 1 of 46 Utiel-Requena wines surpassed this concentration. However, the average tyramine and phenylethylamine contents were similar in all of the regions studied.

Low concentrations of cadaverine and tryptamine were found in the wines, always <0.5 mg/L. No differences were found for cadaverine and tryptamine concentrations among the wine-producing regions, grape varieties, and types of wine (red, rosé, and white).

Influence of Grape Variety on Biogenic Amine Concentration. The biogenic amine concentrations were quantified in Bobal (red and rosé), Garnacha (red), and Tempranillo (red) wines produced in Utiel-Requena. The average concentrations of histamine, tyramine, putrescine, and phenylethylamine are shown in **Table 3**. The histamine and tyramine concentrations were similar in the cases of Tempranillo and Bobal varieties and higher than in Garnacha. The putrescine concentration found in Bobal was slightly lower than those in Tempranillo and Garnacha. Phenylethylamine concentration was very similar in wines from the different grape varieties.

Influence of Type of Winemaking (Red, Rosé, and White) on Biogenic Amine Concentration. A total of 24 white, 10 rosé, and 129 red wines originating from the three different regions in the study were analyzed. In the white and rosé wines histamine and tyramine were <1 mg/L and phenylethylamine was <0.25 mg/L. No differences were observed in the concentrations of these three amines in wines from the different regions. However, the average putrescine concentrations varied in white wines from La Rioja (35 mg/L), Tarragona (29 mg/L), and Utiel-Requena (6.7 mg/L). Red wines showed histamine, tyramine, and phenylethylamine concentrations higher than those of white and rosé wines (see **Table 2**), but putrescine levels were similar in all three types of wines. Putrescine content seems to be more influenced by the geographical region and grape variety than by the type of winemaking.

The majority of white and rosé wines had not undergone malolactic fermentation, but in the cases of those that had, the histamine, tyramine, and phenylethylamine concentrations were close to those observed in red wines after malolactic fermentation. This information suggests that the lactic acid bacteria may be responsible for these higher values.

Influence of pH. The average pH values of the wines analyzed were 3.74 in La Rioja and 3.51 and 3.53 in Utiel-Requena and Tarragona wines, respectively. **Figure 1** shows that in wines that had undergone malolactic fermentation, higher

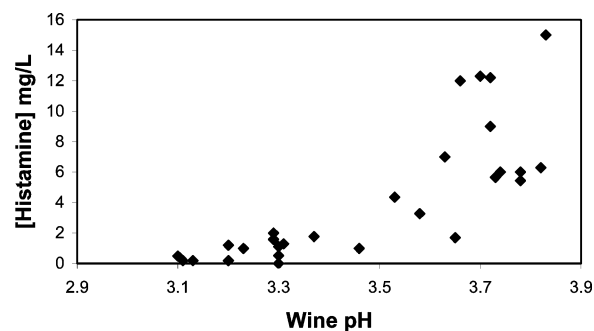


Figure 1. pH values versus histamine concentration from 28 different red, rosé, and white wines analyzed with malolactic fermentation accomplished.

histamine concentrations were observed at higher pH values. Wines with pH <3.6 showed histamine concentrations of <5 mg/L. This is consistent with the observation that white wines with the lowest pH values (average pH 3.11) exhibited the lowest histamine concentrations. However, the influence of pH on amine concentration is less evident for tyramine and phenylethylamine and was not observed for the rest of the amines (data not shown).

Influence of Malolactic Fermentation and Storage on Biogenic Amine Concentration. To establish more precisely the role of malolactic fermentation and storage on biogenic amine concentration, samples before and after malolactic fermentation and at 3, 6, and 12 months of storage were collected from 12 young wines from Utiel-Requena (**Table 4**). The evolution of the average concentrations of biogenic amines can be observed in **Figure 2**.

The biogenic amine showing a higher increase after malolactic fermentation was histamine; the others also increased, but to a lesser extent. During the first 6 months of storage in bottles, the histamine showed another increase, although smaller than that observed after malolactic fermentation. Consequently, a decrease in amine concentration was observed. Putrescine did not show any appreciable changes between the beginning and the end of the time period analyzed.

Quantification of Biogenic Amine Produced by Lactic Acid Bacteria. The ability to produce biogenic amines of lactic acid bacteria isolated from wines of the three different regions was analyzed in synthetic media, wine and must, and the results are reported in **Tables 4** and **5**. **Table 4** shows the results obtained with bacteria isolated from wines surveyed to establish a relationship between malolactic fermentation, storage, and biogenic amine content. The strains isolated were identified as *Oenococcus oeni*, *Pediococcus parvulus*, *Lactobacillus hilgardii*, and *Lactobacillus brevis*. Seven of the 12 wines analyzed contained histamine-producing lactic acid bacteria, with *O. oeni* strains being the most abundant. We found that *O. oeni* strains produced low histamine concentrations, whereas *P. parvulus* and *L. hilgardii* strains produced high levels in synthetic media. Strains of *L. brevis* were able to produce tyramine and phenylethylamine, but not histamine, in BAPM medium. We did not observe lactic acid bacteria capable of producing cadaverine, tryptamine, or putrescine in our experimental conditions. Those strains that were able to produce biogenic amines in synthetic media also produced them in wine or must, although the quantities were lower (see **Table 4**). The low production of tyramine and phenylethylamine produced by *L. brevis* strains in wine was due to their inability to grow. As a consequence, they were assayed in commercial must with added amino acids; the quantities of amines were recorded after

Table 4. Biogenic Amine Production in Synthetic Medium and Wine by Lactic Acid Bacteria Isolated from 12 Utiel-Requena Wines in Which the Effects of Malolactic Fermentation and Storage Were Studied^a

wine	grape variety	strain isolated	histamine (mg/L)		tyramine (mg/L)		phenylethylamine (mg/L)	
			BAPM	wine	BAPM	wine	BAPM	wine
1	Bobal	<i>O. oeni</i> UR37	21	2.2				
2	Bobal	ND ^b						
3	Bobal	<i>O. oeni</i> UR181	12	5				
4	Bobal	<i>Lb. brevis</i> UR32			289	3	115	1.2
		<i>O. oeni</i> UR29	17	0.5				
5	Tempranillo	<i>P. parvulus</i> UR89	223	48				
		<i>O. oeni</i> UR54	22	6				
6	Bobal	<i>O. oeni</i> UR110	12	1.5				
		<i>Lb. brevis</i> UR16A			321	6.2	141	3.8
7	Bobal	<i>O. oeni</i> UR97	34	8				
8	Tempranillo	<i>Lb. hilgardii</i> UR241						
9	Tempranillo	<i>P. parvulus</i> UR86						
		ND						
10	Bobal	<i>O. oeni</i> UR102						
		<i>P. parvulus</i> UR96						
11	Garnacha	<i>Lb. hilgardii</i> UR28	184	41				
		<i>O. oeni</i> UR53B						
12	Garnacha	<i>P. parvulus</i> UR22						

^a No strain was able to produce putrescine, cadaverine, and tryptamine. ^b ND, lactic acid bacteria were not detected.

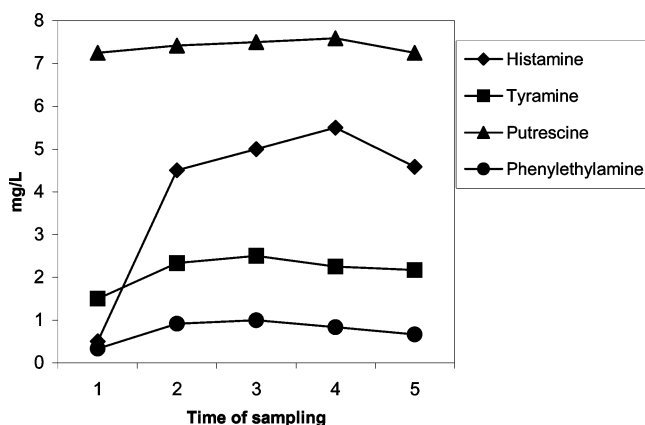


Figure 2. Evolution of histamine, tyramine, phenylethylamine, and putrescine concentration of wines from Utiel-Requena, before (1) and after (2) malolactic fermentation and 3 (3), 6 (4), and 12 (5) months of storage. Values represent mean contents observed in the 12 wines reported in **Table 4**.

Table 5. Histamine Concentration and Histamine-Producing Strains Found in Wines of Different Regions^a

wine origin	histamine concn in wine (mg/L)	lactic acid bacteria isolated	histamine (mg/L)	
			H-MDBmod	wine
Utiel-Requena	4	<i>O. oeni</i> UR83B	17	3
Utiel-Requena	3	<i>O. oeni</i> UR10	21	7
La Rioja	11	<i>O. oeni</i> 318C	18	6.5
La Rioja	9	<i>O. oeni</i> 217B	22	11
Tarragona	1.5	<i>O. oeni</i> T26A	14	4.5
Tarragona	9	<i>O. oeni</i> T41	11	4
Utiel-Requena	8	<i>P. parvulus</i> UR89	223	48
La Rioja	20	<i>P. parvulus</i> 339C	212	34
Tarragona	21	<i>P. parvulus</i> T4	234	28

^a The ability to form histamine in synthetic medium (H-MDBmod) and wine by lactic acid bacteria is also displayed.

growth: strain *L. brevis* UR32 produced 35 mg/L tyramine and 7 mg/L phenylethylamine, whereas *L. brevis* UR16A produced 43 and 11.5 mg/L, respectively.

Table 5 presents both the histamine content of the different wines from the three studied regions and the isolated strains

that showed the ability to form histamine in H-MDBmod and in wine. Although more bacteria were isolated from these wines, only those that showed histamine production are recorded in the table. In these wines the histamine-producing strains belong to the species *O. oeni* and *P. parvulus*. We observed that *O. oeni* strains, as already demonstrated in **Table 4**, produced lower histamine in both synthetic medium and wine than *P. parvulus* strains. We did not find differences in the isolates' ability to produce histamine related to their geographical origin.

DISCUSSION

Putrescine was the most prominent biogenic amine found in wine; the other amines were present in substantially lower concentrations. Histamine and tyramine were the second and third most abundant biogenic amines. Tryptamine and cadaverine were always <1 mg/L. The results of this study are in agreement with other findings (25–27). In general, the biogenic amine concentration in Spanish wines is higher than in Portuguese wine (28) and similar to that in Bourgogne and Bordeaux wines (27).

Tempranillo wines from La Rioja and Tarragona showed the highest levels of putrescine and histamine concentrations. No differences were observed in tyramine and phenylethylamine contents. Differences in putrescine in musts can be explained, in part, by the chemical composition of soil, especially the potassium level, as has been demonstrated in grapevine leaves and eucalyptus (8, 9). In addition, this amine could be formed from ornithine and arginine (via agmatine) by lactic acid bacteria. A higher content of these amino acids besides histidine could explain the higher level of putrescine and histamine in La Rioja and Tarragona wines. Also, it has been reported that wines with higher pH generally have higher amine concentrations (25). We observed that La Rioja wines exhibiting pH values >3.6 set a threshold for high histamine content (see **Figure 1**). This relationship between pH and amines is explained by the fact that at higher pH a greater number of bacteria can develop, thus increasing the probability of having strains able to form amines (29).

Some amines are normal constituents of grapes, being in variable amounts in different varieties. Among biogenic amines detected in grapes, putrescine and spermidine are usually

abundant (20 and 45 mg/kg of fresh fruit, respectively), whereas ethanolamine, agmatine, cadaverine, spermidine, histamine, and tyramine have been found in lower amounts (12–15, 17, 18, 30). High levels of putrescine, cadaverine, and spermidine have been reported in the pericarp of Cabernet-Sauvignon berries (7). In Utiel-Requena, Tempranillo wines showed the highest content of biogenic amines (average of 13.9 mg/L). Garnacha wines have 8.9 mg/L and Bobal, 6.6 mg/L, average (data deduced from **Table 3**). Putrescine is present in Tempranillo and Garnacha in 2-fold higher concentrations than in Bobal, whereas histamine and tyramine concentrations were very similar in Tempranillo and Bobal wines and lower in Garnacha. As the soils in which the grape varieties were cultured are similar in composition, they were all subjected to similar winemaking practices, and the bacteria able to form putrescine were not detected; differences in putrescine concentration could be attributed to the grape variety. Thus, Tempranillo and Garnacha musts probably had higher putrescine contents than Bobal; as we have not yet analyzed musts in this work, this is a hypothesis still to be confirmed. However, differences in histamine, tyramine, and phenylethylamine could be due to either different levels of precursors in the varieties or microbial formation, as can be concluded from the results recorded in **Table 4**.

Our results indicate that the type of vinification influences the amine content in wines; thus, white and rosé wines present lower amine concentrations than red wines. This may be attributed to various causes: lower amino acids content in berries because they are harvested earlier than red grapes, short or no maceration with skins, short contact time with lees, and no malolactic fermentation.

As derived from the results of this work, malolactic fermentation increases histamine concentration, which is probably due to the combination of two factors: the increase of amino acids in wine as a consequence of yeast lysis after alcoholic fermentation (31, 32) and the proliferation of lactic acid bacteria with decarboxylase activity. In a medium poor in nutrients such as the wine, lactic acid bacteria can obtain energy to grow from decarboxylation of amino acid precursors (33). The fact that histamine was the amine which showed the highest increase after malolactic fermentation points to yeast lysis as the source of the precursor of histidine and to the presence of a high number of bacteria with histidine decarboxylase activity. Although *O. oeni* is the bacterium generally responsible for malolactic fermentation (34), other species such as *P. parvulus* and *L. hilgardii* can develop at the same time. *P. parvulus* and *L. hilgardii* strains that are able to form histidine exhibited a high histidine decarboxylase activity, but those of *O. oeni* showed a much lower activity in both synthetic media and wine (**Tables 4 and 5**). For this reason, a high number of *O. oeni* cells is required to explain the increase in histamine concentration when malolactic fermentation is performed by this species alone.

During storage the histamine concentration increased from 3 to 6 months. Gerbaux and Monamy (35) also found an increase in the concentration of histamine between 4 and 8 months after malolactic fermentation in Pinot Noir and Chardonnay wines and, then, a general decrease of concentrations was observed. The levels of histamine concentration, which decreased during storage, are probably due to degradation. In some fermented food it has been observed that the degradation of histamine and tyramine may be due to the action of amine oxidase present in foods, thus preventing their accumulation (36, 37).

One way to prevent the problem of high biogenic amine concentration would be to reduce to a minimum the length of

the processes that incorporate amino acids to must or wine as grape skin maceration and contact with lees, but this is impossible when aged wines are intended. Other factors such as grape variety or type of soil are not susceptible to change. For these reasons the control of this problem could be easily solved by inhibiting the growth of indigenous lactic acid bacteria and inoculating commercial selected *O. oeni* strains unable to produce biogenic amines. In support of this idea we have found lower concentrations of histamine, tyramine, and phenylethylamine in wines in which the malolactic fermentation was performed by a commercial starter.

A thorough study on amino acid decarboxylation by lactic acid bacteria under winemaking conditions would need to be done to estimate the real danger of lactic acid bacteria

ACKNOWLEDGMENT

We are grateful to Nicolas Sánchez for providing wine samples from Utiel-Requena.

LITERATURE CITED

- (1) Bauza, T.; Blaisse, A.; Teissedre, P. L.; Cabanis, J. C.; Kanny, G.; Moneret-Vautrin, D. A. Les amines biogènes du vin, métabolisme et toxicité. *Bull. O. I. V.* **1995**, 767–768, 42–67.
- (2) Maynard, L. S.; Schenker, V. J. Monoamine-oxidase inhibition by ethanol in vitro. *Nature* **1996**, 196, 575–576.
- (3) Lehtonen, P. Determination of amines and amino acids in wine A review. *Am. J. Enol. Vitic.* **1996**, 47, 127–133.
- (4) Forsythe, W. L.; Redmond, A. Two controlled trials of tyramine in children with migraine. *Dev. Med. Child. Neurol.* **1974**, 16, 794–799.
- (5) ten Brink, B.; Damink, C.; Joosten, H. M. L. J.; Huis in't Veld, J. H. J. Occurrence and formation of biologically active amines in foods. *Int. J. Food Microbiol.* **1990**, 11, 73–84.
- (6) Straub, B. W.; Kicherer, M.; Schilcher, S. M.; Hammes, W. P. The formation of biogenic amines by fermentation organisms. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1995**, 201, 79–82.
- (7) Broquedis, M.; Dumery, B.; Boucard, J. Mise en évidence de polyamines (putrescine, cadaverine, nor-spermidine, spermidine, spermin) dans les feuilles et les grappes de *Vitis vinifera* L. *Connaiss. Vigne Vin* **1989**, 23, 1–6.
- (8) Adams, D. O. Accumulation of putrescine in grapevine leaves showing symptoms of potassium deficiency or spring fever. In *Proceedings of the International Symposium on Nitrogen in Grapes and Wine*; Rantz, J., Ed.: American Society for Enology and Viticulture: Davis, CA, 1991; pp 126–131.
- (9) Vaz de Arruda Silveira, R. L.; Malavolta, E.; Broetto, F. Effect of potassium on dry matter production and concentration of putrescine, spermidine and spermine in *Eucalyptus grandis* progenies. *Scient. Foresta.* **2001**, 59, 13–25.
- (10) Spayd, S. E.; Wample, E. L.; Evans, R. G.; Seymour, B. J.; Nagel, C. W. Nitrogen fertilization of white Riesling grapes in Washington must and wine composition. *Am. J. Enol. Vitic.* **1994**, 45, 34–42.
- (11) Lonvaud-Funel, A.; Joyeux, A. Histamine production by wine lactic acid bacteria: isolation of a histamine producing strain of *Leuconostoc oenos*. *J. Appl. Bacteriol.* **1994**, 77, 401–407.
- (12) Radler, F.; Fäth, K. P. Histamine and other biogenic amines in wines. In *Proceedings of the International Symposium on Nitrogen in Grapes and Wine*; Rantz, J., Ed.: American Society for Enology and Viticulture: Davis, CA, 1991; pp 185–195.
- (13) Rivas-Gonzalo, J. C.; Santos-Hernandez, J. F.; Mariné-Font, A. Study of the evolution of tyramine content during the vinification process. *J. Food Sci.* **1983**, 48, 417–418, 429.
- (14) Vidal-Carou, M. C.; Izquierdo-Pulido, M. L.; Mariné-Font, A. Histamine and tyramine in Spanish wines: their formation during the winemaking process. *Am. J. Enol. Vitic.* **1990**, 41, 160–167.

- (15) Zee, J. A.; Simard, R. E.; L'Heureux, L.; Tremblay, J. Biogenic amines in wines. *Am. J. Enol. Vitic.* **1983**, *34*, 6–9.
- (16) Moreno-Arribas, V.; Torlois, S.; Joyeux A.; Bertrand, A.; Lonvaud-Funel, A. Isolation, properties and behaviour of tyramine-producing lactic acid bacteria from wine. *J. Appl. Microbiol.* **2000**, *88*, 584–593.
- (17) Britz, T. J.; Tracey, R. P. The combination effect of pH, SO₂, ethanol and temperature on the growth of *Leuconostoc oenos*. *J. Appl. Bacteriol.* **1990**, *68*, 23–31.
- (18) Baucom, T. L.; Tabacchi M. H.; Cottrell, T. H. E.; Richmond, B. S. Biogenic amine content of New York state wines. *J. Food Sci.* **1996**, *51*, 1376–1377.
- (19) Ough, C. S.; Crowell, E. A.; Kunke, R. E.; Vilas, M. R. S.; Lagier, S. A study of histamine production by various wine bacteria in model solution and in wine. *J. Food Process. Preserv.* **1987**, *12*, 63–70.
- (20) FDA. Fish and Fisheries Products Hazard and Control Guide. In *Food and Drug Administration*, 1st ed.; Office of Seafood: Washington, DC, 1996; p 69.
- (21) Les autorités fédérales de la Confédération suisse. *Ordonnance sur les substrates étrangères et les composants dans les denrées alimentaires (OSEC)*; Le Département fédéral de l'intérieur: Paris, France, 2002; Annexe (art 2, al. 6), p 1068.
- (22) Caspritz, G.; Radler, F. Malolactic enzyme of *Lactobacillus plantarum*. *J. Biol. Chem.* **1983**, *258*, 4907–4010.
- (23) Blasco, L.; Pardo, I.; Ferrer, S. Development of specific fluorescent oligonucleotide probes for *in situ* identification of wine lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **2003**, *225*, 115–123.
- (24) Miller, J. C.; Miller, J. N. *Statistics for Analytical Chemistry*, 2nd ed.; Miller, J. C., Miller, J. N., Eds.; Ellis Horwood: London, U.K., 1988; pp 99–103.
- (25) Vázquez-Lasa, M. B.; Iñiguez-Crespo, M.; González-Larraina, M. A.; González-Guerrero, A. Biogenic amines in Rioja wines. *Am. J. Enol. Vitic.* **1998**, *49*, 229–229.
- (26) Glória, M. B. A.; Watson, B. T.; Simon-Sarkadi, L.; Daeschel, M. A. A survey of biogenic amines in Oregon Pinot noir and Cabernet Sauvignon wines. *Am. J. Enol. Vitic.* **1998**, *49*, 279–232.
- (27) Soufleros, E.; Barrios, M. L.; Bertrand, A. Correlation between the content of biogenic amines and other wine compounds. *Am. J. Enol. Vitic.* **1998**, *49*, 266–277.
- (28) Mafra, I.; Herbert, P.; Santos, L.; Barros, P.; Alves, A. Evaluation of biogenic amines in some Portuguese quality wines by HPLC fluorescence detection of OPA derivatives. *Am. J. Enol. Vitic.* **1999**, *50*, 128–132.
- (29) Wibowo, D.; Eschenbruch, R.; Davis, C. R.; Fleet, G. H.; Lee, T. H. Occurrence and growth of lactic acid bacteria in wine: a review. *Am. J. Enol. Vitic.* **1985**, *36*, 302–313.
- (30) Ough, C. S. Measurement of histamine in California wines. *J. Agric. Food Chem.* **1971**, *19*, 241–244.
- (31) Slaughter, J. C.; Flint, P. W. N.; Kular, K. S. The effect of CO₂ on the absorption of amino acids from a malt extract medium by *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Lett.* **1987**, *40*, 239–243.
- (32) Kruger, L. C.; Pickerell, A. T. W.; Azcell, B. The sensitivity of different brewing yeast strains to dioxide inhibition: fermentation and production of flavour-active volatile compounds. *J. Inst. Brew.* **1992**, *98*, 133–138.
- (33) Molenaar, D.; Bosscher, J. S.; ten Brink, B.; Driessen, J. M.; Konings, W. N. Generation of a proton motive force by histidine decarboxylation and electrogenic histidine/histamine antiport in *Lactobacillus buchneri*. *J. Bacteriol.* **1993**, *175*, 2864–2870.
- (34) Radler, F. Étude microbiologique des bactéries de la fermentation malolactique. *Connaiss. Vigne Vin* **1967**, *1*, 73–91.
- (35) Gerbaux, V.; Monamy, C. Biogenic amines in Burgundy wines. Contents and origin in wines. *Rev. Fr. Oenol.* **2000**, *183*, 25–28.
- (36) Voigt, M. N.; Eitenmiller, R. R. Role of histidine and tyrosine decarboxylases and mono- and diamine oxidases in amine build up in cheese. *J. Food Prot.* **1978**, *41*, 182–186.
- (37) Dapkevicius Enes, M. L. N.; Nhout, M. J. R.; Rombouts, F. M.; Huuben, J. H.; Wymenga, W. Biogenic amine formation and degradation by potential fish silage starter microorganisms. *Int. J. Food Microbiol.* **2000**, *57*, 107–114.

Received for review April 23, 2004. Revised manuscript received October 27, 2004. Accepted November 4, 2004. This work has been funded by the Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (CICYT), Ministerio de Educación y Ciencia, Spain (Project AGL2000-0827-C02-01).

JF049340K

Landete, J.M., Ferrer, S. y Pardo, I. 2005. Which are the lactic acid bacteria responsible for histamine production in wine?. J. Appl. Microbiol. (aceptado).

Capítulo 3

Which lactic acid bacteria are responsible for histamine production in wine?

J.M. Landete, S. Ferrer and I. Pardo

ENOLAB – Laboratori de Microbiologia Enològica, Departament de Microbiologia i Ecologia, Facultat de Biologia, Universitat de València, València, Spain

2004/0749: received 29 June 2004, revised 18 January 2005 and accepted 10 February 2005

ABSTRACT

J.M. LANDETE, S. FERRER AND I. PARDO. 2005.

Aims: To quantify the ability of 136 lactic acid bacteria (LAB), isolated from wine, to produce histamine and to identify the bacteria responsible for histamine production in wine.

Methods and Results: A qualitative method based on pH changes in a plate assay was used to detect wine strains capable of producing high levels of histamine. Two quantitative, highly sensitive methods were used, an enzymatic method and HPLC, to quantify the histamine produced by LAB. Finally, an improved PCR test was carried out to detect the presence of histidine decarboxylase gene in these bacteria. The species exhibiting the highest frequency of histamine production is *Oenococcus oeni*. However, the concentration of histamine produced by this species is lower than that produced by strains belonging to species of *Lactobacillus* and *Pediococcus*. A correlation of 100% between presence of histidine decarboxylase gene and histamine production was observed. Wines containing histamine were analysed to isolate and characterize the LAB responsible for spoilage.

Conclusions: *Oenococcus* was able to synthesize low concentrations of histamine in wines, while *Pediococcus parvulus* and *Lactobacillus hilgardii* have been detected as spoilage, high histamine-producing bacteria in wines.

Significance and Impact of the Study: Information regarding histamine-producing LAB isolated from wines can contribute to prevent histamine formation during winemaking and storage.

Keywords: histamine, HPLC, lactic acid bacteria, PCR, wine.

INTRODUCTION

The biogenic amines are low molecular weight, organic bases frequently found in wines and other fermented foods. Biogenic amines are undesirable in all foods and beverages because if consumed at an excessively high concentration, they may induce headaches, respiratory distress, heart palpitation, hyper-hypotension, and several allergenic disorders in man (Silla-Santos 1996). Histamine is the most important amine in food-borne intoxications, due to its strong biological activity (Cabaniš 1985). The study of histamine in wine is of particular interest as the presence of

alcohol and other amines reportedly promotes its effects by inhibiting human detoxification systems (Chu and Bejdanec 1981; Sessa *et al.* 1984).

A high concentration of histamine in wine is caused by the presence of histidine decarboxylase in some lactic acid bacteria (LAB) (Le Jeune *et al.* 1995; Lonvaud-Funel 2001). There is a great interest in identifying and characterizing the bacteria that are able to produce histamine in wine, in order to prevent its synthesis.

In wines, high levels of histamine have been related to spoilage by *Pediococcus* (Delfini 1989). *Pediococcus* can be present in wine but usually in a low proportion. In recent years, it has been reported that some *Oenococcus oeni* strains are responsible for histamine accumulation in wine (Castino 1975; Le Jeune *et al.* 1995; Guerrini *et al.* 2002). The bacterial population in wine is a complex mixture of

Correspondence to: Isabel Pardo, ENOLAB – Laboratori de Microbiologia Enològica, Departament de Microbiologia i Ecologia, Facultat de Biologia, Universitat de València, C/Dr. Moliner 50, 46100 Burjassot, València, Spain (e-mail: isabel.pardo@uv.es).

different species of LAB (*Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* and *Oenococcus*), with *O. oeni* as the predominant species in wine during and after malolactic fermentation.

Although some authors have reported higher histamine levels after malolactic fermentation (Aerny 1985; Cilliers and van Wyk 1985), others have not (Lafon-Lafourcade 1975; Ough *et al.* 1987). Further information regarding the microbiota responsible for histamine production would contribute to knowing when histamine concentration could increase and, therefore, when it is necessary to control bacterial development.

Although there are previous works about the ability of wine LAB to produce histamine, their conclusions are contradictory. For instance, Lonvaud-Funel and Joyeux (1994), Le Jeune *et al.* (1995), Coton *et al.* (1998) and Guerrini *et al.* (2002) found that histamine decarboxylase activity is present in a high proportion of wine strains. On the contrary, Moreno-Arribas *et al.* (2003) found the frequency of this characteristic to be very low. As histamine concentration increases after malolactic fermentation in some cases, many authors have focused the screening of histamine production on *O. oeni* (Coton *et al.* 1998; Guerrini *et al.* 2002).

The aims of this work are to screen and quantify the ability of LAB isolated from wine to produce histamine, and to correlate the presence and microbial composition of wine with the presence of histamine. Moreover, this work reflects a vast study, as screening was carried out of the highest number of LAB analysed up to date. A total of 136 strains of LAB belonging to different species of *Lactobacillus*, *Oenococcus*, *Pediococcus* and *Leuconostoc* isolated from wine were screened for the presence of the *hdc* gene and the ability to produce histamine in a synthetic medium.

MATERIAL AND METHODS

Bacterial strains and growth conditions

The following strains were previously isolated from wine: 54 *Lactobacillus*, 34 *Pediococcus*, 16 *Leuconostoc* and 32 *Oenococcus*, and are listed in Table 1. In this work, we used positive controls isolated from wine (*Lactobacillus hilgardii* 5W) and from cheese (*Lact. buchneri* ST2A, Sumner *et al.* 1985). *Lactobacillus*, *Pediococcus* and *Leuconostoc* strains were grown in MRS broth (Scharlab) supplemented with 0.5% L-cysteine, *O. oeni* in MLO (Caspritz and Radler 1983) and incubated at 28°C until mid-log phase.

Detection of histamine-producing ability in wine LAB by a plate assay

Lactobacillus, *Pediococcus*, *Leuconostoc* and *Oenococcus* strains were streaked on H-MDBmod (Landete *et al.* 2005) plus 20% agar (H-MDAmod) and incubated at 28°C for 2 d.

Table 1 Bacterial strains studied in this work. Frequency percentage (^a) and number of positive strains (^b) for histamine production on solid H-MDAmod medium, enzymatic method, HPLC and PCR test of *hdc*

Strains	No. strains	Plate assay	Enzymatic		
		(H-MDAmod)	method	HPLC	PCR
<i>Lact. buchneri</i>	3	33.3 ^a (1) ^b	33.3 (1)	33.3 (1)	33.3 (1)
<i>Lact. hilgardii</i>	15	20.0 (3)	26.7 (4)	26.7 (4)	26.7 (4)
<i>Lact. plantarum</i>	13	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>Lact. paracasei</i>	4	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>Lact. casei</i>	3	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>Lact. collimoides</i>	1	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>Lact. brevis</i>	12	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>Lact. mali</i>	3	0 (0)	66.7 (2)	66.7 (2)	66.7 (2)
<i>P. parvulus</i>	31	16.1 (5)	16.1 (5)	16.1 (5)	16.1 (5)
<i>P. pentosaceus</i>	3	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>Leuc. mesenteroides</i>	16	0 (0)	6.3 (1)	6.3 (1)	6.3 (1)
<i>O. oeni</i>	32	3.1 (1)	78.1 (25)	78.1 (25)	78.1 (25)

Measurement of histidine decarboxylase activity using an enzymatic method and HPLC

Histamine production was promoted in liquid H-MDBmod medium (Landete *et al.* 2005). Bacterial cultures, previously grown in MRS or MLO broths, were inoculated into H-MDBmod medium at 0.1%, and incubated at 28°C until mid-log phase. Then, cells were removed by centrifugation and histamine in supernatants was quantified using an enzymatic method and HPLC, as proposed by Landete *et al.* (2005).

Detection of the histidine decarboxylase gene

Bacterial DNA for partial *hdc* gene amplification was obtained using the Microbial DNA isolation Kit (MoBio Laboratories, Inc.). We used different primer pairs to amplify the internal part of the histidine decarboxylase A gene of LAB. These primer pairs JV16HC/JV17HC and CL1/JV17HC were previously described by Le Jeune *et al.* (1995). A new CL1mod was designed, this primer comes from CL1 (Le Jeune *et al.* 1995) but we have modified the original sequence in order to reduce the number of degenerated positions, the sequence of CL1mod is 5'-CCA GG(AT) AAC ATT GGT AAT GGA TA-3'. The combinations of primers used to amplify *hdc* were JV16HC/JV17HC and CL1mod/JV17HC.

The amplification conditions for the couple CL1mod/JV17HC were 5 min at 95°C for denaturation, and subsequently, 40 cycles at 94°C for 0.5 min, 0.5 min at 39.4°C, and 72°C for 2 min followed by 10 min at 72°C. The amplifications with the couple JV16HC/JV17HC were under these conditions: 5 min at 95°C for denaturation

and 40 cycles at 94°C for 1 min, 1 min at 39.6°C, and 1 min at 72°C followed by 10 min at 72°C.

The PCR products were separated by gel electrophoresis in a 1.2% agarose gel using Tris–borate–EDTA 0.5 mol l⁻¹ as buffer system (Sambrook *et al.* 1989). The gels were analysed after being stained with ethidium bromide.

Analyses of histamine concentration and histamine-producing LAB from wines

The histamine concentrations from 12 wines after malolactic fermentation were analysed using the HPLC method proposed by Landete *et al.* (2005). The LAB from these wines were isolated and identified by fluorescence *in situ* hybridization (Blasco *et al.* 2003) and by 16S-ARDRA (Rodas *et al.* 2003), and their histamine-producing ability was quantified using the HPLC and enzymatic methods (Landete *et al.* 2005). The presence of *hdc* was also analysed as mentioned above.

RESULTS

The ability of 136 LAB to produce histamine has been analysed using different methods: a qualitative detection method based on a plate assay, and quantitative HPLC and enzymatic methods. A PCR-specific test was also used to detect whether the *hdc* gene was present in the strains under study.

Ability of LAB to produce histamine

As shown in Table 1, the following histamine-producing strains were detected using the plate assay: one *Lact. buchneri*; three *Lact. hilgardii*; five *P. parvulus* and one *O. oeni* (H-MDAmoD). When these H-MDAmoD-positive strains were grown in H-MDBmoD and analysed using the enzymatic method and HPLC, the histamine levels produced were 98 mg l⁻¹ (*O. oeni* 4042) or higher (Table 2). However, *Lact. mali*, *Leuconostoc* and the remaining *Oenococcus* histamine-producing strains showed low levels of histamine production (≤ 48 mg l⁻¹), which could only be detected using the enzymatic method and HPLC.

Oenococcus oeni 4042 was the only *Oenococcus* strain that proved positive for histamine production on H-MDAmoD medium, this *Oenococcus* produced high levels of histamine, about 100 mg l⁻¹. This strain exhibited important growth in the plate assay, much higher than the other *Oenococcus* analysed, according to the higher energy levels obtained from histidine decarboxylation (Molenaar *et al.* 1993). All *Pediococcus* histamine producers could be detected by plate assay, because all of them produced high levels of histamine (>186 mg l⁻¹) (Table 2).

Table 2 Histamine production in H-MDBmoD by lactic acid bacteria detected by enzymatic method, HPLC and plate assay

Species	Strain	Enzymatic method (mg l ⁻¹)	HPLC (mg l ⁻¹)	Plate assay
<i>Lact. buchneri</i>	ST2A	285	297	+
<i>Lact. hilgardii</i>	5w	122	125	+
<i>Lact. hilgardii</i>	321	39	39	-
<i>Lact. hilgardii</i>	464	222	235	+
<i>Lact. hilgardii</i>	UR28	154	160	+
<i>Lact. mali</i>	45	45	46	-
<i>Lact. mali</i>	54	43	41	-
<i>P. parvulus</i>	276	201	203	+
<i>P. parvulus</i>	281	321	325	+
<i>P. parvulus</i>	339	186	189	+
<i>P. parvulus</i>	T4	265	272	+
<i>P. parvulus</i>	T51	211	213	+
<i>Leuc. mesenteroides</i>	86	42	43	-
<i>O. oeni</i>	3972	34	32	-
<i>O. oeni</i>	3975	12	10	-
<i>O. oeni</i>	4000	23	23	-
<i>O. oeni</i>	4001	19	18	-
<i>O. oeni</i>	4007	27	23	-
<i>O. oeni</i>	4010	16	15	-
<i>O. oeni</i>	4013	27	29	-
<i>O. oeni</i>	4015	8	12	-
<i>O. oeni</i>	4016	26	25	-
<i>O. oeni</i>	4020	32	30	-
<i>O. oeni</i>	4021	12	13	-
<i>O. oeni</i>	4023	17	16	-
<i>O. oeni</i>	4025	14	14	-
<i>O. oeni</i>	4029	36	34	-
<i>O. oeni</i>	4031	8	9	-
<i>O. oeni</i>	4039	23	23	-
<i>O. oeni</i>	4041	19	17	-
<i>O. oeni</i>	4042	98	99	+
<i>O. oeni</i>	4043	33	33	-
<i>O. oeni</i>	4045	12	13	-
<i>O. oeni</i>	4046	6	5	-
<i>O. oeni</i>	L90	27	29	-
<i>O. oeni</i>	L91	32	33	-
<i>O. oeni</i>	L234	48	45	-
<i>O. oeni</i>	M42	19	18	-

Lactobacillus buchneri ST2A (Sumner *et al.* 1985) was used as a positive control, this strain was positive in H-MDAmoD and is able to produce histamine concentrations of about 300 mg l⁻¹. Three of the four *Lact. hilgardii* histamine producers in H-MDBmoD were found positive in the plate assay and showed the highest levels of histamine production when analysed using the enzymatic method and HPLC (Table 2). Three strains of *Lact. mali* were analysed but none was found positive on H-MDAmoD plates (Table 1). However, two strains were positive when histamine was quantified using the enzymatic method and HPLC

in H-MDBmod cultures, but they displayed low histamine production (Table 2).

When *Leuconostoc* strains were analysed, no positive strains were found in H-MDAmod, although we did find one positive strain when the quantitative methods were used; this strain displayed low histamine production (Table 2).

When we analysed all strains isolated from wine using the enzymatic method and HPLC we found that 13% of *Lactobacillus*, 12.2% of *Pediococcus*, 6.3% *Leuconostoc* and 78.1% of *Oenococcus* were able to produce histamine (Table 1). On quantifying the histamine produced, we observed that all the *Pediococcus* produced levels over 200 mg l⁻¹. Thus *Pediococcus* was the genus with the highest histamine production (Table 2). We can also observe that although *Oenococcus* is the genus displaying the highest percentage of histidine decarboxylase-positive strains, it also gave lower levels of histamine production. In the case of the *Lactobacillus* genus, *Lact. hilgardii* was the species of LAB isolated from wine with the highest levels of histamine production, however only 26.7% of *Lact. hilgardii* were histamine producers. By contrast, *Lact. mali* displayed low histamine production.

Detection of the histidine decarboxylase gene

The presence of the *hdc* gene was observed by means of a PCR test. The primer pair JV16HC/JV17HC produced the

synthesis of an approx. 370 bp amplification product from a histidine decarboxylase gene. Amplification using the other primer pair CL1mod/JV17HC produced a fragment of about 450 bp (Fig. 1).

Because some positive strains for histamine production detected by H-MDAmod, enzymatic method and HPLC were not amplified with JV16HC/JV17HC under the conditions originally described by Le Jeune *et al.* (1995), we decided to modify the amplification programme. The number of amplification cycles was increased from 30 to 40, and the annealing temperature decreased from 48 to 39.6°C. In this way, 100% of *Lactobacillus*, *Pediococcus* and *Leuconostoc* histamine producers showed amplification under the new conditions for the JV16HC/JV17HC pair (Table 3). Nevertheless, only 56% of *Oenococcus* histamine producers showed amplification for *hdc*. Therefore, we improved the original CL1 sequence (Le Jeune *et al.* 1995) to a CL1mod primer with fewer degenerated positions according to the sequences of histidine decarboxylase A gene. Under these conditions, 100% of *Oenococcus* histamine-producing strains were positive in the PCR test with CL1mod/JV17HC, while some *Lactobacillus* histamine producers were negative with CL1mod/JV17HC (Table 3, Fig. 1). Under the new amplification conditions and primer sequences that we propose, both pairs of primers yielded accurate results for *Pediococcus* and *Leuconostoc*. For *Lactobacillus*, the JV16HC/JV17HC combination was more exact, whereas for *Oenococcus*, the

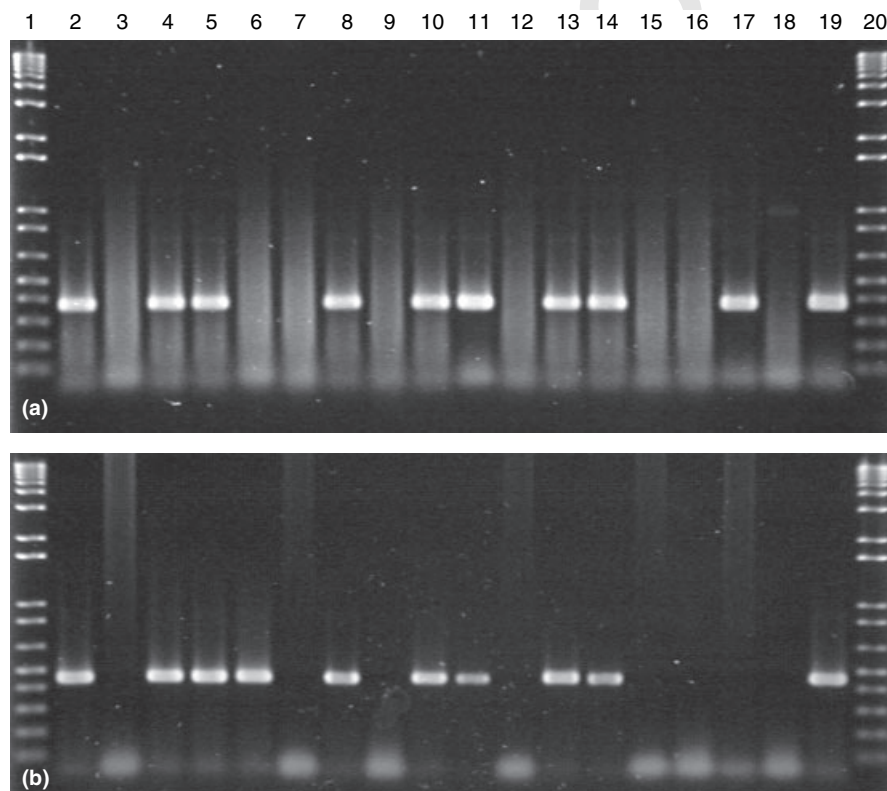


Fig. 1 Electrophoresis of DNA amplified with primer sets JV16HC/JV17HC (a) and CL1mod/JV17HC (b). Lanes 1 and 20, 1 kb ladder; lane 2, positive control. *Lactobacillus buchneri* ST2A, (lane 3) negative control *Pediococcus pentosaceus* 136, (lane 4) *Oenococcus oeni* 4042, (lane 5) *O. oeni* 4023, (lane 6) *O. oeni* 4021, (lane 7) *O. oeni* 4047, (lane 8) *O. oeni* 4010, (lane 9) *O. oeni* 3996, (lane 10) *O. oeni* 4045, (lane 11) *P. parvulus* 339, (lane 12) *P. pentosaceus* 56, (lane 13) *P. parvulus* 276, (lane 14) *Lact. hilgardii* 464, (lane 15) *Lact. plantarum* 98, (lane 16) *Lact. paracasei* 364, (lane 17) *Lact. hilgardii* 5w, (lane 18) *Leuconostoc mesenteroides* 27, (lane 19) *Leuc. mesenteroides* 86

Table 3 Percentage and number of positive strains for histamine production detected by PCR test with each pair of primers and overall results

Genus	No. positives	CL1mod/ JV17HC	JV16HC/ JV17HC
<i>Lactobacillus</i>	7	71.4 (5)	100 (7)
<i>Pediococcus</i>	5	100 (5)	100 (5)
<i>Leuconostoc</i>	1	100 (1)	100 (1)
<i>Oenococcus</i>	25	100 (25)	56 (14)

CL1mod/JV17HC choice gave better results (Table 3, Fig. 1).

The histidine decarboxylase activity assay using the enzymatic method and HPLC method demonstrated that all histamine-producing strains amplified the *hdc* gene adequately in the PCR test, with CL1mod/JV17HC or JV16HC/JV17HC or with both pairs of primers. Therefore, the correlation between the presence of *hdc* detected by the PCR test and the histidine decarboxylase activity detected by enzymatic method and HPLC was 100%.

Analysis of wines containing histamine

In order to characterize the LAB responsible for histamine production in wine, we analysed 12 wines after malolactic fermentation with different histamine content. LAB were isolated from these wines, and they were identified and analysed for their ability to produce histamine in synthetic media and presence of the *hdc* gene (Table 4). Bacteria were present in about 10^6 – 10^7 CFU ml⁻¹, except wines 7 and 9 that contained no detectable bacteria. Eight wines showed histamine concentrations below 10 mg l⁻¹. When the LAB isolated from these wines were analysed, only *O. oeni* strains were found to be histamine producers. However, *Lact. hilgardii* and *P. parvulus* histamine producers appeared in wines with histamine levels over 10 mg l⁻¹. *Oenococcus oeni* histamine-producing strains appeared together with these *Lact. hilgardii* and *P. parvulus* in some cases (Table 4).

When the histamine production of these LAB was analysed in H-MDBmod the highest ability to synthesize histamine corresponded to *Lact. hilgardii* and *P. parvulus*, which were isolated from wines containing the highest histamine levels. *Oenococcus oeni* strains were isolated from both wines with high and with low histamine content, but always produced low amounts of this biogenic amine in synthetic media. All these data indicate that *Lact. hilgardii* or *P. parvulus* strains were responsible for histamine synthesis in these wines. These results are in agreement with those obtained from the 136 wine LAB strains previously analysed.

Table 4 Analysis of histamine concentration (^a) from analysed wines. LAB isolated from these wines, and respective PCR test of *hdc* and histamine production in H-MDBmod (^b)

Wine no.	[Histamine] ^a (mg l ⁻¹)	Isolated LAB	<i>hdc</i> PCR	[Histamine] ^b (mg l ⁻¹)
1	3	<i>O. oeni</i> UR10	+	21
2	15	<i>O. oeni</i> UR121B	+	14
		<i>Lact. hilgardii</i> UR28	+	128
3	3	<i>O. oeni</i> UR30	+	21
4	5	<i>O. oeni</i> UR54	+	22
5	2	<i>O. oeni</i> UR110	+	17
6	16	<i>P. parvulus</i> UR96	+	330
7	1	ND	NA	NA
8	6	<i>O. oeni</i> UR42	+	31
9	2	ND	NA	NA
10	20	<i>O. oeni</i> T6	+	9
		<i>P. parvulus</i> T4	+	212
11	21	<i>P. parvulus</i> T22	+	234
12	4	<i>O. oeni</i> UR83B	+	17

ND, not detected; NA, not applicable.

DISCUSSION

Histamine levels above 500–1000 mg kg⁻¹ food are considered potentially dangerous to human health (ten Brink *et al.* 1990). This level is based on the concentration found in food products involved in histamine poisoning (Taylor 1985). An upper limit of 100 mg histamine kg⁻¹ food and 2 mg l⁻¹ alcoholic beverage has been put forward. As alcohol diminishes the efficiency of man's natural detoxification system (Sessa *et al.* 1984; Sattler *et al.* 1985), the consumption of alcoholic beverages leads to increased sensitivity towards histamine. According to Lehtonen (1996), upper limits for histamine in wine have been recommended in Germany (2 mg l⁻¹), Belgium (5–6 mg l⁻¹), France (8 mg l⁻¹) and in Switzerland 10 mg l⁻¹ has been established as a tolerable value of histamine in wine. It is important to know the ability of bacteria present in fermented foods to produce histamine, in order to establish the potential risk of histamine generation. In this work, 136 LAB strains isolated from wine were used to screen the histidine decarboxylase activity and presence of the histidine decarboxylase gene. An improved plate assay (H-MDA-mod), an enzymatic method, HPLC, and PCR of *hdc* were used in the analysis.

The conclusions drawn regarding the method used are, H-MDBmod is an appropriate medium to detect histamine production, because the histidine decarboxylase gene is always expressed in this medium. However, as in any plate assay the H-MDAmod medium is only suitable to detect strains of LAB producing histamine levels that are dangerously high for health, because its sensitivity is low,

about 100 mg l⁻¹. The plate assay is simple, low cost and useful for determining LAB producing dangerous levels of histamine. It is possible to analyse the ability of many LAB to produce high amounts of histamine in a period of 2 d.

We suggest using H-MDAmod supplemented with natamycin and incubated under anaerobic conditions as an easy, routine system to detect the more dangerous LAB histamine producers in wines. Natamycin is an antibiotic that produces the death of yeast present in wine and anaerobic conditions do not allow acetic acid bacteria to grow. The LAB able to produce high levels of histamine are identified by a purple halo.

The enzymatic method and HPLC (Landete *et al.* 2005) are more sensitive than the H-MDAmod medium, allowing the detection of histamine concentrations below 0.5 and 0.1 mg l⁻¹ respectively (Landete *et al.* 2005). Both quantitative methods can be employed in synthetic media and grape must and wines (white, rose or red).

The PCR method allows the strains harbouring the *hdc* gene to be detected, which are therefore potential histamine producers. It is the fastest method shown here, in 3 h it is possible to detect the presence of bacteria harbouring the *hdc* gene. We strongly recommend using CL1mod/JV17HC for *O. oeni*, and JV16HC/JV17HC for *Lactobacillus*, it is possible to use both primer pairs for *Pediococcus* and *Leuconostoc*. *Oenococcus oeni* is the LAB with the highest percentage of strains harbouring the *hdc* gene, however the histamine concentration produced by *Oenococcus* is always low.

When we used the primer CL1 under the conditions proposed by Le Jeune *et al.* (1995), some strains proved to be histamine producers in the enzymatic method and HPLC, proved negative in the PCR test. With the primer set CL1mod/JV17HC and the conditions proposed here, neither false positives nor false negatives were observed for *Oenococcus* strains. Besides, under the new amplification conditions for JV16HC/JV17HC, neither false positives nor false negatives were observed in *Lactobacillus* strains. We detected a higher percentage of *Oenococcus* positive strains in the PCR test than other researchers (Le Jeune *et al.* 1995; Coton *et al.* 1998). This can be explained because CL1mod primer has less degenerated positions according to the sequences of the *hdc* gene than CL1. The value of these results is based on the high number of analysed strains and on the use of highly sensitive methods to detect histidine decarboxylase activity. Thus, we suggest the use of the primers CL1mod/JV17HC and JHV16/JV17HC under the conditions described here to detect all LAB histamine-producing strains. We also report a 100% correlation between the presence of the *hdc* gene and activity of histidine decarboxylase in LAB strains. This fact supports the application of molecular methods to detect

hazardous bacteria and prevent histamine synthesis in wines.

We observed that *O. oeni*, *Lact. hilgardii*, *Lact. mali*, *Leuconostoc mesenteroides* and *P. parvulus* can contribute to histamine synthesis in wine, but the main species responsible for high histamine production (>10 mg l⁻¹) in wines seem to be *Lact. hilgardii* and *P. parvulus*.

In this work we demonstrate that histamine-producing strains of *O. oeni* are very frequent in wine, in contrast Moreno-Arribas *et al.* (2003), where no *Oenococcus* histamine-producing strains were detected. However, the present work agrees with Guerrini *et al.* (2002) who found a high number of *Oenococcus* histamine producers in wine but low levels of histamine production in general. Histamine-producing strains of *Lactobacillus*, *Pediococcus* and *Leuconostoc* are also detected, but less frequently. Our results do not oppose the common idea that *Pediococcus* spp. (Delfini 1989) is the main genus responsible for histamine production, because although the percentage of *Pediococcus* histamine producers is low, some strains can produce the highest concentrations of histamine. Moreover, *Lact. hilgardii* and *Lact. buchmeri* are also able to produce high levels of histamine.

The presence of *O. oeni*, *Lact. hilgardii* and *P. parvulus* histamine producers found in wines containing histamine, is in accordance with certain authors who have reported higher histamine levels after malolactic fermentation (Castino 1975; Aerny 1985; Cilliers and van Wyk 1985).

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors gratefully acknowledge support by the Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (CICYT), Ministerio de Educación y Ciencia, Spain (Project AGL2000-0827-C02-01). The authors are grateful to Lucía Polo, Ana Rodas and Lucía Blasco for providing assistance in the laboratory work.

REFERENCES

- Aerny, J. (1985) Origine de l'histamine des vins. Connaissances actuelles. *Bull l'Office Int Vigne Vin* **656-657**, 1016-1019.
- Blasco, L., Pardo, I. and Ferrer, S. (2003) Development of specific fluorescent oligonucleotide probes for *in situ* identification of wine lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Lett* **225**, 115-123.
- ten Brink, B., Damink, C., Joosten, H.M.L.J. and Huis in 't Veld, J.H.J. (1990). Occurrence and formation of biologically active amines in foods. *Int J Food Microbiol* **11**, 73-84.
- Cabanis, J.C. (1985) L'histamine et sa toxicité. *Bull l'Office Int Vigne Vin* **656**, 1009-1015.
- Caspritz, G. and Radler, F. (1983) Malolactic enzyme of *Lactobacillus plantarum*. *J Biol Chem* **258**, 4907-4910.
- Castino, M. (1975) Formation of histamine in wines as a consequence of malolactic fermentation. *Atti Acad Ital Vite Vino Siena* **27**, 173-188.

- Chu, C.H. and Bejdanes, L.F. (1981) Effect of diamines, polyamines and tuna fish extracts on the binding of histamine to mucin in vitro. *J Food Sci* **47**, 79–xx.
- Cilliers, J.D. and van Wyk, C.J. (1985) Histamine and tyramine content of South African wine. *S Afr J Enol Viticult* **6**, 35–40.
- Coton, E., Rollan, G., Bertrand, A. and Lonvaud-Funel, A. (1998). Histamine-producing lactic acid bacteria in wines: early detection, frequency and distribution. *Am J Enol Viticult* **49**, 199–204.
- Delfini, C. (1989) Ability of wine malolactic bacteria to produce histamine. *Sci Aliments* **9**, 413–416.
- Guerrini, S., Mangani, S., Granchi, L. and Vincenzini, M. (2002) Biogenic amine production by *Oenococcus oeni*. *Curr Microbiol* **44**, 374–378.
- Lafon-Lafourcade, S. (1975) L'histamine des vins. *Connaissance Vigne Vin* **22**, 11–24.
- Landete, J.M., Ferrer, S. and Pardo, I. (2005) Improved enzymatic method for the rapid determination of histamine in wine. *Food Addit Contam* (in press).
- Le Jeune, C., Lonvaud-Funel, A., ten Brink, B., Hofstra, H. and van der Vossen, J.M.B.M. (1995) Development of a detection system for histidine decarboxylating lactic acid bacteria on DNA probes, PCR and activity test. *J Appl Bacteriol* **78**, 316–326.
- Lehtonen, P. (1996) Determination of amines and amino acids in wine – a review. *Am J Enol Viticult* **47**, 127–133.
- Lonvaud-Funel, A. (2001) Biogenic amines in wines: role of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Lett* **199**, 9–13.
- Lonvaud-Funel, A. and Joyeux, A. (1994) Histamine production by wine lactic acid bacteria: isolation of a histamine-producing strain of *Leuconostoc oenos*. *J Appl Bacteriol* **77**, 401–407.
- Molenaar, D. Bosscher, J.S., ten Brink, B. Driessen, A.J. and Konings, W.N. (1993). Generation of a proton motive force by histidine decarboxylation and electrogenic histidine/histamine antiport in *Lactobacillus buchneri*. *J Bacteriol* **175**, 2864–2870.
- Moreno-Arribas, M.V., Polo, M.C., Jorganes, F. and Muñoz, R. (2003) Screening of biogenic amine production by lactic acid bacteria isolated from grape must and wine. *Int J Food Microbiol* **84**, 117–123.
- Ough, C.S., Crowell, E.A., Kunkee, R.E., Vilas, M.R. and Lagier, S. (1987) A study of histamine production by various wine bacteria in model solutions and in wine. *J Food Process Preserv* **12**, 63–70.
- Rodas, A.M., Ferrer, S. and Pardo, I. (2003) 16S-ARDRA, a tool for identification of lactic acid bacteria isolated from grape must and wine. *Syst Appl Microbiol* **26**, 412–422.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sattler, J., Herterberg, R., Lorenz, W., Schmidt, U., Grombach, M. and Stahlknecht, C.D. (1985) Inhibition of human and canine diamine oxidase by drugs used in intensive care unit: relevance for clinical side effects?. *Agents Actions* **16**, 91–94.
- Sessa, A., Desiderio, M.A. and Perin, A. (1984) Effect of acute ethanol administration on diamine oxidase activity on the upper gastrointestinal tract of rat. *Alcohol Clin Exp Res* **8**, 185–190.
- Silla-Santos, M.H. (1996) Biogenic amines: their importance in foods. *Int J Food Microbiol* **29**, 213–231.
- Sumner, S.S., Speckhard, M.W., Somers, E.B. and Taylor, S.L. (1985) Isolation of histamine-producing *Lactobacillus buchneri* from Swiss cheese implicated in a food poisoning outbreak. *Appl Environ Microbiol* **50**, 1094–1096.
- Taylor, S.L. (1985) *Histamine Poisoning Associated with Fish, Cheese and Other Foods*. FAO/WHO monograph VPH/FOS/85.1. pp. 1–47.

Landete, J.M., Pardo, I. y Ferrer, S. 2005. Tyramine and phenylethylamine synthesis among lactic acid bacteria isolated from wine. Int. J. Food. Microbiol. (enviado).

Capítulo 4

1 **Tyramine and phenylethylamine synthesis among lactic acid**
2 **bacteria isolated from wine**

3

4

5

6 José María Landete, Isabel Pardo and Sergi Ferrer*

7

8

9

10 ENOLAB – Laboratori de Microbiologia Enològica

11 Departament de Microbiologia i Ecologia, Facultat de Biologia, Universitat de València,

12 València, Spain.

13 c/ Dr. Moliner 50. E46100 Burjassot-València. Spain

14

15

16

17

18

19 *Corresponding author: Sergi Ferrer

20 Telephone: +34963544390

21 Fax: +34963544372

22 E-mail: Sergi.Ferrer@uv.es

23 **Abstract**

24

25 The ability of wine lactic acid bacteria to produce tyramine and phenylethylamine
26 was investigated by biochemical and genetic methods. An easy and accurate plate medium
27 was developed to detect tyramine producer strains, and a specific PCR that detects the
28 presence of *tdc* gene was employed. All strains possessing the *tdc* gene produce tyramine
29 and phenylethylamine. Wines containing high quantities of tyramine and phenylethylamine
30 showed to contain *Lactobacillus brevis* or *Lactobacillus hilgardii* strains. The main wine
31 species tyramine producer was *Lactobacillus brevis* whereas this character was no present
32 or infrequent in the rest of analysed wine strains.

33

34 **Key words:** Tyramine; phenylethylamine; lactic acid bacteria; wine; *tdc* gene

35 **1. Introduction**

36

37 Biogenic amines are found in fermented foods such as dry sausages, cheeses and
38 wines. They are formed as a consequence of amino acids decarboxylation by lactic acid
39 bacteria (LAB). Histamine and tyramine have been the most studied biogenic amines due
40 to the toxicological effects derived from their vasoactive and psychoactive properties.
41 Ingestion of large amounts of these amines causes severe health troubles such as migraine
42 and hypertension, and also psychiatric disorders such as depression, schizophrenia and
43 Parkinsonism (Ten Brink et al. 1990, Halász et al. 1994). Alcohol may enhance the effect
44 of amines by direct or indirect inhibition of amine oxidase, a human enzyme that degraded
45 these amines (Schneyder 1973, Zee et al. 1983). Wines containing histamine could also
46 contain tyramine and other biogenic amines such as phenylethylamine.

47 Tyrosine decarboxylase (TDC) converts tyrosine to tyramine; its purification and
48 characterization has been reported for *Enterococcus faecalis* (Borrensen et al. 1989) and
49 *Lactobacillus brevis* IOEB 9809 (Moreno-Arribas and Lonvaud-Funel 1999). Later, the *tdc*
50 genes of both species were sequenced (Connil et al. 2002, Lucas and Lonvaud-Funel 2002,
51 Lucas et al. 2003). The published sequences of *tdc* genes of *Lb. brevis* (Lucas et al. 2003)
52 and *Enterococcus faecalis* (Connil et al. 2002), and the *Enterococcus faecium*
53 decarboxylase protein (ZP_00036405), allowed the development of primers for the
54 detection of tyramine-producing LAB by a PCR test (Lucas and Lonvaud-Funel 2002,
55 Lucas et al. 2003).

56 The majority of research about the presence of tyramine in foods has been focused
57 on cheese, fermented sausage and fermented carrot. *Streptococcus* sp. and *Lactobacillus*
58 *curvatus* appear to be the main tyramine producers in fermented sausages (Rice et al.
59 1976, Straub et al. 1994), whereas *Lb. brevis* showed this property in dry sausages (Maijala

60 et al. 1993) and cheese (Joosten and Northolt 1989). Edwards et al. (1987) and Bover-Cid
61 and Holzapfel (1999) revealed tyramine production by all strains of *Carnobacterium*
62 *divergens* and *Carnobacterium piscicola* isolated from beef meat. Choudhury et al. (1990)
63 reported that *Oenococcus oeni* was the species responsible for tyramine production in
64 fermented carrots. The identification of bacteria that produce large amounts of tyramine
65 constitutes a raising interest in winemaking. In the last years, tyramine-containing wines
66 have been investigated in order to look for bacteria responsible for this amine. Some
67 authors demonstrated that some strains of *Lactobacillus*, particularly *Lb. brevis*, are
68 tyramine-producers (Moreno-Arribas et al. 2000).

69 The study of phenylethylamine production by LAB has received less attention,
70 though some authors as González del Llano et al. (1998), Moreno-Arribas et al. (2000) and
71 Bover-Cid et al. (2001) have demonstrated the simultaneous production of tyramine and
72 phenylethylamine in fermented sausage, milk and wine. The species responsible for them
73 were *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* and *Lactobacillus curvatus* in sausage,
74 *Leuconostoc mesenteroides* and *Weisella paramesenteroides* (syn: *Leuconostoc*
75 *paramesenteroides*) in milk and *Lb. brevis* and *Lactobacillus hilgardii* in wine (Moreno-
76 Arribas et al. 2000). None study about the phenylethylamine decarboxylase enzyme has
77 been performed to our knowledge. However, Boeker and Snell (1972) pointed that
78 phenylethylamine could be formed by the tyrosine decarboxylase.

79 The main objective of this work was to study the incidence of the tyramine and
80 phenylethylamine production in LAB present during the winemaking process. To achieve
81 this objective biochemical and genetic methods have been used and results were compared.
82 A plate differential medium is proposed to facilitate the identification of tyramine producer
83 strains.

84 2. Material and methods

85

86 2.1. Bacterial strains and growth conditions

87

88 Wine strains appearing in Table 1 were isolated and identified by Rodas et al.
89 (2003). Other microorganisms used in this study were five *Enterococcus faecalis* from
90 CECT (184, 408, 795, 963 and 4039), *Carnobacterium divergens* CECT 4016, *Oenococcus*
91 *oeni* CECT 4100^T and two strains of *Lactobacillus sakei* isolated from salmon. All strains
92 were grown in MRS broth (Scharlab) supplemented with 0.5% L-cysteine, except
93 *Oenococcus oeni* that was cultivated in MLO (Zuñiga et al. 1993); all of them were
94 incubated under aerobic conditions at 28°C until mid-log phase.

95

96 2.2. Determination of tyramine and phenylethylamine forming ability in plate medium

97

98 Tyrosine decarboxylase activity of bacteria was assayed by two different plate
99 media; T-MDA plate medium described by Maijala (1993), and a plate medium described
100 by us in this paper: Tyramine Production Medium (TPM), it contains per liter: meat extract
101 8 g, tryptone 5 g, yeast extract 4 g, tyrosine 3 g, glucose 1.5 g, fructose 1 g, Tween 80 0.5
102 g, pyridoxal 5-phosphate 0.25 g, MgSO₄ 0.2 g, CaCO₃ 0.1 g, MnSO₄ 0.05 g, FeSO₄ 0.04 g
103 and agar 20 g. The pH was adjusted to 5.5. Strains previously grown on MRS or MLO
104 plates were streaked on T-MDA and TPM plates. A positive response in T-MDA implied a
105 colour change of this medium, caused by a pH increase due to the basic nature of the
106 amine. The strains were considered tyramine positive in TPM if a clear zone below the
107 grown cells developed (Figure 1). Tyrosine is insoluble and gives an opaque aspect to
108 TPM medium. When tyrosine is decarboxylated to soluble tyramine the medium becomes

109 transparent. The suitability of the TPM medium to detect tyramine producer bacteria was
110 evaluated by comparison with results obtained by an HPLC assay (Landete et al. 2005b).

111 The ability of bacteria to produce phenylethylamine was assayed in the MDA solid
112 medium (Maijala 1993) supplemented with 10 g l⁻¹ of phenylalanine and 0.25 g l⁻¹ of
113 pyridoxal 5-phosphate (Phe-MDA).

114 The plates were incubated at 28°C in aerobic and anaerobic conditions in order to
115 study the effect of oxygen on tyramine and phenylethylamine production.

116

117 2.3. Quantification of tyramine and phenylethylamine

118

119 The production of tyramine and phenylethylamine in liquid media by LAB was
120 simultaneously quantified by HPLC. To do that, 0.1 ml of a pre-culture grown in MRS or
121 MLO media were inoculated in TPM broth supplemented with 10 g l⁻¹ of phenylalanine
122 and incubated at 28 °C until mid-log phase. Samples were centrifuged (13000 rpm 8 min),
123 filtered through a membrane (regenerated cellulose, 0.45 µm pore size) and derivatized
124 with orthophthalaldehyde (OPA). Then, samples were injected into the HPLC system as
125 described by Landete et al. (2005b)

126

127 2.4. Detection of tyrosine decarboxylase gene

128

129 Total DNA was obtained using the microbial DNA isolation Kit (MoBio
130 Laboratories, Inc). The detection of *tdc* gene in LAB was made by partial amplification of
131 this gene using the primers p0303 (5'-CCACTGCTGCATCTGTTTG-3') (Lucas et al.
132 2003) and P1-rev (5'-CCRTARTCIGGIATIGCRAARTCIGTRTG-3') (Lucas and
133 Lonvaud-Funel 2002). The mixture of amplification consisted of 1 ng of total DNA, 50

134 mM of each primer, 1 unit of Taq DNA polymerase (Dynazyme), 5 µl of Taq buffer, and 1
135 µl dNTPs (50 pmol). A final volume of 50 µl was reached by adding H₂O. The
136 amplification was performed following the next conditions: 95 °C for 5 min, then by 35
137 cycles of 94 °C for 1 min (denaturation), 50 °C for 1 min (annealing), and 72 °C for 1 min
138 (extension), and a final extension at 72 °C for 10 min. The PCR products were separated by
139 gel electrophoresis on a 1.2 % agarose gel using Tris-borate EDTA 0.5 M as buffer system
140 (Sambroock et al. 1989). The gels were analysed after staining with ethidium bromide.

141

142 *2.5. Chemical and microbiological analysis of wines*

143

144 Red wines from Utiel-Requena with malolactic fermentation accomplished were
145 analysed in order to quantify their tyramine and phenylethylamine concentrations and to
146 identify the LAB present in them.

147 Chemical analyses of wines were made by HPLC as described in paragraph 2.3.

148 LAB strains were isolated from these wines by plating decimal dilutions on MRS
149 plates supplemented with 0.5% L-cysteine, and MLO plates (Zuñiga et al 1993) which
150 were incubated at 28 °C. LAB were identified by means of Fluorescence *in situ*
151 Hybridisation (FISH) using specific fluorescent oligonucleotide probes (Blasco et al.
152 2003). The ability of LAB to produce tyramine and phenylethylamine was tested as
153 described in paragraph 2.3 and the presence of *tdc* gene as in paragraph 2.4.

154 **3. Results**

155

156 The incidence of the ability to form tyramine and phenylethylamine was screened
157 among 150 wine LAB by different methods: two plate media (T-MDA and TPM), HPLC
158 and a molecular method that detects the *tdc* gene.

159 Tyramine production was firstly assayed in the T-MDA and TPM plates. Results
160 obtained with a subset of strains showed that aerobic conditions produced higher quantities
161 of tyramine, therefore the rest of assays were performed in aerobic conditions. A higher
162 number of strains showed positive reaction in T-MDA than in TPM. However, we
163 observed higher growth and stronger reaction of wine strains when analysed in the second
164 medium. We observed that many strains revealed as positive in T-MDA, did not produce
165 this amine in TPM liquid media when analysed by HPLC, whereas all positive strains on
166 TPM plates produced tyramine in different quantities (Tables 1 and 2). The levels of
167 tyramine produced by lactic acid bacteria strains ranged between 233 and 1422 mg l⁻¹; the
168 highest amount was produced by one strain of *Enterococcus faecalis*. Specific PCR
169 detection of *tdc* gene showed an amplification fragment of 370 bp corresponding to this
170 gene, only in TPM positive strains whatever the species tested (Figure 2).

171 A correlation of 100 % was observed between the results obtained on TPM plates
172 (detection medium) and in TPM broth (quantification medium), and all strains showing
173 ability to produce tyramine harboured the *tdc* gene. However, this gene was not present in
174 strains that were unable to produce this amine. These correlations lead to propose TPM and
175 *tdc* specific PCR as useful methods to screen the ability to produce tyramine in wine LAB.
176 Positive strains on T-MDA but negative on TPM, HPLC quantification and *tdc* PCR
177 amplification, must be considered as false positives.

178 Tyramine production is not a general trait among the lactic acid bacteria reported in
179 Table 1, only 28 strains from 136 showed to be tyramine producers. This ability seems to
180 be a general characteristic of *Lactobacillus brevis* and *Enterococcus faecalis* strains: all
181 assayed strains produced this amine but at different concentrations (Table 2). However, the
182 tyramine production is a strain dependent character in *Lb. hilgardii*, as only two of eight
183 strains in Table 1 produced it. Strains of other LAB species, tested in this work, did not
184 produce this amine. From our results we cannot speculate with the distribution of this
185 character in *Lactobacillus sakei* and *Carnobacterium divergens*, because the number of
186 strains analysed is too low to make general conclusions, but these species have not been
187 described in wine.

188 Phenylethylamine production was assayed in the Phe-MDA plate medium and TPM
189 plus phenylalanine broth. Some strains tested on plate medium gave positive reaction, but
190 the production of phenylethylamine was not confirmed when assayed in liquid medium. In
191 this last medium only 28 from 136 strains of lactic acid bacteria reported in Table 2,
192 produced between 77 and 356 mg l⁻¹ phenylethylamine. Curiously, all strains that produced
193 tyramine also produced phenylethylamine. The levels of phenylethylamine were 4 to 5 fold
194 lower than that of tyramine produced by each strain.

195 In order to establish the relationships between tyramine and phenylethylamine
196 concentrations and lactic acid bacteria present in wine, we quantified these amines and
197 isolated LAB strains in 10 commercial wines. After identification of isolates, their abilities
198 to produce tyramine and phenylethylamine were quantified and the presence/absence of *tdc*
199 gene was investigated. The results obtained from this experiment can be observed in Table
200 3. Tyramine and phenylethylamine concentrations were low in this set of wines, being the
201 maximum values found 7 and 1.8 mg l⁻¹, respectively. The strains isolated belonged to the
202 species *Lb. brevis*, *Lb. hilgardii*, *O. oeni* and *Pediococcus parvulus*. All *Lb. brevis* and *Lb.*

203 *hilgardii* isolates were able to produce tyramine and phenylethylamine in synthetic
204 medium, but not the other isolates. From 150 LAB strains analysed in this work (see Table
205 1 and 3) 32 gave an amplification band of 370 kb corresponding to *tdc* gene. All strains
206 exhibiting this band were tyramine producers, whereas those negative in *tdc* amplification
207 were non producers. Wines in which *Lb. brevis* or *Lb. hilgardii* strains were isolated,
208 showed generally higher contents of tyramine and phenylethylamine (wines 2, 5 and 6)
209 than the other. Strains producing the highest quantities in synthetic medium did not
210 produce the highest in wine, as we can deduce from the results in Table 3. We can observe
211 that tyramine producer strains were also able to produce phenylethylamine, although the
212 quantity of this last one was always lower in both synthetic medium and wine. That
213 confirms the correlation between these two abilities, already demonstrated by the results
214 reported in Tables 1 and 2.

215 **4. Discussion**

216

217 It is important to know the ability to produce amines of bacteria involved in
218 fermented foods in order to establish the potential risk of toxicological disorders in
219 consumers. Tyramine is, besides histamine and putrescine, one of the most abundant
220 amines in wines. Phenylethylamine is also frequently found.

221 The ability to produce tyramine by bacteria has been previously checked by several
222 plate medium developed by Maijala (1993) and Bover-Cid and Holzapfel (1999). T-MDA
223 gave spurious results with our bacteria. The low glucose concentration, low pH (<5.5)
224 (Masson et al. 1997) and the presence of pyridoxal-5-phosphate have a strong enhancing
225 effect on the amino decarboxylase activity (Snell 1990) and, therefore, improves the
226 tyramine production on TPM plates. The accuracy of this medium was demonstrated by
227 comparing the results of HPLC quantification in liquid medium. This plate medium is an
228 easy, conventional and suitable method to screen LAB for tyrosine decarboxylase activity
229 in laboratories lacking sophisticated equipment.

230 In this work we have evaluated the usefulness of the specific PCR using the
231 primers described by Lucas and Lonvaud-Funel (2002) and Lucas et al. (2003) to detect
232 dangerous strains producing tyramine by analyzing a high number of strains belonging to
233 different genus and species. The couple of primers used to amplify the *tdc* gene showed to
234 be of wide application among lactic acid bacteria, because it is able to detect this gene in
235 species belonging to various genera that occur in food: *Carnobacterium*, *Enterococcus* and
236 *Lactobacillus*. As 100 % correlation between the presence of *tdc* gene and the tyramine
237 production has been demonstrated we affirm that PCR specific is a easy genetic useful for
238 the screening of dangerous LAB in foods. Genetic procedures accelerates getting results
239 and allows the introduction of early control measures to avoid the development of these

240 bacteria. A previous work used the specific PCR to detect the presence of *tdc* gene (Coton
241 et al., 2004) but the authors did not correlate the presence or absence of the amplification
242 band with the production or not of tyramine.

243 Derived from the incongruence of data obtained Phe-MDA plate medium when
244 compared to HPLC results (false positives), we stated that this medium is not an adequate
245 way to screen the ability to form phenylethylamine by LAB.

246 We have demonstrated that the phenylethylamine production is associated with
247 tyramine production in lactic acid bacteria. Others authors as González del Llano et al.
248 (1998) have already reported this correlation in some high tyramine producing
249 *Leuconostoc* strains isolated from dairy products. Moreno-Arribas et al. (2000) found
250 similar results in *Lb. brevis* and *Lb. hilgardii* isolated from wine. This correlation could be
251 explained by the fact that phenylalanine should be also a substrate for the tyrosine
252 decarboxylase enzyme, that will produce phenylethylamine in a secondary reaction as
253 Boeker and Snell (1972) demonstrated.

254 It has been demonstrated that the abilities to form tyramine and phenylethylamine
255 are not outspread among wine lactic acid bacteria. They are held mainly by *Lb. brevis* and
256 some *Lb. hilgardii* strains but not by other common wine species as *Lactobacillus*
257 *plantarum*, *Lactobacillus mali*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei*,
258 *Lactobacillus collinoides*, *P. parvulus*, *Pediococcus pentosaceus*, *Leuconostoc*
259 *mesenteroides* and *O. oeni*. Other authors have reported that all strains of *Lb. brevis*
260 isolated not only from wine but meat were able to produce tyramine (Maijala 1993,
261 Moreno-Arribas et al. 2000). The variability of this character in *Lb. hilgardii* found in this
262 work, has been already reported by Moreno-Arribas et al. (2000). The inability to produce
263 tyramine of *O. oeni*, *P. pentosaceus*, *Lb. plantarum*, *Lb. casei* showed by our strains agrees
264 with the results obtained by Moreno-Arribas et al. (2000 and 2003). However our result

265 and the results of Moreno-Arribas et al (2000 and 2003) and González del Llano et al.
266 (1998) disagree for the species *L. mesenteroides*, as we did not find positives strains in this
267 work whereas they found among their isolates; as can be easily deduced, the tyramine
268 formation is a variable character in this species. Choudhury et al. (1990) reported that one
269 strain of *O. oeni* DSM 20205 (CECT 4100^T) produced tyramine, but when this strain was
270 assayed in our system, it was unable to do that; indeed it harboured not the *tdc* gene. Our
271 observations confirm that *O. oeni* does not seem to be one of the responsible of tyramine
272 production in wines. These disagreement in results obtained by us and other researchers are
273 probably dependent on the screening method used, as an example, false positives have
274 been observed in T-MDA and Phe-MDA in this work. All the strains of non-wine species
275 assayed by us, *Lactobacillus sakei*, *E. faecalis* and *C. divergens*, were tyramine producers,
276 as already demonstrated Bover-Cid and Holzapfel (1999) and Bover-Cid et al. (2001).

277 The fact that wines in which *Lb. brevis* and/or *Lb. hilgardii* strains were found
278 exhibited the higher tyramine and phenylethylamine concentration, let us to presume that
279 strains of these species are the responsible for their synthesis. We were unable to isolate
280 amine producing strains in wines exhibiting below 2 mg l⁻¹ tyramine and 0.6 mg l⁻¹ of
281 phenylethylamine, with the exception of wine 3 in which a *Lb. brevis* strain was detected.
282 As we demonstrated the most probable tyramine and phenylethylamine producer in wine is
283 *Lb. brevis* (Landete et al. 2005a), and strains able to produce these amines in synthetic
284 medium were able to produce them in wine. The low levels of these amines in wine 3
285 could be explained because this species was in early phase of development at the moment
286 of sampling. For this reason, any increase in number of *Lb. brevis* could lead to
287 unacceptable levels of tyramine and phenylethylamine, if precursors are available. They
288 also demonstrated that the main increase of these two amines occurred during malolactic
289 fermentation.

Capítulo 4

290 In addition, we have contributed to facilitate the detection of these activities by
291 means of a biochemical plate method of easy performing for winemakers. Also, we have
292 demonstrated that a PCR specific method already described, is a useful method to evidence
293 the presence of bacteria able to form tyramine in a short time. Short times in detecting
294 problems are crucial to adopt correction measures avoiding high levels of amines in wines.

295 **Acknowledgements**

296

297 The authors gratefully acknowledge to the Comisión Interministerial de Ciencia y
298 Tecnología (CICYT), Ministerio de Educación y Ciencia, Spain (Project AGL2000-0827-
299 C02-01) by financial support of this work.

300 The authors are grateful to Lucía Polo, Ana Rodas and Lucía Blasco for providing
301 assistance in the laboratory work, and Patric Lucas and Aline Lonvaud-Funel for help and
302 support during the stage in Bordeaux and from the distance.

303 **References**

304

305 Blasco, L., Pardo, I., Ferrer, S., 2003. Development of specific fluorescent oligonucleotide
306 probes for *in situ* identification of wine lactic acid bacteria. FEMS Microbiol. Lett.
307 225, 115-123.

308 Boeker, E.A., Snell, E.E., 1972. Amino acid decarboxylases. In *The Enzymes*. 3rd Ed.,
309 (Boyer, P.D., ed.) Vol VI pp. 217, Academic Press, NY.

310 Borrensen, T., Klausen, N.K., Larsen, L.M., Sorensen H., 1989. Purification and
311 characterization of tyrosine decarboxylase and aromatic L-amino acid decarboxylase.
312 Biochem. Biophys. Acta 993, 108-115.

313 Bover-Cid, S., Holzapfel, W.H., 1999. Improved screening procedure for biogenic amine
314 production by lactic acid bacteria. Int. J. Food. Microbiol. 53, 33-41.

315 Bover-Cid, S., Hugas M., Izquierdo-Pulido, M., Vidal-Carou, M.C., 2001. Amino acid-
316 decarboxylase activity of bacteria isolated from fermented pork

317 Choudhury, N., Hansen, W., Engesser, D., Hammes, W.P., Holzapfel, W.H., 1990.

318 Formation of histamine and tyramine by lactic acid bacteria in decarboxylase assay
319 medium. Lett. Appl. Microbiol 11, 278-281.

320 Connil, N., Le Breton, Y., Dousset, X., Auffray, Y., Rincé, A., Prevost, H., 2002.

321 Identification of the *Enterococcus faecalis* tyrosine decarboxylase operon involved in
322 tyramine production. Appl. Environ. Microbiol. 68, 3537-3544.

323 Coton, M., Coton, E., Lucas, P., Lonvaud, A., 2004. Identification of the gene encoding a
324 putative tyrosine dacarboxylase of *Carnobacterium divergens* 508. Development of
325 molecular tools for the detection of tyramine-producing bacteria. Food Microbiol. 21,
326 125-130.

- 327 Edwards, R.A., Dainty, R.H., Hibbard, C.M., Ramantanis, S.V., 1987. Amines in fresh
328 beef of normal pH and the role of bacteria in changes in concentration observed
329 during storage in vacuum packs at chill temperatures. *J. Appl. Bacteriol.* 63, 427-434.
- 330 González de Llano, D., Cuesta, P., Rodríguez, A., 1998. Biogenic amine production by
331 wild lactococcal and leuconostoc strains. *Lett. Appl. Microbiol.* 26, 270-274.
- 332 Halász, A., Baráth, A., Simon-Sarkadi, L., Holzapfel, W., 1994. Biogenic amines and their
333 production by microorganism in food. *Trends Food Sci. Technol.* 5, 42-49.
- 334 Joosten, H.M.L.J., Northolt, M.D., 1989. Detection, growth, and amine capacity of
335 lactobacilli in cheese. *Appl. Environ. Bacteriol.* 55, 2356-2359.
- 336 Landete, J.M., Ferrer, S., Polo, L., Pardo, I., 2005a. Biogenic amines in wines from three
337 Spanish regions. *J. Agri. Food. Chem.* (In press).
- 338 Landete, J.M., Ferrer, S. and Pardo, I., 2005b. An improved enzymatic method for the
339 rapid determination of histamine in wine. *Food. Add. Contam.* (In press).
- 340 Lucas, P., Landete, J., Coton, M., Coton, E., Lonvaud-Funel, A., 2003. The tyrosine
341 decarboxylase operon of *Lactobacillus brevis* IOEB 9809: characterization and
342 conservation in tyramine-producing bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 229, 65-71.
- 343 Lucas, P., Lonvaud-Funel, A., 2002. Purification and partial gene sequence of the tyrosine
344 decarboxylase of *Lactobacillus brevis* IOEB 9809. *FEMS Microbiol. Lett.* 211, 85-89.
- 345 Maijala, R. L., 1993. Formation of histamine and tyramine by some lactic acid bacteria in
346 MRS-broth and modified decarboxylation agar. *Lett. Appl. Microbiol.* 17, 40-43.
- 347 Masson, F., Lebert, A., Talon, R., Montel, M.C., 1997. Effects of physico-chemical factors
348 influencing tyramine production by *Carnobacterium divergens*. *J. Appl. Microbiol.* 83,
349 36-42.

Capítulo 4

- 350 Moreno-Arribas, V., Lonvaud-Funel, A., 1999. Tyrosine decarboxylase activity of
351 *Lactobacillus brevis* IOEB 9809 isolated from wine and *L. brevis* ATCC 367. FEMS
352 Microbiol. Lett. 180, 55-60.
- 353 Moreno-Arribas, M.V., Polo, M.C., Jorganes, F., Muñoz, R. 2003. Screening of biogenic
354 amine production by lactic acid bacteria isolated from grape must and wine. Int. J.
355 Food Microbiol. 84, 117-23.
- 356 Moreno-Arribas, V., Torlois, S., Joyeux, A., Bertrand, A., Lonvaud-Funel, A., 2000.
357 Isolation, properties and behaviour of tyramine-producing lactic acid bacteria. J. Appl.
358 Microbiol. 88, 584-593.
- 359 Rice, S.L., Eitenmiller, R.R., Koehler, P.E., 1976. Biologically active amines in foods: a
360 review. J. Milk Food Technol. 36, 353-358.
- 361 Rodas, A.M., Ferrer, S. and Pardo, I., 2003. 16S-ARDRA, a tool for identification of lactic
362 acid bacteria isolated from grape must and wine. Syst. Appl. Microbiol. 26, 412-422.
- 363 Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., 1989. Molecular cloning: A Laboratory Manual,
364 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- 365 Schneyder, J., 1973. Histamine et substances similaires dans les vins. Causes de leur
366 formation. Méthodes de leur élimination du vin. Bull. L'O.I.V. 46. 821-831.
- 367 Snell, E. E., 1990. Vitamin B6 and decarboxylation of histidine. Ann. Y.
368 Acad. Sci., 585, 1-12.
- 369 Straub, B.W., Tichaczek, P.S., Kicherer, M., Hammes, W.P., 1994. Formation of tyramine
370 by *Lactobacillus curvatus* LTH 972. Z. Lebensm. Unters. Forsch. 199, 9-12.
- 371 Ten Brink, B., Damink, C., Joosten, H.M.L.J., Huis In't Veld. J.H.J., 1990. Occurrence and
372 formation of biologically active amines in foods. Int. J. Food. Microbiol. 11, 73-84.

- 373 Zúñiga, M., Pardo, I., Ferrer, S., 1993. An improved medium for distinguishing between
374 homofermentative and heterofermentative lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.*
375 18, 37-42.
- 376 Zee, J.A., Simard, R.E., L'Heureux, L., Tremblay, J., 1983. Biogenic amines in wines. *Am.*
377 *J. Enol. Vit.* 34, 6-9.

378 **Table 1.** Characterization of the ability to produce tyramine and phenylethylamine by
 379 biochemical and genetic methods.

Species	N° of strains tested	TPM plate ^a	TPM broth		Presence of <i>tdc</i> gene ^a	Origin
			Tyramine ^a	Phenyethylamine ^a		
<i>Lb. brevis</i>	18	18	18	18	18	wine
<i>Lb. hilgardii</i>	8	2 ^b	2 ^b	2 ^b	2 ^b	wine
<i>Lb. sakei</i>	2	2	2	2	2	salmon
<i>Lb. plantarum</i>	5	0	0	0	0	wine
<i>Lb. mali</i>	3	0	0	0	0	wine
<i>Lb. buchneri</i> ST2A	1	0	0	0	0	cheese
<i>Lb. casei</i>	2	0	0	0	0	wine
<i>Lb. paracasei</i>	8	0	0	0	0	wine
<i>Lb. collinoides</i> 404	1	0	0	0	0	wine
<i>P. parvulus</i>	22	0	0	0	0	wine
<i>P. pentosaceus</i>	3	0	0	0	0	wine
<i>L. mesenteroides</i>	6	0	0	0	0	wine
<i>Leuconostoc</i> sp.	10	0	0	0	0	wine
<i>O. oeni</i>	41	0	0	0	0	wine
<i>E. faecalis</i>	5	5	5	5	5	CECT
<i>C. divergens</i> 4016	1	1	1	1	1	CECT4016

380

381 ^a Number of positive strains.

382 ^b Strains giving positive response for tyramine and phenylethylamine in plate and broth are

383 the same amplifying the *tdc* fragment.

384 **Table 2.** Tyramine and phenylethylamine production by lactic acid bacteria in TPM
 385 supplemented with phenylalanine.
 386

Strains tested	Tyramine (mg l ⁻¹)	Phenylethylamine (mg l ⁻¹)
<i>Lb. brevis</i> J2	476	97
<i>Lb. brevis</i> J13	1089	221
<i>Lb. brevis</i> 9	422	99
<i>Lb. brevis</i> 11	456	105
<i>Lb. brevis</i> 15	778	209
<i>Lb. brevis</i> UR16A	653	179
<i>Lb. brevis</i> 26	387	89
<i>Lb. brevis</i> UR34A	687	145
<i>Lb. brevis</i> UR34B	402	95
<i>Lb. brevis</i> 40	986	168
<i>Lb. brevis</i> 42	1223	239
<i>Lb. brevis</i> 74	878	201
<i>Lb. brevis</i> 84	398	98
<i>Lb. brevis</i> 106	402	93
<i>Lb. brevis</i> 131	766	157
<i>Lb. brevis</i> 198	1100	198
<i>Lb. brevis</i> 238	434	88
<i>Lb. brevis</i> 377	567	96
<i>Lb. hilgardii</i> UR28	534	151
<i>Lb. hilgardii</i> 359	423	120
<i>Lb. sakei</i> Ib	233	77
<i>Lb. sakei</i> Fb	456	130
<i>E. faecalis</i> CECT184	895	278
<i>E. faecalis</i> CECT408	542	223
<i>E. faecalis</i> CECT795	1189	321
<i>E. faecalis</i> CECT963	1422	356
<i>E. faecalis</i> CECT4039	887	286
<i>C. divergens</i> CECT4016	1134	221

387 **Table 3.** Microbial and biogenic amine composition of wines. Genetic and biochemical
 388 characterization of strains isolated from these wines.

Wine	Wine		Isolated LAB	<i>tdc</i> PCR	TPM broth	
	Tyramine mg l ⁻¹	Phenylethyl- amine mg l ⁻¹			Tyramine mg l ⁻¹	Phenylethyl- amine mg l ⁻¹
1	0.5	0.2	<i>O. oeni</i> 80A	-	-	-
2	7	1.2	<i>O. oeni</i> 121B	-	-	-
			<i>Lb. hilgardii</i> 15B	+	423	77
3	1.2	0.5	<i>O. oeni</i> UR98B	-	-	-
			<i>Lb. brevis</i> UR16	+	634	101
4	1.3	0.6	<i>O. oeni</i> UR29	-	-	-
			<i>P. parvulus</i> UR89	-	-	-
5	2.5	1.2	<i>Lb. brevis</i> UR9	+	567	89
			<i>O. oeni</i> UR42	-	-	-
			<i>P. parvulus</i> UR97	-	-	-
6	4	1.8	<i>P. parvulus</i> UR22	-	-	-
			<i>Lb. brevis</i> UR34A	+	543	91
7	0.8	0.1	<i>P. parvulus</i> UR33			
8	1.6	0,3	-	-	-	-
9	1.0	0.3	<i>O. oeni</i> UR83B	-	-	-
10	1.4	0.4	-	-	-	-

389

390 **Figure legends**

391

392 **Fig. 1.** Results obtained in TPM plate medium. Two *L. brevis* (J2, 84) tyramine producers,
393 show a clear zone below (2 and 6), whereas four: *P. parvulus* P339 (1), *L. collinoides* 404
394 (3), *L. casei* 362 (4) and *L. mali* 54 (5) do not show clearing reaction being considered as
395 negative for tyramine production.

396

397 **Fig 2. PCR amplification of a *tdc* gene fragment with primers p0303 and P1-rev.**

398 1 Kb Plus Ladder (Invitrogen) (1, 14), *Lb. hilgardii* 359 and 464 (2, 3), *Lb. brevis* J2, 9, 40,
399 84 and 106 (4, 5, 6, 8, 11), *Lb. collinoides* 404 (7), *Lb. casei* 362 (9), *Lb. mali* 54 (10),
400 *Pediococcus parvulus* P339 (12), and *Oenococcus oeni* 4042 (13).

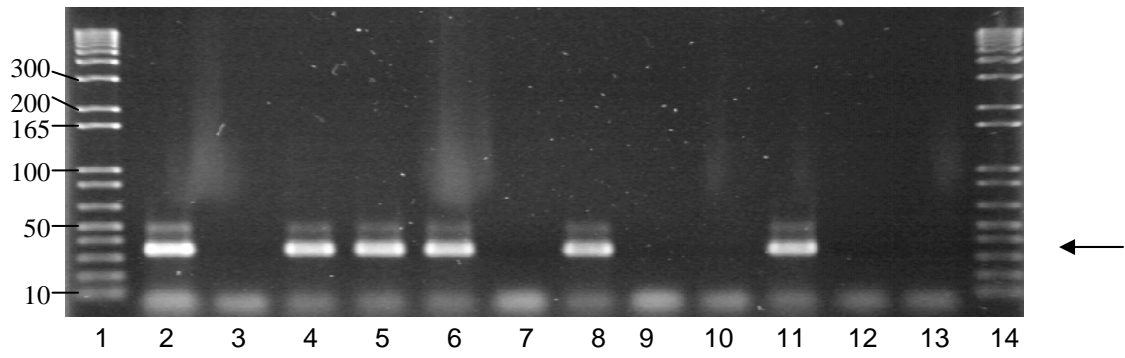
401 **Fig. 1**

402

403



404 **Fig.2**



Lucas, P., Landete, J., Coton, M., Coton, E. and Lonvaud-Funel, A. 2003. The tyrosine decarboxylase operon of Lactobacillus brevis IOEB 9809: characterization and conservation in tyramine-producing bacteria. FEMS Microbiol. Lett. 229, 57-65.

Capítulo 5



The tyrosine decarboxylase operon of *Lactobacillus brevis* IOEB 9809: characterization and conservation in tyramine-producing bacteria

Patrick Lucas^{a,*}, José Landete^{a,1}, Monika Coton^b, Emmanuel Coton^b,
Aline Lonvaud-Funel^a

^a *Faculté d'œnologie, UMR Œnologie-Ampélogie, INRA-Université Victor Segalen Bordeaux 2, 351, cours de la Libération, 33405 Talence, France*

^b *ADRIA NORMANDIE, Blvd du 13 Juin 1944, 14310 Villers-Bocage, France*

Received 16 June 2003; received in revised form 9 October 2003; accepted 10 October 2003

First published online 4 November 2003

Abstract

Bacterial genes of tyrosine decarboxylases were recently identified. Here we continued the sequencing of the tyrosine decarboxylase locus of *Lactobacillus brevis* IOEB 9809 and determined a total of 7979 bp. The sequence contained four complete genes encoding a tyrosyl-tRNA synthetase, the tyrosine decarboxylase, a probable tyrosine permease and a Na⁺/H⁺ antiporter. Rapid amplification of cDNA ends (RACE) was employed to determine the 5'-end of mRNAs containing the tyrosine decarboxylase gene. It was located only 34–35 nucleotides upstream of the start codon, suggesting that the preceding tyrosyl-tRNA synthetase gene was transcribed separately. In contrast, reverse transcription-polymerase chain reactions (RT-PCRs) carried out with primers designed to amplify regions spanning gene junctions showed that some mRNAs contained the four genes. Homology searches revealed similar clusters of four genes in the genome sequences of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. Phylogenetic analyses supported the hypothesis that these genes evolved all together. These data suggest that bacterial tyrosine decarboxylases are encoded in an operon containing four genes.

© 2003 Federation of European Microbiological Societies. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Decarboxylase; Biogenic amine; Tyramine; Lactic acid bacterium; *Lactobacillus*

1. Introduction

Biogenic amines (BA) are organic bases that can be found at undesirable concentrations in foods and beverages such as dry sausages, cheeses and wines [1–3]. Ingestion of large amounts of BA cause severe toxicological disorders since they function as neurotransmitters in the nervous system of vertebrates where they are normally present at trace levels [4]. Accumulation of BA in foods depends on the availability of precursors (mainly amino acids) and on the presence of microorganisms containing specific amino acid decarboxylases [1–3]. The decarboxylation systems are thought to provide metabolic energy to

microorganisms and to regulate their intracellular pH by translocating charges across the cytoplasmic membrane [5–7]. Surprisingly, these systems are not present in all organisms of a same species but are rather strain-specific. A possible explanation would be that genes encoding amino acid decarboxylases could propagate in bacteria as mobile genetic elements [7].

Tyramine is one of the most frequently encountered BA. Many lactic acid bacteria involved in food processing can decarboxylate tyrosine to produce tyramine. These bacteria belong to genera as diverse as *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Enterococcus* or *Carnobacterium* [1–3]. Tyrosine decarboxylases were partially purified and characterized from *Lactobacillus brevis* IOEB 9809 [8] and *Enterococcus faecalis* [9]. Both required the cofactor pyridoxal-phosphate for activity, showed related kinetic parameters and appeared as dimers of 70–75-kDa polypeptides. The first sequences of bacterial genes encoding tyrosine decarboxylases (*tyrDC*) were reported recently [10,11]. A 792-bp fragment of the *L. brevis tyrDC* was

* Corresponding author. Tel.: +33 5 4000 6469; Fax: +33 5 4000 6468.
E-mail address: patrick_mr_lucas@hotmail.com (P. Lucas).

¹ Present address: Departament de Microbiologia i Ecologia, Facultat de Ciències Biològiques, Universitat de València, Dr Moliner, 50, Burjassot, Valencia, Spain.

determined after microsequencing of polypeptides of the purified tyrosine decarboxylase [10] and the *E. faecalis* *tyrDC* was obtained by screening a library of insertional mutants [11]. The latter was located between genes of a tyrosyl-tRNA synthetase and a putative tyrosine/tyramine exchanger, and it was probably cotranscribed with them [11]. Here we continued the sequencing of *L. brevis* IOEB 9809 *tyrDC* with the aim to obtain its complete sequence and to determine the genetic organization of the *tyrDC* locus of this bacterium.

2. Materials and methods

2.1. Enzymes and oligonucleotide primers

Restriction enzymes were from New England Biolabs and Promega and used according to the manufacturer's instructions. Oligonucleotide primers for polymerase chain reaction (PCR), sequencing, and cDNA synthesis were purchased from Qbiogene or Prologo and named as follows: p0301: GATATCATGGTATTGGTTTGGATCAAG, p0302: CCYACIGAYTTYGCIATICCIGAYTAYGG, p0303: CCACTGCTGCATCTGTTT, p0304: GCATACCAGAGTCCCTCAAG, p0305: GAACCATCTGCGACAATGTG, p0306: CTTCCAACCTCCATA-TCCCTG, p0307: GCCTTCTATGACAAGCATC, p0308: CGGATACGGACGCACAATTG, p0309: GGTGGGTAATGTTAGAAAGTTG, p0310: GTATCCGACAGTGGTGACAG, p0311: CAACTTTCTAACATTACCAACC, p0312: CGTATCTTCAATCGTTTCGTG, p0313: GATAAGCTGATGACTGGTGG, p0314: TTTCGCGCATACCAGAGTCC, p0315: TTGGATCCGAAGGTATGTAG.

2.2. Bacterial strain and growth conditions

The strain *L. brevis* IOEB 9809 used in this study was isolated in our laboratory from a red wine [12]. Cultures were carried out at 25°C without shaking in MRS medium [13].

2.3. Genomic DNA extraction, amplification and sequencing

Genomic DNA was extracted using the Wizard genomic DNA purification kit (Promega). PCRs were performed with the ExTaq (Takara) DNA polymerase. DNA products were purified with the Qiaquick kit (Qiagen) or separated on 0.8% agarose-TAE gel and recovered using the SNAP kit (Invitrogen). The nucleotide sequence of the *tyrDC* locus was obtained by the linker-mediated PCR strategy of the Topo-walker kit (Invitrogen). Briefly, genomic DNA was digested with a restriction enzyme generating cohesive ends. DNA fragments were dephosphorylated and A-tailed by primer extension using the ExTaq

DNA polymerase and primers p0304 or p0306 directed towards the 5'- and 3'-ends of the known *tyrDC* fragment, respectively. DNA linkers were added to the A-tailed extremities by topoisomerase I-mediated ligation. The DNA constructions were amplified by PCR with a primer specific of the DNA linker and p0305 (5'-end direction) or p0307 (3'-end direction). PCR products were directly sequenced on both strands. To obtain the 7979-bp sequence reported here, additional DNA templates were synthesized similarly with primers matching newly determined DNA regions.

2.4. Southern blot hybridization

Genomic DNA was digested and transferred onto Hybond-N+ membranes (Amersham) and hybridized as described by Sambrook et al. [14]. DNA probes were amplified using genomic DNA as template and primer sets p0301 and p0302 or p0303 and p0302, labeled with digoxigenin-11-deoxyuridine triphosphate (dUTP) using the DIG-DNA labeling kit (Roche) and detected by chemiluminescence with an anti-digoxigenin antibody and CDP-star (Roche).

2.5. Total RNA preparation, 5'-rapid amplification of cDNA ends (RACE) and reverse transcription (RT)-PCR experiments

Total RNAs were extracted from 10 ml of exponentially growing cells. After collection, cells were resuspended in 1 ml of ice-cold Tri-reagent (Sigma), transferred in tubes containing the Lysing Matrix B (Q-biogen) and lysed in a FastPrep FP120A instrument (Q-biogen) by three cycles of 45 s at maximum speed and 1 min on ice. The lysates were centrifuged at 13 000 × *g* for 15 min and at 4°C. RNAs contained in the upper phase were washed with chloroform, precipitated with isopropanol, washed with ice-cold 70% ethanol, dried and resuspended in 20 µl of diethyl pyrocarbonate (DEPC)-treated water. Residual DNA was digested with an RNase-free DNase (Ambion) according to the manufacturer's instructions. To control the quality of RNA samples, 2-µl aliquots were mixed with 10 µl formamide, 4 µl formaldehyde, heated 10 min at 65°C and separated by electrophoresis in a 0.8% agarose-TAE gel containing 0.6 µg ml⁻¹ ethidium bromide. In intact samples, 16S and 23S rRNA bands were visualized under an ultraviolet (UV) light at the positions of 1.4 and 2.6 kbp DNAs, respectively.

5'-ends of *tyrDC* transcripts were determined using a 5'-RACE kit (Invitrogen). Total RNAs (1 µg) were reverse transcribed with primer p0305 and the superscript II RT. cDNAs were C-tailed with a terminal deoxynucleotidyl transferase and used as template in a PCR with an anchor primer specific of the C-tailed extremity and p0314 situated in *tyrDC*. To reduce the high background of non-specific amplification, a second PCR was carried out using

the first DNA product as template, a nested anchor primer of the 5'-RACE kit and p0315. The single DNA band amplified after this second PCR was purified and sequenced.

RT-PCR experiments were performed in two steps. First, four cDNAs were synthesized with the Sybr RT master mix (Qiagen), 1 µg of total *L. brevis* RNAs and primers p0305, p0309, p0310 or p0312 specific of *tyrDC*, *tyrP*, *nhaC* and *otc*, respectively. Each cDNA preparation was then used as template in a PCR carried out with primers designed to amplify regions spanning gene junctions: p0308+p0305 (*tyrRS-tyrDC*), p0307+p0309 (*tyrDC-tyrP*), p0311+p0310 (*tyrP-nhaC*) or p0313+p0312 (*nhaC-otc*).

3. Results

3.1. Nucleotide sequence of the *tyrDC* locus

A strategy based on linker-mediated PCR was employed to sequence the *L. brevis* IOEB 9809 genomic sequence surrounding the 792-bp fragment of *tyrDC* determined previously [10]. A restriction map of the *tyrDC* locus was first drawn up by Southern blot with the enzymes *HindIII*, *NdeI*, *ClaI*, *KpnI* and *SacI*. The map was then used to identify restriction fragments containing at least 100 bp of known *tyrDC* sequence and 1–5 kbp of unknown flanking DNA. A DNA linker was joined at the unknown ends of these fragments by a self-ligation method and the resulting DNAs were amplified by PCR and sequenced. A total of 7979 bp was determined by this procedure, including the initial 792-bp fragment.

The genetic organization of the sequence is depicted in Fig. 1. Analyses revealed the presence of four complete and one partial open reading frames (ORFs) encoding polypeptides larger than 100 amino acids. All of them were found in the same direction. The *tyrDC* gene proved to encode a protein of 626 amino acids with a calculated molecular mass of 70.5 kDa in agreement with experimental measurements [8,10]. The upstream ORF showed

strong similarities with genes of tyrosyl-tRNA synthetase (*tyrRS*). Downstream of *tyrDC* were two ORFs related to genes of amino acid permeases (*tyrP*) and Na⁺/H⁺ antiporters (*nhaC*), and the 5'-end of a fifth ORF similar to ornithine transcarbamylase genes (*otc*). The consensus sequence of putative ribosome binding sites was identified 7–12 bp upstream of each translation initiation site. The intergenic regions *tyrRS-tyrDC*, *tyrDC-tyrP* and *tyrP-nhaC* were quite short (209, 92 and 72 bp, respectively), suggesting that these four genes could be cotranscribed. However, putative transcription termination hairpins were identified in the *tyrRS-tyrDC* and *tyrP-nhaC* regions (Fig. 1). Another predicted hairpin was located in the large *nhaC-otc* intergenic region.

3.2. Characterization of *tyrDC* RNA transcripts

To characterize the transcripts containing *tyrDC* we first analyzed their 5'-ends. 5'-RACE was performed using total RNAs of *L. brevis* IOEB 9809 and oligonucleotide primers situated in the first 600 bp of *tyrDC*. Only one DNA product could be obtained, suggesting that the majority of *tyrDC* transcripts were initiated at the same site. Sequencing of the DNA product assigned the initiation site 34–35 bp upstream of the *tyrDC* start codon (Fig. 2A). The consensus sequences of –10 and –35 boxes were identified. They were preceded by a putative transcription termination hairpin ($\Delta G = -18.05$ kcal mol⁻¹) located 73 bp upstream of the –35 box and 37 bp downstream of the *tyrRS* stop codon (Fig. 2A).

To determine whether *tyrDC* was cotranscribed with other genes of the *tyrDC* locus, total RNAs of *L. brevis* were used in RT-PCRs with four sets of primers designed to amplify regions spanning gene junctions: *tyrRS-tyrDC*, *tyrDC-tyrP*, *tyrP-nhaC* or *nhaC-otc*. Surprisingly three amplification products were obtained, showing that *tyrRS*, *tyrDC*, *tyrP* and *nhaC* can be cotranscribed (Fig. 2B). The strong signal of the *tyrDC-tyrP* product indicated that RNAs containing these two genes were probably abundant. The *tyrRS-tyrDC* and *tyrP-nhaC* product signals were less important but they proved that some RNAs contained *tyrRS* and *tyrDC*, and/or *tyrP* and *nhaC*. Am-

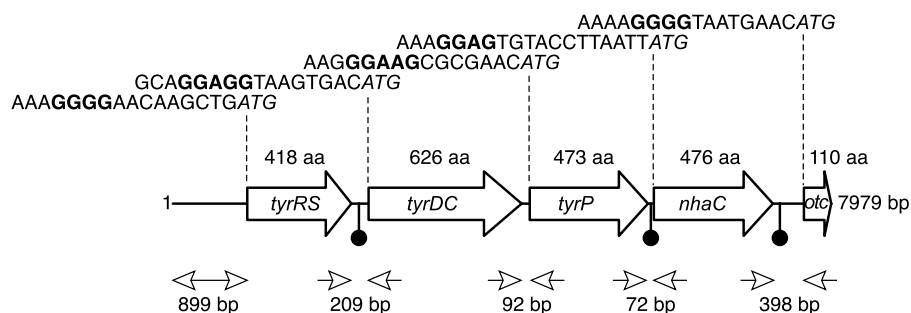


Fig. 1. Genetic organization of the *tyrDC* operon of *L. brevis* IOEB 9809. Large arrows represent the ORFs of potential genes. The sizes of predicted proteins are indicated in amino acids (aa). Putative ribosome binding sites (in bold) are shown with corresponding start codons (in italics). Dark circles and lines depict probable transcription termination hairpins. The sizes of extragenic regions are indicated in bp between small arrows. The sequence was deposited in GenBank under the accession number AF446085.

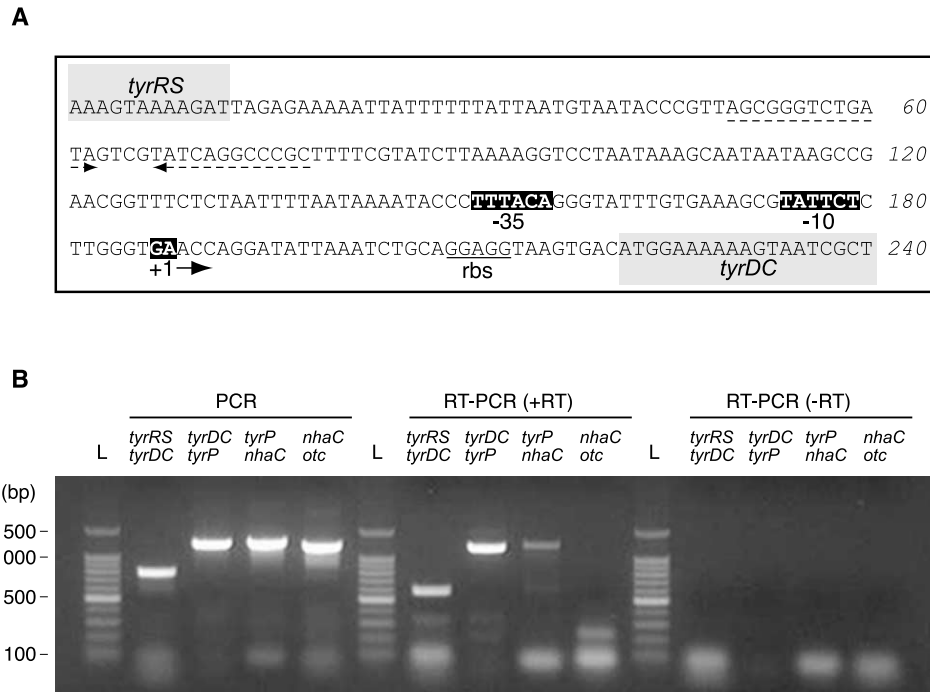


Fig. 2. Transcriptional analysis of the *tyrDC* locus. A: The *tyrRS*–*tyrDC* intergenic sequence is represented together with the last and first nucleotides of genes (gray backgrounds). The *tyrDC* transcription initiation site (G or A nucleotide, shown on a black background) was determined by 5'-RACE. Putative –10 and –35 boxes were identified by sequence analysis. Dashed arrows represent a probable transcription termination hairpin. B: RT-PCRs were performed with total RNAs and primer sets allowing amplification of the indicated intergenic regions (lanes of +RT). To confirm the absence of contaminating DNA, similar experiments were conducted without reverse transcriptase (lanes of –RT). Control PCRs were carried out with the same primer sets and genomic DNA instead of cDNAs as template.

plification of a *tyrRS*–*tyrDC* product showed that *tyrDC* transcripts could be initiated at two different promoters: one upstream of *tyrDC* (identified by 5'-RACE, Fig. 2A) and the other one upstream of *tyrRS*. We suppose that the 5'-RACE experiment revealed only RNAs initiated at the first promoter because they were better reverse transcribed

and amplified than the large RNAs initiated upstream of *tyrRS*. Surprisingly, the *tyrRS*–*tyrDC* product was slightly shorter when it was amplified from RNAs than from genomic DNA. A sequence analysis revealed that RNAs containing this region might fold into a large secondary structure (130 nucleotides), which could be read-through

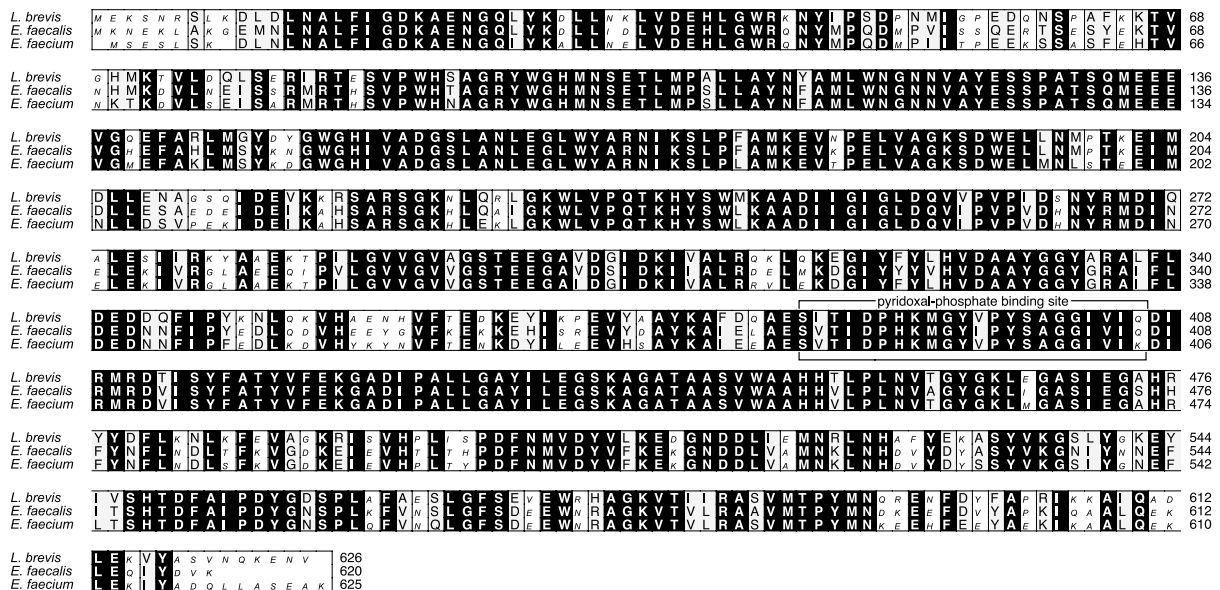


Fig. 3. Protein sequence alignment of tyrosine decarboxylases of *L. brevis*, *E. faecalis* (AF354231) and *E. faecium* (ZP_00036405) constructed with Clustal W. Identical (black background) and similar (gray background) residues were shaded using AMAS [19].

by the reverse transcriptase and produce shortened amplification products.

3.3. Conservation of the proteins of the *tyrDC* locus

A survey of databases was carried out to identify the closest relatives of the genes located in the *tyrDC* locus of *L. brevis*. As anticipated, *tyrRS*, *tyrDC* and *tyrP* were close to the three genes of the *E. faecalis* tyrosine decarboxylase operon reported previously [11]. Interestingly, inspection of the available genome sequence of this bacterium [15] allowed us to detect a fourth gene, related to *nhaC*, in its *tyrDC* locus. In addition, we found a cluster containing four similar genes in the genome of *Enterococcus faecium*.

An alignment of the amino acid sequences of the three tyrosine decarboxylases of *L. brevis*, *E. faecalis* and *E. faecium* showed that they were closely related (69% identity and 84% similarity, Fig. 3). The consensus sequence of the binding site for the cofactor pyridoxal-phosphate was conserved in all three proteins. Similarly, the putative tyrosine permeases encoded by genes *tyrP* of the three bacteria were homologous (61% identity and 80% similarity) and distant from all other known amino acid permeases (not shown). In contrast, although the three tyrosyl-tRNA synthetases and the three Na⁺/H⁺ antiporters showed much resemblance, they were also related to other tyrosyl-tRNA synthetases and Na⁺/H⁺ antiporters commonly found in bacteria. Phylogenetic trees were constructed to precise the evolutionary relationships between these proteins. As shown in Fig. 4, the distribution of tyrosyl-tRNA synthetases and Na⁺/H⁺ antiporters encoded by genes of the *tyrDC* loci did not follow the phylogeny of their hosts. These proteins made tight clusters and were clearly separated from their relatives encoded elsewhere in bacterial genomes. These results suggested that *tyrRS*, *tyrDC*, *tyrP* and *nhaC* evolved together and were disseminated in *L. brevis*, *E. faecalis* and *E. faecium* as a single genetic element.

4. Discussion

4.1. Bacterial tyrosine decarboxylases

We have reported the complete sequences of the gene encoding the tyrosine decarboxylase of *L. brevis* IOEB 9809 and adjacent genes found in the same locus. This is the third bacterial tyrosine decarboxylase gene identified to date since homologs were detected in *E. faecalis* [11] and *E. faecium*. An alignment of the three protein sequences revealed positions of conserved amino acids (Fig. 3) that could be used to design degenerated PCR primers and to develop a PCR-based strategy to detect tyramine-producing bacteria. A comparable approach was already used to determine the presence of histamine-producing bacteria

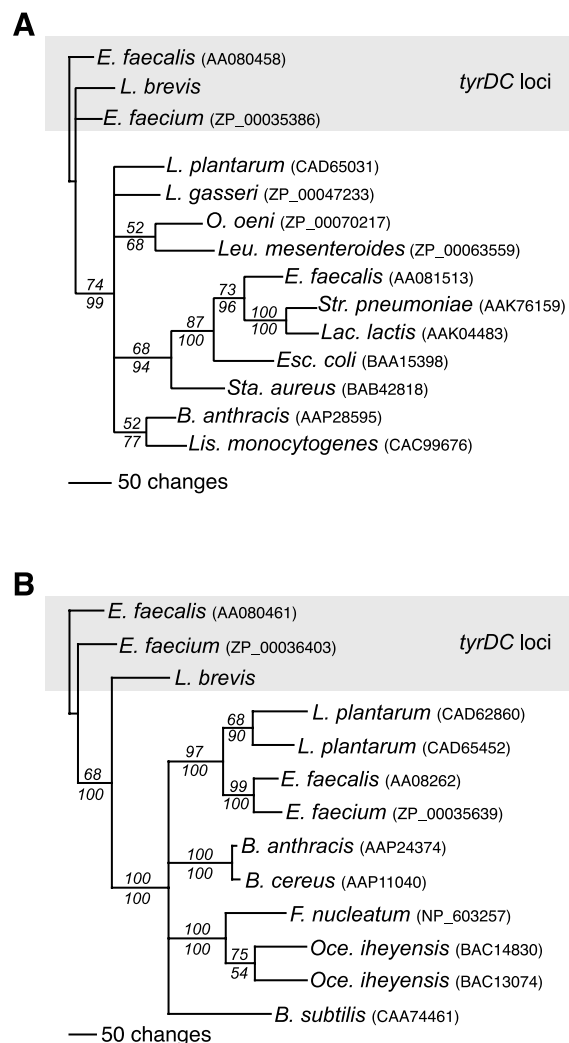


Fig. 4. Evolutionary relationships between bacterial tyrosyl-tRNA synthetases (A) and Na⁺/H⁺ antiporters (B). Protein sequences of tyrosyl-tRNA synthetases and Na⁺/H⁺ antiporters were aligned with Clustal W and phylogenetic trees were constructed by the maximum parsimony method with PAUP* V4.0b10 [20]. Similar trees were obtained by neighbor-joining ([21], not shown). Bootstrap resampling ([22], 500 replications) was carried out to quantify the relative support of branches of the inferred trees. Bootstrap values are indicated above (maximum parsimony) and below (neighbor-joining) each branch. Proteins encoded by genes located in *tyrDC* loci are denoted in gray boxes. *Leu.*: *Leuconostoc*, *O.*: *Oenococcus*, *B.*: *Bacillus*, *Lis.*: *Listeria*, *Sta.*: *Staphylococcus*, *Str.*: *Streptococcus*, *Lac.*: *Lactococcus*, *Esc.*: *Escherichia*, *F.*: *Fusobacterium*, *Oce.*: *Oceanobacillus*.

in wines [16]. Rapid detection systems for both tyramine and histamine producers may help to prevent spoilage of foods and beverages by these BA.

4.2. Organization of the tyrosine decarboxylase operon

The sequence of the *L. brevis* *tyrDC* locus contained four genes transcribed in the same direction, *tyrRS*, *tyrDC*, *tyrP* and *nhaC*, which encode a tyrosyl-tRNA synthetase, the tyrosine decarboxylase, a probable tyrosine permease and a Na⁺/H⁺ antiporter, respectively. We

found the same gene clusters in the available genome sequences of *E. faecalis* and *E. faecium*, and different bordering sequences in the three bacteria (not shown). There is no doubt that *tyrDC* and *tyrP* are elements of a single operon because they were cotranscribed in both *L. brevis* IOEB 9809 (Fig. 2B) and *E. faecalis* [11] and genes of bacterial amino acid decarboxylases are generally associated to genes of corresponding amino acid permeases [7]. On the other hand it was difficult to confirm whether *tyrRS* and *nhaC* take part in the operon or not. A transcription initiation site was situated immediately upstream of *L. brevis tyrDC*, excluding the possibility that *tyrRS* was cotranscribed with *tyrDC* from this site (Fig. 2A). This conclusion was corroborated by the identification of a putative transcription termination hairpin between *tyrRS* and *tyrDC*. Another predicted hairpin located between *tyrP* and *nhaC* could also prevent cotranscription of the latter with *tyrDC* and *tyrP* (Fig. 1). However, the small sizes of the intergenic regions were compatible with an operon organization and RT-PCRs confirmed that *tyrRS* and *tyrDC* were cotranscribed in some of the *L. brevis* RNAs, and also *tyrP* and *nhaC* (Fig. 2B). Therefore these results suggest that the *tyrDC* operon would be made up of the four genes and that transcription regulation could occur and exclude *tyrRS* and/or *nhaC* from a part of the transcripts. In agreement, phylogenetic analyses of *tyrRS*- and *nhaC*-encoded proteins (Fig. 4) supported the hypothesis of a co-evolution of *tyrRS*, *tyrDC*, *tyrP* and *nhaC*. These analyses also suggested that the four genes were transferred in bacteria as a single mobile genetic element.

4.3. What is the role of the proteins of the *tyrDC* operon?

Identification of the *tyrDC* operon raised questions about the role of its encoded proteins. Based on analogy to other bacterial amino acid decarboxylation systems, the operon could supply energy and participate in pH regulation [5–7]. In this respect, the combined activities of the tyrosine decarboxylase and the putative tyrosine permease would be sufficient. The finding of a Na⁺/H⁺ antiporter in the operon was thus unexpected. Na⁺/H⁺ antiporters are known to contribute in pH and Na⁺ homeostasis, although recent works suggest that they can also transport various substrates [17,18]. Characterization of the protein encoded in the *tyrDC* operon will be required to determine how it works and what its role could be. It was also surprising to identify the gene of a tyrosyl-tRNA synthetase in the *tyrDC* operon because this enzyme is already present in all living cells. Accordingly, we have detected two genes of tyrosyl-tRNA synthetases in the genome sequence of *E. faecalis*: one was found within the *tyrDC* operon (AA080458) and the other one (AA081513) was situated elsewhere in the genome (Fig. 4A). Given that tyrosine decarboxylase and tyrosyl-tRNA synthetase compete for the same substrate, we supposed that expression

of a second tyrosyl-tRNA synthetase could be required to preserve protein synthesis in bacteria energized by the tyrosine decarboxylation system.

Acknowledgements

The authors are grateful to Drs Claire Le Henaff and Megumi Lucas for useful discussions. This work was supported by a grant from the French Ministry of Research (AQS program no. 2000/S13).

References

- [1] Silla Santos, M.H. (1996) Biogenic amines: their importance in food. *Int. J. Food Microbiol.* 29, 213–231.
- [2] Ten Brink, B., Damink, C., Joosten, H.M.L.J. and Huis In't Veld, J.H.J. (1990) Occurrence and formation of biologically active amines in foods. *Int. J. Food Microbiol.* 11, 73–84.
- [3] Lonvaud-Funel, A. (2001) Biogenic amines in wines: role of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 199, 9–13.
- [4] Borowsky, B. et al. (2001) Trace amines: identification of a family of mammalian G protein-coupled receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 8966–8971.
- [5] Molenaar, D., Bosscher, J.S., TenBrink, B., Driessen, A.J.M. and Konings, W.N. (1993) Generation of a proton motive force by histidine decarboxylation and electrogenic histidine/histamine antiport in *Lactobacillus buchneri*. *J. Bacteriol.* 175, 2864–2870.
- [6] Konings, W.N., Lolkema, J.S., Bolhuis, H., van Veen, H.W., Poolman, B. and Driessen, A.J.M. (1997) The role of transport processes in survival of lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 71, 117–128.
- [7] Abe, K., Ohnishi, F., Yagi, K., Nakajima, T., Higuchi, T., Sano, M., Machida, M., Sarder, R.I. and Maloney, P.C. (2002) Plasmid-encoded *asp* operon confers a proton motive metabolic cycle catalyzed by an aspartate-alanine exchange reaction. *J. Bacteriol.* 184, 2906–2913.
- [8] Moreno-Arribas, V. and Lonvaud-Funel, A. (2001) Purification and characterization of tyrosine decarboxylase of *Lactobacillus brevis* IOEB 9809. *FEMS Microbiol. Lett.* 195, 103–107.
- [9] Børresen, T., Klausen, N.K., Larsen, L.M. and Sørensen, H. (1989) Purification and characterization of tyrosine decarboxylase and aromatic-L-amino-acid decarboxylase. *Biochim. Biophys. Acta* 993, 108–115.
- [10] Lucas, P. and Lonvaud-Funel, A. (2002) Purification and partial gene sequence of the tyrosine decarboxylase of *Lactobacillus brevis* IOEB 9809. *FEMS Microbiol. Lett.* 211, 85–89.
- [11] Connil, N., Le Breton, Y., Dousset, X., Auffray, Y., Rincé, A. and Prévost, H. (2002) Identification of the *Enterococcus faecalis* tyrosine decarboxylase operon involved in tyramine production. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 3537–3544.
- [12] Moreno-Arribas, V., Torlois, S., Joyeux, A., Bertrand, A. and Lonvaud-Funel, A. (2000) Isolation, properties and behaviours of tyramine-producing lactic acid bacteria from wine. *J. Appl. Microbiol.* 88, 584–593.
- [13] De Man, J.C., Rogosa, M. and Sharpe, M.E. (1960) A medium for the cultivation of *Lactobacilli*. *J. Appl. Bacteriol.* 23, 130–135.
- [14] Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- [15] Paulsen, I.T. et al. (2003) Role of mobile DNA in the evolution of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Science* 299, 2071–2074.

- [16] Le Jeune, C., Lonvaud-Funel, A., Ten Brink, B., Hofstra, H. and van der Vossen, J.M.B.M. (1995) Development of a detection system for histidine decarboxylating lactic acid bacteria based on DNA probes, PCR and activity test. *J. Appl. Bacteriol.* 78, 316–326.
- [17] Padan, E., Venturi, M., Gerchman, Y. and Dover, N. (2001) Na⁺/H⁺ antiporters. *Biochim. Biophys. Acta* 1505, 144–157.
- [18] Lolkema, J.S. and Slotboom, D.-J. (2003) Classification of 29 families of secondary transport proteins into a single structural class using hydropathy profile analysis. *J. Mol. Biol.* 327, 901–909.
- [19] Livingstone, C.D. and Barton, G.J. (1993) Protein sequence alignments: a strategy for the hierarchical analysis of residue conservation. *Comput. Appl. Biosci.* 9, 745–756.
- [20] Swofford, D.L. (2001) PAUP* V4.0b6. Phylogenetic analysis using parsimony (* and other methods), version 4.0. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- [21] Saitou, N. and Nei, M. (1987) The neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4, 406–425.
- [22] Felsenstein, J. (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39, 783–791.

Landete, J.M., Pardo, I. y Ferrer, S. 2005. Regulation of hdc expression and HDC activity by enological factors in lactic acid bacteria. J. Appl. Microbiol. (enviado).

Capítulo 6

1 Running head: Regulation of histamine production in lactic acid bacteria

2

3 **Regulation of *hdc* expression and HDC activity by enological factors in**
4 **lactic acid bacteria**

5

6 **Landete J.M., Pardo I. and Ferrer S.***

7

8 ENOLAB, Departament de Microbiologia i Ecologia, Facultat de Ciències Biològiques,
9 Universitat de València. Dr. Moliner 50, E 46100, Burjassot, Valencia, Spain.

10

11

12 Key words: Histamine, lactic acid bacteria, *hdc*, HDC, malolactic fermentation, enological
13 factors, regulation, expression

14

15

16

17 *Corresponding author: Sergi Ferrer

18 Telephone: +34963544390

19 Fax: +34963544372

20 E-mail: Sergi.Ferrer@uv.es

21 **ABSTRACT**

22

23 **Aims:** The aim of this work was to study the influence of enological factors (organic acids,
24 sugars, ethanol, SO₂, pH and temperature) on the histidine decarboxylase gene (*hdc*)
25 expression and on histidine decarboxylase enzyme (HDC) activity in *Lactobacillus*
26 *hilgardii*, *Pediococcus parvulus* and *Oenococcus oeni*.

27 **Methods and Results:** Cell extracts and whole cells were used to study the influence of
28 different factors on *hdc* expression and HDC activity. Glucose, fructose, malic acid and
29 citric acid diminished the *hdc* expression, while ethanol increased the histidine
30 decarboxylase enzyme activity. Temperature and pH had effect on the activity of HDC but
31 not on *hdc* expression. Tartaric acid and L-lactic acid, and SO₂ had no effect on enzyme
32 synthesis and activity. *Lact. hilgardii* is the most active species, and *O. oeni* the less one.
33 Lactic acid bacteria species differ in the relative enzymatic activity but all the factors
34 affected in the same way to *Lact. hilgardii*, *Ped. parvulus* and *O. oeni*.

35 **Conclusions:** The *hdc* gene expression was lowered by glucose, fructose, malic acid, and
36 citric acid, whereas ethanol enhanced the HDC enzyme activity. This behaviour was
37 observed for all the studied microorganisms. Thus, the conditions that normally occur
38 during malolactic fermentation and later on, could favour the histamine production. SO₂
39 could prevent bacterial growth, but does not diminish the HDC enzyme activity.

40 **Significance and Impact of Study:** Information on *hdc* expression and HDC activity can
41 contribute to the prevention of histamine formation during wine production and storage.
42 Both species responsible for malolactic fermentation and spoilage species have been
43 studied.

44 **INTRODUCTION**

45

46 Biogenic amines are nitrogenous compounds that can cause food poisoning incidents if
47 large amounts are ingested, or when the natural mechanisms for their catabolism are
48 inhibited or genetically deficient (ten Brink *et al.* 1990; Halász *et al.* 1994). Ethanol may
49 enhance the effect of amines by direct or indirect inhibition of amine oxidase (Aerny
50 1985). In fermented foods, biogenic amines are usually degradation products of the
51 corresponding amino acid generated by bacteria (ten Brink *et al.* 1990; Halász *et al.* 1994).

52 In previous works, Lafon-Lafourcade (1975) and Ought *et al.* (1987) concluded that
53 there is no close relation between malolactic fermentation and histamine content. However,
54 Aerny (1985) observed that histamine was formed at the end of malic acid degradation and
55 even afterwards. Biogenic amines and specially histamine seem to be more abundant in
56 wines where malolactic fermentation has occurred (Aerny 1985; Cilliers and van Wyk
57 1985; Vázquez Lasa *et al.* 1998). This fact and the relative high amount of precursors can
58 explain why the highest concentrations of histamine are found in red wines. In other work,
59 Landete *et al.* (2005a) studied the evolution of biogenic amines before and after malolactic
60 fermentation, observing an increase of histamine during malolactic fermentation and after
61 six months of storage in bottle.

62 It has been shown that some *Oenococcus oeni* strains (Lonvaud-Funel and Joyeux
63 1994), and *Pediococcus damnosus* (Delfini 1989) are able to produce histamine from
64 histidine in wines. Some strains of *Lactobacillus buchneri* are able to produce histamine
65 from histidine in cheese (Molenaar *et al.* 1993). These authors also show that *Lactobacillus*
66 *buchneri* generates metabolic energy from the decarboxylation of histidine and the
67 electrogenic antiport of histidine and histamine. Landete *et al.* (2005b) also found

68 *Lactobacillus hilgardii*, *Lactobacillus mali*, *Pediococcus parvulus* and *Leuconostoc*
69 *mesenteroides* in wine as histamine producers.

70 These organisms, above mentioned, synthesize the L-histidine decarboxylase
71 enzyme (HDC) (EC 4.1.1.22) responsible for histamine formation. This enzyme was
72 purified to homogeneity and characterized, and the cloning and sequencing of the
73 corresponding *hdc* gene in different lactic acid bacteria were performed (Chang and Snell
74 1968; Recsei *et al.* 1983; Rollan *et al.* 1995; Coton *et al.* 1998). Based on the nucleic acid
75 sequences of these genes, oligonucleotides were known to be able to reveal the presence of
76 *hdc* gene in bacteria by PCR amplifications (Le Jeune *et al.* 1995; Landete *et al.* 2005b). A
77 correlation of 100% between presence of histidine decarboxylase gene and histamine
78 production was observed (Landete *et al.* 2005b). Nevertheless, the influence of enological
79 conditions on the histamine synthesis, and the respective regulation mechanisms, have
80 received little attention.

81 *Lactobacillus hilgardii*, *Pediococcus parvulus*, and *Oenococcus oeni* histamine
82 producers were used to study the influence of organic acids, sugars, ethanol, SO₂, pH and
83 temperature on the *hdc* expression and the HDC activity. All this knowledge can contribute
84 to the prevention of histamine formation during winemaking and storage.

85 **MATERIAL AND METHODS**

86

87 **Microorganisms and culture conditions**

88

89 *Lactobacillus hilgardii* 464, *Pediococcus parvulus* P270 and *Oenococcus oeni* 4042 were
90 previously isolated from Spanish wines by Rodas *et al.* (2003). Strains were selected
91 according to their ability to produce histamine; we also detected previously in them the
92 presence of *hdc* gene of these strains by PCR test (Landete *et al.* 2005b). *Lactobacillus* and
93 *Pediococcus* were grown routinely on MRS (Scharlab) plates, and *Oenococcus* on MLO
94 plates (Caspritz and Radler 1983), and maintained at 4 °C until needed. Microorganisms
95 were incubated in H-RAM (H-MDBmod (Landete *et al.* 2004) medium at pH 5.0
96 containing only 1 g l⁻¹ histidine) for regulation and activity studies.

97

98 **Influence of enological factors on HDC activity**

99

100 Microorganisms were incubated in H-RAM medium until mid log-phase at 28 °C. Cell-free
101 extracts were obtained according to Maicas *et al.* (2002) breaking cells with glass beads.
102 The supernatant was pooled in a pre-cooled Eppendorf tube and stored at -20 °C for further
103 analyses. The Micro BCA protein Assay Reagent (Pierce) was used to measure the protein
104 concentration in the cell-free extracts, according to the manufacturer's instructions using
105 BSA as a standard.

106 The influence of organic acids, sugars, ethanol, SO₂, pH and temperature (Table 1) on the
107 histidine decarboxylase activity was determined by incubating a volume of 200 µl of cell-
108 free extracts containing 1 mg of protein in ammonium acetate buffer (0.5 mol l⁻¹, pH 4.8)
109 in a final volume of 3 ml. The reaction mixture contained histidine (25 mmol l⁻¹) in the

110 same buffer. The experiments were conducted at 37°C during 10 min, unless otherwise
111 specified. Then, the enzyme was totally inactivated at 110°C during 3 min, and the
112 histamine production was measured by the enzymatic method proposed by Landete *et al.*
113 (2004). One enzyme unit (U) was defined as the amount of enzyme that released 1 µmol of
114 histamine per min under the given assay conditions. Specific activity was expressed as
115 enzyme units per mg of protein.

116

117 **Influence of enological factors on *hdc* expression**

118

119 **Analysis of specific activity (in whole cells)**

120

121 The strains were previously grown in H-RAM, to study the influence of each factor
122 (organic acids, sugars, ethanol, pH and temperature) on *hdc* expression. We inoculated 0.1
123 ml of *Lact. hilgardii*, *Ped. parvulus* and *O. oeni* at a density of 10^7 - 10^8 cells ml⁻¹ in 10
124 ml of H-RAM supplement with different concentrations of these compounds or conditions
125 of pH and temperature (Table 1). The cultures were incubated until mid log-phase at 28 °C,
126 and cell-free extracts were obtained as mentioned above, and the protein concentration was
127 measured in the cell-free extracts as before. Then 0.2 ml of each extract were incubated in
128 3 mL of ammonium acetate buffer (0.5 mol l⁻¹, pH 4.8) supplement with 25 mmol l⁻¹ of
129 histidine during 10 min at 37°C. The enzyme was totally inactivated at 110°C for 3 min.
130 Finally, the histamine produced was measured by the enzymatic method proposed by
131 Landete *et al.* (2004). Specific activity was expressed as enzyme units per mg of protein.

132

133 **Analysis of *hdc* gene expression**

134

135 Total RNA of *Lactobacillus hilgardii* 464 was isolated from cells grown in H-RAM
136 supplemented with organic acids, sugars, ethanol, SO₂ or under different conditions of pH
137 and temperature (Table 1) by using the High Pure RNA isolation Kit (Roche) according to
138 the manufacturer's instructions. RNA was digested and transferred onto Hybond-N+
139 membranes (Amershan) and hybridized as described by Sambrook *et al.* (1989).
140 Preparation of the single-stranded labelled probes was as follows. First, a DNA fragment
141 was amplified by PCR using chromosomal DNA of *Lact. hilgardii* and primers JV16HC
142 and JV17HC, labelled with digoxigenin-11-deoxyuridine triphosphate (dUTP) using the
143 DIG-DNA labelling Kit (Roche). The amplification conditions for the couple
144 JV16HC/JV17HC were 5 min at 95°C for denaturation, and subsequently, thirty-five cycles
145 of 1 min at 94°C, 1 min at 39.6°C, and 1 min at 72°C were performed. The detection was
146 realized by luminescence with an anti-digoxigenin antibody and CDP-star (Roche).

147 **Physiologic response to enological factors by lactic acid bacteria**

148

149 A volume of 0.1 ml of microorganisms grown in MRS until mid log-phase were inoculated
150 in 10 ml of H-RAM supplemented with different concentrations of organic acids, sugars,
151 SO₂, ethanol or conditions of pH and temperature mentioned in Table 1. Cells were
152 incubated until an O.D. of 0.5 (5×10^8 cfu ml⁻¹, approximately) at 28 °C. Cells were
153 discarded after centrifugation and supernatants stored at -20 °C until histamine analysis.
154 The analysis of histamine was realised following the enzymatic method of Landete *et al.*
155 (2004).

156

157 **Reproducibility**

158

159 All results presented in this paper are the means of three replicate assays.

160 **RESULTS**

161

162 The histidine decarboxylase activity observed in cell-free extracts from microorganisms
163 grown until mid log-phase in H-RAM, without the presence of factors studied here, in
164 ammonium acetate buffer (0.5 mol l⁻¹, pH 4.8) were 2230 U per mg of protein for the *Lact.*
165 *hilgardii* 464, 1814 U per mg of protein for *Ped. parvulus* P270, and 519 U per mg of
166 protein for *O. oeni* 4042.

167

168 **Influence of enological factors on HDC activity**

169

170 The HDC activity showed a maximum at 28 °C for all three microorganisms. At Fig. 1a
171 the response of *Lact. hilgardii* 464 can be observed. The HDC activity was very low at 4
172 and 50°C. The Fig 1b shows the effect of pH on HDC activity; maximum activity was
173 observed at pH 8, decreasing progressively to lower pH values. Oppositely, an 86%
174 activity drop was obtained at pH 8.5. The HDC activity was not influenced by any of the
175 organic acids, sugars, nor SO₂. Only the presence of ethanol in the medium produced an
176 increase in the HDC activity (Fig 1c). For *Lact. hilgardii* 464, *Ped. parvulus* P270 and *O.*
177 *oeni* 4042 the behaviour was similar with maximum at 28 °C and pH 8.0, and an increase
178 in the HDC activity was observed in the presence of ethanol.

179

180 **Influence of enological factors on *hdc* expression**

181

182 **Analysis of specific activity**

183

184 The behaviours observed for the three microorganisms (*Lact. hilgardii* 464, *Ped. parvulus*
185 P270, *O. oeni* 4042) were qualitatively similar, and only results for *Lact. hilgardii* are
186 shown in Fig. 2. The *hdc* expression was not influenced by the pH and temperature. The
187 *hdc* expression showed a different behaviour for the different organic acids. The addition
188 of malic acid and/or citric acid reduced the *hdc* expression (Fig. 2). However, lactic acid,
189 and tartaric acids did not alter it. We can observe in Fig. 2 as the highest inhibition of *hdc*
190 is produced by the presence of citric acid. A progressive diminution in the *hdc* activity was
191 observed when increasing the glucose concentration. A residual 80% activity was observed
192 for 2.5 g l⁻¹, and 25% for 50 g l⁻¹ glucose. We did not observe an influence of ethanol and
193 SO₂ on *hdc* expression. To confirm these results, Northern blot experiments were
194 performed.

195

196 **Analysis of *hdc* gene expression**

197

198 By Northern blot experiments we could observe than the highest expression was achieved
199 when the cells were incubated without glucose, fructose, citric acid or malic acid (Fig. 3).
200 The highest inhibition of mRNA synthesis can be observed in the presence of 50 g l⁻¹ of
201 glucose or 0.8 g l⁻¹ of citric acid. The presence of ethanol, tartaric acid or SO₂ did not show
202 influence the mRNA synthesis.

203

204 **Physiological response of whole cells to enological factors**

205

206 We analyzed the histamine production by whole cells from *Oenococcus oeni* 4042,
207 *Lactobacillus hilgardii* 464, and *Pediococcus parvulus* P270 (Fig. 4). In the experiments
208 with whole cells, we could observe that the lowest histamine production for the three

209 strains analyzed occurred in the richest growth conditions (with glucose, fructose, malic
210 acid and citric acid). The behaviour observed for the three strains analyzed in this work is
211 qualitatively similar. A glucose concentration of 50 g l⁻¹ produced a diminution in the
212 histamine production until a 35%, while the same concentration of fructose produced a
213 diminution to 50%. The highest inhibition was produced by the citric acid, which produced
214 a decrease to 20% of initial activity with 0.8 g l⁻¹. The malic acid also produced an
215 inhibition in the histamine production, although minor than glucose, fructose and citric
216 acid. We also observed that the histamine production increased when the ethanol content
217 increased. The levels of reduction in the percentage of histamine production in whole cells
218 (case of glucose, fructose, malic acid or citric) or increase (case of ethanol), were
219 comparable to the levels observed with HDC activity (Fig. 1) and *hdc* expression (Fig. 2)
220 in the experiments with cell-free extracts. The effect of temperature is also similar for *in*
221 *vitro* and *in vivo* analysis. For the pH, an optimal value of 8 is observed for cell-free
222 extracts and 5 for whole cells. In this case, there is an important difference in the behaviour
223 of whole cells of *O. oeni* from *Lact. hilgardii* and *Ped. parvulus*: whereas these last two
224 lactic acid bacteria show an important activity decrease towards acidic pH values (lower
225 than the optimum pH 5.0 value), *O. oeni* cells keep more than 75% activity at a pH of 3.0.
226 Variations in the histamine production were not observed when we added tartaric acid,
227 lactic acid, or SO₂.

228 **DISCUSSION**

229

230 The histamine producer strains analysed in this work showed different histidine
231 decarboxylating activities. *Lact. hilgardii* 464 and *Ped. parvulus* P270 present high
232 specific activities in H-RAM (2230 and 1814 U per mg of protein respectively), whereas
233 *O. oeni* 4042 shows a lower specific activity (519 U per mg of protein). These data are in
234 accordance with others shown by Landete *et al.* (2005b).

235 Although specific activities were different for the three studied strains, a similar
236 proportional response was obtained for each metabolite and regulation level (expression
237 and activity) in each microorganism. This could mean that a general mechanism rules the
238 synthesis and activity of the histidine decarboxylase in these organisms.

239 Temperature and pH influence the rate of enzyme activity. Usually a 10°C rise
240 doubles the rate of enzyme activity up to an optimum temperature; however beyond this
241 point (usually 40°C) the enzyme becomes inactive. Therefore, when the conditions of
242 temperature and pH are not ideal the enzyme activity will be reduced. In the case of
243 temperature, if the wine is made and conserved at relative low temperatures, the histamine
244 production will be reduced.

245 *O. oeni*, *Ped. parvulus* and *Lact. hilgardii* showed the maximum histamine
246 production by whole cells at pH 5. While, at wine pHs, only *O. oeni* showed the histamine
247 production near to its maximum (Fig. 4). *Ped. parvulus* and *Lact. hilgardii* showed a
248 important diminution (until 40%) in the histamine production for wine pHs. In spite of this,
249 *Ped. parvulus* and *Lact. hilgardii* were still able to produce 2.5 and 3 fold more histamine
250 respectively than *O. oeni*. These differences between *O. oeni*, *Ped. parvulus* and *Lact.*
251 *hilgardii* can be due to different intracellular pH. This is supported by the fact that HDC
252 extracts from these organisms behave similarly, with an optimum at pH 8.0.

253 The histamine production observed by whole cells in H-RAM with the different
254 supplements (organic acids, sugars, ethanol and SO₂) is in concordance with the data
255 showed in the studies of HDC activity and *hdc* expression. Thus, the reduction in histamine
256 production in whole cells by glucose, fructose, malic acid and citric acid is due to the
257 diminution in the *hdc* expression produced by these metabolites. The lactic acid, tartaric
258 acid and SO₂ had not effect on *hdc* expression or HDC activity and therefore, the histamine
259 production by whole cells had not variation. Moreno-Arribas and Lonvaud-Funel (1999)
260 observed that citric acid, lactic acid and ethanol had an inhibitory effect on whole cells, but
261 none could inhibit the tyrosine decarboxylase activity at the usual concentrations in wines.
262 On the other hand, the increase in the histamine production by ethanol was due to the
263 influence of this compound on HDC activity. Rollan *et al.* (1995) found also that up to
264 10% (v/v) of ethanol increased the histamine production in whole cells of *O. oeni*.
265 However, as they did not find effects on the cell free extracts, they suggested explaining
266 this by an easier transport of histidine inside the cells, owing to the fluidification of the
267 membrane by ethanol. Lonvaud-Funel and Joyeux (1994) observed that the histamine
268 production is enhanced in cultures at pH 3.5 and low concentrations of ethanol (10.7%,
269 v/v), where the conditions for histidine transport inside the cells are more favourable. From
270 our results with *O. oeni*, *Ped. parvulus* and *Lact. hilgardii*, we deduce that the enhancing
271 effect of ethanol on histamine synthesis is due to an increase in the HDC enzyme activity.
272 Vidal-Carou *et al.* (1990) observed that the highest levels of histamine occur in
273 wines with low concentrations of sulphur dioxide. Here we observe that sulphur dioxide
274 did not influence the *hdc* expression or HDC activity. Therefore, we think that the effect
275 observed by Vidal-Carou *et al.* (1990) could be explained by death of lactic acid bacteria
276 by SO₂, not by its direct effect on the histidine decarboxylase expression and/or activity. A
277 high dose of SO₂ can kill all the cells, but the histamine production can persist if the HDC

278 active enzyme is still in the wine. This explains our previous observations of an increase of
279 histamine during malolactic fermentation and after six months of storage in bottle (Landete
280 *et al.* 2005a).

281 Histamine synthesis was negatively correlated to malic acid, citric acid and glucose
282 content, and positively correlated to ethanol content; this indicates that the histamine is
283 favoured to develop during malolactic fermentation. This is in accordance with Soufleros
284 *et al.* (1998) who observed that during malolactic fermentation performed by lactic acid
285 bacteria, amino acid concentrations declined significantly while biogenic amines increased.
286 Some authors support these observations (Aerny 1985; Vidal-Carou *et al.* 1990; Vázquez-
287 Lasa *et al.* 1998). A possible reason would be that the lactic acid bacteria use glucose,
288 fructose, malic acid and citric acid for generating metabolic energy. When the cells have
289 these metabolites in the medium the *hdc* gene is repressed, because it is not necessary the
290 production of energy from decarboxylation reactions. When the levels of these metabolites
291 decrease the *hdc* gene is derepressed, and the cells obtain energy to survive in a medium
292 poor in nutrients through decarboxylation of histidine. The tartaric acid and lactic acid are
293 not normally used as substrates to provide metabolic energy, thus the *hdc* is not repressed
294 by these substrates. This is in accordance with the results of Molenaar *et al.* (1993) who
295 shows that amino acid decarboxylation can provide energy to lactic acid bacteria by the
296 same mechanism as malic acid decarboxylation (Poolman *et al.* 1991). Liu *et al.* (1996)
297 observed that lactic acid bacteria obtain metabolic energy through of the deamination of
298 arginine; the mechanism is different but the results are similar to the decarboxylation of
299 histidine.

300 These results contribute to the understanding of histamine production by lactic acid
301 bacteria in wine, and could lead to future applications for preventing excessive amounts of
302 histamine forming during vinification and storage.

303 **ACKNOWLEDGEMENTS**

304

305 The authors gratefully acknowledge support of this work by the Comisión
306 Interministerial de Ciencia y Tecnología (CICYT), Ministerio de Educación y Ciencia,
307 Spain (Project AGL2000-0827-C2-01).

308 The authors wish to thank Lucía Polo and Lucía Blasco for providing assistance in
309 the laboratory work.

310 **REFERENCES**

311

312 Aerny, J. (1985) Origine de l'histamine des vins. Connaissances actuelles. *Bulletin de*
313 *l'Office International du Vin* **656-657**, 1016-1019.

314

315 Caspritz, G. and Radler, F. (1983) Malolactic enzyme of *Lactobacillus plantarum*. *Journal*
316 *of Biological Chemistry* **258**, 4907-4010.

317

318 Chang, G.W. and Snell, E.E. (1968) Histidine decarboxylase of *Lactobacillus* 30a: II.
319 Purification, substrate specificity and stereospecificity. *Biochemistry* **7**, 2005-2012.

320

321 Cilliers, J.D. and van Wyk, C.J. (1985) Histamine and tyramine content of South African
322 wine. *South African Journal of Enology and Viticulture* **6**, 35-40.

323

324 Coton, E., Rollan, G.C. and Lonvaud-Funel, A. (1998) Histidine decarboxylase of
325 *Leuconostoc oenos* 9204: purification, kinetic properties, cloning and nucleotide sequence
326 of *hdc* gene. *Journal of Applied Microbiology* **84**, 143-151.

327

328 Delfini, C. (1989) Ability of wine malolactic bacteria to produce histamine. *Sciences des*
329 *Aliments* **9**, 413-416.

330

331 Halász, A., Baráth, A., Simon-Sarkadi, L. and Holzapfel, W.H. (1994) Biogenic amines
332 and their production by microorganisms in food. *Trends Food Science and Technology* **5**,
333 42-49.

334

Capítulo 6

335 Lafon-Lafourcade, S. (1975) L'histamine des vins. *Connaissance de la Vigne et du Vin* **22**,
336 11-24.

337

338 Landete, J.M., Ferrer, S. and Pardo, I. (2004) Improved enzymatic method for the rapid
339 determination of histamine in wine *Food Additives and Contaminants* **21**, 1149-1154.

340

341 Landete, J.M., Ferrer, S. Polo, L. and Pardo, I. (2005a) Biogenic amines in wines from
342 three Spanish regions. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* **53**, 1119-1124.

343

344 Landete, J.M., Ferrer, S. and Pardo, I. (2005b) Which are the lactic acid bacteria
345 responsible of histamine production in wine?. *Journal of Applied Microbiology* (In press).

346

347 Le Jeune, C., Lonvaud-Funel, A., ten Brink, B., Hofstra, H. and van der Vossen, J.M.B.M.
348 (1995) Development of a detection system for histidine decarboxylating lactic acid bacteria
349 on DNA probes, PCR and activity test. *Journal of Applied Bacteriology* **78**, 316-326.

350

351 Liu, S.-Q., G. G. Pritchard, M. J. Hardman, and Pilone, G. J. (1996) Arginine catabolism in
352 wine lactic acid bacteria: is it via the arginine deiminase pathway or the arginase-urease
353 pathway?. *Journal of Applied Microbiology* **81**, 486-492.

354

355 Lonvaud-Funel, A. and Joyeux, A. (1994) Histamine production by wine lactic acid
356 bacteria. Isolation of a histamine-producing strain of *Leuconostoc oenos*. *Journal of*
357 *Applied Bacteriology* **77**, 401-407.

358

- 359 Maicas, S., Ferrer, S. and Pardo, I. (2002) NAD(P)H regeneration is the key for
360 heterolactic fermentation of hexoses in *Oenococcus oeni* **148**, 325-332.
361
- 362 Molenaar, D., Bosscher, J.S., ten Brink, B., Driessen, A.J.M. and Konings, W.M. (1993)
363 Generation of a proton motive force by histidine decarboxylation and electrogenic
364 histidine/histamine antiport in *Lactobacillus buchneri*. *Journal of Bacteriology* **175**, 2864-
365 2870.
366
- 367 Moreno-Arribas, V. and Lonvaud-Funel, A. (1999) Tyrosine decarboxylase activity of
368 *Lactobacillus brevis* IOEB 9809 isolated from wine and *L. brevis* ATCC 367. *FEMS*
369 *Microbiology Letters* **180**, 55-60
370
- 371 Ough, C.S., Crowell, E.A., Kunkee R.E., Vilas M.R. and Lagier S. (1987) A study of
372 histamine production by various wine bacteria in model solutions and in wine. *Journal of*
373 *Food Process and Preservation* **12**, 63-70.
374
- 375 Poolman, B., Molenaar, D., Smid, E.J., Ubbink, T., Abe, T., Renault, P.P. and Konings,
376 W.N. (1991) Malolactic fermentation: electrogenic malate uptake and malate/lactate
377 antiport generate metabolic energy. *Journal of Bacteriology* **173**, 6030-6037.
378
- 379 Recsei, P.A., Moore, W.M. and Snell, E.E. (1983) Pyruvoyl-dependent histidine
380 decarboxylases from *Clostridium perfringens* and *Lactobacillus buchneri*. *Journal of*
381 *Biological Chemistry* **258**, 439-444.
382

Capítulo 6

- 383 Rodas, A.M., Ferrer, S. and Pardo, I. (2003) 16S-ARDRA, a tool for identification of lactic
384 acid bacteria isolated from grape must and wine. *Systematic and Applied Microbiology* **26**,
385 412-422.
- 386
- 387 Rollan, G.C., Coton, E. and Lonvaud-Funel, A. (1995) Histidine decarboxylase activity of
388 *Leuconostoc oenos* 9204. *Food Microbiology* **12**, 455-461.
- 389
- 390 Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) Molecular cloning. A laboratory
391 manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*.
- 392
- 393 Soufleros, E., Barrios, M.-L. and Bertrand, A. (1998) Correlation between the content of
394 biogenic amines and other wine compounds. *American Journal of Enology and Viticulture*
395 **49**, 266-278.
- 396
- 397 ten Brink, B., Damink, C. and Joosten, H.M.L.J. (1990) Occurrence and formation of
398 biologically active amines in foods. *International Journal of Food Microbiology* **11**, 73-84.
- 399
- 400 Vázquez-Lasa, M.B., Iñiguez-Crespo, M., González-Larraina, M.A. and González-
401 Guerrero, A. (1998) Biogenic amines in Rioja wines. *American Journal of Enology and*
402 *Viticulture* **49**, 229-229.
- 403
- 404 Vidal-Carou, M.C., Codony-Salcedo, R. and Mariné-Font, A. (1990) Histamine and
405 tyramine in spanish wines: Relationships with total sulphur dioxide level, volatile acidity
406 and malo-lactic fermentation intensity. *Food Chemistry* **35**, 217-227.

407 **Figure 1.** Effect of temperature (a), pH (b) and ethanol (c) on HDC activity of
 408 *Lactobacillus hilgardii* 464.

409

410 **Figure 2.** Effect of malic acid (a), citric acid (b) and glucose (c) on *hdc* expression of
 411 *Lactobacillus hilgardii* 464.

412

413 **Figure 3.** Northern blot of the L-malic acid effect on the *hdc* expression. Malic acid
 414 concentrations in the H-RAM growth medium (from left to right): 0, 0.5, 1, 2, and 4 g l⁻¹.

415

416 **Figure 4.** Histamine production of *Lactobacillus hilgardii* 464 (◆), *Pediococcus parvulus*
 417 P270 (■) and *Oenococcus oeni* 4042 (▲) under different concentrations of glucose,
 418 fructose, malic acid, citric acid, ethanol and different conditions of temperature and pH.

419

Glucose g l ⁻¹	0.0	2.0	5.0	25.0	50.0								
Fructose g l ⁻¹	0.0	2.0	5.0	25.0	50.0								
L-malic acid g l ⁻¹	0.0	0.5	1.0	2.0	4.0								
L-citric acid g l ⁻¹	0.0	0.2	0.4	0.6	0.8								
L-tartaric acid g l ⁻¹	0.0	1.0	2.0	4.0	8.0								
L-lactic acid g l ⁻¹	0.0	0.5	1.0	2.5	5.0								
Ethanol % (v/v)	0.0	4.0	8.0	12.0	16.0								
Total SO ₂ g l ⁻¹	0.0	5.0	10.0	25.0	50.0								
Temperature °C	4	15	28	37	50								
pH	3.0	3.5	4.0	4.5	5.0	5.5	6.0	6.5	7.0	7.5	8.0	8.5	9.0

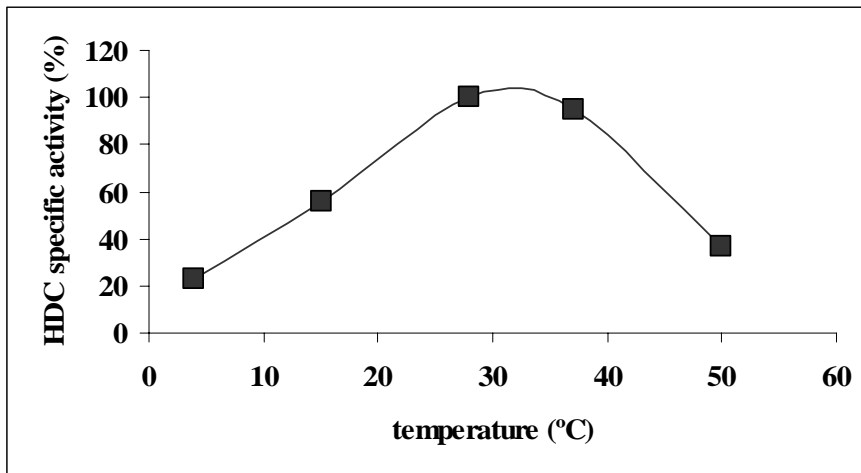
420

421

422 **Table 1.** Different concentrations of sugars, organic acids, ethanol and SO₂ and different
 423 conditions of pH and temperature (°C) used to determine their influence on *hdc* expression
 424 and HDC activity in H-RAM medium.

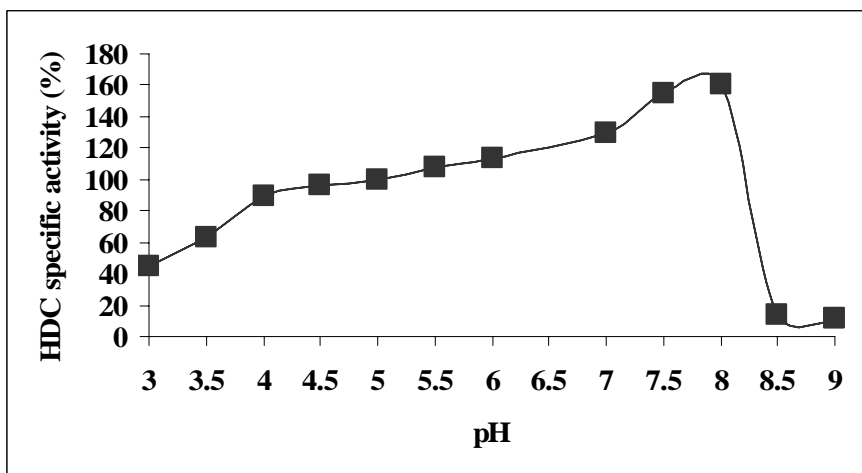
425 Figure 1.

426 a)



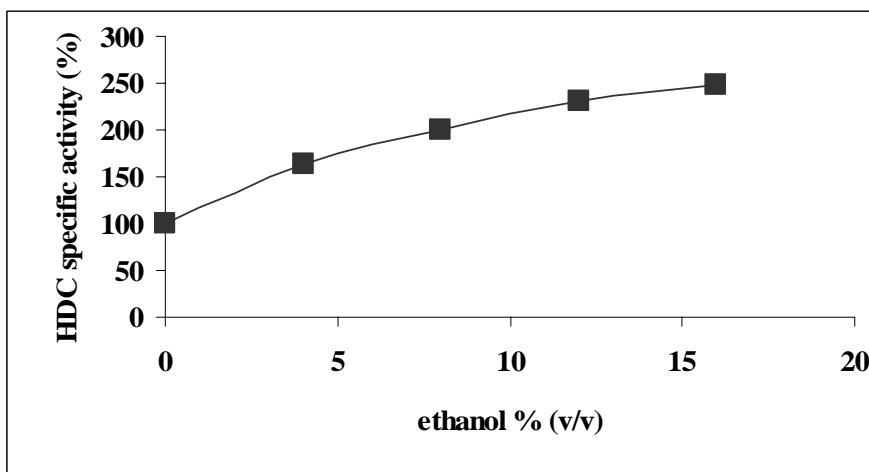
427

428 b)



429

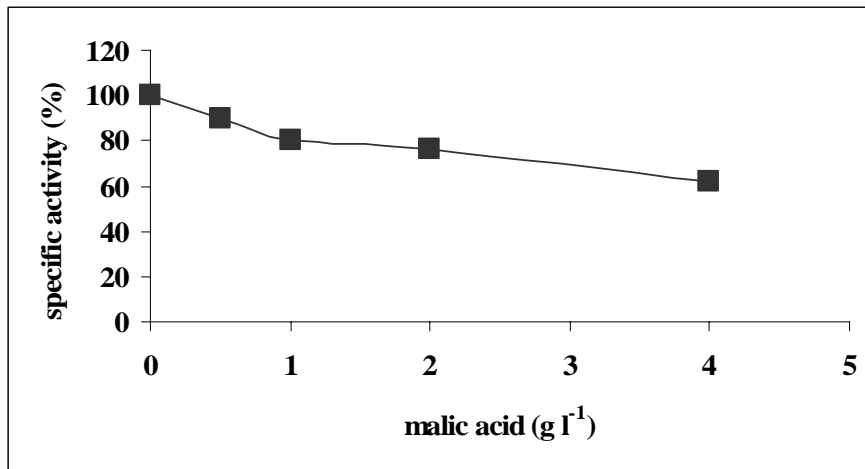
430 c)



431

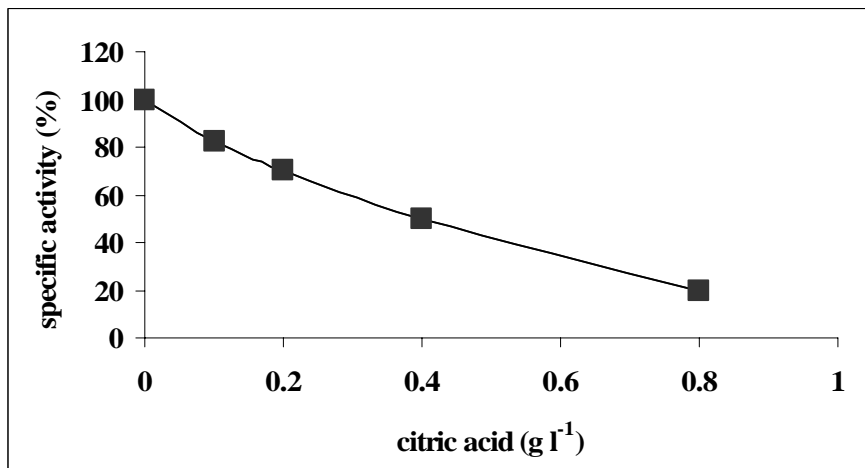
432 Figure 2.

433 a)



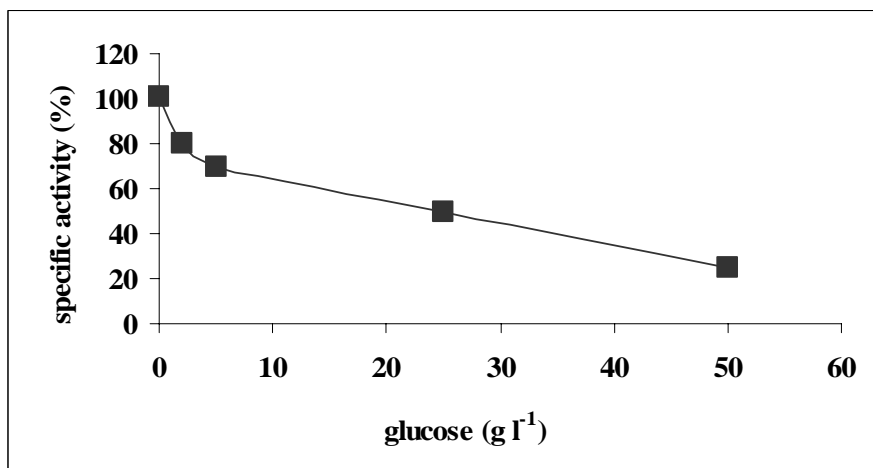
434

435 b)



436

437 c)

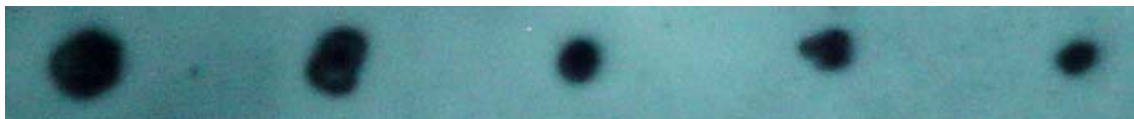


438

439 Figure 3.

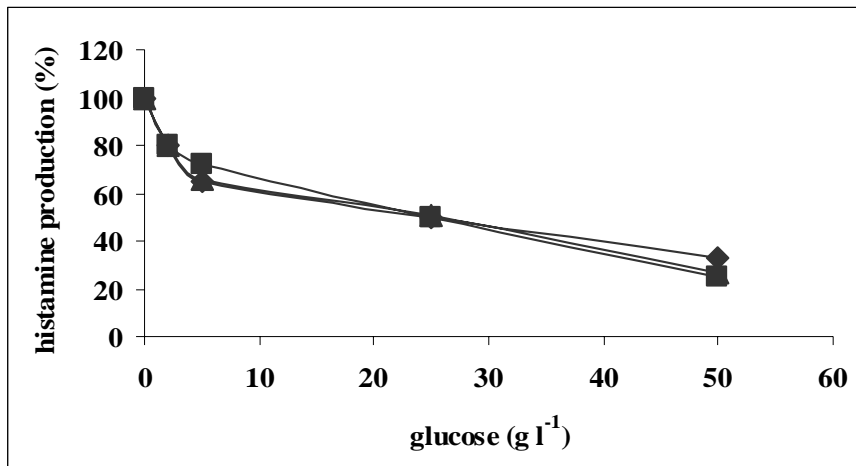
440

441

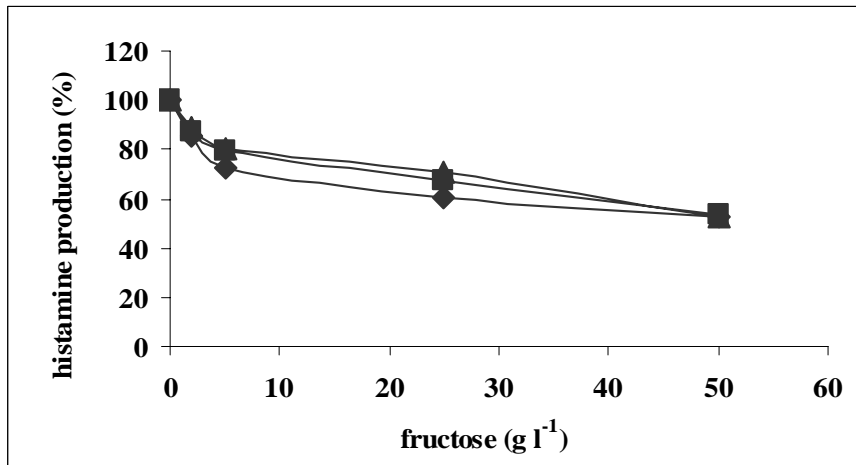


442

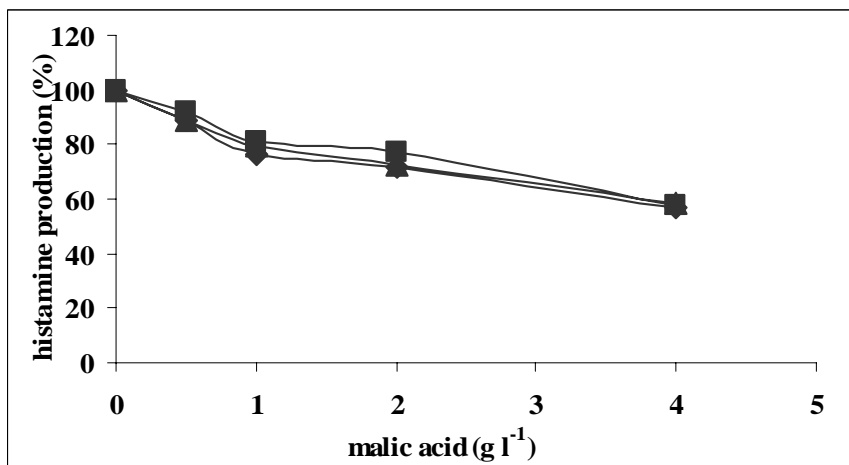
443 Figure 4.



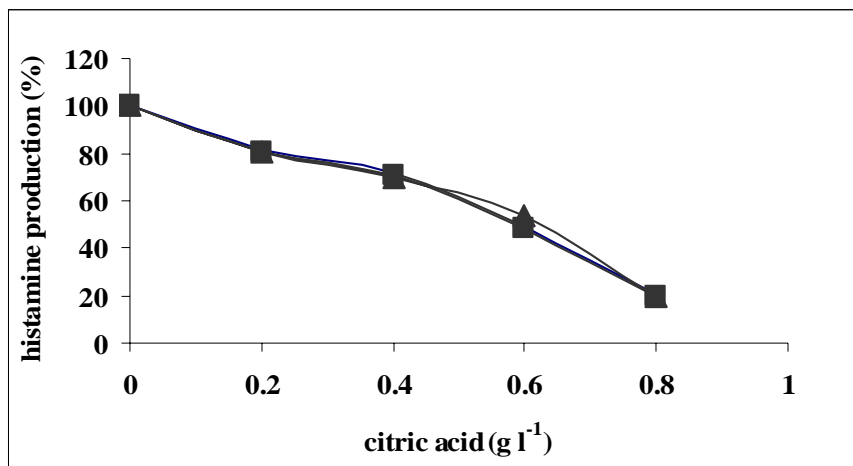
444



445

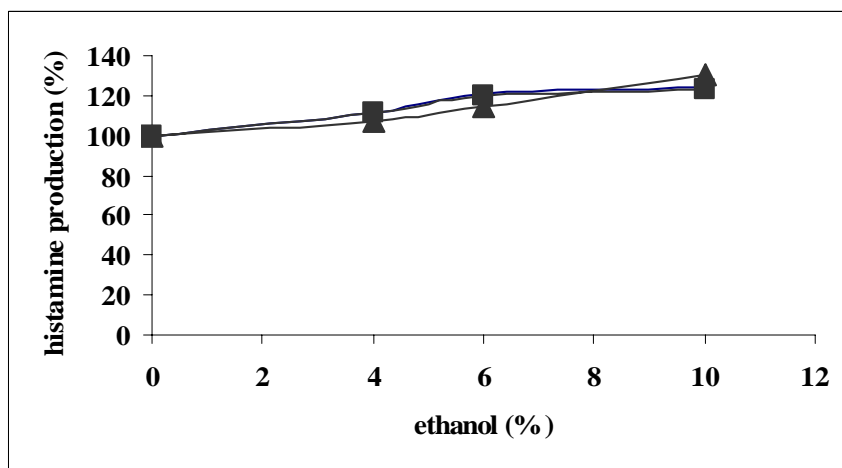


446

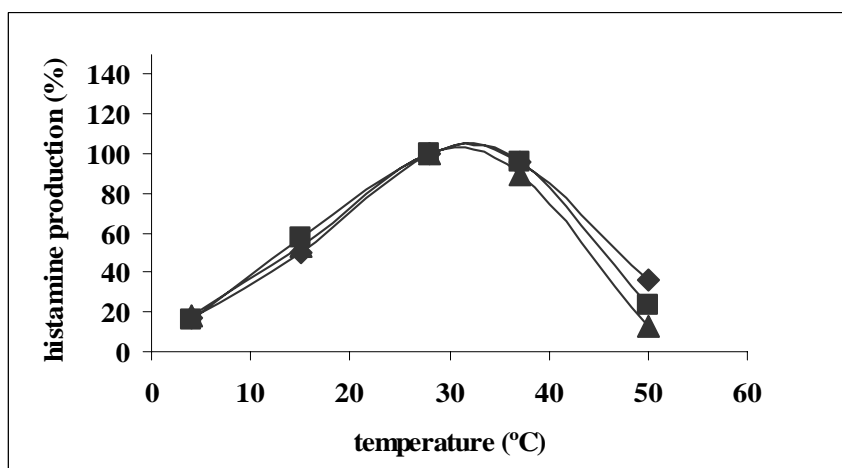


447

448

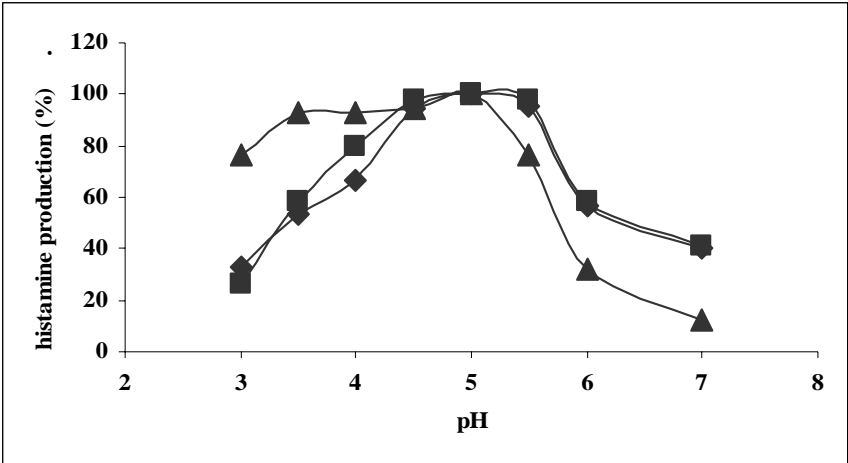


449



450

451



452

453

Landete, J.M., Pardo, I. y Ferrer, S. 2005. Histamine, histidine and growth phase mediated regulation of histidine decarboxylase gene in lactic acid bacteria.

Capítulo 7

Histamine, histidine and growth phase mediated regulation of histidine decarboxylase gene in lactic acid bacteria isolated from wine

Landete JM, Pardo I and Ferrer S

ENOLAB – Laboratori de Microbiologia Enològica

Departament de Microbiologia i Ecologia, Facultat de Biologia, Universitat de València, València, Spain. C/ Dr. Moliner 50. 46100 Burjassot

En este Capítulo se analizó la influencia de la histidina, histamina y piridoxal 5-fosfato sobre la producción de histamina por parte de las mismas tres cepas del Capítulo 6 (*Lactobacillus hilgardii* 464, *Pediococcus parvulus* P270 y *Oenococcus oeni* 4042). La capacidad de cada cepa para producir histamina fue diferente aunque la influencia de los distintos factores sobre la producción de histamina fue cualitativamente similar. Además, en este Capítulo analizamos la influencia de la fase de crecimiento sobre la producción de histamina por parte de *Lactobacillus hilgardii* 464.

La actividad histidina descarboxilasa específica para las tres cepas ya ha sido presentada en el Capítulo 6 y la metodología empleada es la misma que la utilizada en el Capítulo 6.

Efecto de la fase de crecimiento sobre la producción de histamina

La actividad histidina descarboxilasa específica de *Lactobacillus hilgardii* 464 fue determinada durante las diferentes fases de crecimiento (Figura 1). En las muestras recogidas a las 3 horas ya se apreciaba actividad histidina descarboxilasa específica, incluso superior a las de 6 y 12 horas, probablemente porque a las 3 horas aun mostrara actividad residual del medio de donde procedía, pues las bacterias procedían de MRS y estaban en fase de crecimiento exponencial cuando se inocularon. En las muestras recogidas a las 24, 32 y 48 horas se apreciaba la mayor actividad histidina descarboxilasa específica, estas muestras corresponden con la fase de crecimiento exponencial. La muestra recogida en la hora 60 ya demostraba una disminución considerable de esta actividad, mucho más evidente a las 72 horas, estas muestras correspondían con la fase de

crecimiento estacionario. Incluso parte de la actividad mostrada a las 72 horas correspondería con actividad residual del periodo anterior, aunque en un periodo de tiempo de 12 horas un porcentaje elevado de la actividad se pierde.

Para confirmar los datos obtenidos con los experimentos de actividad específica realizamos experimentos de Northern blot, estos experimentos revelaron una mayor concentración de RNAm de la histidina descarboxilasa durante la fase de crecimiento exponencial confirmando los datos anteriormente mostrados. Ello demuestra un efecto sobre la expresión génica del gen *hdc*.

Aunque cierta actividad residual puede quedar de un periodo de recogida de muestras al siguiente, los experimentos de Northern blot nos demostraron que la actividad enzimática que queda es residual y que si que se produce una verdadera inducción.

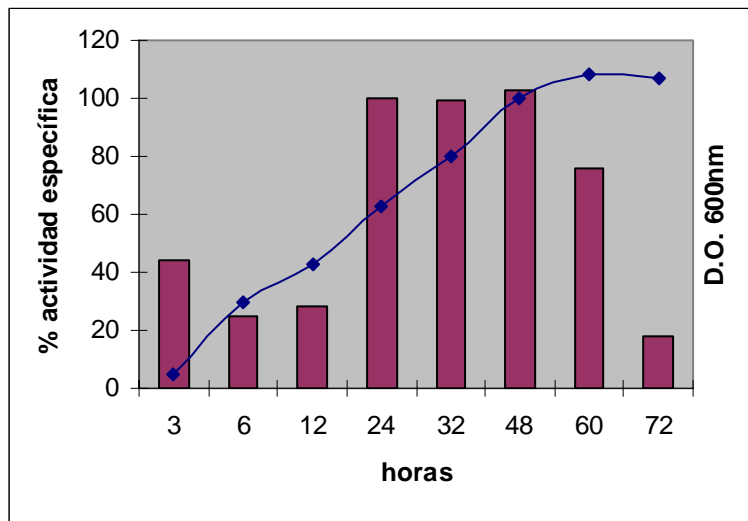


Figura 1. Efecto de la fase de crecimiento sobre la actividad específica de la histidina descarboxilasa de *Lactobacillus hilgardii* 464 en medio H-RAM.

Efecto de la histidina y la histamina sobre la expresión del gen *hdc*

Para estudiar la influencia de la histidina sobre la expresión del gen *hdc* de los tres microorganismos estudiados, tuvimos que realizar los experimentos en medio mínimo (Neidhardt y cols. 1974) sin histidina, para asegurarnos que este aminoácido no estuviera presente y sobre ese mismo medio mínimo con diferentes concentraciones de histidina, para ver el efecto de la adición de histidina sobre la expresión del gen *hdc*. Los microorganismos en estos experimentos y en los de la influencia de la histamina se se

recogieron a mitad de la fase de crecimiento exponencial. La actividad específica mostrada en el medio mínimo sin histidina fue muy baja (18%, en el caso de *Lactobacillus hilgardii* 464), sin embargo cuando añadimos histidina la actividad específica aumentó y con 1 y 2 g/L de histidina alcanzó el 100%. En la Figura 2 puede apreciarse cómo la adicción de 1 g/L de histidina incrementó entre 5 y 6 veces la actividad específica de la histidina descarboxilasa de *Lactobacillus hilgardii* 464.

Para demostrar que la histidina incrementa la expresión del gen *hdc* realizamos experimentos de Northern blot, encontrándonos con una concentración de RNAm muy superior cuando añadimos histidina al medio. No se apreciaron diferencias entre 1 y 2 g/L de histidina.

Para demostrar la influencia de la histamina sobre la expresión del gen *hdc* sembramos los microorganismos en medio H-RAM suplementado con diferentes concentraciones de histamina. La adicción de hasta 2 g/L de histamina reducía la expresión del gen *hdc* hasta el 76%. Los experimentos de Northern blot confirmaron la inhibición del gen *hdc* por la histamina.

Los resultados fueron cualitativamente similares en los tres microorganismos estudiados, lo cual indica el mismo tipo de mecanismo de respuesta

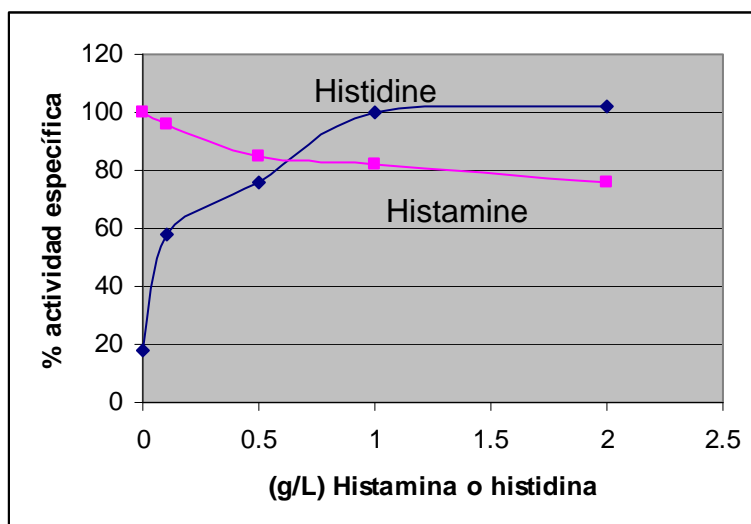


Figura 2. Efecto de la histamina en el medio H-RAM o histidina en el medio mínimo sobre la actividad específica de *Lactobacillus hilgardii* 464.

Influencia del piridoxal 5-fosfato sobre la actividad del enzima HDC y la expresión del gen *hdc*.

En estos experimentos observamos cómo el piridoxal 5-fosfato actuaba incrementando la actividad del enzima histidina descarboxilasa. Así, concentraciones de 0.25 g/L de piridoxal 5-fosfato incrementaban más de 2 veces la actividad del enzima y concentraciones de 1 g/L de este cofactor incrementaban la actividad del enzima hasta 3 veces. En la Figura 3 se observa una pequeña diferencia entre 0.75 y 1 g/L del cofactor, haciendo presuponer que concentraciones más altas de 1 g/L no afecten de manera importante a la actividad del enzima.

Por otro lado, los experimentos de expresión génica, actividad específica y Northern blot, no demostraron ninguna influencia sobre la expresión del gen *hdc*.

Estos resultados también fueron similares para los tres microorganismos.

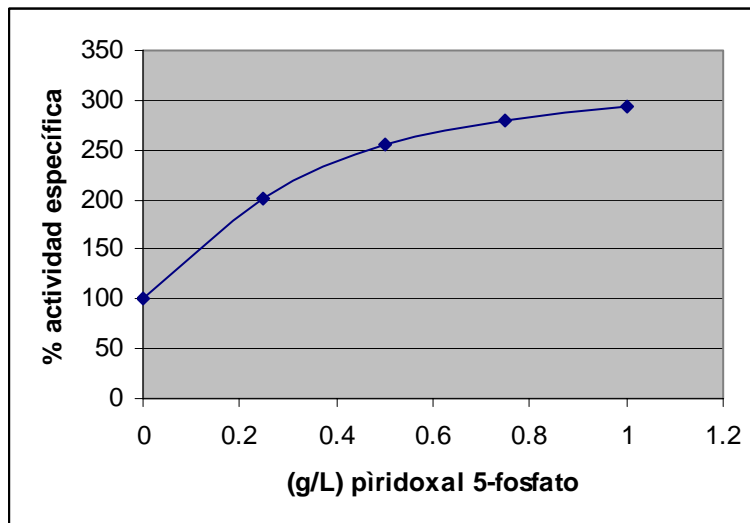


Figura 3. Efecto del piridoxal 5-fosfato sobre la actividad del enzima histidina descarboxilasa.

Nota:

Este capítulo corresponde a un artículo que en breve será enviado al “Internacional Journal Food Microbiology”.

Resumen de resultados

En la presente Tesis Doctoral se muestra un amplio estudio acerca de las aminas biógenas de mayor interés en el mundo de la enología: en primer lugar, mostramos el desarrollo de un método enzimático para la cuantificación de las aminas biógenas en mosto, vino y medio sintético. A continuación, analizamos la incidencia de histamina, tiramina, feniletilamina, putrescina, cadaverina y triptamina en vinos españoles, intentando correlacionar su concentración con distintos factores: geográficos, vitícolas, enológicos, microbiológicos, etc. Posteriormente, pasamos a analizar qué microorganismos eran los responsables de la producción de las aminas biógenas; para ello se estudió la capacidad de formar histamina, tiramina y feniletilamina en bacterias lácticas procedentes del vino y se cuantificó la cantidad que eran capaz de producir en medio sintético y en vino. Caracterizamos genéticamente del operón de la tirosina descarboxilasa de *Lactobacillus brevis* IOEB 9809 lo cuál nos permitió diseñar cebadores para la detección de bacterias lácticas capaces de producir tiramina. En la última parte de la tesis analizamos la influencia de varios factores físico-químicos del vino sobre la actividad del enzima histidina descarboxilasa (HDC) y sobre la expresión del gen histidina descarboxilasa (*hdc*). La finalidad de estos estudios es conocer qué parámetros controlan la producción de histamina en el vino y de esta forma proponer procedimientos que conduzcan a su reducción, siempre y cuando estos sean asumibles desde el punto de vista enológico.

De acuerdo a los objetivos propuestos los resultados obtenidos han sido:

Desarrollo de un método enzimático para la cuantificación de aminas biógenas en vinos.

Este primer objetivo queda recogido en el artículo de Landete y cols. (2004), que se presenta en el Capítulo 1 de la presente Tesis.

El método que hasta el momento se había utilizado para cuantificar las aminas en el vino era la cromatografía líquida de alta precisión (HPLC). En este trabajo hemos desarrollado un método enzimático que permite la cuantificación de histamina mediante un espectrofotómetro, un equipo más frecuentemente utilizado en bodegas y en laboratorios modestos que la HPLC.

El método se basa en dos reacciones bioquímicas sucesivas que producen un incremento en la absorbancia proporcional a la concentración de histamina. Presenta una gran sensibilidad, permite detectar un amplio margen de concentraciones y es aplicable a medios sintéticos, mostos y vinos (Tabla 1, Capítulo 1), a diferencia de otros métodos

enzimáticos previamente desarrollados para cuantificar histamina en pescado (Tabla 2, Capítulo 1) (Lerke y cols. 1983; López-Sabater y cols. 1993 y Rodríguez-Jerez y cols. 1994). La comparación de los resultados obtenidos por el método enzimático y por HPLC se muestra en la Figura 2 del Capítulo 1, pudiendo deducirse de la misma que existe una correlación muy elevada ($r^2 = 0.9987$, $p < 0.001$) entre ambos métodos, lo que garantiza su precisión como método de análisis.

El método enzimático se ha adaptado al sistema de microplacas, ello permite analizar hasta 96 muestras de forma simultánea en 4 horas. La cuantificación de histamina en las muestras de cada pocillo se realiza mediante un lector de placas de ELISA.

La principal ventaja del método enzimático frente al HPLC es que permite analizar el contenido de histamina de mayor número de muestras en tiempos notablemente inferiores. Por contra, la HPLC permite la detección simultánea de todas las aminas biógenas que existen en el vino.

En este trabajo también se han llevado a cabo modificaciones de los métodos de HPLC previamente descritos para el análisis de las aminas biógenas en vinos, con el fin de mejorar los resultados.

Estudio de la incidencia de aminas biógenas en vinos y de los factores que influyen en su concentración.

Este segundo objetivo queda recogido en el artículo de Landete y cols. (2005a), que se presenta en el Capítulo 2 de la presente Tesis. En esta parte del trabajo se analiza la influencia de la origen geográfico, de la variedad de uva, del tipo de elaboración, del pH del vino, de la fermentación maloláctica y del periodo almacenamiento sobre la presencia de aminas biógenas.

Se estimaron las concentraciones de histamina, tiramina, feniletilamina, putrescina, cadaverina y triptamina de vinos de tres D.O. (La Rioja, Tarragona y Utiel-Requena). Los resultados mostraron que los vinos de las D.O. Rioja y Tarragona presentaban concentraciones de histamina y putrescina superiores a los de la de Utiel-Requena, siendo La Rioja la D. O. con mayor concentración de estas dos aminas biógenas (Tabla 2, Capítulo 2). Por el contrario, tiramina y feniletilamina mostraban concentraciones similares en las tres regiones (Tabla 2, Capítulo 2).

Se observó que existían variaciones en el contenido de aminas en vinos procedentes de distintas variedades de uva (Bobal, Tempranillo y Garnacha) de la misma D.O. (Utiel-

Requena). La variedad Bobal era la que presentaba concentraciones de putrescina más bajas mientras que la Garnacha era la que menores concentraciones de histamina y tiramina contenía (Tabla 3, Capítulo 2). Las concentraciones de triptamina y cadaverina fueron similares en todas las variedades y D.O. estudiadas y siempre inferiores a 0.5 mg/L.

La influencia de las diferentes formas de elaboración del vino también se analizó en este Capítulo. Para ello, se cuantificaron los contenidos de aminas en vinos tintos, rosados y blancos, observándose que los vinos tintos presentaban mayores concentraciones de histamina, tiramina y feniletilamina. Las concentraciones de putrescina, cadaverina y triptamina no mostraban diferencias significativas en ninguno de los tres tipos de vinos.

Se observó la existencia de una relación entre el pH del vino y la concentración de histamina en el mismo, de manera que las concentraciones más elevadas de histamina se observaban en los vinos de pH más alto (Figura 1 del Capítulo 2).

También se ha estudiado la influencia de la fermentación maloláctica y del almacenamiento durante 12 meses en botella sobre los contenidos en aminas. En la Figura 2 del Capítulo 2 se aprecia como la fermentación maloláctica supone un incremento significativo de las concentraciones de histamina, tiramina y feniletilamina. Sin embargo, no tuvo ninguna consecuencia sobre los niveles de putrescina. Los vinos blancos y rosados con la fermentación maloláctica realizada mostraban concentraciones de aminas biógenas más parecidas a las de los vinos tintos. En el caso de la histamina se pudo observar también un incremento durante los seis primeros meses de almacenamiento y una posterior disminución tras los siguientes seis meses. En el caso de la tiramina y feniletilamina no se observaron cambios significativos desde el final de la fermentación maloláctica (Figura 2, Capítulo 2). A partir de 12 vinos donde se estudió la evolución de las aminas biógenas a lo largo del tiempo se aislaron e identificaron las bacterias lácticas presentes en los mismos. Igualmente se determinó y cuantificó el tipo de amina que producían tanto en medio sintético como en vino (Tabla 4, Capítulo 2), viendo que algunas de ellas producían histamina o tiramina y feniletilamina, siendo pues los potenciales responsables de la síntesis de esas aminas biógenas en los vinos donde habían sido aisladas.

Caracterización de la capacidad de producción de histamina por bacterias lácticas de origen enológico.

Este tercer objetivo queda recogido en el artículo de Landete y cols. (2005b), que se presenta en el Capítulo 3 de la presente Tesis.

Resumen de resultados

Se analizó la capacidad de producir histamina de 136 cepas de bacterias lácticas procedentes de vino y pertenecientes a los géneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Oenococcus*. Para ello, utilizamos un medio en placa (H-MDBmod suplementado con 20 g/L de agar y 0.03 g/L de púrpura de bromocresol), el método enzimático y el de HPLC descritos en el Capítulo 1 (Tabla 1, Capítulo 3). Los resultados obtenidos de este estudio fueron que *Lactobacillus hilgardii*, *Lactobacillus mali*, *Pediococcus parvulus*, *Leuconostoc mesenteroides* y *Oenococcus oeni* fueron las especies de bacterias lácticas capaces de producir histamina. Como se deduce de los resultados de HPLC y del método enzimático expuestos en las Tablas 1 y 2 del Capítulo 3, la especie *Oenococcus oeni* es la que presenta un mayor porcentaje de cepas productoras de histamina, aunque la producen en bajas cantidades tanto en medio sintético como en vino. Por el contrario, las especies *Pediococcus parvulus* y *Lactobacillus hilgardii* presentan un bajo número de cepas productoras de histamina pero la producen en cantidades elevadas. Al analizar los resultados obtenidos con el método en placa y con el método enzimático y HPLC (Tabla 1), vemos que la mayoría de cepas de *Oenococcus oeni* y *Lactobacillus mali* detectadas como productoras de histamina por estos dos últimos métodos no dan reacción positiva en placa; sin embargo todas las cepas productoras de histamina de *Lactobacillus hilgardii* (excepto una) y de *Pediococcus parvulus* dan reacción positiva en placa. La explicación de esta aparente incongruencia es que el medio en placa presenta una baja sensibilidad y es incapaz de detectar como positivas las cepas que producen bajas cantidades de histamina.

En este trabajo se utilizaron dos parejas de cebadores para poner en evidencia la presencia/ausencia del gen *hdc* en las bacterias analizadas (Figura 1, Capítulo 3). Se observó que la pareja de cebadores JV16HC/JV17HC es la mejor para la detección del gen *hdc* en el género *Lactobacillus*, mientras que la pareja CL1mod/JV17HC es ideal para la detección del gen en *O. oeni*, aunque también funciona bien para las especies de los géneros *Leuconostoc* y *Pediococcus* (Tabla 3 y Figura 1, Capítulo 3). Se observó que todas las cepas que producían histamina (cuantificada por HPLC y método enzimático) daban una banda de amplificación correspondiente al gen *hdc* (Tabla 1, Capítulo 3), lo cual indica una correlación del 100% entre presencia del gen y expresión de la actividad histidina descarboxilasa.

Se analizó el contenido en histamina de algunos vinos y se aislaron las bacterias lácticas presentes en los mismos. Se observó que los vinos que presentaban mayores concentraciones de histamina contenían cepas productoras de esta amina pertenecientes a

las especies *Lb. hilgardii* y *P. parvulus* (Tabla 4, Capítulo 3), mientras que de los vinos que exhibían concentraciones inferiores a 10 mg/L solo se aislaron cepas de *O. oeni* que producían bajas concentraciones de histamina en medio sintético. Estos resultados confirman las diferentes capacidades para producir histamina de las diferentes especies, ya demostradas en las Tablas 4 y 5 del Capítulo 2 y en la Tabla 2 del Capítulo 3.

Caracterización molecular del operón de la tirosina descarboxilasa y estudio de la incidencia de la producción de tiramina y feniletilamina por bacterias lácticas origen enológico.

Este objetivo queda recogido en el artículo de Lucas y cols. (2003) y Landete y cols. (2005c), que corresponden a los Capítulos 4 y 5 de la presente Tesis.

Ante la necesidad de desarrollar un método molecular que nos permitiera identificar la presencia del gen de la tirosina descarboxilasa (*tdc*) en bacterias lácticas de origen enológico, nos planteamos la secuenciación y caracterización molecular del operón *tdc* del *Lactobacillus brevis* 9809 (Capítulo 4). Se partió del trabajo previo de Lucas y Lonvaud-Funel (2002) en el que los autores secuenciaron 792 pb del gen *tdc* de la bacteria antes citada. En el trabajo que se expone en el Capítulo 4 de esta tesis se completó la secuencia de ese operón *tdc*: un total de 7979 pb que incluyeron las 792 pb del fragmento inicialmente secuenciado. La secuencia correspondiente al operón completo fue depositada en GenBank con el número de acceso AF446085.

En la Figura 1 del Capítulo 4 puede observarse la organización genética del operón de la tirosina descarboxilasa. La secuencia contiene 4 genes completos que codifican para una tirosin-RNA_t sintetasa, para la tirosina descarboxilasa, para una probable tirosina permeasa y para un antiportador Na⁺/H⁺.

Para caracterizar los transcritos que contienen la secuencia del *tyrDC* se analizaron sus extremos 5'. Ello se hizo mediante rápidas amplificaciones de los extremos del cDNA (RACE) aplicado al RNA total de la cepa y usando cebadores oligonucleotídicos situados en los primeros 600 pares de bases del *tyrDC*. Con esta estrategia solo se obtuvo un único producto de amplificación, lo que sugiere que la mayoría de los transcritos se inician en el mismo sitio. Este sitio se localiza a 34-35 nucleótidos “upstream” del codón de inicio del gen *tdc*.

Para determinar si el gen *tyrDC* se cotranscribe con el resto de genes del operón *tyrDC*, el RNA total de *Lactobacillus brevis* se usó como molde en una reacción RT-PCR,

en la se emplearon 4 pares de cebadores diseñados para amplificar regiones adyacentes a la unión de los genes. Se obtuvieron tres productos de amplificación, mostrando que los genes *tyrRS*, *tyrDC*, *tyrP* y *nhaC* pueden ser cotranscritos. La fuerte señal obtenida del producto *tyrDC-tyrP* indicó que estos genes se cotranscriben frecuentemente. Los transcritos *tyrRS-tyrDC* y *tyrP-nhaC* se detectaron pero con señales más débiles.

El alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la tirosina descarboxilasa y de la tirosina permeasa de *Lactobacillus brevis*, *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium* reveló que estos genes estaban fuertemente relacionados en las tres especies (69 y 61 % de identidad y 84 y 80 % de similaridad respectivamente) (Figura 3, Capítulo 4).

Los resultados obtenidos al analizar la interrelación evolutiva de los genes tirosin-RNA_t sintetasa y el antiporter Na⁺/H⁺ (Figura 4, Capítulo 4) sugieren que los cuatro genes del operón evolucionaron juntos y fueron diseminados en *Lactobacillus brevis*, *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium* como elementos móviles simples.

Una vez caracterizado el operón de la tirosina descarboxilasa a nivel molecular se utilizaron cebadores específicos previamente desarrollados por Lucas y Lonvaud-Funel (2002) y Lucas y cols. (2003) para conocer la incidencia del gen *tdc* (*tyrDC*) en bacterias lácticas aisladas de vinos. Nuestros estudios pusieron de manifiesto que estos cebadores fueron útiles para evidenciar la presencia de este gen en diferentes especies de géneros presentes en vino como *Lactobacillus*, *Enterococcus*, o no como *Carnobacterium* (Tabla 1, Capítulo 5). También se estudió la correlación existente entre la presencia del gen *tdc* y la capacidad para producir tiramina y feniletilamina por las bacterias lácticas analizadas, observándose que era del 100% (Tabla 1, Capítulo 5). El análisis de la producción de tiramina y feniletilamina por bacterias lácticas reveló que la feniletilamina y tiramina se producían simultáneamente. Todas las cepas de las especie *Lb. brevis* y algunas cepas de *Lb. hilgardii* aisladas de vinos producían tiramina y feniletilamina, aunque esta última en concentraciones de 3 a 4 veces inferiores a las de la tiramina (Tabla 2, Capítulo 5). También otras cepas de *Lactobacillus sakei*, *Enterococcus faecalis* y *Carnobacterium divergens* procedentes de hábitat diferentes del vino producían estas aminas (Tabla 1 y Tabla 2, Capítulo 5). Ello nos hace pensar que la producción de feniletilamina a partir de la fenilalanina es catalizada por la tirosina descarboxilasa.

Con la finalidad de facilitar la detección de cepas de bacterias lácticas productoras de tiramina se desarrolló un método en placa (Figura 1, Capítulo 5). Se compararon los resultados obtenidos en este medio con los obtenidos con HPLC, observándose que

coinciden al 100%. Esta correlación garantiza la precisión de un resultado cuya principal ventaja es su sencillez para ser un procedimiento aplicable en bodega.

Se analizó el contenido en tiramina y feniletilamina de diversos vinos, se aislaron las bacterias lácticas presentes en los mismos y se ensayó la capacidad de estas bacterias para producir estas dos aminas en medio sintético. Los resultados obtenidos mostraron que los vinos que presentaban mayor concentraciones de tiramina y feniletilamina eran aquellos en los que se habían aislado cepas de *Lb. brevis* y *Lb. hilgardii* productoras de tiramina y feniletilamina (Tabla 3, Capítulo 5). Además se demostró que estas cepas producían elevadas cantidades de estas dos aminas en medio sintético (Tabla 3, Capítulo 5). Estos resultados refrendan los resultados previamente obtenidos al analizar la distribución de estas dos capacidades entre las bacterias lácticas de vinos y al analizar la capacidad de *Lb. brevis* para formar tiramina tanto en medio sintético BAPM como en mosto (Tabla 4, Capítulo 2).

Determinación de los factores que intervienen en la producción de histamina.

Este objetivo queda recogido en los artículos de Landete y cols. (2005d) y Landete y cols. (2005e) que corresponden a los Capítulos 6 y 7 de la presente Tesis.

Se analizó la influencia sobre la producción de histamina de ácidos orgánicos (ácido málico, ácido láctico, ácido cítrico y ácido tartárico) y azúcares (glucosa y fructosa) presentes en el vino, de la concentración de histidina, histamina y piridoxal y de factores enológicos como etanol, SO₂, pH y temperatura. Se estudió igualmente si estos factores actuaban regulando la expresión del gen *hdc* o el nivel de actividad del enzima HDC. Las especies elegidas para realizar este estudio fueron: *Oenococcus oeni*, *Lactobacillus hilgardii* y *Pediococcus parvulus*. También se analizó si la expresión del gen *hdc* se veía influenciada por las diferentes etapas del crecimiento en *Lb. hilgardii*.

Para estudiar la influencia de los factores antes citados sobre la expresión del gen *hdc* y la actividad del enzima HDC se realizaron experimentos de actividad específica sobre extractos celulares y células enteras y de Northern blot.

Los resultados observados del análisis del efecto de los distintos metabolitos y condiciones fueron cualitativamente similares para las tres especies. Pudimos comprobar que la glucosa, fructosa, ácido málico y ácido cítrico disminuían la expresión del gen *hdc* (Figura 2, Capítulo 6), y no presentaban ningún efecto sobre la actividad del enzima HDC.

Resumen de resultados

En los experimentos donde analizamos la producción de histamina por células enteras observamos como la presencia de estos factores producía una disminución.

El ácido láctico, ácido tartárico y SO₂ no tenían efecto ni sobre la expresión del gen *hdc* ni sobre la actividad del enzima HDC. La presencia de 50 g/L de SO₂ total disminuía la producción de histamina, pues aunque no producían ningún efecto sobre la expresión del gen *hdc* ni sobre la actividad del enzima HDC, sí que producían una inhibición en el crecimiento de las células.

La presencia de histidina aumentaban la expresión del gen *hdc*, mientras que la histamina reducía dicha expresión (Figura 2, Capítulo 7), ni la histidina ni la histamina afectaban a la actividad del enzima HDC.

La presencia de etanol y piridoxal aumentaban la actividad del enzima HDC (Figura 1, Capítulo 6 y Figura 3, Capítulo 7), el efecto activador de este último se debía a que actúa como cofactor del enzima. Ni etanol ni piridoxal afectaban a la expresión del gen *hdc*. Cuando analizamos la producción de histamina en células enteras observamos que niveles de hasta 10% (v/v) aumentaban la producción de histamina (Figura 4, Capítulo 6), por encima de estos niveles las células sufrían una importante inhibición en el crecimiento que se traducía en una disminución en la producción de histamina.

Temperaturas de entre 28 y 37 °C y valores de pH entre 7.5 y 8 eran las condiciones en las que el enzima HDC mostraba su máxima actividad (Figura 1, Capítulo 6); cuando temperatura y pH se alejaban de estos valores la actividad del enzima HDC disminuía. Por tanto, estos dos factores afectaban a la actividad del enzima HDC, sin embargo no afectan a la expresión del gen *hdc*. Cuando analizamos la producción de histamina por células enteras observamos como la mayor producción de histamina se producía a los 28 °C (Figura 4, Capítulo 6). El pH óptimo para la producción de histamina estaba en torno a 5, aunque existían diferencias de comportamiento entre los diferentes géneros estudiados (Figura 4, Capítulo 6). Este pH óptimo es muy diferente del pH óptimo de los experimentos de actividad específica sobre extractos celulares (pH 8).

Al analizar la influencia de la fase de crecimiento observamos como es durante la fase de crecimiento exponencial cuando se produce su máxima expresión del gen *hdc* (Figura 1, Capítulo 7).

Discusión general

Dado el carácter nocivo para la salud y el efecto negativo sobre los aromas y sabor de la presencia de aminas biógenas en vino, es necesario disponer de métodos adecuados para el análisis de la presencia de dichas aminas en vino. El método más adecuado por su sensibilidad y el más utilizado es el HPLC (Lethonen, 1996; Mafra y cols. 1999 y Paleólogos y Kontominas, 2004). En esta tesis se ha desarrollado un método enzimático como alternativa al HPLC para la cuantificación de histamina. Esta amina es quizás la más importante en vino y la única para la que se le han puesto límites de concentración en el vino destinado a la exportación. El método enzimático no es tan sensible como el HPLC, sin embargo, presenta ciertas ventajas sobre éste: menor tiempo de análisis, procesamiento simultáneo de hasta 98 muestras, menor precio del equipo y además no requiere de personal especialmente entrenado para su uso. Estas ventajas convierten al método enzimático en un método atractivo para la determinación de histamina en bodegas y laboratorios con poca infraestructura. El método enzimático que se propone en este trabajo permite la cuantificación de histamina en vinos (blancos, rosados y tintos) y mostos, a diferencia de los métodos propuestos con anterioridad (Lerke y cols. 1983; López-Sabater y cols. 1993; Rodríguez-Jerez y cols. 1994) donde utilizaban leuco cristal violeta, el cual se oxidaba de manera inespecífica en medios naturales como vino y no permitía, por tanto, la cuantificación de histamina. Además es más sensible y permite la cuantificación de histamina en un rango de concentraciones más amplio que los anteriormente descritos, además de mejorar la sensibilidad y ampliar el margen de concentraciones detectadas dentro de la linealidad.

Además del método enzimático para la cuantificación de histamina en vino, en esta tesis presentamos una modificación del método de HPLC que nos permite detectar sin interferencias histamina, tiramina, feniletilamina, putrescina, cadaverina y triptamina, algunos aminoácidos como la lisina y la ornitina y algunas otras aminas como espermidina, espermina también. Algunos protocolos anteriormente utilizados para el análisis de aminas por HPLC (Mafra y cols. 1999, Jiménez-Moreno y cols. 2003) son capaces de detectar más aminas y más aminoácidos que el que nosotros proponemos. Sin embargo los cromatogramas que obtienen presentan solapamiento de picos en algunas de las aminas anteriormente descritas, en especial cuando están en concentraciones relativamente elevadas. Las aminas estudiadas en esta tesis son la más importantes por su frecuencia y cantidad en el mundo de la enología, por ello, el método propuesto aquí permite la detección de estas aminas sin interferencia y sin la necesidad de diluciones, permitiendo

detectar tanto cantidades muy bajas (inferiores a 0.1 mg/L) como cantidades elevadas (superiores a los 50 mg/L).

A partir de los resultados obtenidos tras el análisis de aminas en vinos por HPLC (Capítulo 2) hemos deducido que la putrescina es la amina más abundante seguida de la histamina y tiramina en orden decreciente. Estos datos concuerdan con las ya expuestos por otros autores (Soufleros y cols. 1998; Vazquez-Lasa y cols. 1998; Gloria y cols. 1998). En general, la concentración de aminas biógenas es más alta en los vinos españoles de las D.O. Tarragona, La Rioja y Utiel-Requena que en los vinos portugueses (Mafra y cols. 1999) y similar a la de Borgoña y Burdeos (Soufleros y cols. 1998). La cadaverina y triptamina siempre se presentaban en bajas concentraciones por lo que se deduce que estas aminas biógenas no tengan tanta importancia en el mundo del vino.

También pudimos comprobar la existencia de diferentes concentraciones de aminas en vinos de la misma variedad pero procedentes de diferentes D.O. Estas diferencias se pueden atribuir a las diferentes formas de elaboración en las diferentes denominaciones, por ejemplo diferentes tiempos de maceración, de contacto con lías, etc. Otros factores que podrían explicar esto serían los diferentes tipos de suelos y climas de las diferentes zonas geográficas y también los microorganismos que intervienen en el proceso de vinificación (Delfín, 1989; Lonvaud-Funel 2001; Guerrini y cols).

Al analizar vinos procedentes de uva cultivados en la misma D.O. observamos que la variedad Tempranillo es la que mostraba mayor concentración de putrescina e histamina. Estas diferencias podían atribuirse a diversos factores como la diferencia en concentración de aminoácidos y aminas biógenas en la materia prima (Broquedis y cols. 1989; Adamas, 1991) y al diferente tratamiento por parte de la bodega de las variedades de uva.

Las diferencias en la concentración de aminas biógenas encontradas entre vinos tintos, rosados y blancos parecen demostrar que el tipo de vinificación influye en el contenido de estos compuestos en el vino tal y como también indican otros autores (Vidal-Carou y cols. 1990; Herbert y cols. 2005). También se observaron que estas diferencias se reducían cuando se compararon vinos de los tintos tres tipos que habían realizado la fermentación maloláctica. Las diferencias pueden ser atribuibles a varias causas, la diferente variedad de uva utilizada para cada vino, los mayores tiempos de maceración y de contacto con lías de los vinos tintos (Lonvaud-Funel y Joyeux, 1994) y a la realización de la fermentación maloláctica. Varios autores (Aerny, 1985; Vidal-Carou y cols. 1990; Soufleros y cols. 1998) han demostrado que la concentración de histamina y tiramina aumenta durante la fermentación maloláctica. El incremento de histamina que

mostraban los vinos sometidos a almacenamiento en botella durante los primeros seis meses y su posterior disminución confirman los datos obtenidos por Jiménez-Moreno y cols. (2003).

Una vez analizado el contenido de aminas en un importante número de vinos, y establecidas las relaciones entre este contenido y diversos parámetros vitícolas y enológicos, estudiamos cuáles de los microorganismos que intervienen en el proceso de vinificación eran los responsables de su síntesis. La conclusión de este estudio fue que ni las levaduras ni las bacterias acéticas son capaces de producir las aminas biógenas que hemos estudiado a lo largo de este trabajo (histamina, tiramina, feniletilamina, putrescina, cadaverina y triptamina). Sin embargo estudios previos sí que han mostrado que algunas especies de levaduras pueden producir algunas aminas biógenas como isoamilamina, etilamina y agmatina (Torrea y Ancín, 2002; Caruso y cols. 2002). En el presente trabajo mostramos que las bacterias lácticas sí que presentan la capacidad para la producción de las aminas biógenas histamina, tiramina y feniletilamina pero no de cadaverina, triptamina o putrescina. Nosotros no hemos encontrado bacterias lácticas productoras de putrescina, sin embargo otros autores si encontraron bacterias lácticas aisladas de vino capaces de producir esta amina, aunque la frecuencia de aparición de esta carácter era muy baja (Arena y cols. 2001; Guerrini y cols. 2002; Marcobal y cols. 2004). El hecho de que los niveles de histamina, tiramina y feniletilamina en mosto sean muy bajos, la constatación de que las levaduras no las producen y la observación de que las aminas biógenas, sobretudo la histamina, aumenta tras la fermentación alcohólica, apoyan la idea de que son las bacterias lácticas las productoras de estas aminas (Castino 1975; Delfín, 1989; Le Jeune y cols. 1995; Guerrini y cols. 2002). Las especies productoras de mayores cantidades de histamina tanto en vino como en medio sintético son *Lactobacillus hilgardii* y *Pediococcus parvulus*, mientras que *Oenococcus oeni* producía baja cantidad. Ha habido mucha controversia al respecto de si *Oenococcus oeni* era una especie productora o no de histamina en vinos. Lafon-Lafourcade (1975) y Ough y cols. (1987) descartaron la posibilidad de que esta especie la produjera al no detectar aumento de histamina tras la fermentación maloláctica. Más recientemente Moreno-Arribas y cols. (2003) demuestran más directamente en su trabajo que cepas de esta especie son incapaces de producirla. Sin embargo, otros autores han demostrado lo contrario (Lonvaud-Funel y Joyeux, 1994; Le Jeune y cols., 1995; Coton y cols. 199; Guerrini y cols. 2002). En este trabajo también hemos demostrado que esta especie la produce y que generalmente hay un aumento de histamina tras la fermentación maloláctica. En la mayoría de los vinos que han llevado a

Discusión general

cabo esta fermentación la especie que se aísla es *Oenococcus oeni*, aunque también se han detectado con menor frecuencia la presencia de *Lactobacillus hilgardii* y *Pediococcus parvulus* productores de histamina. Así, en aquellos vinos en los que se aislaba *Oenococcus oeni* las concentraciones de histamina eran inferiores a las de aquellos en las que se aislaban *Lactobacillus hilgardii* y *Pediococcus parvulus*. Las especies productoras de los niveles más altos de tiramina y feniletilamina eran *Lactobacillus brevis* y *Lactobacillus hilgardii*; estos resultados coinciden con los encontrados por Arribas y cols. (2000 y 2003). Todas las cepas de *Lactobacillus brevis* eran productoras de tiramina y también producían feniletilamina aunque en menor concentración. Moreno-Arribas y cols. (2000), Bover-Cid y cols. (2001) y González del Llano y cols. (2003) ya evidenciaron que en las cepas que ellos analizaron, la producción de tiramina y feniletilamina era simultánea. Esta simultaneidad en la producción de ambas aminas hace pensar que el enzima tirosina descarboxilasa es el que interviene en la formación de ambas. Esta afirmación se apoya en el trabajo de Boeker y Snell, (1972) en el que demostraron que la tirosina descarboxilasa es capaz de descarboxilar el aminoácido fenilalanina, aunque posee una afinidad menor por este sustrato que por la tirosina. Ello explicaría también porque hay menos feniletilamina que tirosina en los vinos. Al analizar la evolución de estas dos aminas durante la vinificación vimos que ya estaban presentes en vino antes de la fermentación maloláctica, aunque tras ella aumentaban ligeramente. También pusimos de manifiesto la presencia de las especies *Lactobacillus brevis* y *Lactobacillus hilgardii* en aquellos vinos que presentaban mayores niveles de tiramina y feniletilamina.

Cuando se analizó la frecuencia de cepas productoras de histamina observamos que ésta era muy elevada en la especie *Oenococcus oeni* (80%) y baja en *Lactobacillus hilgardii* y *Pediococcus parvulus* (27 y 16% respectivamente). Sin embargo, las cepas más peligrosas desde el punto de vista enológico eran las pertenecientes a estas dos últimas especies ya que la producían en mucha mayor cantidad que las de *Oenococcus oeni*. La frecuencia de cepas productoras de tiramina y feniletilamina era del 100% en la especie *Lactobacillus brevis* mientras que solo el 25% de las cepas de *Lactobacillus hilgardii* presentaban esta capacidad. Otros autores también encontraron que todas las cepas de *Lactobacillus brevis* analizadas eran capaces de producir tiramina (Bover-Cid y Holzapfel, 1999; Moreno-Arribas y cols. 1999 y 2000). Desde el punto de vista tecnológico parece que *Lactobacillus brevis* es más peligrosa porque en general produce mayor cantidad de estas dos aminas y porque todas las cepas son capaces de producirla.

En este trabajo se han desarrollado métodos bioquímicos y moleculares que nos permitieran detectar fácilmente la capacidad de producir histamina y tiramina por las bacterias lácticas aisladas de vinos o de otros sustratos. Algunos métodos bioquímicos se basaban en medios sólidos que contenían el precursor de la amina y cuyo aspecto cambiaba en función de que la cepa inoculada fuese o no capaz de producir la amina correspondiente. Este cambio se revelaba como un cambio de color del medio H-MDAmod (desarrollado para detectar cepas productoras de histamina) debido a la presencia de un indicador de pH que viraba al alcalinizarse el medio tras la formación de la amina. La detección de las cepas productoras de tiramina se revelaba en el medio TPM por un aclaramiento bajo la zona de crecimiento de las bacterias debido a que la tirosina insoluble se transformaba en tiramina soluble (no sé si merece la pena ponerlo aquí o no). Los medios H-MDAmod y TPM presentan la ventaja respecto a otros anteriormente desarrollados (Moller, 1954; Niven y cols. 1981; Choudhury y cols. 1990; Joosten y Northold, 1989; Maijala, 1993; Bover-Cid y Holzapfel, 1999) de que son más sensibles y que no dan falsos positivos. H-MDAmod, como muchos otros métodos en placa, tiene el inconveniente de que no detecta cepas que producen bajos niveles de histamina (*Oenococcus oeni*), pero sí de las cepas realmente peligrosas (*Lactobacillus hilgardii* y *Pediococcus parvulus*). Por el contrario, el TPM era capaz de detectar todas las cepas productoras de tiramina, independientemente de la concentración producida, tal y como demostramos al comparar los resultados obtenidos en este medio y en HPLC (correlación del 100%); ello demuestra la fiabilidad del método. Debemos comentar que la cuantificación de la producción de tiramina por HPLC reveló que todas las cepas que producían tiramina lo hacían en elevadas cantidades. Las principales ventajas que ofrecen los métodos de detección en placa son la sencillez de uso, su bajo coste y la fácil interpretación de los resultados. Todo ello permite extender su uso a bodegas o a laboratorios con poco equipamiento. Aunque intentamos desarrollar métodos parecidos para detectar cepas productoras de otras aminas (putrescina, cadaverina y triptamina) no lo conseguimos debido a que aparecían muchos falsos positivos. Sin embargo, dado que hemos demostrado que las bacterias lácticas no producen estas aminas, el desarrollo de este tipo de medios para la detección de bacterias lácticas productoras de esas aminas carece de interés. Otro método bioquímico sería el método enzimático que ya hemos comentado para la determinación de histamina en vinos y mostos, este método también fue usado para la determinación de la producción de histamina por las bacterias lácticas, tanto en vinos y mostos como en medio sintético. Frente al método en placa presenta las ventajas de poder cuantificar la producción de histamina por bacterias lácticas

Discusión general

además de permitir detectar cepas productoras de bajos niveles, frente al HPLC presenta las ventajas ya comentadas anteriormente.

Los métodos moleculares desarrollados con el fin de detectar cepas productoras de histamina y tiramina se basan en el desarrollo de cebadores que reconocen exclusivamente las secuencias de los genes *hdc* y *tdcD* en las bacterias. Los cebadores diseñados para detectar el gen *hdc* presentaban la ventaja respecto a los desarrollados por Le Jeune y col. (1995) que detectaban el gen en un todas de cepas que se habían revelado como productoras de histamina mediante HPLC, no observándose falsos negativos ni falsos positivos. Encontrándonos un mayor número de cepas que presentaban el gen *hdc* que Le Jeune y cols. (1995). Los cebadores diseñados para detectar el gen *tdcD* han sido probados con un gran número de bacterias y los resultados obtenidos se han contrastado con los conseguidos por HPLC, mostrando un 100% de correlación entre presencia del gen y actividad formadora de tiramina en las cepas. Aunque Cotton y col. (2004), desarrollaron otros cebadores con el mismo fin, no han estudiado ni su aplicabilidad a distintas especies de bacterias lácticas, ni su fiabilidad, ya que no enfrentan los resultados derivados de la PCR con la cuantificación de la actividad formadora de tiramina. Además, solamente analizaron la presencia del gen en 6 cepas mientras que este trabajo fueron analizadas 151 cepas. La principal ventaja que tienen estos métodos de detección molecular es la rapidez y fiabilidad en conocer si una cepa es potencialmente productora de histidina o tiramina, ya que en sólo 3 horas podemos resolverlo. Sin embargo, hay que tener en cuenta que la detección de los genes *hdc* y *tdcD* no nos informa acerca de la mayor o menor peligrosidad de la cepa que los porta, es decir de si produce mucha o poca cantidad de histidina y tiramina. Para conseguir esta información debemos recurrir a métodos que nos permitan la cuantificación de la amina como HPLC o el método enzimático descrito previamente en este trabajo. Aunque dados los resultado presentados en este trabajo, si detectáramos la presencia de los genes *hdc* y/o *tdcD* en cepas de *Lactobacillus hilgardii*, *Lactobacillus brevis* o *Pediococcus parvulus* podríamos presuponer que se trata de cepas peligrosas, caso contrario al de *Oenococcus oeni* portadores del gen *hdc*.

Al estudiar la regulación de la producción de histamina por *Oenococcus oeni*, *Lactobacillus hilgardii* y *Pediococcus parvulus*, además de confirmar la mayor producción de histamina por *Lactobacillus* y *Pediococcus* que por *Oenococcus*, ya observada en el Capítulo 2, pudimos comprobar como la producción de histamina era mayor cuando se daban las condiciones más desfavorables, es decir cuando los niveles de glucosa, fructosa, ácido málico y ácido cítrico eran más bajos. Estos niveles se dan durante la fermentación

maloláctica; esto explicaría porque es precisamente durante esta fase de la elaboración del vino cuando aparece la histamina. Soufleros y cols. (1998) ya apuntaron que el incremento de histamina estaba relacionado con una disminución de ácido málico y ácido cítrico, fenómeno que ocurre durante la fermentación maloláctica. Recordemos que la descarboxilación de aminoácidos por bacterias lácticas tiene como objetivo la obtención de energía y la regulación del pH interno (Molennar y cols. 1993), esto explica porque cuando las bacterias lácticas no disponen de medios de obtener energía es cuando descarboxilan los aminoácidos. Otros autores muestran resultados que están de acuerdo con los nuestros, así Lonvaud-Funel y Joyeux (1994) observaron que *Oenococcus oeni* producía mayores cantidades de histamina en los medios nutricionalmente más pobres (sin glucosa, ni ácido málico) y Rollan y cols. (1995) también observaron que el ácido cítrico disminuía la producción de histamina. La presencia de ácido láctico y ácido tartárico, que normalmente no son utilizados como fuente de energía por las bacterias lácticas, no influyen en la producción de histamina según los resultados mostrados en este trabajo; sin embargo Rollan y cols. (1995) observaron que el ácido láctico disminuía la producción de histamina. Farías y cols. (1993) observaron que el ácido málico y ácido cítrico aumentaban la actividad del enzima HDC mientras que nosotros no encontramos ningún efecto de estos factores sobre el enzima. Todos los estudios acerca de la influencia de factores enológicos sobre la producción de histamina desarrollados con anterioridad se basaban en estudios sobre células enteras o extractos celulares; en este trabajo y con el objetivo de determinar a qué nivel influían los distintos factores se realizaron experimentos de expresión génica. Así, pudimos comprobar en los experimentos de Northern blot y actividad específica cómo la glucosa, fructosa, ácido málico y ácido cítrico disminuían la expresión del RNAm de la histidina descarboxilasa, demostrándonos que estos factores actúan a nivel génico.

Era de esperar que el pH tuviera influencia sobre la producción de histamina. En el capítulo 2 observamos cómo a mayores pHs las concentraciones de histamina eran también más altas. Los pHs más altos del vino favorecen una mayor proliferación de bacterias lácticas (Wibowo y cols. 1985), en especial de *Lactobacillus* y *Pediococcus*. Los pHs más altos favorecen también una mayor diversidad de especies. En este trabajo se ha comprobado que el pH no actúa sobre la expresión génica, pero sí sobre la actividad enzimática. En este trabajo se ha demostrado que la máxima actividad del enzima se da a pH 8, sin embargo, Farías y cols. (1993) y Coton y cols. (1998), encontraron que la máxima actividad ocurría a pH 4 y 4.8 respectivamente. Observamos como, en *Lactobacillus hilgardii* y *Pediococcus parvulus*, a pH 4 la producción de histamina era el

Discusión general

doble que a pH 3, esto no ocurría en *Oenococcus oeni*, cuya diferencia entre pH 3 y 4 era pequeña, pudiendo comprobar cómo a pHs del vino el porcentaje de producción de histamina era diferentes en las tres especies, siendo *Oenococcus oeni* el que presentaba una mayor porcentaje en estos pHs, aunque los valores de concentración de histamina total producidos por *Oenococcus oeni* fueran menores. Podemos concluir que el pH afecta al crecimiento microbiano y a la actividad del enzima, pero no a la expresión del gen. Luego, una forma de reducir la producción de histamina en vino, dado los diversos factores presentados aquí, sería la de reducir el pH de los mismos, aunque esto influiría en la calidad del vino.

La temperatura también afectaría a la producción de histamina. Farías y cols. (1993) encontraron que la temperatura de máxima actividad del enzima HDC era a 37°C similar a lo que nosotros encontramos, que estaba entre 28 y 37°C. Las temperaturas elevadas favorecen la proliferación microbiana, la diversidad y aumentan la actividad del enzima histidina descarboxilasa, luego el mantenimiento del vino por debajo de 15°C prevendría la producción de histamina. Esto es algo que sí que se puede hacer, incluso es recomendada la conservación de los vinos a esas temperaturas.

La adición de sulfuroso al vino elimina parte o toda la población microbiana, pero no tiene influencia para la producción de histamina por parte de las bacterias lácticas, ni a nivel génico ni a nivel enzimático. Así, Vidal-Carou y cols. (1990) observaron que los vinos en los que había una mayor producción de histamina y tiramina eran vinos con baja concentración de sulfuroso, en los que existía una elevada población microbiana. Luego, la eliminación de las bacterias lácticas por adición de sulfuroso y posterior inoculación de bacterias malolácticas carentes de los genes de la histidina descarboxilasa y de la tirosina descarboxilasa facilitaría la obtención de vinos sin o con escasas concentraciones de histamina o de tiramina.

El etanol presente en el vino también influye en la concentración de histamina de forma diferente. Cuando las concentraciones superan el 10% se observa una disminución en la población microbiana y por tanto en los niveles de histamina. Sin embargo cuando los niveles de etanol son iguales o inferiores al 10%, nosotros observamos que la producción de histamina aumentaba con la concentración alcohólica. Parece ser que la actividad del enzima se favorece por la presencia de etanol. Sin embargo, Farías y cols. (1993) encontraron que el etanol inhibía la actividad del enzima y Rollan y cols. (1995) no observaron que la actividad del HDC quedase afectada por el etanol. A diferencia de estos

autores nosotros sí observamos cómo la presencia de etanol aumentaba la actividad del enzima HDC en medio sintético pero no la expresión del gen *hdc*.

Al analizar la influencia de sustrato y producto de la histidina descarboxilasa sobre la producción de histamina, observamos cómo la histidina descarboxilasa es expresada, aunque de diferente forma tanto en presencia como en ausencia de histidina. Sin histidina en el medio, la expresión del gen *hdc* es muy baja, sin embargo, cuando existe histidina en el medio, la expresión del gen *hdc* aumenta de forma considerable. Lonvaud-Funel y Joyeux (1994) observaron como una mayor cantidad de histidina fruto de la lisis de levaduras aumentaba la producción de histamina. Por ello, todos los procesos que aporten histidina al vino, como maceraciones prolongadas y contacto con lías, favorecen el incremento de histamina en el vino. La histamina, por el contrario, ejerce un efecto inhibitorio sobre la producción de histamina. Así, Rollan y cols. (1995) encontraron que la histamina era un inhibidor competitivo de la HDC, nosotros no encontramos efecto negativo sobre el propio enzima HDC; pero sí sobre la expresión del gen *hdc*.

El análisis del efecto de glucosa, fructosa, ácido málico, ácido cítrico, ácido láctico, ácido tartárico, piridoxal, sulfuroso, pH, temperatura, histidina e histamina, reveló que *Oenococcus*, *Pediococcus* y *Lactobacillus* tenían un mismo comportamiento, demostrando que los mecanismo reguladores son similares en los tres géneros. La única diferencia fue la respuesta fisiológica de *Oenococcus* ante el pH, ya que mantiene un porcentaje de actividad específica elevado a niveles bajos de pH, mientras que a esos pHs, el porcentaje de actividad específica decrece de forma considerable en *Lactobacillus* y *Pediococcus*.

Como observamos, la expresión del gen *hdc* y la actividad del enzima HDC está influenciada por las características del medio en el que viven las bacterias lácticas. Para tratar de disminuir la presencia de histamina podemos promover condiciones que reduzcan sus bajos niveles de precursores, pH bajos, concentraciones de SO₂ superiores a 50 mg/L luego, fermentación maloláctica con cepas seleccionadas de *Oenococcus oeni*, que no porten el gen *hdc*; esto parece en ocasiones difícil pues como hemos visto a lo largo de la tesis la mayor parte de los *Oenococcus* tienen este gen, incluso en cepas de *Oenococcus* comerciales hemos encontrado el gen. Las cepas de *Oenococcus* producen bajos niveles de histamina pero recordemos que en determinadas condiciones la expresión del gen puede aumentar incrementando los niveles de histamina.

El interés en estas sustancias no decrece con los años. En la bibliografía especializada no dejan de aumentar las referencias sobre aminas biógenas en vinos de distinta procedencias. Todo es indicio de la atención que merecen.

Discusión general

En el futuro el estudio de las aminas biógenas se centrará en el desarrollo de métodos más rápidos y económicos de detección de aminas en vino, utilizables por las bodegas. El único método del que se dispone actualmente para cuantificar histamina es el enzimático ya que el HPLC plantea problemas por su alto coste y la necesidad de personal especializado. También el futuro se centrará en la mejora de las condiciones higiénicas y en el control microbiológico de los microorganismos del vino, y en el desarrollo de métodos moleculares de detección de bacterias productoras de aminas. Ahora disponemos de cebadores para la detección de los genes responsables de la producción de histamina y tiramina mediante PCR, otros podrían desarrollarse para detectar las especies responsables de la formación del resto de aminas, igualmente se podrían desarrollar sondas de esos genes que permitan detectar microorganismos que llevan esos genes por hibridación directamente sobre vino. Por último, el estudio de la regulación génica y enzimática de las distintas aminas nos daría mucha información acerca de cómo disminuir los niveles de aminas en vino.

A nivel tecnológico recomendamos controlar la población de bacterias lácticas mediante medidas higiénicas adecuadas, adición de SO₂ e inoculación con cultivos seleccionados, pueden también filtrarse los vinos acabados. Controlar la temperatura y el pH pueden evidentemente ser de gran ayuda. Hay toda una serie de cuestiones que finalmente el enólogo deberá evaluar, según el tipo de vino y las posibilidades del mismo, como tiempo y condiciones de maceración, adición de enzimas, crianza sobre lías, autólisis de levaduras, etc. Estos últimos aspectos inciden evidentemente en la cantidad de aminoácidos libres en el vino, (y por tanto susceptibles de convertirse en aminas biógenas), pero también muy directamente en la calidad y características del producto final, y son necesarias en muchas ocasiones.

Conclusiones

1. Un método enzimático como alternativa al HPLC para la detección de histamina ha sido presentado en este trabajo. Este método presenta muy buena sensibilidad, permite detectar un amplio margen de concentraciones, puede ser aplicable a mostos y vinos, es un método barato, no necesita de personal especializado y además permite obtener muchos resultados en un periodo breve de tiempo. Además, el método de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) propuesto en esta tesis, permite detectar simultáneamente las aminas biógenas más importantes del vino con una gran sensibilidad y resolución.

2. Las aminas más abundantes encontradas en los vinos analizados son putrescina, histamina, tiramina y feniletilamina por orden decreciente. El origen geográfico influye en la concentración de aminas observándose que en La Rioja y Tarragona los vinos mostraban mayores concentraciones de putrescina e histamina que los de Utiel-Requena. Los vinos procedentes de diferentes variedades de uva también presentan diferencias en su contenido en aminas; siendo los procedentes de la variedad Tempranillo y Bobal los que presentan mayores concentraciones de histamina y Tempranillo y Garnacha los que presentan mayores concentraciones de putrescina. El tipo de vinificación también influye, siendo los vinos tintos los que presentan una mayor concentración de histamina, tiramina y feniletilamina. Las causas de las diferencias en aminas biógenas entre vinos, según los resultados obtenidos en esta Tesis, se pueden atribuir a las diferentes prácticas enológicas, a la realización o no de la fermentación maloláctica, al pH del vino y a los microorganismos presentes en el mismo.

3. Se han descrito dos métodos en placa para la detección de cepas productoras de histamina y tiramina, el primero (H-MDAmód) permite la detección de bacterias productoras de niveles peligrosos de histamina. El segundo (TPM) permite detectar cualquier cepa productora de tiramina.

4. Hemos desarrollado parejas de cebadores que nos permiten la detección específica de los genes *hdc* y *tdc* en un gran número de bacterias lácticas. Han demostrado ser muy fiables ya que hay un 100 % de correlación entre presencia de estos genes y producción de histidina y tiramina. La presencia del gen *hdc* no garantiza que la cepa sea peligrosa desde el punto de vista enológico.

Conclusiones

6. El operón de la tirosina descarboxilasa contiene 4 genes completos que codificaban para una tirosin-RNA_t sintetasa, para la tirosina descarboxilasa, para una probable tirosina permeasa y para un antiporter Na⁺/H⁺.

7. Las especies de bacterias lácticas de origen enológico ensayadas en este trabajo producen histamina, tiramina y feniletilamina pero no putrescina, cadaverina o triptamina.

8. Casi el 80% de las cepas de *Oenococcus oeni* son capaces de producir histamina aunque normalmente la producen a bajos niveles. Por el contrario, solo el 27% de las cepas de *Lactobacillus hilgardii* y el 16% de las cepas de *Pediococcus parvulus* exhiben esta capacidad y producen todas ellas elevados niveles de histamina en vino y medio sintético. Estas dos especies son las responsables de las concentraciones de histamina en vino superiores a 10 mg/L.

9. Todas las cepas de *Lactobacillus brevis* y el 25% de las de *Lactobacillus hilgardii* ensayadas producían tiramina y feniletilamina, el resto de especies asociadas a la vinificación no las producen, por lo que consideramos a estas dos especies las responsables de la formación de tiramina y feniletilamina en vino. Las cepas que producen, tiramina también producen feniletilamina de forma simultánea, aunque en cantidades inferiores. Hay informaciones previas que apuntan que la tirosina descarboxilasa es capaz de descarboxilar la fenilalanina aunque con menor afinidad que la tirosina.

10. La glucosa, fructosa, ácido málico, ácido cítrico y la histamina inhiben la expresión del gen histidina descarboxilasa, mientras que la histidina y el crecimiento exponencial aumentan dicha expresión. Este comportamiento es cualitativamente similar en *Lactobacillus hilgardii*, *Pediococcus parvulus* y *Oenococcus oeni*. El etanol y piridoxal 5'fosfato incrementan la actividad de la histidina descarboxilasa. La temperatura y pH óptimos son de 28 °C y de pH 5 respectivamente.

Bibliografía

Abe, K., Hayashi, H. y Maloney, P.C. 1996. Exchange of aspartate and alanine. *J. Biol. Chem.* 271, 3079-3084.

Abe, K., Ohnishi, F., Yagi, K., Nakajima, T., Higuchi, T., Sano, M., Machida, M., Sarder, R.I. y Maloney, P.C. 2002. Plasmid-encoded *asp* confers a proton motive metabolic cycle catalyzed by and aspartate-alanine exchange reaction. *J. Bacteriol.* 184, 2906-2913.

Adams, D.O. Accumulation of putrescine in grapevine leaves showing symptoms of potassium deficiency or spring fever. In *Proceedings of the International Symposium on Nitrogen in Grapes and Wine*; Rantz, J., Ed.: American Society for Enology and Viticulture: Davis, CA, 1991; pp 126-131.

Aerny, J. 1985. Origine de l'histamine des vins. Connaissances actuelles. *Bull. O.I.V.* 656-657, 1016-1019.

Amerine, M.A. y Kunkee, R.E. 1968. Microbiology of winemaking. *Am. Rev. Microbiol.* 22, 323-357.

Arena, M.E. y Manca de Nadra M.C. 2001. Biogenic amine production by *Lactobacillus*. *J. Appl. Microbiol.* 90, 158-162.

Arthurs, C.E. y Lloyd, D. 1999. Kinetics, stereospecificity, and expression of the malolactic enzyme. *Appl. Environ. Microbiol.* 3360-3363.

Baucom, T.L., Tabacchi, M.H., Cottrell, T.H.E. y Richmond, B.S. 1996. Biogenic amine content of New York state wines. *J. Food. Sci.* 51, 1376-1377.

Bauza, T., Blaisse, A., Teissedre, P.L., Cabanis, J. C., Kanny, G. y Moneret-Vautrin, D.A. 1995. Les amines biogenes du vin, métabolisme et toxicité. *Bull. O.I.V.* 767-768, 42-67.

Biodyn AG/SA. A little thought can save your stomach no end of trouble (2nd ed)..
Byodyn AG/AS

Bibliografía

Bitonti, A.J., Kelly, S.E. y McCann, P.P. 1984. Regulation of growth and macromolecular synthesis by putrescine and spermidine in *Pseudomonas aeruginosa*. Life Sci. 34, 1513-1520.

Blasco, L. Pardo, I. y Ferrer, S. 2003. Development of specific fluorescent oligonucleotide probes for *in situ* identification of wine lactic acid bacteria. FEMS Microbiol. Lett. 225, 115-123.

Boeker, E.A. y Snell, E.E. 1972. Amino Acid Decarboxylases in *The Enzymes*. 3rd Ed., (Boyer, P.D., ed.) Vol VI pp. 217, Academic Press, NY.

Borowsky, B., Adham, N., Jones, K.A., Raddatz, R., Artymyshyn, R., Ogozalek, K.L., Durkin, M.M., Lakhani, P.P., Bonini, J.A. y Pathirana, S. 2001. Trace amines: identification of a family of mammalian G protein-coupled receptors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98, 8966-8971.

Borrensen, T., Klausen, N.K., Larsen, L.M. y Sorensen H. 1989. Purification and characterization of tyrosine decarboxylase and aromatic L-amino acid decarboxylase. Biochem. Biophys. Acta. 993, 108-115.

Bover-Cid, S. y Holzapfel, W.H. 1999. Improved screening procedure for biogenic amine production by lactic acid bacteria. Int. J. Food. Microbiol. 53, 33-41.

Bover-Cid, S., Hugas, M., Izquierdo-Pulido, M. y Vidal-Carou, M.C. 2001. Amino acid-decarboxylase activity of bacteria isolated from fermented pork sausages. Int. J. Food. Microbiol. 66, 185-189.

Britz, T. J. y Tracey, R. P. 1990. The combination effect of pH, SO₂, ethanol and temperature on the growth of *Leuconostoc oenos*. J. Appl. Bacteriol. 68, 23-31.

Broquedis, M., Dumery, B. y Boucard, J. 1989. Mise en Évidence de polyamines (putrescine, cadaverine, nor-spermidine, spermidine, spermin) dans les feuilles et les grappes de *Vitis vinifera* L. Connaiss. Vigne Vin. 23, 1-6.

- Busto, O., Gusach, J. y Borrull, F. 1996. Biogenic amines in wine: a review of analytical methods. *J. Int. Vinge Vin.* 30, 85-101.
- Buteau, C., Duitschaever, C. L. y Ashton, G. C. 1984. High-performance liquid chromatographic detection and quantitation of amines in must and wine. *J. Chromatogr.* 284, 201-210.
- Cabanis, J. C. 1985. L'histamine et sa toxicité. *Bull. O.I.V.* 656, 1010-1015.
- Cabanis, J.C., Cabanis, M.T., Cheynier, V. y Teissendré, P.L. Tablas de composición. En "Enología: fundamentos científicos y tecnológicos». En: C. Flanzky (ed.): 218-231, AMV Ediciones y Mundi Pressa. Madrid, 2000.
- Calero, F. 1993. La fermentación maloláctica en la zona vitivinícola "Montilla-Moriles". Fisiología de las bacterias implicadas en la inducción de dicha fermentación a nivel industrial. Tesis Doctoral. Universidad de Córdoba.
- Caspritz, G. y Radler, F. 1983. Malolactic enzyme of *Lactobacillus plantarum*. *J. Biol. Chem.* 258, 4907-4010.
- Castino, M. 1975. Formation of histamine in wines as a consequence of malolactic fermentation. *Atti Acad Itali. della Vit. Vino Siena* 27, 173-188.
- Caruso, M., Fiore, C., Contursi, M., Salzano, G., Paparella, A. y Romano, P.:2002 Formation of biogenic amines as criteria for the selection of wine yeasts. *World J Microbiol Biotechnol.* 18, 159-163.
- Chalfan, Y., Goldberg, L. y Mateles, R.J. 1977. Isolation and characterization of malolactic bacteria from Israeli red wines. *J. Food. Sci.* 42, 939-943.
- Chang, G.W. y Snell, E.E. 1968. Histidine decarboxylase of *Lactobacillus* 30a. 3. Composition and subunit structure. *Biochem.* 7, 2012-2020.

Bibliografía

Choudhury, N., Hansen, W., Engesser, D., Hammest, W.P. y Holzappel, W.H. 1990. Formation of histamine and tyramine by lactic acid bacteria in decarboxylase assay medium. *Lett. Appl. Microbiol* 11, 278-281.

Cilliers, J.D. y van Wyk, C.J. 1985. Histamine and tyramine content of South African wine. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 6, 35-40.

Chu, C. H. y Bejdanes, L.F. 1981. Effect of diamines, polyamines and tuna fish extracts on the binding of histamine to mucin in vitro. *J. Food Sci.* 47, 79-88.

Collier, H. O., McDonald-Gibson, W. J. y Saeed, S. A. 1976. Stimulation of prostaglandin biosynthesis by drugs: effects in vitro of some drugs affecting gut function. *British J. Pharmacol.* 58:193-9.

Connil, N., Le Breton, Y., Dousset, X., Auffray, Y., Rincé, A. y Prevost, H. 2002. Identification of the *Enterococcus faecalis* tyrosine decarboxylase operon involved in tyramine production. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 3537-3544.

Costello, M.D., Morrison, G.J., Lee, T.H. y Flee G.H. 1983. Numbers and species of lactic acid bacteria in wines during vinification. *Food Technol. Aust.* 35, 14-18.

Coton, E., Rollan, G., Bertrand, A. y Lonvaud-Funel, A. 1998. Histamine-producing lactic acid bacteria in wines: early detection, frequency and distribution. *Am. J. Enol. Vitic.* 49, 199-204.

Coton, E., Rollan, G. C. y Lonvaud-Funel., A. 1998. Histidine decarboxylase of *Leuconostoc oenos* 9204: purification, kinetic properties, cloning and nucleotide sequence of the *hdc* gene. *J. Appl. Microbiol.* 84, 143-151.

Coton, M., Coton, E., Lucas, P. y Lonvaud, A. 2004. Identification of the gene encoding a putative tyrosine dacarboxylase of *Carnobacterium divergens* 508. Development of molecular tools for the detection of tyramine-producing bacteria. *Food Microbiol.* 21, 125-130.

Cunin, R., Glansdorff, N., Piérard, A. y Stalon, V. 1986. Biosynthesis and metabolism of arginine in bacteria. *Microbiol. Rev.* 50, 314-352.

Dapkevicius Enes, M.L.N., Nhout, M.J.R., Rombouts, F.M., Huuben, J.H. y Wymenga, W. 2000. Biogenic amine formation and degradation by potential fish silage starter microorganisms. *Int. J. Food. Microbiol.* 57, 107-114.

Davis, C.R., Wibowo, D., Lee, T.H. y Fleet, G.H. 1986. Growth and metabolism of lactic acid bacteria during and after malolactic fermentation: a review. *Am. J. Enol. Vitic.* 36, 290-301.

Davis, C.R., Wibowo, D., Lee, T.H. y Fleet, G.H. 1986. Growth and metabolism of lactic acid bacteria during fermentation and conservation of wines at different pH. *Appl. Environ. Microbiol.* 51, 539-545.

De Man, J.C., Rogosa, M. y Sharpe, M.E. 1960. A medium for the cultivation of *Lactobacilli*. *J. Appl. Bacteriol.* 23, 130-135.

Delfini, C. 1989. Ability of wine malolactic bacteria to produce histamine. *Science des Aliments.* 9, 413-416.

Edwards, R.A., Dainty, R.H., Hibbard, C.M. y Ramantanis, S.V. 1987. Amines in fresh beef of normal pH and the role of bacteria in changes in concentration observed during storage in vacuum packs at chill temperatures. *J. Appl. Bacteriol.* 63, 427-434.

Edwards, C.G. y Beelman, R.B. 1989. Inducing malolactic fermentation in wines. *Biotechnol. Advances.* 7, 333-60.

Edwards, C.G., Collins, M.D., Lawson, P.A. y Rodriguez, A.V. 2000. *Lactobacillus nageli* sp. nov., an organism isolated from a partially fermented wine. *Int. J. Sys. Evol. Microbiol.* 50, 699-702.

Bibliografía

Edwards, C.G., Haag, K.M., Collins, M.D., Hutson, R.A. y Huang, Y.C. 1998. *Lactobacillus kunkeei* sp. nov.: a spoilage organism associated with grape juice fermentation. *J. Appl. Microbiol.* 84, 698-702.

Edwards, R.A., Dainty, R.H., Hibbard, C.M. y Ramantanis, S.V. 1987. Amines in fresh beef of normal pH and the role of bacteria in changes in concentration observed during storage in vacuum packs at chill temperatures. *J. Appl. Bacteriol.* 63, 427-434.

FDA. Fish and Fisheries Products Hazard and Control Guide. *In Food and Drug Administration*; 1ª, Ed.: Office of Seafood, Washington, DC, 1996; pp 69.

Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution.* 39, 783-791.

Feuillat, M. 1974. Contribution a l'étude des composés azotés dans les moûts de raisin et dans les vins. Thèse de Doctorat és Sciences. Université de Dijon.

Flanzy, C. y Poux, C. 1965. Note sur le teneur en acides aminés du moût de raisin et du vin en fonction des conditions de l'année. *Ann. Technol. Agric.* 14, 87-91.

Fornachon, J.C.M. 1957. The occurrence of malo-lactic fermentation in Australia wines. *Aust. J. Appl. Sci.* 8, 120-129.

Forsythe, W. L. y Redmond, A. 1974. Two controlled trials of tyramine in children with migraine. *Dev. Med. Child. Neurol.* 16, 794-799.

French, T.A., Masserano, J.M. y Weiner, N. 1985. Ethanol-Induce changes in tyrosine hydrolase activity in adrenal glands of mice selectively bred for differences in sensitivity to ethanol. *Pharmacol. Experim. Therape.* 232, 315-321.

Gerbaux, V. y Monamy, C. 2000. Biogenic amines in Burgundy wines. Contents and origin in wines. *Rev. Fr. Oenol.* 183, 25-28.

Guerrini, S., Mangani, S., Granchi, L. y Vincenzini, M. 2002. Biogenic amine production by *Oenococcus oeni*. *Current Microbiol.* 44, 374-378.

Glória, M.B.A., Watson, B.T., Simon-Sarkadi, L. y Daeschel, M.A. 1998. A Survey of biogenic amines in Oregon Pinot noir and Cabernet Sauvignon wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 49, 279-232.

Gonzales de Llano, D., Cuesta, P. y Rodríguez, A. 1998. Biogenic amine production by wild lactococcal and leuconostoc strains. *Lett. Appl. Microbiol.* 26, 270-274.

Guraya, H. S. y Koehler, P. E. 1991. Histamine in cats foods: survey and comparison of methodologies. *Vet. Hum. Toxicol.* 33, 124-128.

Halász, A., Baráth, A., Simon-Sarkadi, L. y Holzapfel, W. H. 1994. Biogenic amines and their production by microorganisms in food. *Trends Food Sci. Technol.* 5, 42-49.

Hirata, N., Takeuchi, K., Ukai, K., y Sakakura, Y. 1999. Expression of histidine decarboxylase messenger RNA and histamine N-methyltransferase messenger RNA in nasal allergy. *Clin. Exp. Allergy.* 29, 76-83.

Henick-Kling, T. Malolactic fermentation. En "Wine, Microbiology and Technology". En Graham H. Fleet. (ed.): 289-326, Harwood Academia Publishers GMBH, Poststrasse 22, 7000 Chur, Switzerland. 1993.

Herbert, P., Cabrita, M.J., Ratola, N., Laureano, O. y Alves, A. 2005. Free amino acids and biogenic amines in wines and must from the Alentejo region. Evolution of amines during alcoholic fermentation and relationship with variety, sub-region and vintage. *J. Food Engin.* 66, 315-322.

Huynh, Q.K. y Snell, E.E. 1985. Pyrovoyl-dependent histidine decarboxylase. Preparation and amino acid sequences of the β chains of histidine decarboxylase from *Clostridium perfringens* and *Lactobacillus buchneri*. *J.Biol. Chem.* 260, 2798-2803.

Bibliografía

Innocente, N. y D'Agostin. P. 2002. Formation of biogenic amines in a typical semihard Italian cheese. *J. Food. Protect.* 65, 1498-1501..

Jiménez Moreno, N., Torrea Goñi, D. y Ancin A.C. 2003. Changes in amine concentrations during aging of red wine in oak barrels. *J. Agric. Food Chem.* 51, 5732-5737.

Joosten, H.M.L.J. y Northolt, M.D. 1989. Detection, growth, and and amine capacity of lactobacilli in cheese. *Appl. Environ. Bacteriol.* 55, 2356-2359.

Konings, W. N., Lolkema, J.S. y B. Poolman, B. 1995. The generation of metabolic energy by solute transport. *Arch. Microbiol.* 164, 235-242.

Konings, W.N., Lolkema, J.S., Bolbuis, H., van Veen, H.W., Poolman, B. y Driessen, A.J.M. 1997. The role of transport processes in survival of lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 71, 117-128.

Kruger, L. C., Pickerell, A. T. W. y Azcell, B. 1992. The sensitivity of different brewing yeast strains to dioxide inhibition: Fermentation and production of flavour-active volatile compounds. *J. Inst. Brew.* 98, 133-138.

Kutlán, D. y Molnár-Perl, I. 2003. New aspects of simultaneously análisis of amino acids and amiines as their o-phthadialdehyde derivates by high-performance liquid chromatography. *Analysis of wine, beer and vinegar. J. Chromatogr. A.* 987, 311-322.

Landete, J.M., Ferrer, S. y Pardo, I. 2004. Improved enzymatic method for the rapid determination of histamine in wine. *Food Add. Contam.* 21, 1149-1154.

Landete, J. M. Ferrer, S. Polo, L y. Pardo, I. 2003. Análisis de la presencia en vino de tiramina y de bacterias lácticas con actividad tirosina descarboxilasa. *Tecnol. vino. Nov/Dic.* 115-118.

Landete, J.M., Ferrer, S., Polo, L. y Pardo, I. 2005a. Biogenic amines in wines from three Spanish regions. *J. Agri. Food. Chem.* 53, 1119-1124.

Landete, J.M., Ferrer, S. y Pardo, I. 2005b. Which are the lactic acid bacteria responsible for histamine production in wine?. *J. Appl. Microbiol.* (aceptado).

Landete, J.M., Pardo, I. y Ferrer, S. 2005c. Tyramine and phenylethylamine synthesis among lactic acid bacteria isolated from wine. *Int. J. Food. Microbiol.* (enviado).

Landete, J.M., Pardo, I. y Ferrer, S. 2005d. Regulation of *hdc* expression and HDC activity by enological factors in lactic acid bacteria. *J. Appl. Microbiol.* (enviado).

Lafon-Lafourcade, S. 1975. L'histamine des vins. *Connaiss. Vigne Vin.* 22,11-24.

Lafon-Lafourcade, S. 1983. Wine and Brandy. In "Biotechnology" Vol 5. H.-J. Rhem and G. Reed (eds). pp. 81-163. Verlag Chemie. Basel.

Le Jeune, C., Lonvaud-Funel, A., Ten Brink., Hofstra, H. y van der Vossen. J.M.B.M.1995. Development of a detection system for histidine decarboxylating lactic acid bacteria on DNA probes, PCR and activity test. *J. Appl. Bacteriol.* 78, 316-326.

Les autorités fédérales de la Confédération suisse. Ordonnance sur les substrates étrangères et les composants dans les denrées alimentaires (OSEC). Le Département federal de l'interieur. Annexe (art 2, al. 6). 2002; pp 1068.

Lehtonen, P. 1996. Determination of amines and amino acid in wine - A review. *Am. J. Enol. Vitic.* 47, 127-133.

Lerke, P. A., Porcuna, M. N. y Chin, H. B. 1983. Screening test for histamine in fish. *J. Food Sci.* 48, 155-157.

Bibliografía

Liu, S.-O., Pritchard, G.G., Hardman, M.J. y Pilone, G.J. 1995. Occurrence of Arginine Deiminase Pathway Enzymes in Arginine Catabolism by Wine Lactic Acid Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 310-316.

Liu, S.-Q., Pritchard, G.G., Hardman, M.J. y Pilone, G.J. 1996. Arginine catabolism in wine lactic acid bacteria: is it via the arginine deiminase pathway or the arginase-urease pathway? *J. Appl. Bacteriol.* 81, 486-492.

Livingstone, C.D. y Barton, G.J. 1993. Protein sequence alignments: a strategy for the hierarchical analysis of residue conservation. *Comput. Appl. Biosci.* 9, 745-756.

Llaubères, R.-M., Richard, B., Lonvaud, A. y Dubourdieu, D. 1990. Structure of an exocellular b-D-glucan from *Pediococcus sp.*, a wine lactic acid bacteria. *Carbohydrate Research.* 203, 103–107.

Lolkema, J.S. y Slotboom, D.J. 2003. Classification of 29 families of secondary transport proteins into a single structural class using hydropathy profile analysis. *J. Mol. Biol.* 327, 901-909.

Lonvaud-Funel, A. 2001. Biogenic amines in wines: role of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 199, 9-13.

Lonvaud-Funel, A., Guilloux, Y. y Joyeux, A. 1993. Isolation of a DNA probe for identification of glucan-producing *Pediococcus damnosus* in wines. *J. Appl. Bacteriol.* 74, 41–47.

Lonvaud-Funel, A. y Joyeux A. 1994. Histamine production by wine lactic acid bacteria: Isolation of a histamine producing strain of *Leuconostoc oenos*. *J. Appl. Bacteriol.* 77, 401-407.

López-Sabater, E. I., Rodríguez-Jerez, J. J., Roig-Sagués, A. X. y Mora-Ventura, M. T. 1993. Determination of histamine in fish using an enzymatic method. *Food Add. Contam.* 10, 155-157.

- López-Sabater, E. I., Rodríguez-Jerez, J. J., Hernández-Herrero, M. y Mora-Ventura, M. T. 1994. Evaluation of histidine decarboxylase activity of bacteria isolated from sardine (*Sardine pilchardus*) by an enzymic method. *Lett. Appl. Microbiol.* 19, 70-75.
- Lucas, P. y Lonvaud-Funel, A. 2002. Purification and partial gene sequence of the tyrosine decarboxylase of *Lactobacillus brevis* IOEB 9809. *FEMS Microbiol. Lett.* 211, 85-89.
- Lucas, P., Landete, J., Coton, M., Coton, E. y Lonvaud-Funel, A. 2003. The tyrosine decarboxylase operon of *Lactobacillus brevis* IOEB 9809: characterization and conservation in tyramine-producing bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 229, 57-65.
- Mafra, I., Herbert, P., Santos, L., Barros, P. y Alves, A. 1999. Evaluation of biogenic amines in some portugueses quality wines by HPLC fluorescence detection of OPA derivatives. *Am. J. Enol. Vitic.* 50, 128-132.
- Maloney, P.C., Anantharam. V. y Allison, M.J. 1992. Measurement of the substrate dissociation constant of a solubilized membrane carrier. Substrate stabilization of OxIT, the anion exchange protein of *Oxalobacter formigenes*. *J Biol Chem.* 267, 10531-6.
- Maijala, R. L. 1993. Formation of histamine and tyramine by some lactic acid bacteria in MRS-broth and modified decarboxylation agar. *Lett. Appl. Microbiol.* 17, 40-43.
- Manca de Nadra, M.C., Pesce de Ruiz Holgado, A. y Oliver, G. 1982. Arginine dihydrolase activity in lactic acid bacteria. *Milchwissenschaft* 37, 669-670
- Marcobal, A., de las Rivas B., Moreno-Arribas, M.V. y Muñoz, R. Identification of the ornithine decarboxylase gene in the putrescine-producer *Oenococcus oeni* BIFI-83. *FEMS Microbiol. Lett.* 239, 213-20.
- Maret, R. y Sozzi, T. 1977. Flore malolactic de moûts et de vins du Canton du Valais (Suisse). I. Lactobacilles et pédiocoques. *Ann. Technol. Agric.* 27, 255-273.

Bibliografía

Maret, R. y Sozzi, T. 1979. Flore malolactic de moûts et de vins du Canton du Valais (Suisse). II. Évolution des populations des lactobacilles et de pédiocoques au cors de la vinification d'un vin blanc (Fendant) et d'un vi rouge (une Dole) . Ann. Technol. Agric. 28, 31-40

Mariné-Font, A., Vidal-Carou, M. C., Izquierdo-Pulido, M., Veciana-Nogués, M. T., y Hernández-Jover, T. 1995. Les amines biogènes dans les aliments: leur signification, leur analyse. Ann. Fals. Exp. Chim. 88, 119-140.

Masson, F., Lebert, A., Talon, R. y Montel, M.C. 1997. Effects of physico-chemical factors influencing tyramine production by *Carnobacterium divergens*. J. Appl. Microbiol. 83, 36-42.

Maynard, L. S; Schenker, V. J. 1996. Monoamine-oxidase inhibition by ethanol in vitro. Nature. 196, 575-576.

Miller, J. C. y Miller, J. N., 1988, Statistics for Analytical Chemistry, Second Edition. J.C. Miller y J.N. Miller/Ellis Horwood Limited. Millies, K. D., Zimlich, D. Histamingehalle von Weinen und Schaumweinen. Weinwirtschaft-Technik. 1, 21-24.

Millery, A., Duteurtre, B., Bondaille, J.P. y Maujean, A. 1968. Différenciation des trois cépages champenois à partir de l'analyse des acides aminés libres des récoltes 1983 et 1984. Rev. Fr. Oenol. 103, 32-50.

Moeller, M. 1954. Distribution of amino acid decarboxylase in Enterobacteriaceae. Acta Pathol. Microbiol. Scand. 35, 259-271.

Molenaar, D. Bosscher, J.S., ten Brink, B., Driessen, J. M., Konings, W. N. 1993. Generation of a proton motive force by histidine decarboxylation and electrogenic histidine/histamine antiport in *Lactobacillus buchneri*. J. Bacteriol. 175, 2864-2870.

Moreno-Arribas, V. y Lonvaud-Funel, A. 1999. Tyrosine decarboxylase activity of *Lactobacillus brevis* IOEB 9809 isolated from wine *L. brevis* ATCC 367. FEMS Microbiol. Lett. 180, 55-60.

Moreno-Arribas, V. y Lonvaud-Funel, A. 2001. Purification and characterization of tyrosine decarboxylase activity of *Lactobacillus brevis* IOEB 9809. FEMS Microbiol. Lett. 195, 103-107.

Moreno-Arribas, V., Torlois, S., Joyeux A., Bertrand, A., Lonvaud-Funel, A. 2000. Isolation, properties and behaviour of tyramine-producing lactic acid bacteria from wine. J. Appl. Microbiol. 88, 584-593.

Moreno-Arribas, M.V., Polo, M.C., Jorganes, F. y Muñoz, R. 2003. Screening of biogenic amine production by lactic acid bacteria isolated from grape must and wine. Int. J. Food Microbiol. 84, 117-23.

Morita, H., Yoshikawa, H., Sakata, R., Nagata, Y. y Tanaka, H. 1997. Synthesis of nitric oxide from the two equivalent guanidino nitrogens of L-arginine by *Lactobacillus fermentum*. J. Bacteriol. 179, 7812-7815.

Niven, C.F., Jeffrey, M.R. y Corlett, D.A. 1981. Differential plating médium for quantitative detection of histamine producing bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 41, 321-322.

Novella-Rodriguez, S., Veciana-Nogues, M.T., Roig-Sagues, A.X., Trujillo-Mesa, A.J. y Vidal-Carou, M.C. 2004. Comparison of biogenic amine profile in cheeses manufactured from fresh and stored (4 degrees C, 48 hours) raw goat's milk. J. Food Protect. 67, 110-116.

Ooghe, W., Kastelijin. y De Waele, A. 1981. Détermination de l'origen d'un vin rouge á l'aide du spectre des acides aminés. Ann. Fals. Exp. Chim. 74, 381-408.

Ordonnance sur les substrates étrangères et les composants dans les denrées alimentaires (OSEC). Le Département federal de l'interieur 2002.

Bibliografía

Ough, C. S. 1971. Measurement of histamine in California wines. *J. Agric. Food Chem.* 19, 241-244.

Ough, C.S. 1968. Proline content of grapes and wines. *Vitis.* 7, 321.

Ough, C.S., Crowell, E.A., Kunke, R.E., Vilas, M.R.S. y Lagier, S. 1987. A study of histamine production by various wine bacteria in model solution and in wine. *J. Food Process. Preserv.* 12, 63-70.

Pan, C.S., Lee, T.H. y Fleet, G.H. 1982. A comparison of five media for the isolation of lactic acid bacteria from wines. *Aus. Grape Grow. Winemaker.* 220, 42-46.

Padan, E., Venturi, M., Gerchman, Y. y Dover, N. 2001. Na⁺/H⁺ antiporters. *Biochim. Biophys. Acta* 1505, 144-157.

Paleologos, E.K. y Kontominas, M.G. 2004. On line solid-phase extraction with surfactant accelerated on-column derivatization and micellar liquid chromatographic separation as a tool for the determination of biogenic amines in various food substrates. *Anal. Chem.* 76, 1289-94.

Pan, C.S., Lee, T.H. y Fleet, G.H. 1982. A comparison of five media for the isolation of lactic acid bacteria from wines. *Aus. Grape Grow. Winemaker.* 220, 42-46.

Pardo, I. 1987. Estudio de la microflora presenta en mostos y vinos de la D.O. Utiel-Requena. Tesis Doctoral. Universitat de València.

Pardo, I. y Zuñiga, M. 1992. Lactic acid bacteria in Spanish red, rosé and white musts and wines under cellar conditions. *J. Food. Sci.* 57, 392-405.

Paulsen, I.T., et al. 2003. Role of mobile DNA in the evolution of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Science* 299, 2071-2074.

Peypnaud, E. 1998. Enología práctica: conocimiento y elaboración del vino. Ediciones Mundi-Prensa, Castelló, 37. 28001 Madrid

Poolman, B., Molenaar, D., Smid, E.J., Ubbink, T., Abee, T., Renault, P.P. y Konings, W.N. 1991. Malolactic fermentation: electrogenic malate uptake and malate/lactate antiport generate metabolic energy. *J. Bacteriol.* 173, 6030-6037.

Poux, C. y Ournac, A. 1970. Acides aminés libres et polypeptides du vin. *Ann. Technol. Agric.* 19, 217-237.

Primikiriou, N.I. y Roubelakis-Angelakis, K.A. 1999. Cloning and expression of an arginine decarboxylase cDNA from *Vitis vinifera* L. cell-suspension cultures. *Planta.* 208, 574-82.

Prozorowski, V. y Jörnvall, H. 1975. structural studies of histidine decarboxylase from *Micrococcus* sp. n. *Eur. J. Biochem.* 53, 169-174.

Radler, F. 1967. Étude microbiologique des bactéries de la fermentation malolactique. *Conn. Vigne Vin.* 1, 73-91.

Radler, F. y Fáth, K. P. Histamine and other biogenic amines in wines. In Proceedings of the International Symposium on Nitrogen in Grapes and Wine; Rantz, J., Ed.: American Society for Enology and Viticulture: Davis, CA, 1991; pp 185-195.

Recsei, P.A., Moore, W.M. y Snell, E.E. 1983. Pyruvate-dependent histidine decarboxylases from *Clostridium perfringens* and *Lactobacillus buchneri*. *J. Biol. Chem.* 258, 439-444.

Rice, S.L., Eitenmiller, R.R. y Koehler, P.E. 1976. Biologically active amines in foods: a review. *J. Milk Food Technol.* 36, 353-358.

Rivas-Gonzalo, J. C., Garcia Moreno, C., Gomez-Cerro, A. y Marine-Font, A. 1979. Spectrofluorometric determination on thin layer chromatographic identification of tyramine in wines. *J. Assoc. Office. Analyt. Chem.* 62(2):272-5.

Bibliografía

Rivas-Gonzalo, J.C., Santos-Hernandez, J.F. y Marine-Font, A. 1983. Study of the evolution of tyramine content during the vinification process. *J. Food. Sci.* 48, 417-418, 429.

Rodas, A.M., Ferrer, S. y Pardo, I. 2003. 16S-ARDRA, a tool for identification of lactic acid bacteria isolated from grape must and wine. *System. Appl. Microbiol.* 26, 412-422.

Rodríguez-Jerez, J.J., Gras, M.A. y Civera, T., 1994, A modification of Lerke enzymic test for histamine quantification. *J. Food Protec.* 57, 1019- 1021.

Romero, R., Gazquez, D., Bagur, M.G. y Sánchez-Vinas, M. 2000. Optimization of chromatography parameters for the determination of biogenic amines in wine by reverse-phase high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A.* 871 (1-2): 75-83.

Ruby, K. W., Griffith, R. W. y Kaeberle, M. L. 2002. Histamine production by *Haemophilus somnus*. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 25, 13-20.

Saitou, N. y Nei, M. 1987. The neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4, 406-425.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T. 1989. *Molecular cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.

Sattler, J., Herterberg, R., Lorenz, W., Schmidt, U., Grombach, M. y Stahlknecht, C.D. 1985. Inhibition of human and canine diamine oxidase by drugs used in intensive care unit: relevance for clinical side effects? *Agents Actions.* 16, 91-94.

Scheneyder, J. 1973. Histamine et substances similaires dans les vins. Causes de leur formation. Méthodes de leur élimination du vin. *Bull. l'O.I.V.* 46. 821-831.

Sessa, A., Desiderio, M. A. y Perin, A., 1984, Effect of acute ethanol administration on diamine oxidase activity on the upper gastrointestinal tract of rat. *Alcohol Clin Exp Res.* 8, 185-190.

- Shin, S., Wu, P. and Chen, C.H. 1991. Biochemical studies of the actions of ethanol on acetylcholinesterase activity: ethanol-enzyme-solvent interaction. *Inter. J. Biochemi.* 23, 169-74.
- Silla-Santos, M.H. 1996. Biogenic amines: their importance in foods. *Int. J. Food Microbiol.* 29, 213-231.
- Siatkin, S.P. y Galaev, Iu.V. 1977. Oxidation of putrescine, spermidine and spermine by diamino-oxidase from mouse liver. *Biokhimiia.* 42, 1010-1013.
- Slaughter, J.C., Flint, P.W.N. y Kular, K.S. 1987. The effect of CO₂ on the absorption of amino acids from a malt extract medium by *Saccharomyces cerevisiae*: *FEMS Microbiol Lett.* 40, 239-243.
- Snell, E. E. 1990. Vitamin B6 and decarboxylation of histidine. *Ann. Y. Acad. Sci.* 585, 1-12.
- Soufleros, E., Marie-Lyse, B. y Bertrand, A. 1998. Correlation between the content of biogenic amines and other wine compounds. *Am. J. Enol. Vitic.* 49, 266-277.
- Spayd, S.E. y Andersen-Bagge, J. 1996. Free amino acid composition of grape juice from 12 *Vitis vinifera* cultivars in Washington. *Am. J. Enol. Vitic.* 47, 389-402.
- Spayd, S.E., Wample, E.L., Evans, R.G., Seymour, B.J. y Nagel, C.W. 1994. Nitrogen-Fertilization of white Riesling grapes in Washington-must and wine composition. *Am. J. Enol. Vitic.* 45, 34-42.
- Sponholz, W.R. 1991. Nitrogen compounds in Grapes, Must and Wine. In: (1991): *Proceeding of the International Symposium on Nitrogen in Grapes and Wine.* ASEV ed.
- Straub, B.W., Kicherer, M., Schilcher, S.M. y Hammes, W.P. 1995. The formation of biogenic amines by fermentation organisms. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 201, 79-82.

Bibliografía

Stratton, J.E., Hutkins, R.W. y Taylor, S. 1991. Biogenic amines in cheese and other fermented foods: a review. *J. Food Protect.* 54, 460–470

Sumner, S.S. y Taylor, S.L. 1989. Detection method for histamine-producing, dairy-related bacteria using diamine oxidase and leucocrystal violet. *J. Food. Protec.* 52, 105-108.

Sumner, S.S., Speckhard, M.W., Somers, E.B. y Taylor, S.L. 1985. Isolation of histamine-producing *Lactobacillus buchneri* from Swiss cheese implicated in a food poisoning outbreak. *Appl. Environ. Microbiol.* 50, 1094-1096.

Swofford, D.L. 2001. PAUP* V4.0b6. Phylogenetic analysis using parsimony (* and other methods), version 4.0. Sinauer Associates, Sunderland, MA.

Taylor, S. L. 1983. Histamine poisoning associated with fish, cheese and other foods. FAO/WHO monograph CX/PH 83/11.

ten Brink, B., Damink, C. y Joosten, H. M. L. J. 1990. Occurrence and formation of biologically active amines in foods. *Int. J. Food Microbiol.* 11, 73-84.

Thoenen, H., Hurlimann, A. y Haefely, W. 1967. Cation-dependency of noradrenaline liberation by tyramine *Helv. Physiol. Pharmacol. Acta.* 25.

Torrea, D. y Ancin, C. 2002. Content of biogenic amines in a Chardonnay wine obtained through spontaneous and inoculated fermentations. *J. Agri. Food Chem.* 50, 4895-4899.

Torrea, D. y Ancin, C. 2001. Influence of Yeast Strain on Biogenic Amines Content in Wines: Relationship with the Utilization of Amino Acids during Fermentation. *Am. J. Enol. Vitic.* 52, 185-190.

Vanderslice, P., Copeland, W.C. y Robertus, J.D. 1986. Cloning and nucleotide sequence of wild type and a mutant histidine decarboxylase from *Lactobacillus* 30A. *J. Biol. Chem.* 261, 15186-15191.

Van Poejle, P.D. y Snell. E.E. 1990. Cloning, sequencing, expresión, and site-directed mutagenesis of the gene from *Clostridium prefringens* encoding pyruvoyl-dependent histidine decarboxylase. *Biochem.* 29, 132-139.

Vaz de Arruda Silveira, R.L., Malavolta, E. y Broetto, F. 2001. Effect of potassium on dry matter production and concentration of putrescine, spermidine and spermine in *Eucalyptus grandis* progenies. *Scient. Foresta.* 59, 13-25.

Vazquez-Lasa, M.B., Iñiguez-Crespo, M., González-Larraina, M.A., y González-Guerrero, A. 1998. Biogenic amines in Rioja wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 49, 229-229.

Vidal-Carou, M.C., Codony-Salcedo, R. y Mariné-Font, A. 1990. Histamine and tyramine in spanish wines: Relationships with total sulphur dioxide level, volatile acidity and malolactic fermentation intensity. *Food Chem.* 35, 217-227.

Vidal-Carou, M.C., Izquierdo-Pulido, M.L. y Marine-Font, A. 1990. Histamine and tyramine in Spanish wines: their formation during the winemaking process. *Am. J. Enol. Vitic.* 41, 160-167.

Wibowo, D., Eschenbruch, R., Davis, C.R., Fleet, G. H. y Lee, T. H. 1985. Occurrence and growth of lactic acid bacteria in wine: a review. *Am. J. Enol. Vitic.* 36, 302-313.

Zee, J. A., Simard, R. E., L'Heureux, L. y Tremblay, J. 1983. Biogenic amines in wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 34, 6-9.

Zúñiga, M., Pardo, I. and Ferrer, S. 1993. A improved medium for distinguishing between homofermentative and heterofermentative lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 18, 37-42.

Voigt, M.N. y Eitenmiller, R.R. 1978. Role of histidine and tyrosine decarboxylases and mono- and diamine oxidases in amine build up in cheese. *J. Food. Prot.* 41, 182-186.

Bibliografía

Woller, R. 2005. Aminas biógenas: presencia en el vino y efectos en el organismo. ACE, Revista de Enología, 54, 9-13.