



TESIS DOCTORALES

67

BACTERIAS LÁCTICAS DE SIDRA NATURAL:  
IMPLICACIÓN EN ALTERACIONES Y POTENCIAL PROBIÓTICO  
DE CEPAS PRODUCTORAS DE (1,3)(1,2)- $\beta$ -D-GLUCANOS

*Gaizka Garai Ibabe*



EUSKO JAURLARITZA



GOBIERNO VASCO

INGURUMEN, LURRALDE  
PLANGINTZA, NEKAZARITZA  
ETA ARRANTZA SAILA

DEPARTAMENTO DE MEDIO AMBIENTE,  
PLANIFICACIÓN TERRITORIAL,  
AGRICULTURA Y PESCA

# TESIS DOCTORALES

## N.º 67

UNIVERSIDAD DEL PAÍS VASCO

### BACTERIAS LÁCTICAS DE SIDRA NATURAL: IMPLICACIÓN EN ALTERACIONES Y POTENCIAL PROBIÓTICO DE CEPAS PRODUCTORAS DE (1,3)(1,2)- $\beta$ -D-GLUCANOS

Gaizka Garai Ibabe

**EUSKO JAURLARITZA**



**GOBIERNO VASCO**

INGURUMEN, LURRALDE  
PLANGINTZA, NEKAZARITZA  
ETA ARRANTZA SAILA

DEPARTAMENTO DE MEDIO AMBIENTE,  
PLANIFICACIÓN TERRITORIAL,  
AGRICULTURA Y PESCA

**Eusko Jaurlaritzaren Argitalpen Zerbitzu Nagusia**

Servicio Central de Publicaciones del Gobierno Vasco

Vitoria-Gasteiz, 2010

Un registro bibliográfico de esta obra puede consultarse en el catálogo de la Biblioteca General del Gobierno Vasco: <<http://www.euskadi.net/ejgybiblioteca>>.

Edición: 1.ª abril 2010

Tirada: 50 ejemplares

© Administración de la Comunidad Autónoma del País Vasco  
Departamento de Medio Ambiente, Planificación Territorial, Agricultura y Pesca

Internet: [www.euskadi.net](http://www.euskadi.net)

Edita: Eusko Jaurlaritzaren Argitalpen Zerbitzu Nagusia  
Servicio Central de Publicaciones del Gobierno Vasco  
Donostia-San Sebastián, 1 - 01010 Vitoria-Gasteiz

Impresión: Eusko Printing Service, S.L.  
[www.eps-grupo.com](http://www.eps-grupo.com)

ISBN: 978-84-457-3061-4

D. L.: VI 111-2010

*Aita Joxe ta Ama Goretti-ri*

## AGRADECIMIENTOS

Esta tesis ha sido financiada por una beca predoctoral de formación de investigadores del Departamento de Agricultura, Pesca y Alimentación del Gobierno Vasco y se ha realizado en la Unidad de Microbiología del departamento de Química Aplicada de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU) en Donostia.

Mediante estas primeras líneas quisiera agradecer y recordar a todas aquellas personas que con su esfuerzo, paciencia y ayuda han logrado que este trabajo llegue a buen puerto. Eskerrik asko denoi bihotz-bihotzez.

En primer lugar quisiera agradecer a las Dras. Maite Dueñas y Ana Irastorza por la dirección de esta tesis, darme la oportunidad de conocer de cerca lo que es de verdad la investigación y por confiar en mí en todo momento. Así mismo, agradecer también a la Dra. Victoria Moreno Arribas por la dirección de esta tesis y saber como aprovechar de manera positiva todos los resultados obtenidos en los trabajos realizados en colaboración.

A mis queridas compañeras de laboratorio Idoia y Susana. A Idoia por su compañerismo, por su disposición en todo momento a echar una mano y aguantar mis arrebatos durante estos últimos meses. Y a Susana por su amor a la ciencia, ideas, determinación y entrega a la hora de trabajar y por nuestras acaloradas discusiones. Gracias a las dos por todo.

Quisiera mostrar mi gratitud a la Dra. Paloma López del Departamento de Microbiología Molecular y Biología de las Infecciones del Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC) por brindarme la oportunidad de realizar los ensayos de análisis del potencial probiótico en su laboratorio. A la Dra. Pilar Fernández de Palencia, no se como expresar mi agradecimiento por todo tu tiempo, trabajo, ayuda y paciencia mientras he estado con vosotros. Eres un sol Pilar. No me olvido de vosotras Lali y Cris, por vuestra ayuda y por hacer tan agradable mi estancia en Madrid.

Agradecer al Dr. Javier Areizaga del departamento de Ciencia y Tecnología de Polímeros por su disposición a realizar todos los análisis de GPC planteados, que no han sido pocos, y por el asesoramiento culinario.

A la Dra. Rosa Aznar y Patricia Elizaquível por el trabajo realizado en la tipificación de las cepas productoras de EPS.

A su vez, quisiera agradecer a la Dra. Arantza Munduate, por su ayuda con el tratamiento estadístico de los resultados, y al Dr. J.I. Miranda del servicio de RMN por su asesoramiento. Así como a Domingo Arina por su ayuda en la obtención de muestras de sidra y a todos los sidreros por su colaboración a lo largo de esta tesis.

Biokimika II taldeko Unai Ugalde Dr-ari, bere laborategia erabiltzen uzteagatik eta batez ere laborategitik pasatako lankide guztiei, Oier, Ana, Aitor, Erika eta Shandrari.

Azkenik eskerrak eman nahi dotzuet zuoi guztixoi, nire bizitzan garrantzitsuenak zarienoi beti hor egotiatatik. Zuri ama dana emutiagatik, zure poztasuna ta filosofia transmititzen jakin dozulako, eta beti gure atzien bultzadaxo bat emuten egotiatatik. Eta zutaz be asko gogoraketan naz aita, nahiz ta momentu hautan gure artien ez egon. Zuk erakutsi zuztesun lanak dauken balixua eta lana ñaz azkenien gauza guztixak lortzen diela. Eskerrik asko Ou, Biri eta Goroxi, anai guztixei, zueik barik be ez nitzakelako ezer izengo, eta baitxa kuadrilako beste lagunei Liher, Ohiana, Maider eta Mireni. Eta bereziki eskerrak zuri Enara, beti niaz egotiatatik momentu on, ez hain on eta txarretan, urte asko izanagitxik motz injatelako. Eskerrak oin dala 10 urtetako maiatzeko egun hartan aurkitxu zintxudala, bestela nire beste erdixa faltauko jatelako. Maitxe zaitxuztet.

De la presente Tesis Doctoral se han extraído las siguientes publicaciones y comunicaciones a congresos

## **Publicaciones**

Garai G., Ibarburu I., Velasco S., Dueñas M.T. y Irastorza A. La fermentación maloláctica y la estabilidad microbiana de la sidra. 2006. *Sustrai*.74: 54-56.

Garai G., Dueñas M. T., Irastorza A., Martín-Alvarez P. J. y Moreno-Arribas M. V. 2006. Biogenic amines in natural ciders. *Journal of Food Protection*. 69: 3006-3012.

Garai G., Dueñas M. T., Irastorza A. y Moreno-Arribas M. V. 2007. Biogenic amine production by lactic acid bacteria isolated from cider. *Letters in Applied Microbiology*. 45: 473-478.

Garai-Ibabe G., Ibarburu I., Berregi I., Claisse O., Lonvaud-Funel A., Irastorza A. y Dueñas, M. T. 2008. Glycerol metabolism and bitterness producing lactic acid bacteria in cidermaking. *International Journal of Food Microbiology*. 121: 253-261.

Garai-Ibabe G., Dueñas M. T., Irastorza A., Sierra-Filardi E., Werning M. L., López P., Corbí A. L. y Fernández de Palencia P. Physiological properties of 2-substituted (1,3)- $\beta$ -D-glucan producing *Lactobacillus suebicus* and *Pediococcus parvulus* strain isolated from cider. *Applied and Environmental Microbiology*. (enviado)

Garai-Ibabe G, Areizaga J., Aznar R., Elizaquível P., Prieto A., Irastorza A., Dueñas M. T. Screening and selection of 2 substituted (1,3)- $\beta$ -D-glucan producing lactic acid bacteria and exopolysaccharide characterization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. (enviado)

Garai-Ibabe G., Irastorza A., Dueñas M. T., Martín-Alvarez P. J. y Moreno-Arribas M. V. Evolution of amino acids and biogenic amines throughout the industrial manufacture of natural cider. (en elaboración)

## Congresos

Ibarburu I., Werning M. L., Garai G., Irastorza A., Dueñas M. T., Navas J. y López P. “Development of specific probes for detection of ropiness causing lactic acid bacteria in cider” European Symposium on Apple Processing. Rennes, Francia. 2005.

Garai G., Dueñas M. T., Irastorza A. y Moreno-Arribas M. V. “Biogenic amine production by lactic acid bacteria isolated from cider”. FEMS 2007 (2<sup>nd</sup> Congress of European Microbiologists). Madrid. 2007.

Garai-Ibabe G., Ibarburu I., Berregi I., Claisse O., Lonvaud-Funel A., Irastorza A. y Dueñas M. T. “Glycerol catabolism by lactic acid bacteria isolated from bitter ciders”. FEMS 2007 (2<sup>nd</sup> Congress of European Microbiologists). Madrid. 2007.

Garai-Ibabe G., Fernández de Palencia P., Ibarburu I., Areizaga J., López P., Irastorza A. y Dueñas M. T. "Screening of  $\beta$ -(1,3)-glucan producing lactic acid bacteria from cider". Symposium on Lactic Acid Bacteria. Egmond aan Zee, Holanda. 2008.

Garai-Ibabe G., Fernández de Palencia P., Ibarburu I., Areizaga J., López P., Irastorza A. y Dueñas M.T. “Screening de bacterias lácticas productoras de  $\beta$ -(1,3)-glucanos”. CMIBM 2008 (Congreso de Microbiología Industrial y Biotecnología Microbiana). Barcelona. 2008.

Garai-Ibabe G., Ibarburu I., López P., Werning M. L., Fernández de Palencia P., Corbí A., Irastorza A. y Dueñas M. T. “Probiotic and technological potentialities of EPS producing LAB strains isolates from non-dairy source”. Food and Function 2009. Zilina, Eslovaquia. 2009.

Elizaquível P., Nacher-Vázquez A., Dueñas M., Garai-Ibabe G., Fernández de Palencia P. y Aznar R. “Survival of (1-3,1-2)- $\beta$ -D-glucan producing lactic acid bacteria under simulated gastrointestinal conditions” FEMS 2009 (3<sup>rd</sup> Congress of European Microbiologists. Goteborg, Suecia. 2009.



**ABREVIATURAS**

1,3-PDL	1,3-propanodiol
3-HP	Ácido 3-hidroxi propiónico
3-HPA	3-hidroxi propionaldehído
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADP	Adenosina-5'-difosfato
Aglut	Aglutinación
ARNr	Ácido ribonucleico ribosómico
ATP	Adenosina-5'-trifosfato
BAL	Bacterias ácido lácticas
BC	Medio de Bover-Cid
C	Control
Carr-m	Medio de Carr modificado
CECT	Colección Española de Cultivos Tipo
COSY	Espectroscopía de correlación
CTP	Citidina-5'-trifosfato
CUPV	Colección de la UPV
Da	Dalton
DGGE	Electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización
DHA	Glicerol deshidratasa
DO <sub>600</sub>	Densidad óptica 600nm
EPS	Exopolisacárido
eq	Equivalentes
FCS	Suero fetal bovino
FML	Fermentación maloláctica
Fruc	Fructosa
F-S	Fenol sulfúrico
G	Estrés gástrico
G/R	Verde/Rojo
Gal	Galactosa
GAP	Gliceraldehído-3-fosfato
GC-MS	Cromatografía de gases-espectrometría de masas
GI	Estrés gastrointestinal

Gluc	Glucosa
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos
GTF	Glicosil transferasa
GTP	Guanidina-5'-trifosfato
HDO	Agua semipesada
HePS	Heteropolisacárido
HoPS	Homopolisacárido
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia
IL	Interleuquina
IR	Índice de refracción
Kb	Kilobase
Lact	Lactosa
LSD	Método de la mínima diferencia significativa
Malt	Maltosa
MAM	Medio Men-Alpha
Manit	Manitol
M-CSF	Factor estimulante de colonias de macrófagos
MEC	2- $\beta$ -mercaptoetanol
MRS	Medio Man Rogosa Sharpe
MRS-m	Medio MRS modificado
MRS-T-F	Medio MRS suplementado con tomate y fructosa
Mw	Peso molecular promedio
NAD <sup>+</sup>	Nicotinamida adenina dinucleótido
NCBI	National Collection of Industrial Bacteria
nt	Nucleótidos
OIV	Organización Internacional de la Viña y el Vino
OPA	Ortoftaldialdehído
p/v	Peso/Volumen
pb	Pares de bases
PBMC	Células sanguíneas mononucleares periféricas humanas
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PI	Yoduro de propidio
ppm	Partes por millón

---

RADP	Amplificación al azar de fragmentos polimórficos de ADN
Rafin	Rafinosa
Ramn	Ramnosa
RMN	Resonancia magnética nuclear
RP-HPLC	HPLC en fase inversa
rpm	Revoluciones por minuto
<i>rpoB</i>	Subunidad $\beta$ de la ARN-polimerasa
Sac	Sacarosa
SCFA	Ácidos grasos de cadena corta
SEC	Cromatografía de exclusión molecular
SMD	Medio semidefinido
Sorb	Sorbitol
TFA	Ácido trifluoroacético
TLR	Receptores tipo Toll
TNF	Tumor necrosis factor
Treha.	Trehalosa
TTP	Timidina-5'-trifosfato
UFC	Unidades formadoras de colonias
UGP	UDP-glucosa pirofosforilasa
UV-Vis	Ultravioleta-Visible
V	Voltio
v/v	Volumen/Volumen
Xil	Xilosa
$\alpha$ -PGM	$\alpha$ -fosfoglucomutasa

## Índice

---

<b>Presentación del tema y objetivos</b> .....	21
<b>Capítulo 1. Introducción general</b> .....	27
1.1. Elaboración de sidra natural.....	29
1.2. Las bacterias lácticas en la elaboración de la sidra.....	30
1.2.1. Influencia del metabolismo de las bacterias lácticas en la composición de la sidra.....	31
1.2.1.1. Metabolismo de azúcares.....	31
1.2.1.2. Metabolismo de ácidos orgánicos.....	34
1.2.1.2.1. <i>Metabolismo del ácido málico</i> .....	34
1.2.1.2.2. <i>Metabolismo del ácido quínico</i> .....	34
1.2.1.2.3. <i>Metabolismo del ácido cítrico</i> .....	35
1.2.1.2.4. <i>Metabolismo del ácido láctico</i> .....	36
1.2.1.3. Metabolismo de aminoácidos.....	37
1.2.1.3.1. <i>Producción de aminas biógenas</i> .....	38
1.2.1.4. Síntesis de exopolisacáridos.....	42
1.3. Alteraciones de la sidra natural originadas por bacterias lácticas.....	45
1.3.1. Acetificación.....	45
1.3.2. Amargor o picado acroleico.....	45
1.3.3. Ahilado o enfermedad de la grasa.....	48
1.4. Bacterias lácticas productoras de exopolisacáridos e industria alimentaria.....	49
1.5. Bibliografía.....	53
<b>Capítulo 2. Picado acroleico en sidra natural del País Vasco</b> .....	61
2.1. Introducción.....	63
2.2. Material y Métodos.....	65
2.2.1. Caracterización microbiológica de las sidras alteradas y aislamiento de bacterias lácticas.....	65
2.2.2. Detección de cepas bacterias lácticas productoras de 3-hidroxipropionaldehído.....	66
2.2.3. Detección de la actividad glicerol deshidratasa.....	66
2.2.4. Detección por PCR del gen glicerol deshidratasa.....	67
2.2.5. Identificación de las cepas de bacterias lácticas productoras de 3-HPA.....	68

2.2.5.1. Identificación mediante secuenciación de un fragmento del gen ANRr 16S amplificado.....	68
2.2.5.2. Identificación mediante PCR-DGGE <i>rpoB</i> .....	69
2.2.6. Cuantificación de sustratos y productos de fermentación.....	70
2.2.7. Influencia de factores medioambientales sobre el metabolismo del glicerol y producción y acumulación de 3-HPA en <i>Lactobacillus collinoides</i> 17.....	70
2.3. Resultados.....	73
2.3.1. Aislamiento y detección de bacterias lácticas productoras de 3-HPA.....	73
2.3.2. Influencia de la concentración de fructosa sobre el metabolismo del glicerol en <i>L. collinoides</i> 17.....	75
2.3.3. Influencia del pH.....	81
2.3.4. Influencia de la temperatura.....	83
2.4. Discusión.....	85
2.5. Conclusiones.....	89
2.6. Bibliografía.....	91
<b>Capítulo 3. Aminas biógenas en sidra natural del País Vasco.....</b>	<b>95</b>
3.1. Introducción.....	97
3.2. Material y Métodos.....	99
3.2.1. Muestras de sidra natural comercializada.....	99
3.2.2. Elaboración de sidra natural y toma de muestras.....	99
3.2.3. Bacterias lácticas y medios de cultivo.....	100
3.2.4. Identificación de las cepas de bacterias lácticas.....	100
3.2.5. Determinación de los parámetros convencionales de la sidra natural.....	100
3.2.6. Nitrógeno total.....	101
3.2.7. Análisis de aminas biógenas.....	101
3.2.8. Análisis de aminoácidos.....	102
3.2.9. Caracterización microbiológica de mostos y sidras.....	103
3.2.10. Detección de bacterias lácticas productoras de aminas biógenas.....	104
3.3. Resultados.....	105
3.3.1. Determinación de aminas biógenas en sidra natural comercializada.....	105
3.3.2. Detección de bacterias lácticas productoras de aminas biógenas aisladas de sidra natural del País Vasco.....	112

3.3.3. Evolución de los aminoácidos y aminos biógenas a lo largo del proceso de elaboración de la sidra natural del País Vasco.....	116
3.4. Discusión.....	127
3.5. Conclusiones.....	135
3.6. Bibliografía.....	137
<b>Capítulo 4. Detección y selección de cepas de bacterias lácticas productoras de (1,3)(1,2)-<math>\beta</math>-glucanos aisladas de sidra natural y análisis de su potencial probiótico</b>	<b>143</b>
4.1. Introducción.....	145
4.2. Material y Métodos.....	149
4.2.1. Cepas bacterianas y condiciones de cultivo.....	149
4.2.2. Detección y caracterización de bacterias lácticas productoras de exopolisacáridos.....	149
4.2.2.1. Extracción de ADN e identificación de cepas productoras de exopolisacáridos.....	150
4.2.2.2. Detección y caracterización del gen <i>gtf</i> en cepas productoras de exopolisacáridos.....	150
4.2.2.3. Fermentación de azúcares.....	151
4.2.2.4. Aislamiento y cuantificación del exopolisacárido.....	151
4.2.2.5. Análisis de aglutinación para la detección de cepas productoras de (1,3)(1,2)- $\beta$ -D-glucano.....	152
4.2.3. Tipificación de cepas de <i>P. parvulus</i> productoras de exopolisacárido.....	152
4.2.3.1. RAPD-PCR (Amplificación al azar de fragmentos polimórficos de ADN)...	152
4.2.3.2. Análisis estadístico de los perfiles genotípicos y fenotípicos.....	153
4.2.4. Caracterización de exopolisacáridos.....	153
4.2.4.1. Viscosidad del medio de cultivo.....	153
4.2.4.2. Aislamiento y purificación del exopolisacárido.....	154
4.2.4.3. Resonancia Magnética Nuclear (RMN).....	154
4.2.4.4. Composición monosacáridica y análisis de mutilación.....	154
4.2.4.5. Determinación de la masa molecular.....	155
4.2.5. Caracterización del potencial probiótico de cepas seleccionadas.....	155
4.2.5.1. Cepas bacterianas y condiciones de cultivo.....	155
4.2.5.2. Ensayos de tolerancia al estrés gastrointestinal.....	156
4.2.5.2.1. Análisis de viabilidad celular.....	158

4.2.5.3. Cultivo de células Caco-2 y ensayos de adhesión.....	161
4.2.5.4. Detección del exopolisacárido por microscopía electrónica de transmisión.....	162
4.2.5.5. Cultivo, diferenciación de macrófagos y ensayos de inmunoestimulación....	162
4.2.5.6. Análisis estadístico.....	163
4.3. Resultados.....	165
4.3.1. Detección e identificación de las cepas de bacterias lácticas productoras de exopolisacáridos.....	165
4.3.2. Producción de exopolisacáridos.....	165
4.3.3. Detección por PCR e inmunológica de cepas productoras de (1,3)(1,2)- $\beta$ -D-glucanos.....	168
4.3.4. Caracterización de los exopolisacáridos.....	170
4.3.4.1. Análisis estructural.....	170
4.3.4.2. Determinación del peso molecular .....	172
4.3.5. Tipificación de las cepas de <i>P. parvulus</i> productoras de exopolisacáridos.....	175
4.3.5.1. Análisis de los perfiles RAPD.....	175
4.3.5.2. Análisis combinado de datos genotípicos y fenotípicos.....	175
4.3.6. Caracterización del potencial probiótico de cepas de bacterias lácticas productoras de (1,3)(1,2)- $\beta$ -D-glucanos.....	178
4.3.6.1. Caracterización de bacterias lácticas y producción de exopolisacáridos.....	178
4.3.6.2. Tolerancia al estrés gastrointestinal.....	182
4.3.6.3. Adhesión de las cepas seleccionadas a células Caco-2.....	185
4.3.6.4. Capacidad inmunoestimuladora de las cepas <i>P. parvulus</i> CUPV22 y <i>L. suebicus</i> CUPV221.....	186
4.4. Discusión.....	189
4.5. Conclusiones.....	195
4.6. Bibliografía.....	197
<b>5. Conclusiones generales.....</b>	<b>203</b>
<b>Anexo I.....</b>	<b>207</b>
<b>Anexo II.....</b>	<b>215</b>
<b>Anexo III.....</b>	<b>221</b>



## **Presentación del tema y objetivos**

---

La sidra se define como la bebida resultante de la fermentación alcohólica total o parcial del mosto de manzana. Bajo este término se agrupan una serie de productos que pueden ser muy diferentes desde el punto de vista analítico y organoléptico según los países productores. En este sentido, la mayor parte de la sidra elaborada en el País Vasco pertenece al tipo denominado como “sidra natural” (B.O.E. 28/8/79), y según la reglamentación sanitaria es elaborada mediante prácticas enológicas tradicionales, sin adición de azúcares ni gas carbónico y cuya graduación alcohólica debe ser superior a 4,5%.

Durante los últimos 15 años, el sector sidrero gipuzkoano ha introducido muchas mejoras en el proceso de elaboración, tales como la instalación de túneles de lavado de manzana y sistemas de prensado de ciclo rápido así como el uso de recipientes de acero inoxidable. Paralelo a ello, la producción de sidra natural está adquiriendo progresivamente mayor relevancia económica, lo que se demuestra con el paulatino incremento de la producción de sidra natural registrado en Gipuzkoa entre los años 1987 y 2007, en los que la producción ha pasado de los 7-8 millones de litros/año en 1987 (Uria, 1987) a los 12,5 millones de litros en la cosecha 2007 ([www.argia.com/sagardoa/historia-5.htm](http://www.argia.com/sagardoa/historia-5.htm)). En Bizkaia la producción actual, también en progresivo aumento, se estima en torno a los 300 mil litros/año. Además, uno de los objetivos actuales del sector sidrero gipuzkoano reside en la obtención de un distintivo de calidad para la bebida, por lo que se está estudiando la posibilidad de crear una Denominación de Origen Protegida.

Sin embargo, para conseguir este distintivo de calidad el sector sidrero gipuzkoano se enfrenta a diversos retos. Uno de los principales es la escasez de manzana sidrera autóctona, ya que la producción local no es suficiente para abastecer las necesidades del sector. Por ello, una gran parte de la manzana empleada, que puede llegar a ser superior al 60% de la demanda, se obtiene de otras zonas de producción con los inconvenientes que ello conlleva con respecto al control de calidad de la materia prima y de la disponibilidad de variedades de manzana adecuadas.

Otro problema es la falta de estabilidad de la sidra embotellada debido a que, en general, no se realizan tratamientos de estabilización microbiológica. Por ello, tras la fermentación maloláctica, las bacterias lácticas se convierten en la microbiota principal y

en estas condiciones pueden metabolizar las fuentes carbonadas residuales y producir alteraciones, como la acetificación, el ahilado y el amargor o picado acroléico, generando pérdidas económicas importantes en el sector sidrero. La mejora de la calidad de la sidra implica el conocimiento de los agentes que provocan estas alteraciones y de los factores que pueden contribuir a su desarrollo, información que a su vez nos indicará la forma de evitar su aparición.

Algunas de estas alteraciones como la acetificación y el ahilado han sido estudiadas con anterioridad. Sin embargo, entre las sidras rechazadas por el consumidor se encuentran aquellas que tienen sabores muy amargos y que, según información previa, han sido atribuidos a compuestos originados por la unión de polifenoles a la acroleína. Algunas bacterias lácticas metabolizan el glicerol y producen 3-hidroxiacetaldehído, precursor de la acroleína. Por ello, en el marco de la presente Tesis Doctoral se ha estudiado la microbiota láctica implicada en el desarrollo de esta alteración en la sidra.

Por otra parte y en el marco de las políticas de seguridad alimentaria, en este trabajo se ha abordado la producción de aminas biógenas, aspecto que todavía no había sido estudiado en la sidra natural. Estos compuestos, cuya síntesis ha sido atribuida al metabolismo de bacterias lácticas, pueden ejercer efectos tóxicos en individuos sensibles y/o si son ingeridos a través de alimentos y/o bebidas fermentadas en cantidades suficientes. Las bacterias lácticas realizan un papel esencial durante la elaboración de la sidra, lo que la convierte en un producto susceptible a la producción de aminas biógenas. Con el objetivo de conocer en profundidad el origen de estos compuestos en la sidra, en la presente investigación se ha determinado el contenido de estas aminas en sidra natural del País Vasco, tanto en su etapa de comercialización como durante la elaboración industrial, y se han identificado las bacterias lácticas productoras.

Con respecto a la alteración del ahilado, ésta es provocada por ciertas cepas de bacterias lácticas que producen exopolisacáridos. Esta propiedad, que en la elaboración de vinos y sidras resulta perjudicial para la bebida, ha despertado sin embargo gran interés en la industria alimentaria. En la actualidad algunas de estas cepas se utilizan como cultivos iniciadores o coadyuvantes, ya que mejoran la textura, palatabilidad y estabilidad del

producto. Además, se ha descrito que varias cepas de bacterias lácticas y sus exopolisacáridos pueden presentar efectos beneficiosos para la salud del consumidor.

En el caso de la sidra, algunas de las bacterias responsables del ahilado son productoras de (1,3)- $\beta$ -D-glucanos, polisacáridos que han sido ampliamente estudiados, tanto por su capacidad gelificante, como por ejercer efectos beneficiosos sobre la salud humana y animal. En consecuencia, estas bacterias podrían ser utilizadas para la elaboración de alimentos funcionales. En esta línea, resultados previos con la cepa *Pediococcus parvulus* 2.6, aislada de sidra y productora de un (1,3)(1,2)- $\beta$ -D-glucano, indican que posee potencial como probiótico y además, su polisacárido tiene capacidad bioespesante. En consecuencia, uno de los objetivos de este trabajo ha sido la búsqueda y selección de nuevas cepas productoras de  $\beta$ -glucanos y análisis posterior de su potencial probiótico.

En resumen, teniendo en cuenta estos antecedentes los objetivos generales de la presente Tesis Doctoral han sido: A) Estudio de la microbiota implicada en la alteración del picado acroléico o amargor en sidra natural del País Vasco (Capítulo 2), B) Evaluación de la presencia de aminas biógenas y su microbiota responsable en sidra natural del País Vasco (Capítulo 3) y C) Detección y selección de cepas productoras de (1,3)(1,2)- $\beta$ -D-glucanos aisladas de sidra natural, y análisis de su potencial probiótico (Capítulo 4).

Para la consecución de estos objetivos, se han realizado los siguientes estudios:

- 1- Detección e identificación de cepas de bacterias lácticas responsables del amargor en sidra natural del País Vasco.
- 2- Análisis de la influencia de diferentes factores (concentración de azúcares, pH y temperatura) en la producción y acumulación de 3-hidroxipropionaldehído por una cepa de *Lactobacillus collinoides*.
- 3- Determinación del contenido de aminas biógenas en sidra natural comercializada y de los factores relacionados con su presencia durante el proceso de elaboración industrial de la sidra natural.

- 4- Detección de cepas productoras de aminos biógenas en bacterias lácticas aisladas de sidra natural.
- 5- Detección, identificación y selección de bacterias lácticas productoras de (1,3)(1,2)- $\beta$ -D-glucanos y caracterización de sus exopolisacáridos.
- 6- Evaluación del potencial probiótico de las cepas seleccionadas previamente mediante el análisis de su tolerancia al estrés gastrointestinal, capacidad de adhesión a células Caco-2 y actividad inmunoestimuladora.

## **1. Introducción general**

---

## 1.1. ELABORACIÓN DE SIDRA NATURAL

El proceso de elaboración de la sidra natural se inicia con la mezcla de distintas variedades de manzana de sidra, proceso que comienza a principios de octubre y se alarga hasta mediados de noviembre, cuando se recogen las variedades de manzana más tardías. Éstas se pueden dividir, atendiendo al contenido en azúcares y compuestos fenólicos, en cuatro grandes grupos: dulces, ácidas, dulce-amargas y ácido-amargas. Mediante el programa de Fomento de la Pomología, la Diputación Foral de Gipuzkoa (Dpto. de Agricultura) ha recuperado y seleccionado varias variedades de manzana sidrera y entre ellas la Asociación de Sidra Natural de Gipuzkoa recomienda las siguientes: Aritza, Patzolua, Errezila, Txakala, Gezamina, Udare marroi, Goikoetxea, Urdin, Manttoni, Urtebi handi, Moko, Urtebi txiki, Mozolua y Verde agria ([www.sagardotegiak.com/sagardogintza/sagarbarietateak](http://www.sagardotegiak.com/sagardogintza/sagarbarietateak)).

Para la obtención del mosto, la manzana es lavada y troceada mediante trituradoras de cilindros perfilados. La pulpa obtenida se deposita en la prensa y se acostumbra a que macere en contacto con el aire durante un periodo de 5 a 20 horas, antes de realizar el prensado. Para este proceso se utilizan dos tipos de prensas, la tradicional, que es una prensa discontinua de cajón, o la de membrana. Esta última se ha impuesto en los últimos años, ya que además de facilitar el trabajo del productor, presenta ciclos de prensado más rápidos. El rendimiento en mosto varía entre el 50 y 70% en función a la variedad y punto de maduración de la manzana ([www.sagardotegiak.com/sagardogintza/](http://www.sagardotegiak.com/sagardogintza/); [www.sagardoa.com](http://www.sagardoa.com)).

Una vez obtenido el mosto de manzana, se transfiere directamente a los depósitos de fermentación. Para este fin, en la actualidad, además de los depósitos de acero inoxidable y de poliéster, se siguen utilizando las cubas de madera. Generalmente, los mostos no sufren ningún tipo de tratamiento (sulfitado, desfangado o filtrado) previo a las fermentaciones alcohólica y maloláctica. Éstas se desarrollan simultáneamente y de forma espontánea sin necesidad de añadir cultivos iniciadores de levaduras o bacterias lácticas, gracias a la microbiota endógena procedente tanto de la manzana como del equipamiento de bodega (Dueñas et al., 1994). La adición de levadura seca activa sólo se utiliza cuando ocurre una parada de fermentación.

Tras ambas fermentaciones, sigue un periodo de maduración de varios meses y a continuación la sidra se embotella sin ningún tipo de tratamiento de estabilización microbiológica, por lo que la sidra natural del País Vasco se presenta turbia y con mucho depósito. La microbiota dominante está constituida por bacterias lácticas (BAL), tanto durante el periodo de maduración como tras el embotellado, las cuales pueden metabolizar fuentes carbonadas residuales (fructosa, glicerol, ácido láctico, etc) y producir diferentes alteraciones que disminuyen la calidad de la bebida. Entre las alteraciones más frecuentes producidas por la población láctica se encuentran la acetificación (Dueñas et al., 1994), el ahilado (Dueñas et al., 1995; Fernández et al., 1996) y el picado acroléico o amargor (Garai-Ibabe et al., 2008), por orden de importancia.

## 1.2. LAS BACTERIAS LÁCTICAS EN LA ELABORACIÓN DE SIDRA

Las bacterias lácticas engloban un grupo de microorganismos unidos por un conjunto de características morfológicas y fisiológicas. Son bacterias Gram-positivas, en forma de cocos, bacilos o coco-bacilos, inmóviles, anaerobias aerotolerantes, no esporuladas, catalasa negativas y desprovistas de citocromos. En consecuencia, presentan un metabolismo estrictamente fermentativo, sintetizando ácido láctico como principal producto de la fermentación de carbohidratos (Axelsson, 2004). Por otro lado, son microorganismos nutricionalmente exigentes por lo que requieren de una gran cantidad de factores nutritivos para su crecimiento, tales como aminoácidos, bases nitrogenadas y vitaminas.

El término “bacteria láctica” está íntimamente asociado con bacterias implicadas en la fermentación de alimentos y piensos, incluyendo bacterias normalmente asociadas con superficies mucosas de humanos y animales. Los principales géneros implicados en tecnología alimentaria son: *Aerococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Oenococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Carnobacterium*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weissella*. El género *Bifidobacterium*, a menudo considerado como bacteria láctica por compartir muchas de sus características típicas, no están relacionados filogenéticamente y presenta un único modo de fermentación de azúcares (Axelsson, 2004).



Con respecto a la microbiota láctica implicada en la elaboración de la sidra natural del País Vasco, la población predominante es heterofermentativa y constituida principalmente por las especies *Lactobacillus brevis* y *Oenococcus oeni* (Dueñas et al., 1994), las cuales se aíslan a lo largo de todo el proceso de elaboración (mosto, fermentación alcohólica, maduración y sidra embotellada). Además, se han aislado otros lactobacilos heterofermentativos en sidras ahiladas, tales como *L. diolivorans*, *L. collinoides* y *L. suebicus* capaces de producir exopolisacáridos (Werning et al., 2006). Por otra parte, las especies homofermentativas constituyen una población bastante minoritaria y están representadas por *L. mali* y *L. plantarum*, las cuales se aíslan principalmente en el mosto y en las primeras etapas de la fermentación alcohólica. Las especies del género *Pediococcus*, también homofermentativas, han sido raramente encontradas (Dueñas et al., 1994) y en las sidras vascas, *P. damnosus*, (posteriormente reclasificado como *P. parvulus*) se ha asociado también con la alteración del ahilado (Fernández et al., 1996).

A continuación se destacan aquellos aspectos del metabolismo de las bacterias lácticas (BAL) que inciden en el proceso de fermentación y calidad de la sidra natural.

### **1.2.1. Influencia del metabolismo de las bacterias lácticas en la composición de la sidra**

Las bacterias lácticas pueden utilizar para su crecimiento una gran cantidad de sustratos presentes en los mostos de manzana, tales como azúcares, ácidos orgánicos, glicerol y algunos aminoácidos, dando lugar a productos de interés organoléptico, aunque también pueden ser el origen de diversas alteraciones de la sidra.

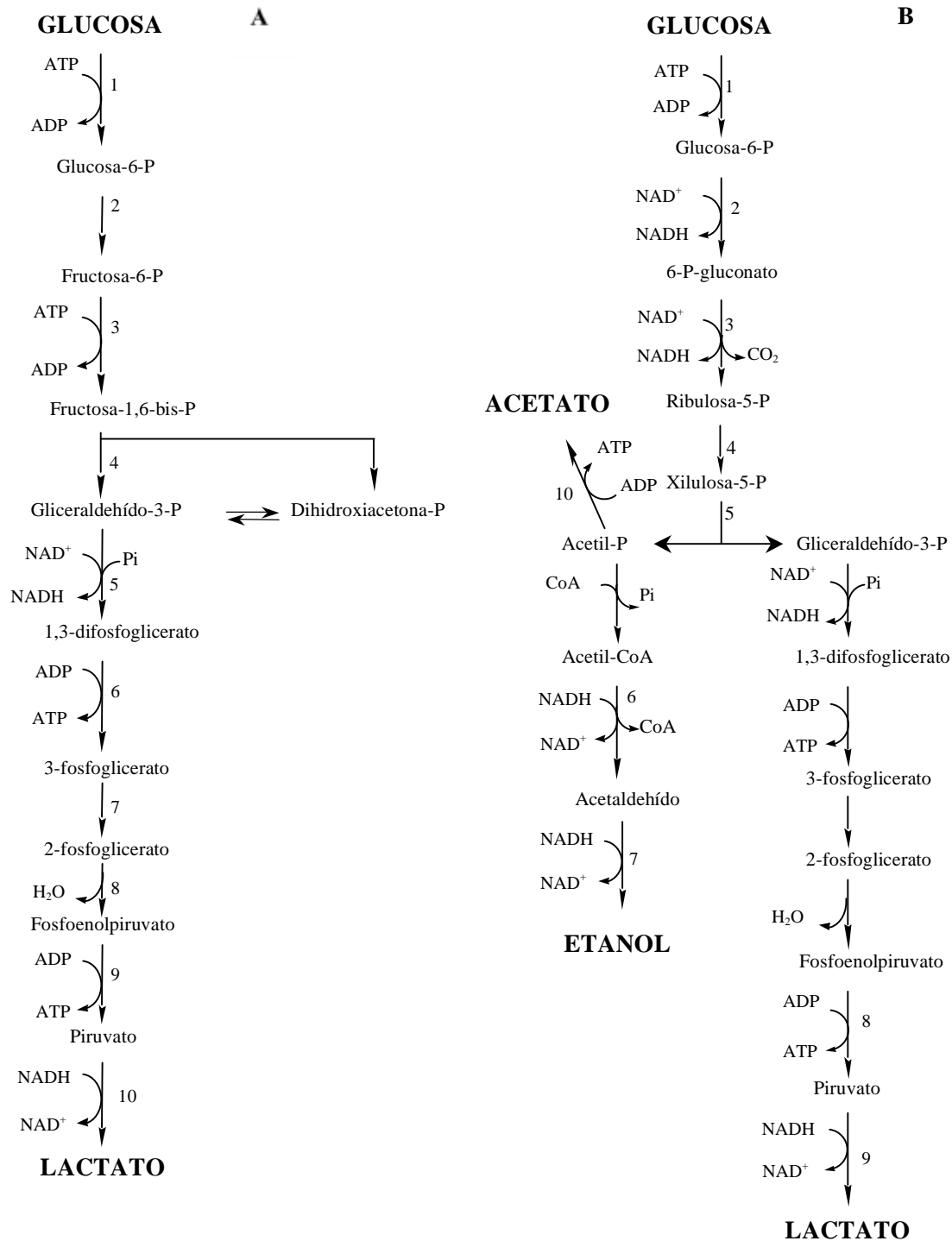
#### **1.2.1.1. Metabolismo de azúcares**

Los azúcares constituyen la principal fuente de carbono y energía para las bacterias lácticas y son catabolizados por vía fermentativa acoplada a la fosforilación a nivel de sustrato. Los principales azúcares del mosto de manzana son la fructosa, del orden del 6% (p/v), la glucosa 1,5-2% (p/v) y la sacarosa 1% (p/v). Además, se encuentran pequeñas cantidades de polioles, entre los que destaca el sorbitol (0,04%, p/v), y pentosas, como la

xilosa (0,05%, p/v) (Beech y Carr, 1977). En la sidra natural sólo se encuentran cantidades residuales de los azúcares mayoritarios en la manzana, en especial, fructosa ( $<1 \text{ g L}^{-1}$ ). Con respecto al sorbitol, éste no es fermentado por las levaduras y por ello se encuentra en general en la sidra en cantidades de entre  $4\text{-}7 \text{ g L}^{-1}$  (Picinelli et al., 2000), aunque podría ser utilizado por bacterias lácticas tales como *L. plantarum* y *L. casei* (Carr y Davies, 1970; Carr y Whiting, 1971).

La fermentación de hexosas por bacterias lácticas puede ser realizada según dos rutas principales: A) Vía de la glicólisis (ruta de Embden-Meyerhof-Parnas) o fermentación homoláctica (Figura 1.1 A), caracterizada por la formación de ácido láctico como producto único de la fermentación. Esta ruta está presente en todas las bacterias lácticas, excepto en *Leuconostoc*, *Weissella*, *Oenococcus* y en *Lactobacillus* del grupo III (Axelsson, 2004). B) Vía de la 6-fosfogluconato/fosfocetolasa o fermentación heteroláctica (Figura 1.1 B). Esta ruta se inicia con una deshidrogenación de glucosa-6-fosfato a 6-fosfogluconato, descarboxilación posterior a ribulosa-5-fosfato e isomerización de ésta a xilulosa-5-fosfato. Posteriormente, esta pentosa se escinde mediante una fosfocetolasa para dar gliceraldehído-3-fosfato (GAP) y acetil-fosfato. El GAP se metaboliza por la vía glicolítica obteniéndose ácido láctico. El acetil-fosfato se reduce a etanol vía acetil-CoA y acetaldehído. En presencia de aceptores de electrones alternativos al acetaldehído, tales como fructosa, citrato, glicerol u oxígeno molecular, el acetil-fosfato se transforma en acetato. Por ello, la presencia en la sidra de cepas de BAL con esta ruta metabólica contribuirá a la acetificación de la bebida (Dueñas et al., 1994).

Las bacterias lácticas se clasifican como *homofermentativas*, cuando degradan la glucosa a través de la vía glicolítica, y *heterofermentativas* si lo hacen por la ruta de la 6-fosfogluconato/fosfocetolasa. Sin embargo, en ocasiones la glicólisis puede dar lugar a una fermentación heteroláctica, si el piruvato se transforma en lactato y otros productos tales como acetato, formiato o etanol, mediante el sistema piruvato-formiato liasa, o en diacetilo, acetoína/2,3-butanodiol, por la ruta diacetilo/acetoína. Por otro lado, se denominan *heterofermentativas facultativas*, aquellas BAL homofermentativas que son capaces de consumir las pentosas a través de la segunda parte de la ruta 6-fosfogluconato/fosfocetolasa, donde se forman cantidades equimolares de ácido láctico y acético.



**Figura 1.1.** (A) Fermentación homoláctica de la glucosa. 1, hexoquinasa; 2, glucosa-fosfato-isomerasa; 3, fosfofructoquinasa; 4, fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa; 5, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa; 6, 3-fosfo-glicerato quinasa; 7, fosfoglicerato mutasa; 8, enolasa; 9, piruvato quinasa; 10, lactato deshidrogenasa. (B) Fermentación heteroláctica de la glucosa. 1, hexoquinasa; 2, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa; 3, 6-fosfo-gluconato deshidrogenasa; 4, ribulosa-3-fosfato epimerasa; 5, fosfocetolasa; 6, acetaldehído deshidrogenasa; 7, alcohol deshidrogenasa; 8, piruvato quinasa; 9, lactato deshidrogenasa; 10, acetato quinasa.

### **1.2.1.2. Metabolismo de ácidos orgánicos**

Las bacterias lácticas son capaces de metabolizar los principales ácidos orgánicos presentes en los mostos de manzana. Algunos de estos ácidos provienen directamente de la manzana mientras que otros son producidos por levaduras, bacterias acéticas o las propias BAL. El principal ácido orgánico presente en los mostos es el ácido málico cuyo contenido varía entre 0,3-0,7% (p/v) en manzana sidrera del País Vasco y Asturias. El siguiente ácido en importancia cuantitativa es el ácido quínico, cuyo contenido varía ampliamente entre las variedades de manzana, en cantidades comprendidas entre 0,03-0,39% (p/v), y en menor medida el ácido cítrico (Beech y Carr, 1977; Blanco-Gomis et al., 1988; Santos, 2005). En concentraciones mucho más bajas se encuentran el ácido siquímico, clorogénico y *p*-cumarilquínico, y los ácidos galacturónico y caféico. Como consecuencia de la actividad microbiana durante la fermentación de los mostos aparecen otros ácidos como el pirúvico, L- o D-láctico, succínico, acético, glucónico o α-cetoglutarato (Whiting, 1976; Del Campo et al.; 2003; Del Campo et al., 2008).

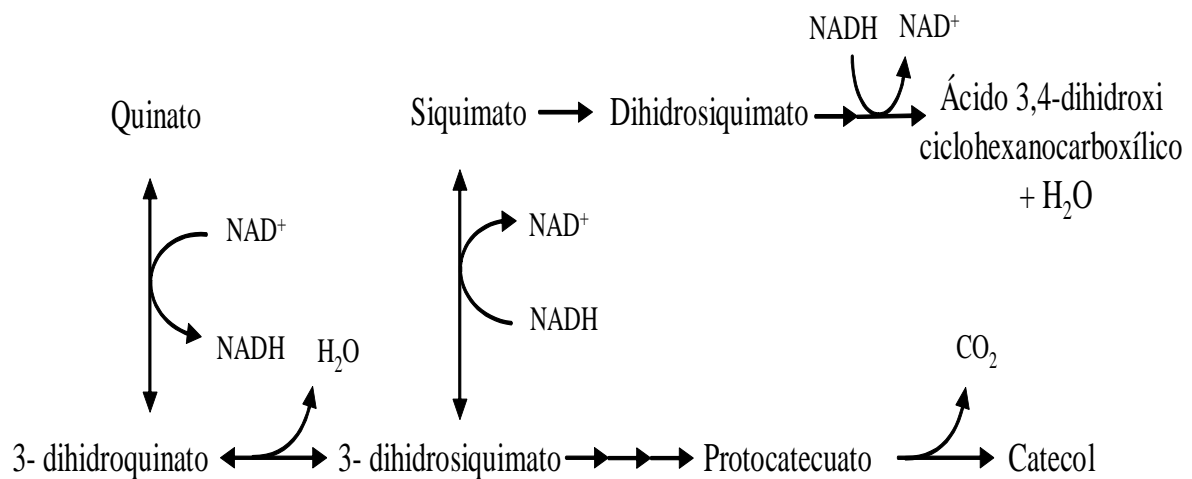
#### ***1.2.1.2.1. Metabolismo del ácido málico***

Como ya se ha mencionado anteriormente, la fermentación maloláctica (FML) se realiza espontáneamente y al mismo tiempo que la fermentación alcohólica. La FML consiste en la descarboxilación del ácido L-málico en ácido L-láctico y CO<sub>2</sub> por ciertas especies de BAL. Esta reacción es catalizada por la enzima maloláctica, que requiere como cofactores NAD<sup>+</sup> e iones divalentes, siendo el Mn<sup>2+</sup> el más efectivo (Ribéreau-Gayon et al., 2006). Como consecuencia de esta fermentación, se detecta una disminución de la acidez y se sustituye el astringente sabor del ácido málico por otro más suave, el del ácido láctico.

#### ***1.2.1.2.2. Metabolismo del ácido quínico***

Este ácido se metaboliza durante el almacenamiento y maduración de la sidra, una vez realizada la FML (Beech y Carr, 1977; Blanco-Gomis et al., 1991). Las BAL heterofermentativas reducen el ácido quínico a ácido dihidroquínico. En las homofermentativas, por su parte, la reducción continúa hasta el ácido 3,4-

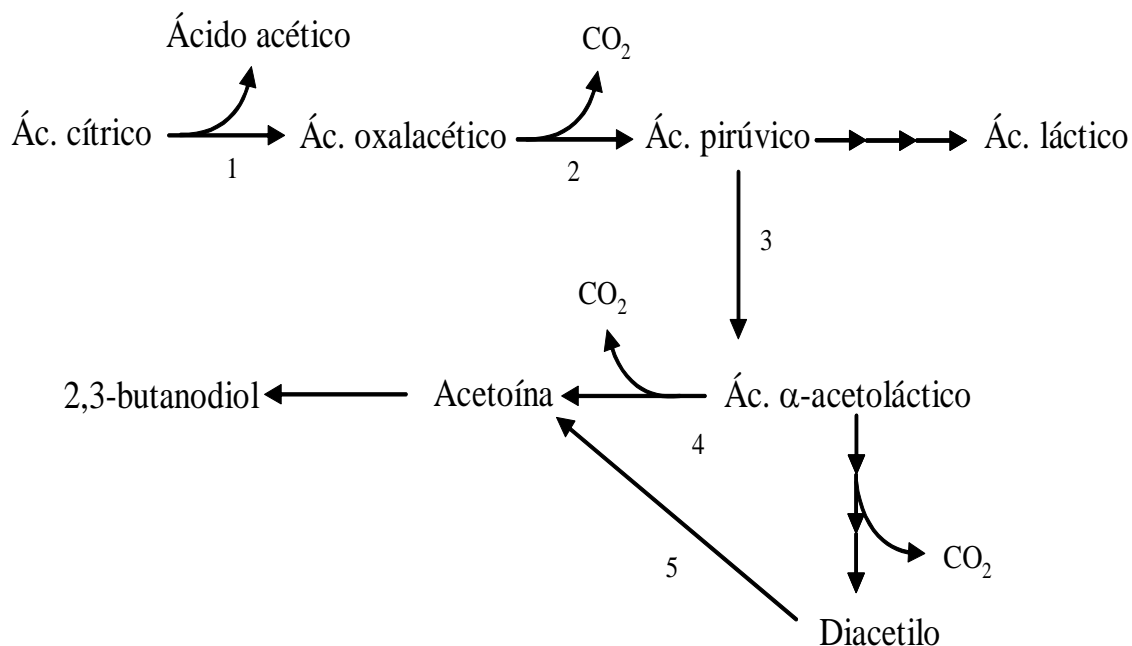
dihidroxiciclohexano-1-carboxílico (Figura 1.2) (Whiting y Coggins, 1971). El ácido siquímico es un intermediario de la ruta de degradación del ácido quínico por lo que es reducido a los mismos productos. Por otro lado, algunas especies de BAL, como *L. plantarum*, pueden oxidar el ácido siquímico a catecol (Carr y Whiting, 1971), el cual afecta negativamente a la calidad de la sidra.



**Figura 1.2.** Metabolismo del ácido quínico por BAL.

### 1.2.1.2.3. Metabolismo del ácido cítrico

Algunas bacterias lácticas degradan el ácido cítrico (cocos heterofermentativos y bacilos homofermentativos). La primera etapa del metabolismo consiste en la escisión de la molécula de citrato por la citratoliasa, generando ácido acético y oxalacetato (Figura 1.3). Posteriormente, el oxalacetato se descarboxila a piruvato, que es el punto de partida de diferentes vías metabólicas, de las cuales se pueden obtener ácido acético, ácido láctico, y lo que es más interesante desde el punto de vista organoléptico, diacetilo, acetoína y 2,3-butanodiol (Figura 1.3). El primer compuesto es particularmente interesante debido a que aporta una nota de olor a mantequilla (Ribéreau-Gayon et al., 2006).

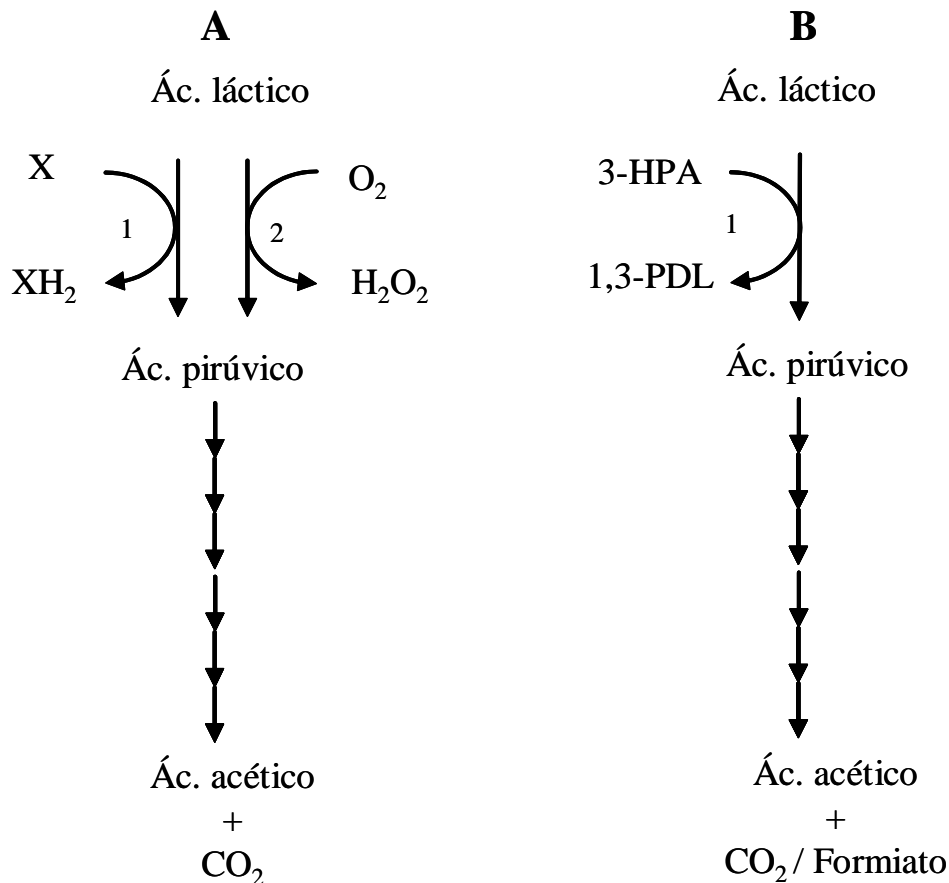


**Figura 1.3.** Ruta mayoritaria del metabolismo del ácido cítrico en BAL. 1, citrato liasa; 2, oxalacetato descarboxilasa; 3, α-acetolactato sintasa; 4, α-acetolactato descarboxilasa; 5, diacetil reductasa.

#### 1.2.1.2.4. Metabolismo del ácido láctico

Las bacterias lácticas se caracterizan por producir ácido láctico a partir de diferentes sustratos, como carbohidratos, ácidos orgánicos y aminoácidos. Sin embargo, algunas estirpes BAL son capaces de utilizar el ácido láctico como fuente de energía. El catabolismo del lactato puede ocurrir en presencia o ausencia de oxígeno, aunque en ambos casos, el ácido láctico es oxidado a piruvato, el cual se transforma posteriormente en ácido acético, con el correspondiente aporte de energía para la célula.

En presencia de oxígeno, el ácido láctico se transforma en piruvato en una reacción catalizada por una lactato oxidasa, sin embargo, también puede ser catalizada por una lactato deshidrogenasa independiente de NAD<sup>+</sup>, como en el caso de *L. curvatus*, *L. sake*, *L. casei* y *L. plantarum* (Figura 1.4 A) (Liu, 2003). Por el contrario, en condiciones de anaerobiosis, la misma transformación es catalizada únicamente por una lactato deshidrogenasa independiente de NAD<sup>+</sup> en cepas de *L. brevis*, *L. buchneri* y *L. plantarum* (Figura 1.4 B). En este último caso, estos lactobacilos utilizan otros aceptores de electrones, como por ejemplo 3-hidroxi propionaldehído (procedente de la degradación del glicerol), siquimato u oxalacetato.



**Figura 1.4.** Ruta propuesta para el catabolismo aeróbico (A) y anaeróbico (B) del ácido láctico. 1) lactato deshidrogenasa independiente de NAD<sup>+</sup>; 2) lactato oxidasa. 3-HPA, 3-hidroxipropionaldehído; 1,3-PDL, 1,3-propanodiol.

### 1.2.1.3. Metabolismo de aminoácidos

A diferencia de las levaduras, las bacterias lácticas son, generalmente, incapaces de utilizar las sales amoniacales como fuente de nitrógeno, por lo que necesitan de aminoácidos o péptidos cortos para su crecimiento (García, 1992). La cantidad de aminoácidos libres en mostos de manzana (entre 44 y 333 mg L<sup>-1</sup>) es mucho menor a la detectada en los mostos de uva, por lo que la sidra presenta un menor contenido en aminoácidos en comparación con los del vino (Moreno-Arribas y Polo, 2009). Los aminoácidos de las manzanas se dividen en dos grupos. Por un lado se encuentran el ácido aspártico, ácido glutámico, asparragina, serina, glutamina y α-alanina, los cuales constituyen el 90% de los aminoácidos totales, y por otro lado, la glicina, treonina, ácido γ-amino butírico (GABA), fenilalanina, isoleucina, leucina, ornitina, β-alanina, lisina, histidina, homoserina y arginina (Blanco-Gomis et al., 1990). La concentración de

aminoácidos del mosto de manzana es considerablemente superior a la de la sidra. Sin embargo, la sidra presenta una mayor variedad de aminoácidos, siendo la serina,  $\alpha$ -alanina y leucina los más abundantes (Beech y Carr, 1977).

Los aminoácidos libres de los mostos tienen gran importancia, debido a que son una fuente de nitrógeno tanto para las levaduras, en la fermentación alcohólica, como para las bacterias, en la fermentación maloláctica. Como ocurre durante la elaboración del vino, en la primera etapa de la fermentación del mosto de manzana se consumen prácticamente la totalidad de los aminoácidos libres, aunque posteriormente, reaparecen en pequeñas cantidades debido a la excreción y autólisis de las levaduras. En el caso de la sidra, se ha reportado que los aminoácidos que aumentan su concentración en estos procesos son la leucina, lisina, arginina, fenilalanina y tirosina (Burroughs, 1957).

El catabolismo de aminoácidos puede resultar de gran importancia para la calidad de la sidra, debido a la producción de compuestos de interés desde el punto de vista aromático, especialmente, aldehídos y alcoholes. Sin embargo, en determinados casos, algunos aminoácidos pueden dar lugar a compuestos indeseables, como las aminas biógenas.

#### ***1.2.1.3.1. Producción de aminas biógenas***

Las aminas biógenas son bases orgánicas de bajo peso molecular con actividad biológica, que se encuentran de forma habitual en alimentos y bebidas fermentadas (Landete et al., 2007). Éstas pueden ser sintetizadas por las enzimas presentes en la materia prima o, lo que es más habitual, ser producidas mediante la descarboxilación de los correspondientes aminoácidos precursores gracias a las enzimas aminoácido descarboxilasas de los microorganismos presentes en alimentos (Silla-Santos, 1996) (Tabla 1.1). En consecuencia, las aminas biógenas pueden ser detectadas tanto en alimentos crudos como en procesados (Ten Brink et al., 1990; Halász et al., 1994). Por otro lado, se ha comprobado que ciertas aminas alifáticas pueden formarse *in vivo* por la aminación de los aldehídos correspondientes (Maijala et al., 1993).



**Tabla 1.1.** Aminas biógenas, aminoácidos precursores y enzimas responsables de su síntesis.

Amina biogéna	Precursor	Enzima
Histamina	Histidina	Histidina descarboxilasa
Tiramina	Tirosina	Tirosina descarboxilasa
Putrescina	Ornitina	Ornitina descarboxilasa
Feniletilamina	Fenilalanina	Fenilalanina/Tirosina descarboxilasa
Cadaverina	Lisina	Lisina descarboxilasa
Triptamina	Triptófano	Triptófano descarboxilasa

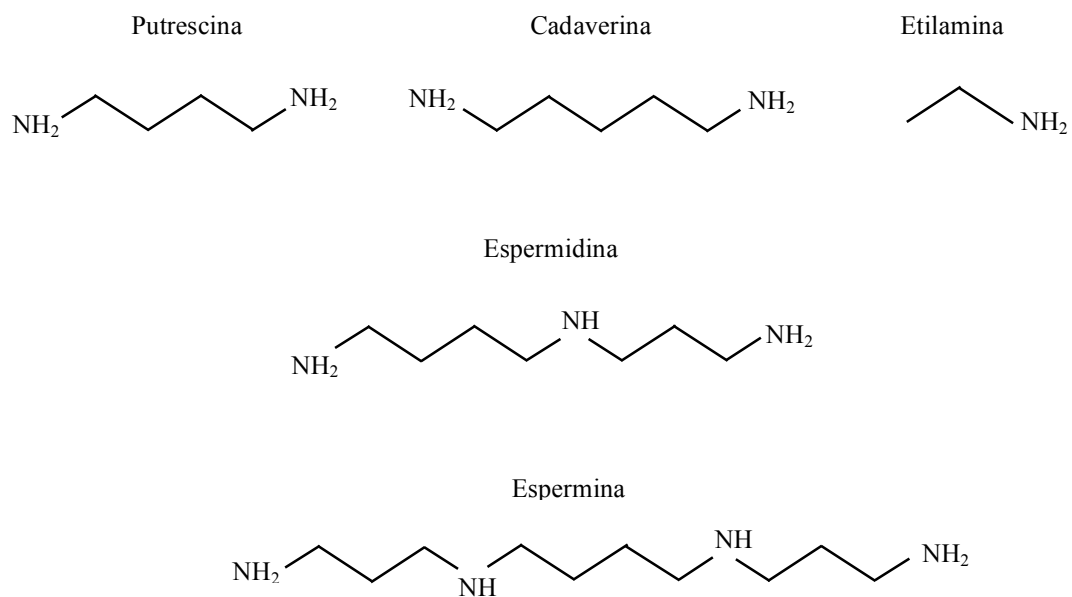
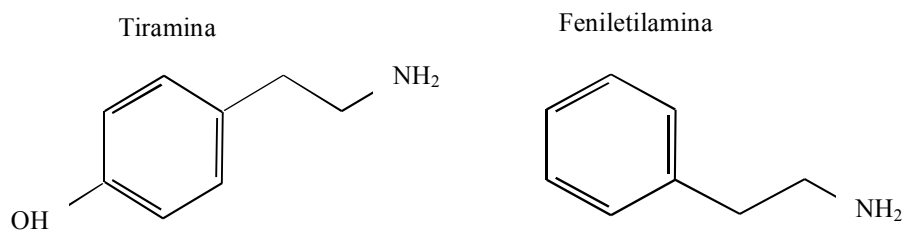
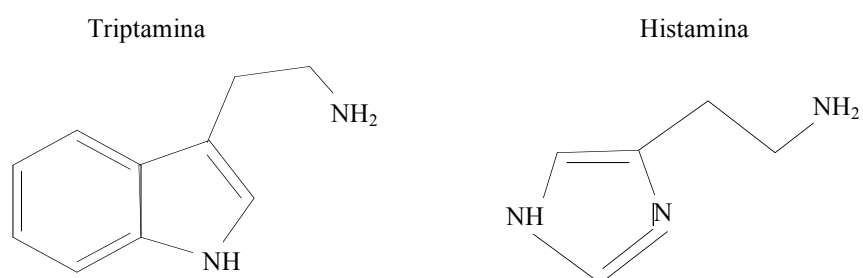
Las aminas biógenas se pueden clasificar dependiendo de su estructura química en alifáticas (putrescina, cadaverina, etilamina, espermina y espermidina), aromáticas (tiramina y feniletilamina) y heterocíclicas (histamina y triptamina) (Figura 1.5). Las funciones biológicas de estas aminas son muy diversas, algunas como la putrescina, espermina, espermidina y cadaverina, son componentes indispensables de los organismos vivos por su importancia en la síntesis de proteínas y, probablemente, en la estabilización de membranas (Bardócz et al., 1993; Maijala et al., 1993; Halász et al., 1994). Además, las aminas biógenas participan en la regulación de la temperatura corporal, el volumen y pH estomacal y la actividad cerebral, entre otros. Sin embargo, la ingesta de alimentos y/o bebidas con elevadas cantidades de estos compuestos puede tener efectos tóxicos sobre el consumidor (Shalaby, 1996).

Las aminas biógenas más abundantes en alimentos y bebidas fermentadas, son la histamina, tiramina, putrescina y cadaverina (Silla-Santos, 1996). Una parte importante de las intoxicaciones alimentarias se deben a la ingesta de histamina y tiramina. La intoxicación por histamina ocurre frecuentemente en relación al consumo de pescado, principalmente de la familia *Scombridae*, con elevados niveles de esta amina (Lehane y Olley, 2000). La histamina ejerce sus efectos tóxicos induciendo la dilatación de vasos sanguíneos, capilares y arterias, dando lugar a dolor de cabeza, hipotensión, problemas digestivos y edemas (Taylor, 1986). La tiramina, es la amina biogéna más frecuente en alimentos fermentados y los casos de intoxicación se han relacionado principalmente con el consumo de quesos (Stratton et al., 1991). Esta produce un efecto indirecto, liberando y aumentando la concentración de noradrenalina en sangre, que actúa como vasoconstrictor,

originando dolor de cabeza, hipertensión y migraña. Finalmente, las diaminas, putrescina y cadaverina, aunque no son tóxicas por sí mismas, dificultan la detoxificación de la histamina y tiramina con lo que se potencian sus efectos tóxicos. Además, la putrescina puede resultar perjudicial para la salud debido a que puede reaccionar con nitrito produciendo nitrosopirrolidina, una nitrosamina heterocíclica cancerígena (Wathersen et al., 1975).

La intoxicación alimentaria producida por las aminas biógenas puede ser más severa en consumidores sensibles, los cuales muestran una reducida actividad de las enzimas mono- y diamino oxidas (Bodmer et al., 1999), responsables del catabolismo de las aminas. Además, es de destacar que la ingesta de alcohol puede aumentar los efectos nocivos producidos por las aminas biógenas (Maynard and Schenker, 1996).

En el capítulo 3 del presente trabajo se ha estudiado la presencia de aminas biógenas en sidra natural del País Vasco, con el objeto de conocer mejor el origen y los factores implicados en su síntesis y acumulación, así como el riesgo potencial que representan para la calidad y seguridad del producto. Para ello, se ha determinado el contenido en aminas biógenas de la sidra natural comercializada, los microorganismos responsables la síntesis de aminas y la influencia de diferentes factores sobre su acumulación durante la elaboración industrial de la sidra.

**Aminas alifáticas****Aminas aromáticas****Aminas heterocíclicas****Figura 1.5.** Estructura química de las principales aminas biógenas.

#### 1.2.1.4. Síntesis de exopolisacáridos

Ciertas bacterias lácticas son capaces de secretar exopolisacáridos (EPS), que pueden provocar en sidras y vinos la alteración denominada ahilado. Estos pueden ser homopolisacáridos (HoPSs)- o heteropolisacáridos (HePSs) y en sidras se han descrito bacterias lácticas productoras de ambos tipos de polímeros (Dueñas-Chasco et al., 1997; Dueñas-Chasco et al., 1998; Ibarburu et al., 2007).

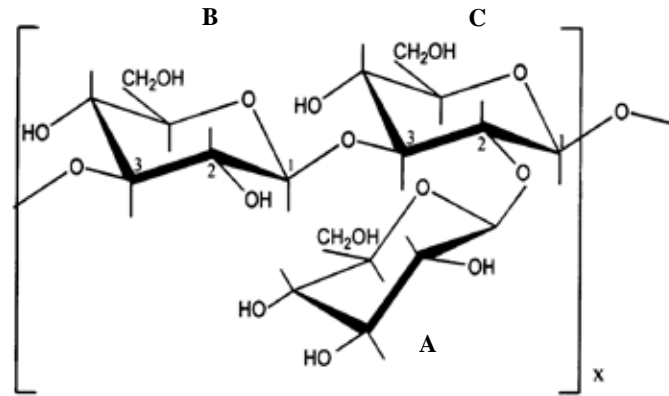
Con respecto a la síntesis de heteropolisacáridos, únicamente se ha descrito la producción por *O.oeni* I4 y *L. suebicus* CUPV225 y CUPV226, aisladas de sidras del País Vasco. *O. oeni* I4 sintetiza dos tipos de heteropolisacáridos, uno compuesto por galactosa, glucosa y ramnosa y el otro formado por galactosa y glucosa (Ibarburu et al., 2007). Por otra parte, las dos cepas de *L. suebicus* sintetizan un HePS constituido por glucosa, galactosa y N-acetil-glucosamina (Ibarburu, 2009). Estos monosacáridos, en particular glucosa y galactosa, se han descrito como los más abundantes en los HePSs sintetizados por BAL aislados de productos lácteos (Ruas-Madiedo et al., 2009).

La síntesis de los HePSs por bacterias lácticas aisladas de sidra no ha sido estudiada todavía, pero en otras BAL se ha propuesto que se realiza a nivel de membrana, y consiste en la polimerización extracelular de las unidades repetitivas, sintetizadas en el lado citosólico de la membrana plasmática. En ella intervienen glicosiltransferasas (GTF) de membrana que catalizan la transferencia secuencial de los monosacáridos desde los azúcares activados (UDP-glucosa, UDP-galactosa o dTDP-ramnosa) a la unidad repetitiva en formación. El proceso de síntesis de la unidad repetitiva comienza con la acción de una “priming”-GTF que une el azúcar activado a una molécula transportadora, situada en la membrana plasmática (probablemente un lípido de tipo undecaprenil-fosfato, C<sub>55</sub>-P). Posteriormente, otras glicosiltransferasas catalizan la adición secuencial de los monosacáridos y aunque se desconoce el mecanismo preciso, la unidad repetitiva sintetizada se transloca al espacio periplásmico probablemente mediante la actividad de una proteína del tipo flipasa. Finalmente, una polimerasa cataliza la unión de las unidades repetitivas, terminando el proceso con la retranslocación y defosforilación del lípido transportador (Ruas-Madiedo et al., 2009).

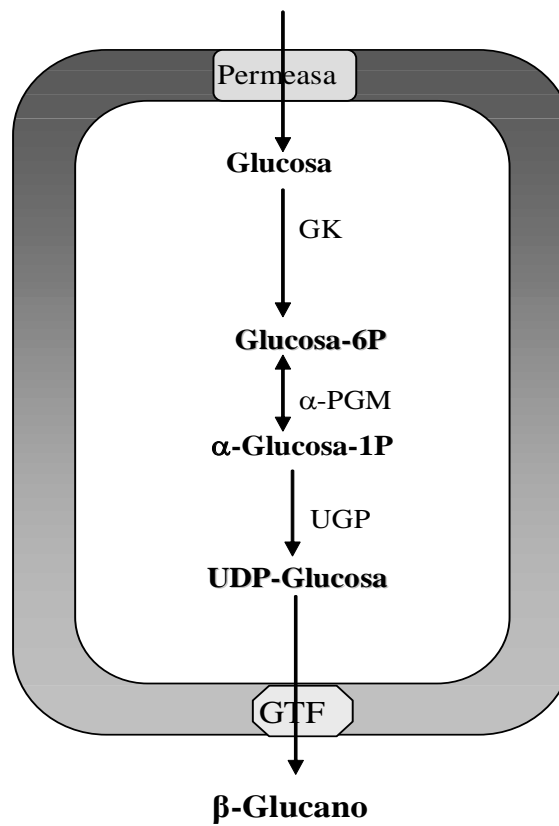
En relación a la síntesis de HoPSs por BAL, los dos grupos mayoritarios son los  $\alpha$ -D-glucanos y  $\beta$ -D-fructanos, los cuales se sintetizan a partir de sacarosa mediante la acción de glicansacararas extracelulares. Estas enzimas utilizan la energía del enlace glicosídico de la sacarosa para transferir un residuo de glucosa o fructosa a un aceptor, oligo- o polisacárido. En sidras, se ha descrito que *L. diolivorans* G77 es capaz de producir un  $\alpha$ -glucano (Dueñas-Chasco et al., 1998), pero el mecanismo de síntesis es totalmente desconocido.

Sin embargo, una gran parte de las cepas productoras de HoPSs en sidras producen  $\beta$ -glucanos, los cuales presentan siempre un trisacárido como unidad repetitiva con enlaces  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3) en la cadena principal, estando una de las glucosas sustituida en posición 2 (Figura 1.6). Su síntesis ha sido descrita tanto en *L. diolivorans* G77 como en cepas de la mayor parte de las especies habituales en sidra: *O. oeni*, *L. suebicus*, *L. collinoides* y *P. parvulus* (Dueñas-Chasco et al., 1997; Dueñas-Chasco et al., 1998; Ibarburu et al., 2007; Ibarburu, 2009). La síntesis de este  $\beta$ -glucano ha sido también descrita en cepas de *P. parvulus* y *O. oeni* aisladas de vinos (Llaubères et al., 1990; Dols-Lafargue et al., 2008).

Con respecto a la síntesis de estos  $\beta$ -glucanos, no se ha descrito la implicación de glicansacararas extracelulares y la síntesis se ha atribuido a una única glicosiltransferasa (GTF) unida a membrana (Werning et al., 2006; Dols-Lafargue et al., 2008). La participación de esta enzima ha sido verificada mediante experiencias de clonaje del gen *gtf* en *Lc. lactis* (Werning et al., 2008) y además se ha comprobado que la síntesis es dependiente de azúcares activados en forma de UDP-glucosa (Walling et al., 2005; Werning et al., 2006). Velasco et al. (2007) estudiaron la producción del (1,3)- $\beta$ -D-glucano por *P. parvulus* 2.6 a partir de glucosa, fructosa y maltosa. La glucosa constituye la fuente carbonada más adecuada y la Figura 1.7 muestra la vía propuesta para la biosíntesis del  $\beta$ -glucano a partir de este azúcar. Asimismo, estos autores encontraron que la actividad de la enzima  $\alpha$ -fosfoglucomutasa ( $\alpha$ -PGM) está correlacionada con el rendimiento en polisacárido, y que la actividad de la UDP-glucosa pirofosforilasa (UGP) parece constituir el principal cuello de botella para su síntesis.



**Figura 1.6.** Estructura del (1,3)(1,2)- $\beta$ -D-glucano sintetizado por *P. parvulus* 2.6 (Dueñas-Chasco et al., 1997).



**Figura 1.7.** Vía propuesta para la síntesis del  $\beta$ -glucano en *P. parvulus* 2.6 a partir de glucosa; glicosiltransferasa (GTF), glucoquinasa (GK),  $\alpha$ -fosfoglucomutasa ( $\alpha$ -PGM), UDP-glucosa pirofosforilasa (UGP).

### **1.3. ALTERACIONES DE LA SIDRA NATURAL ORIGINADAS POR BACTERIAS LÁCTICAS**

Como se ha mencionado anteriormente, la sidra natural no se estabiliza microbiológicamente antes del embotellado, por lo que suelen presentar recuentos elevados de bacterias lácticas. Entre las alteraciones más frecuentes producidas por ellas y que originan más pérdidas económicas al sector sidrero, se pueden citar la acetificación, el ahilado y el picado acroléico o amargor, por orden de importancia (Dueñas et al., 1994; Dueñas et al., 1995; Garai-Ibabe et al., 2008).

#### **1.3.1. Acetificación**

La acetificación se caracteriza por contenidos elevados de ácido acético en la sidra y superiores a lo legalmente establecido ( $2 \text{ g L}^{-1}$  ácido acético). Si bien las levaduras forman una pequeña cantidad de este compuesto durante la fermentación alcohólica, las bacterias lácticas heterofermentativas, que constituyen la microbiota predominante durante el periodo de almacenamiento, pueden incrementar de manera significativa la acidez volátil de las sidras. Las BAL pueden consumir varios sustratos carbonados tales como azúcares residuales, glicerol y varios ácidos orgánicos, produciendo ácido acético (Dueñas et al., 1994).

#### **1.3.2. Picado acroléico o Amargor**

La alteración del picado acroléico o amargor es debida a una de las vías de degradación del glicerol por ciertas especies de bacterias lácticas. El glicerol lo producen las levaduras durante las primeras etapas de la fermentación alcohólica y su degradación tiene una influencia negativa en la calidad del producto, dado que contribuye a dar cuerpo y untuosidad a sidras y vinos.

Se han descrito tres vías metabólicas de degradación del glicerol en bacterias lácticas presentes en vinos (Figura 1.8): 1) vía de la glicerol quinasa, 2) vía de la glicerol deshidrogenasa y 3) vía de la glicerol deshidratasa, siendo esta última la implicada en el desarrollo del picado acroléico.

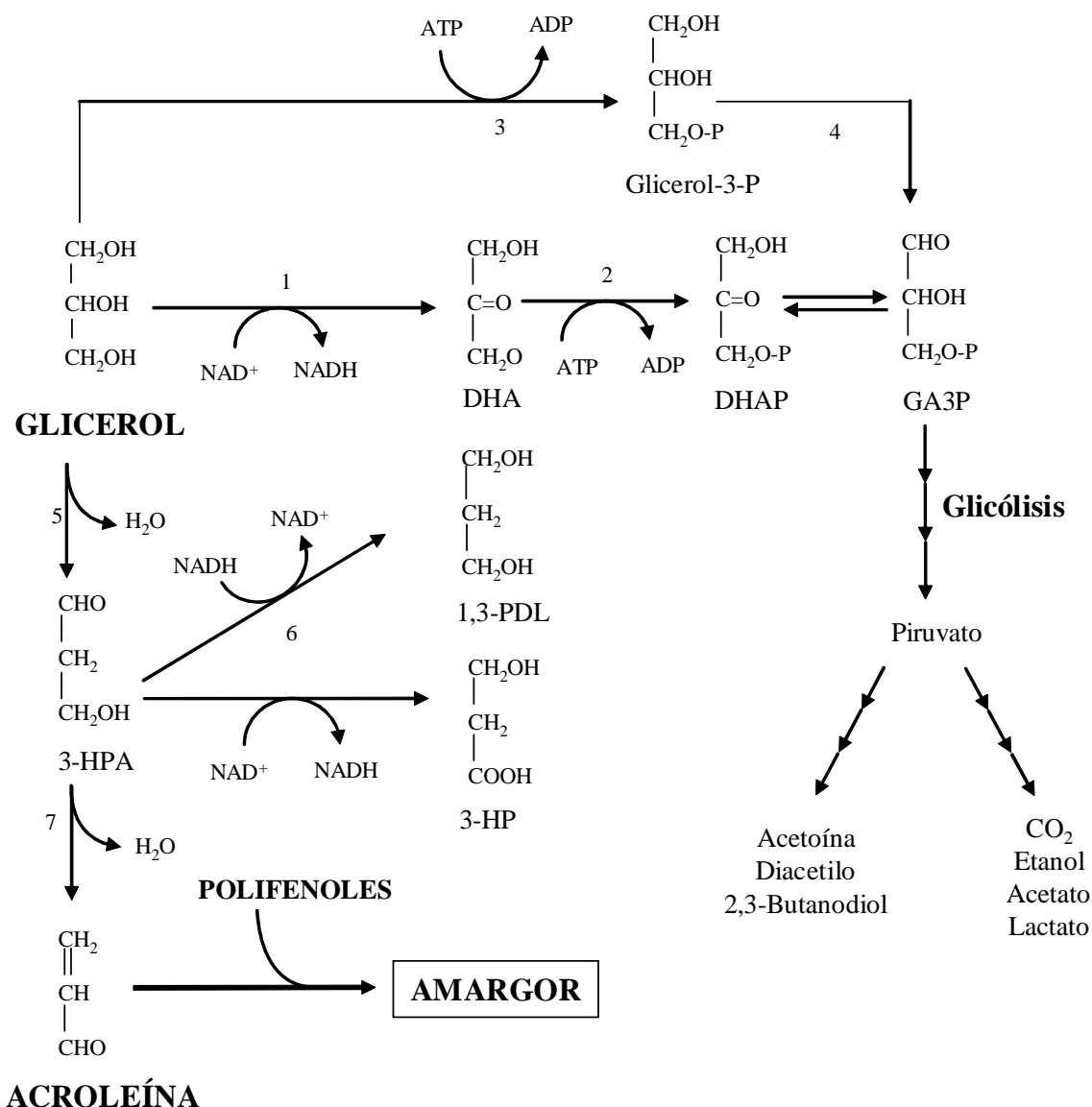
En la primera vía, la enzima glicerol quinasa fosforila el glicerol a glicerol-3-P, que posteriormente se oxida a gliceraldehído-3-P. En la vía glicerol deshidrogenasa, el glicerol se transforma en dihidroxiacetona, la cual es fosforilada a dihidroxiacetona-P. De ambas vías se obtiene finalmente piruvato, el cual puede dar origen a diferentes compuestos tales como ácido láctico, etanol, 2,3-butanodiol, ácido acético, acetoína y diacetilo, pudiendo estos tres últimos afectar negativamente a las características organolépticas de la bebida (Pasteris y Strasser de Saad, 2009).

En la tercera vía el glicerol se deshidrata, por la acción de una glicerol/diol deshidratasa a 3-hidroxi propionaldehído (3-HPA), el cual se reduce a 1,3-propanodiol (1,3-PDL), mediante una 1,3-propanodiol deshidrogenasa, o se oxida a ácido 3-hidroxi propiónico (3-HP) (Figura 1.8). A partir del 3-HPA se puede formar acroleína mediante deshidratación química espontánea en condiciones de pH ácido o temperatura elevada. Este compuesto puede reaccionar con los polifenoles de vinos o sidras, generando compuestos de sabor amargo que dan origen al picado acroléico (Ribéreau-Gayon et al., 2006). Con respecto al 3-HPA, se ha comprobado que en solución acuosa se puede dimerizar y/o hidratar de forma reversible (Figura 1.9), dando lugar a un equilibrio entre las tres formas (3-HPA, HPA-hidrato y HPA-dímero), que se conoce como “reuterina o sistema-HPA” (Vollenweider y Lacroix, 2004) la cual presenta un efecto antibacteriano (Gram+ y Gram-) y antifúngico (Talarico y Dobrogosz, 1989).

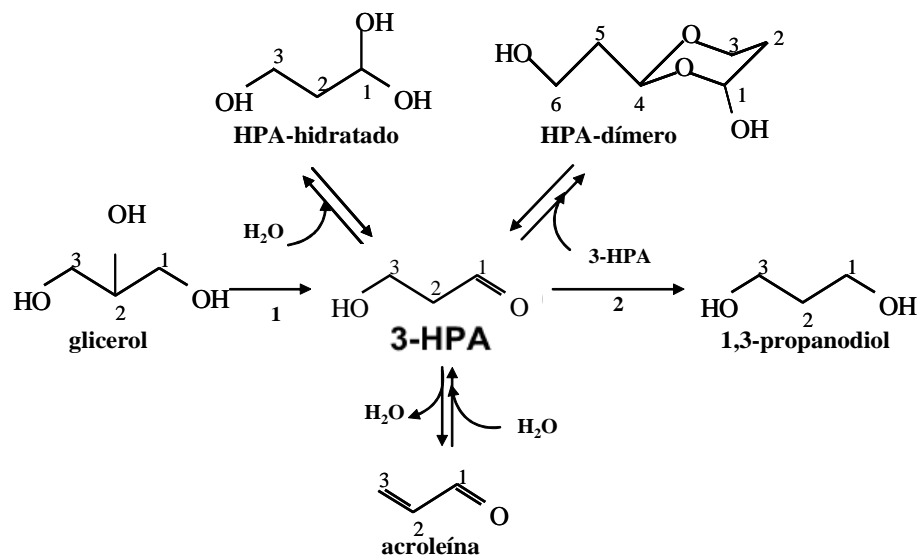
En cuanto a la microbiota láctica implicada, se han descrito diferentes lactobacilos heterofermentativos que presentan esta última vía metabólica. Entre ellos y aislados de vino se encuentran cepas de *L. brevis* (Schütz y Radler, 1984), *L. hilgardii* y *L. diolivorans* (Gorga et al., 2002). Por otra parte, en sidras francesas se han identificado cepas de *L. collinoides* (Sauvageot et al., 2000; Claisse y Lonvaud-Funel, 2000).



En el Capítulo 2 del presente trabajo, se ha identificado la microbiota implicada en el picado acroleico de la sidra natural vasca. Además, se ha estudiado la influencia del tipo y concentración del azúcar utilizado como fuente energética, pH del medio de cultivo y temperatura de incubación sobre el consumo de glicerol y síntesis de 3-hidroxi propionaldehído por una cepa de *Lactobacillus collinoides*.



**Figura 1.8.** Metabolismo del glicerol por parte de cepas BAL. 1) glicerol deshidrogenasa y dihidroxiacetona quinasa, 2) triosa fosfato isomerasa, 3) glicerol quinasa, 4) glicerol 3-P deshidrogenasa, 5) Glicerol deshidratasa, 6) 1,3-propanodiol deshidrogenasa y 7) deshidratación química espontánea. 3,HPA, 3-hidroxi propionaldehído; 1,3-PDL, 1,3-propanodiol; 3-HP, ácido hidroxipropiónico; DHA, dihidroxiacetona; GA3P, gliceraldehído-3-P.



**Figura 1.9.** Formación de acroleína a partir de glicerol y el sistema-HPA o reuterina. 1) glicerol deshidratasa 2) 1,3-propanodiol deshidrogenasa.

### 1.3.3. Ahilado o enfermedad de la grasa

Esta alteración ha sido descrita en sidra (Dueñas et al., 1995), vino (Lonvaud-Funel, 1999) y cerveza (Van Oevelen y Verachtert, 1979) y se caracteriza por el aumento de la viscosidad y la consistencia de las bebidas, como consecuencia de la producción de exopolisacáridos por diferentes estirpes de bacterias lácticas. A diferencia de otras alteraciones, no varía el sabor del producto ni representa un riesgo para la salud. Sin embargo, el hecho de que la bebida presente un aspecto aceitoso, hace que sea rechazada por el consumidor.

En sidras y vinos ahilados, se han descrito diversas cepas de BAL productoras de exopolisacáridos, tales como *Streptococcus mucilaginosus* (Luthi, 1957), y diversas especies de los géneros *Leuconostoc* (Beech y Carr, 1977), *O. oeni* (Ibarburu et al., 2007; Dols-Lafargue et al., 2008), *Lactobacillus* (Dueñas et al., 1995) y *Pediococcus* (Lonvaud-Funel y Joyeux, 1988; Manca de Nadra et al., 1995; Fernández et al., 1996). Como excepción, una cepa EPS<sup>+</sup> de la especie *Bacillus licheniformis* fue aislada de una sidra francesa alterada (Larpin et al., 2002).

En las sidras vascas las especies más frecuentemente encontradas han sido *P. parvulus* y *L. diolivorans* y en menor proporción *L. suebicus*, *L. collinoides* y *O. oeni* (Ibarburu, 2009). Como se ha comentado anteriormente, todas ellas sintetizan el mismo (1,3)- $\beta$ -D-glucano (Figura 1.6) pero, en el caso de cepas de *Lactobacillus* y *Oenococcus*, sintetizan además otro tipo de exopolisacárido.

Se ha estudiado además la localización del gen *gtf*, que codifica la síntesis de la glicosiltransferasa de membrana, y se han encontrado diferentes ubicaciones genómicas en función de la cepa: i) integrado en el cromosoma bacteriano como en *O. oeni* I4 y *O. oeni* IOEB0205, obtenidos de sidra y vino, respectivamente (Werning et al., 2006; Dols-Lafargue et al., 2008), ii) en un plásmido pequeño de 5,5 Kb en *P. damnosus* (pF8801) (Gindreau et al., 2001) y *L. diolivorans* G77 (pLD1) (Werning et al., 2006) aislados de vino y sidra, respectivamente y finalmente iii) en un plásmido de 35 Kb en *P. parvulus* 2.6 procedente de sidra (Werning et al., 2006).

La determinación de la secuencia nucleotídica de los genes *gtf* en *L. diolivorans* G77 y *O. oeni* I4 reveló que poseen un 100 y un 98,8% de identidad, respectivamente, con la secuencia del gen en *P. parvulus* 2.6 (Ibarburu, 2009). Esto indica que el gen está altamente conservado en las cepas alterantes productoras del (1,3)(1,2)- $\beta$ -D-glucano en sidra. Con estos antecedentes y con el fin de detectar esta microbiota alterante antes del embotellado, se diseñaron dos métodos de PCR que están basados en el gen *gtf*, uno a tiempo final y otro a tiempo real (RT-PCR) (Ibarburu, 2009).

#### **1.4. BACTERIAS LÁCTICAS PRODUCTORAS DE EXOPOLISACÁRIDOS E INDUSTRIA ALIMENTARIA**

Las bacterias lácticas se utilizan en la fermentación de muchos alimentos, ya que mejoran su conservación así como su valor nutricional y características sensoriales. En los últimos años, las bacterias lácticas productoras de exopolisacáridos han recibido una gran atención. Se utilizan como bioespesantes naturales producidos *in situ*, como alternativa al empleo de aditivos texturizantes, tales como carbohidratos de plantas (almidón, pectina y goma guar), hidrocoloides animales (gelatina y caseína), o biopolímeros bacterianos (xantanos, gelanos o el (1,3)- $\beta$ -D-glucano curdlano) (Sutherland, 2001).

En esta línea, se ha comprobado que las BAL EPS<sup>+</sup> utilizadas como cultivos iniciadores o coadyuvantes mejoran las propiedades reológicas y la textura de varios productos lácteos (yogures, leches fermentadas, quesos bajos en grasa y postres lácteos) (De Vuyst y Vaningelgem, 2003; Torino et al., 2005), así como de la masa ácida de panadería (Tieking et al., 2003). La presencia de estas cepas aumenta la viscosidad y estabilidad del producto y proporciona una mayor capacidad de retención de agua, evitándose así la sinéresis (Duboc y Mollet, 2001).

Por otro lado, en los últimos años se ha observado una tendencia creciente en los consumidores a demandar alimentos con valores nutricionales añadidos y efectos positivos sobre la salud (Waldherr y Vogel, 2009), alimentos que han sido denominados como funcionales. Este tipo de alimentos pueden obtenerse mediante el uso de microorganismos probióticos y/o la adición de aditivos prebióticos. Los probióticos se definen como organismos vivos no patógenos, que al ser administrados en cantidades adecuadas tienen un efecto positivo en la salud del consumidor (FAO/WHO, 2002). Por otra parte, los aditivos prebióticos son ingredientes no digeribles pero fermentables por la microbiota intestinal y que estimulan selectivamente el crecimiento y/o la actividad de un número limitado de bacterias en el colon, por lo que mejoran la salud del huésped (Gibson y Roberfroid, 1995).

En esta línea de desarrollo de nuevos alimentos, se ha sugerido que los EPSs producidos por algunas bacterias lácticas pueden ejercer efectos beneficiosos para la salud humana tales como: protección contra úlceras estomacales y colitis, efecto prebiótico, capacidad de reducir los niveles de colesterol, así como de modular la respuesta inmunitaria y en consecuencia, presentar actividad anticarcinogénica (Ruas Madiedo et al., 2008). En la actualidad, gran parte de los microorganismos probióticos comercializados presentan la capacidad de producir exopolisacáridos (Salminen et al., 1998) y pertenecen a los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*. Este hecho sugiere que las propiedades beneficiosas de estos microorganismos podrían estar relacionadas con las actividades biológicas de estos polímeros.

Como se ha comentado anteriormente, algunas BAL aisladas de sidras y vinos ahilados sintetizan (1,3)- $\beta$ -D-glucanos, sustituidos en posición 2. Éstos pertenecen a un

grupo muy heterogéneo de polisacáridos, los (1,3)- $\beta$ -D-glucanos, producidos tanto por organismos procariotas como eucariotas. En los últimos años han sido intensamente estudiados, debido fundamentalmente a sus actividades biológicas beneficiosas y por considerarse modificadores de la respuesta biológica.

Teniendo en cuenta estos antecedentes, en el marco de la presente Tesis Doctoral se ha estudiado la producción de (1,3)(1,2)- $\beta$ -D-glucanos por cepas de bacterias lácticas aisladas de sidra y se ha examinado el potencial probiótico de algunas de las cepas seleccionadas (Capítulo 4).

## 1.5. BIBLIOGRAFÍA

- Axelsson L.T. (2004). Lactic Acid Bacteria: Classification y Physiology p. 1-66. En: S. Salminen, A. von Wright y A. Ouwehand (Eds.), Lactic Acid Bacteria. Microbiological and functional aspects. Third Edition, revised and expanded. Marcel Dekker, Inc, New York.
- B.O.E. 1979. Orden del 28/8/1979. Reglamentación de las sidras y otras bebidas derivadas de la manzana. Madrid.
- Bardocz S., Grant G., Brown D. S., Ralph A. y Pusztai A. 1993. Polyamines in food - implications for growth and health. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 4:66-71.
- Beech F. W. y Carr J. G. 1977. Cider and Perry. pp:131-139. En: Rose (Ed.), Economic microbiology, Vol. 1. Alcoholic Beverages. Academic Press, London.
- Blanco D., Moran M. J., Gutierrez M. D. y Mangas J. 1988. Application of HPLC to characterization and control of individual acids in apple extracts and ciders. *Chromatographia*. 25: 1054-1058.
- Blanco-Gomis D., Picinelli-Lobo A. M., Gutiérrez-Alvarez M. D. y Mangas-Alonso J. J. 1990. Determination of amino acids in apple extracts by high performance chromatography. *Chromatographia*. 29: 155-160.
- Blanco-Gomis D. B., Gutierrez M. D., Morán M. J., Moreno J., Dapena E., Cabranes C. y Alonso J. M. 1991. Analytical control of cider production by two technological methods. *Journal of Institute of Brewing*. 97: 453-456.
- Bodmer S., Imark C y Kneubuhl M. 1999. Biogenic amines in foods. Histamine and food processing. *Inflammation Research*. 48: 296-300.
- Burroughs L. F. 1957. The amino-acids of apple juice and ciders. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 8: 122-31.
- Carr J. G. y Davies P. A. 1970. Homofermentative lactobacilli of ciders including *Lactobacillus mali* nov. spec. *Journal of Applied Bacteriology*. 33: 768-74.
- Carr J. G. y Whiting G. C. 1971. Microbiological aspects of production and spoilage of cider. *Journal of Applied Bacteriology*. 34: 81-93.
- Claisse O. y Lonvaud-Funel A. 2000. Assimilation of glycerol by a strain of *Lactobacillus collinoides* isolated from cider. *Food Microbiology*. 17: 513-519.
- De Vuyst L. y Vaningelgem F. 2003. Developing new polisaccharides. pp 275-320. En: B. M. McKenna (ed.) Texture in food, vol. 2, Semi solid foods. Woodhead Publishing Ltd., Cambridge, United Kingdom.

- Del Campo G., Santos J. I., Berregui I., Velasco S., Ibarburu I., Dueñas M. e Irastorza A. 2003. Ciders produced by two types of presses and fermented in stainless and wooden barrels vats. *Journal of the Institute of Brewing*. 109:342-348.
- Del Campo G., Berregi I., Santos J. I., Dueñas M. e Irastorza A. 2008. Development of alcoholic and malolactic fermentations in highly acidic and phenolic apple musts. *Bioresource Technology*. 99: 2857-2863.
- Dols-Lafargue M., Hyo Y. L., Le Marrec C., Heyraud A., Chambat G. y Lonvaud-Funel A. 2008. Characterization of *gtf*, a glucosyltransferase gene in the genomes of *Pediococcus parvulus* and *Oenococcus oeni*, two bacterial species commonly found in wine. *Applied and Environmental Microbiology*. 74: 4079-4090.
- Duboc P. y Mollet B. 2001. Applications of exopolysaccharides in the dairy industry. *International Dairy Journal*. 11: 759-768.
- Dueñas M., Irastorza A., Fernández C., Bilbao A. y Huerta A. 1994. Microbial populations and malolactic fermentation of apple cider using traditional and modified methods. *Journal of Food Science*. 59: 1060-1064.
- Dueñas M., Irastorza A., Fernández K. y Bilbao A. 1995. Heterofermentative *Lactobacilli* causing ropiness in Basque Country ciders. *Journal of Food Protection*. 58: 76-80.
- Dueñas-Chasco M. T., Rodríguez-Carvajal M. A., Mateo P. T., Franco-Rodríguez G., Espartero J. L., Irastorza-Iribas A. y Gil-Serrano A. M. 1997. Structural analysis of the exopolysaccharide produced by *Pediococcus damnosus* 2.6. *Carbohydrate Research*. 303: 453-458
- Dueñas-Chasco M. T., Rodríguez-Carvajal M. A., Tejero-Mateo P., Espartero J. L., Irastorza-Iribas A. y Gil-Serrano A. M. 1998. Structural analysis of the exopolysaccharides produced by *Lactobacillus* spp. G-77. *Carbohydrate Research*. 307: 125-133
- FAO/WHO. 2002. <ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/wgreport2.pdf>
- Fernández K., Dueñas M., Irastorza A., Bilbao A. y del Campo G. 1996. Characterization and DNA plasmid analysis of ropy *Pediococcus* spp. strains isolated from Basque Country ciders. *Journal of Food Protection*. 59: 35-40
- Garai-Ibabe G., Ibarburu I., Berregi I., Claisse O., Lonvaud-Funel A., Irastorza A. y Dueñas M. T. 2008. Glycerol metabolism and bitterness producing lactic acid bacteria in cidermaking. *Internacional. Internatinal Journal of Food Microbiology*. 121: 253-261.

- García M. J., Zúñiga M. y Uruburu F. 1992. El metabolismo y el control de las bacterias lácticas en el vino. *Revista Española de Ciencia y Tecnología de Alimentos*. 32: 233-268.
- Gibson G. R. y Roberfroid M. B. 1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *The Journal of Nutrition*. 125: 1401-1412.
- Gindreau E., Walling E. y Lonvaud-Funel A. 2001. Direct polymerase chain reaction detection of ropy *Pediococcus damnosus* strains in wine. *Journal of Applied Microbiology*. 90: 535-542.
- Gorga A., Claisse O. y Lonvaud-Funel A. 2002. Organisation of the genes encoding glycerol dehydratase of *Lactobacillus collinoides*, *Lactobacillus hilgardii* and *Lactobacillus diolivorans*. *Sciences des Aliments*. 22: 151-160.
- Hálasz A., Barath A., Simon-Sarkadi L. y Holzapfel W. 1994. Biogenic amines and their production by microorganism in food. *Trends in Food Science and Technology*. 5: 42-49.
- Ibarburu I. 2009. Bacterias lácticas productoras de exopolisacáridos: análisis estructural de polisacáridos y detección molecular de estirpes que sintetizan  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)(1 $\rightarrow$ 2)-D-glucanos. Tesis Doctoral. Universidad del País Vasco (UPV/EHU).
- Landete J. M., de las Rivas B., Marcobal A. y Muñoz R. 2007. Molecular methods for the detection of biogenic amine-producing bacteria in foods. *International Journal of Food Microbiology*. 117: 258-269
- Larpin S., Sauvageot N., Pichereau V., Laplace J. M. y Auffray Y. 2002. Biosynthesis of exopolysaccharide by a *Bacillus licheniformis* strain isolated from ropy cider. *International Journal of Food Microbiology*. 77: 1-9.
- Lehane L. y Olley J. 2000. Histamine fish poisoning revisited. *International Journal of Food Microbiology*. 58: 1-37.
- Liu S.-Q. 2003. Practical implications of lactate and pyruvate metabolism by lactic acid bacteria in food and beverage fermentations. *International Journal of Food Microbiology*. 83: 115-131.
- Llaubères R. M., Richard B., Lonvaud A., Dubourdieu D. y Fournet B. 1990. Structure of an exocellular  $\beta$ -D-glucan from *Pediococcus* sp., a wine lactic bacteria. *Carbohydrate Research*. 203: 103-107.



- Lonvaud-Funel A. y Joyeux A. 1988. A bacterial disease causing ropiness of wines. *Sciences des Aliments*. 8: 33-49.
- Lonvaud-Funel A. 1999. Lactic acid bacteria in the quality improvement and depreciation of wine. *Antonie van Leeuwenhoek*. 76: 317-331.
- Lüthi H. 1957. Symbiotic problems relating to the bacterial deterioration of wines. *American Journal of Enology and Viticulture*. 8: 176-181.
- Maijala R. L., Eerola S. H., Aho M. A. y Hirn J. A. 1993. The effect of GDL-induced pH decrease on the formation of biogenic amines in meat. *Journal of Food Protection*. 56: 125-129.
- Manca de Nadra M. C. y Strasser de Saad A. M. 1995. Polysaccharide production by *Pediococcus pentosaceus* from wine. *International Journal of Food Microbiology*. 27: 101-106.
- Maynard L. S. y Schenker V. J. 1996. Monoamine-oxidase inhibition by ethanol in vitro. *Nature*. 196: 575-576.
- Moreno-Arribas M.V. y Polo M.C. 2009. Amino acids and biogenic amines. pp. 163-189. M. V. Moreno-Arribas y M. C. Polo (Eds.), En: *Wine Chemistry and Biochemistry*. Springer Life Sciences Publisher. New York, EEUU.
- Pasteris S. E. y Strasser de Saad A. M. 2009. Sugar-glycerol cofermentations by *Lactobacillus hilgardii* isolated from wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 57: 3853-3858.
- Piccinelli A., Suárez B., Moreno J., Rodríguez R., Caso-García L. M. y Mangas J. J. 2000. Chemical characterization of Asturian Cider. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 48: 3997-4002.
- Piccinelli A., Suárez B., Moreno J., Rodríguez R., Caso L. M., Pando R. M. y Mangas J. 2000. Técnicas analíticas en el control de calidad de la sidra natural asturiana. *Alimentaria*. 9: 129-136.
- Reid G., Sanders M E; Gaskins H R., Gibson G. R, Mercenier A., Rastall R., Roberfroid M., Rowland I., Cherbut C. y Klaenhammer T. R. 2003. New scientific paradigms for probiotics and prebiotics. *Journal of Clinical Gastroenterology*. 37: 105-18.
- Ribéreau-Gayon P., Dubourdiou D., Donèche B. y Lonvaud A. 2006. The Microbiology of Wine and Vinifications. Ribéreau-Gayon P., Dubourdiou D., Donèche B. y Lonvaud (Ed.), En: *Handbook of enology*, volume 1, 2<sup>nd</sup> edition. John Wiley & Sons Ltd, Chichester, England.

- Ruas-Madiedo P., Abraham A., Mozzi F. y de los Reyes-Gavilán C. G. 2008. Functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria, pp. 137-166. B. Mayo, P. López y G. Pérez-Martín (ed.), En: Molecular aspects of lactic acid bacteria for traditional and new applications. Research Signpost, Kerala, India.
- Ruas-Madiedo P., Salazar N. y de los Reyes-Gavilán C. G. 2009. Biosynthesis and chemical composition of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. pp. 279-310. M. Ullrich (Ed.), En: Bacterial Polysaccharides. Caister Academic Press. Norwich, UK.
- Salminen S., von Wright A., Morelli L., Marteau P., Brassart D., de Vos W. M., Fonden R., Saxelin M., Collins K., Mogensen G., Birkeland S. E. y Mattila-Sandholm T. 1998. Demonstration of safety of probiotics: a review. *International Journal of Food Microbiology*. 44: 93-106.
- Santos J. I. 2005. Caracterización de manzanas y sidras del País Vasco. Aplicaciones de la espectroscopía RMN. Tesis Doctoral. Universidad del País Vasco (UPV/EHU).
- Sauvageot N., Gouffi K., Laplace J. M. y Auffray Y. 2000. Glycerol metabolism in *Lactobacillus collinoides*: production of 3-hydroxypropionaldehyde, a precursor of acrolein. *International Journal of Food Microbiology*. 55: 167-170.
- Schutz H. y Radler F. 1984. Anaerobic reduction of glycerol to propanediol 1,3 by *Lactobacillus brevis* and *Lactobacillus buchneri*. *Systematic and Applied Microbiology*. 5: 169-178.
- Shalaby A. R. 1996. Significance of biogenic amines to food safety and human health. *Food Research International*. 29: 675-690.
- Silla Santos M. H. 1996. Biogenic amines: their importance in foods. *International Journal of Food Microbiology*. 29: 213-231.
- Stratton J. E., Hutkins R. W. y Taylor S. L. 1991. Biogenic amines in cheese and other fermented foods: A review. *Journal of Food Protection*. 54: 460-470.
- Sutherland I. 2001. Microbial polysaccharides from gram-negative bacteria. *International Dairy Journal*. 11: 663-674.
- Talarico T. L. y Dobrogosz W. J. 1989. Chemical characterization of an antimicrobial substance produced by *Lactobacillus reuteri*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 33: 674-9
- Taylor S. L. 1986. Histamine food poisoning: toxicology and clinical aspects. *Critical reviews in toxicology*. 17: 91-128

- Ten Brink B., Damink C., Joosten H. M. L. J. y Huis in't Veld J. H. J. 1990. Occurrence and formation of biologically active amines in foods. *International Journal of Food Microbiology*. 11: 73-84.
- Tieking M., Korakli M., Erhmann M. A., Gänzle M. G. y Vogel R. F. 2003. In situ production of exopolysaccharides during sourdough fermentation by cereal and intestinal isolates of lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 69: 945-952
- Torino M. I., Mozzi F. y Font de Valdez G. 2005. Exopolysaccharide biosynthesis by *Lactobacillus helveticus* ATCC 15807. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 68: 259-265.
- Uria Irastorza J. 1987. La sidra. Editorial Sendoa. San Sebastián, España.
- Van Oevelen D. y Verachtert H. 1979. Slime production by brewery strains of *Pediococcus cerevisiae*. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*. 37: 34-7.
- Velasco S. E., Yebra M. J., Monedero V., Ibarburu I., Dueñas M. T. e Irastorza A. 2007. Influence of the carbohydrate source on  $\beta$ -glucan production and enzyme activities involved in sugar metabolism in *Pediococcus parvulus* 2.6. *International Journal of Food Microbiology*. 115: 325-334
- Vollenweider S. y Lacroix C. 2004. 3-hydroxypropionaldehyde: applications and perspectives of biotechnological production. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 64: 16-27.
- Waldherr F. W. y Vogel R. F. 2009. Commercial exploitation of homo-exopolysaccharides in non-dairy food systems. pp. 313-329. M. Ullrich (Ed.). En: Bacterial Polysaccharides. Caister Academic Press, Norfolk, UK.
- Walling E., Gindreau E. y Lonvaud-Funel A. 2005. A putative glucan synthase gene *dps* detected in exopolysaccharide-producing *Pediococcus damnosus* and *Oenococcus oeni* strains isolated from wine and cider. *International Journal of Food Microbiology*. 98: 53-62.
- Wathersen J. J., Scanlan R. A., Bills D. D. y Libbey, L. M., 1975. Formation of heterocyclic N-nitrosamines from the reaction of nitrite and selected primary diamines and amino acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 23: 898-902.

- Werning M. L., Ibarburu I., Dueñas M. T., Irastorza A., Navas J. y López, P. 2006. *Pediococcus parvulus* *gtf* gene encoding the GTF glycosyltransferase and its application for specific PCR detection of  $\beta$ -D-glucan producing bacteria in foods and beverages. *Journal of Food Protection*. 69: 161–169.
- Werning M. L., Corrales M. A., Prieto A., Fernández de Palencia P., Navas J. y López P. 2008. Heterologous expression of a position 2-substituted (1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glucan in *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*. 74: 5259-5262.
- Whiting G. C. y Coggins R. A. 1971. The role of quinate and shiquimate in metabolism of lactobacilli. *Antonie van Leeuwenhoek*. 37: 33-49.
- Whiting G. C. 1976. Organic acid metabolism of yeasts during fermentation of alcoholic beverages. A review. *Journal of the Institute of Brewing*. 82: 84–92.

## **2. Picado acroleico en sidra natural del País Vasco**

---

## 2.1. INTRODUCCIÓN

El picado acroleico o amargor es una alteración de vinos y sidras, caracterizada por un sabor amargo desagradable de la bebida y relacionada con la presencia de acroleína. Este aldehído  $\alpha$ ,  $\beta$ -insaturado es el resultado de la deshidratación química del 3-hidroxi propionaldehído, producido en la degradación del glicerol por ciertos lactobacilos heterofermentativos como *L. brevis* y *L. buchneri* (Schütz y Radler, 1984), *L. collinoides* (Sauvageot et al., 2000; Claisse y Lonvaud-Funel, 2000), *L. hilgardii* (Pasteris y Strasser de Saad, 2009) o *L. diolivorans* (Gorga et al., 2002).

Como se ha mencionado anteriormente, la sidra natural no se estabiliza microbiológicamente después de la fermentación maloláctica, por lo que se encuentran poblaciones elevadas de bacterias lácticas, en torno a  $10^7$  UFC mL<sup>-1</sup> (Dueñas et al., 1994). Éstas pueden utilizar fuentes carbonadas residuales, que posibilitan el mantenimiento de poblaciones viables de estas bacterias. Entre los sustratos disponibles se encuentra el glicerol, producto de la fermentación glicero-pirúvica de levaduras durante la elaboración de sidra (Del Campo et al., 2003). La degradación de este poliol resulta perjudicial para la calidad de la bebida ya que se trata de un componente importante para las características sensoriales, y por otra parte debido a que es el precursor metabólico del 3-HPA. Además, podría tener incidencia en la elaboración del “sagardoz” (destilado de la sidra), ya que en el proceso de destilación el 3-HPA podría deshidratarse a acroleína (Lonvaud-Funel, 2002).

Se ha descrito que la transformación del glicerol en 3-HPA puede estar catalizada por dos enzimas isofuncionales dependientes de coenzima B<sub>12</sub>. Según la especie, puede tratarse de una diol deshidratasa (EC.4.2.2.28) o bien una glicerol deshidratasa (EC.4.2.2.30), en base a la mayor afinidad por 1,2-propanodiol o glicerol, respectivamente (Daniel et al., 1999). Estas deshidratasas han sido ampliamente estudiadas en diversas especies bacterianas (*Klebsiella pneumoniae*, *K. oxytoca*, *Citrobacter freundii*, *Clostridium pasteurianum*, y *Salmonella enterica*) y todas exhiben la misma estructura hexamérica  $\alpha_2\beta_2\gamma_2$ . Con respecto a las cepas de *Lactobacillus* aisladas de bebidas, Sauvageot et al. (2002) purificaron, caracterizaron e identificaron las subunidades de la diol deshidratasa de una cepa de *L. collinoides* aislada de sidra (Sauvageot et al., 2002a; Sauvageot et al., 2002b) y Gorga et al. (2002) secuenciaron una parte del operón diol deshidratasa en cepas

de *L. hilgardii* y *L. diolivorans* procedentes de vino. Los trabajos más recientes sobre el picado acroleico en bebidas alcohólicas se han centrado en la identificación de los microorganismos responsables de la alteración (Sauvageot et al., 2000; Claisse y Lonvaud-Funel, 2000), así como en el desarrollo de herramientas moleculares para su detección (Claisse y Lonvaud-Funel, 2001). En esta línea, se diseñaron los cebadores específicos GD1 y GD2 para la detección por PCR del gen glicerol deshidratasa para la identificación de bacterias productoras de 3-HPA.

Por otro lado, es muy limitada la información sobre los factores que influyen en el metabolismo del glicerol en cepas de BAL aisladas de vinos y sidras, como *L. collinoides* (Claisse y Lonvaud-Funel, 2000), *L. hilgardii* (Pasteris y Strasser de Saad, 2009) y *L. brevis* (Schütz y Radler, 1984). Se ha estudiado fundamentalmente el efecto de los diferentes tipos y concentraciones de azúcares. Ninguna de las cepas fue capaz de crecer con glicerol como única fuente carbonada, mientras que la presencia de glucosa y/o fructosa en el medio indujo tanto el consumo de glicerol como el crecimiento celular. Por el contrario, en el caso de *L. brevis*, las pentosas ribosa, arabinosa y xilosa no ejercieron el mismo efecto sobre el consumo de glicerol (Schütz y Radler, 1984). En relación a la acumulación de 3-HPA, se ha puesto de manifiesto la importancia de la relación cuantitativa entre glucosa y glicerol, de forma que un valor no superior a 1:3 favorece el consumo de glicerol y la acumulación del aldehído en *Lactobacillus* 208-A (Sobolov y Smiley, 1960) y en *L. collinoides* (Sauvageot et al., 2000).

Teniendo en cuenta estos antecedentes, este trabajo se planteó con el objeto de estudiar la microbiota láctica implicada en la alteración del amargor en la sidra natural. Para ello, se estudiaron diferentes sidras alteradas donde el glicerol había sido total o parcialmente consumido y presentaban sabores amargos desagradables. Estas sidras fueron microbiológicamente caracterizadas y a partir de ellas se aislaron e identificaron cepas de *Lactobacillus* con capacidad de degradar el glicerol por la vía de la glicerol deshidratasa. Además con el objeto de conocer las condiciones medioambientales que conducen a la acumulación de 3-HPA en la sidra, se estudió la influencia del principal azúcar residual (fructosa) sobre *L. collinoides* 17. Se examinó asimismo el efecto del pH y temperatura de almacenamiento de la sidra, ya que estas variables podrían ser controladas por el productor sidrero.

## 2.2. MATERIAL Y MÉTODOS

### 2.2.1. Caracterización microbiológica de las sidras alteradas y aislamiento de bacterias lácticas

Para el estudio de la alteración del amargor, se recogieron seis muestras de sidra de seis sidrerías diferentes que presentaban sabores amargos y degradación total o parcial del glicerol. El análisis de las poblaciones de bacterias lácticas, bacterias acéticas y levaduras, se realizó mediante recuento en placa. Para ello, se prepararon diluciones seriadas de las sidras en solución de Ringer, se eligieron las diluciones adecuadas y se sembraron, por duplicado, 100 L de cada una de ellas, mediante siembra en superficie.

El recuento en placa de la población de bacterias lácticas se realizó en agar MRS (de Man, Rogosa y Sharpe, 1960) (Anexo I) suplementado con zumo de tomate (20%, v/v) y fructosa ( $5 \text{ g L}^{-1}$ ) (MRS-T-F) (pH 4,8), al que se añadió pimaricina ( $0,05 \text{ g L}^{-1}$ ) y estreptomycinina ( $0,1 \text{ g L}^{-1}$ ) para evitar el crecimiento de levaduras y bacterias acéticas, respectivamente. Las placas fueron incubadas a  $28 \text{ }^{\circ}\text{C}$  en atmósfera enriquecida con 5%  $\text{CO}_2$  durante 7 días. Tras la incubación se recogieron de 10 a 12 colonias representativas por placa y los aislados se purificaron mediante sucesivas siembras en placas de MRS-T-F (pH 4,8). La conservación de la cepas se realizó a  $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$  en medio MRS suplementado con 20% de glicerol (v/v).

Las levaduras se enumeraron en placas de agar malta (Cultimed) (pH 4,8) suplementadas con  $0,1 \text{ g L}^{-1}$  de estreptomycinina y  $10 \text{ mL L}^{-1}$  de penicilina G ( $165800 \text{ UI L}^{-1}$ ), para inhibir el crecimiento de bacterias acéticas y bacterias lácticas, respectivamente. Por otro lado, las poblaciones de bacterias acéticas se cuantificaron en placas de agar mosto (pH 5) compuesto por: mosto de manzana a una densidad de  $1045 \text{ g L}^{-1}$ , 1% (p/v) de extracto de levadura y 3% (p/v) de agar, suplementado con  $10 \text{ mL L}^{-1}$  de penicilina G ( $165800 \text{ UI L}^{-1}$ ) y  $0,05 \text{ g L}^{-1}$  de pimaricina, para inhibir el crecimiento de bacterias lácticas y levaduras, respectivamente (Dueñas et al., 1995). En ambos casos, las placas fueron incubadas a  $28 \text{ }^{\circ}\text{C}$ .



### **2.2.2. Detección de cepas de bacterias lácticas productoras de 3-hidroxi propionaldehído**

Para la detección de las cepas capaces de consumir glicerol y producir 3-HPA, los aislados se propagaron en medio MRS suplementado con 10 g L<sup>-1</sup> de fructosa y 10 g L<sup>-1</sup> de glucosa (MRS-m) (pH 4,8). Transcurridas 24 h, se recogieron las células en fase exponencial (10000 rpm, 20 min) y se inocularon en medio de Carr modificado (Carr-m) (Claisse y Lonvaud-Funel, 2001) (Anexo I) a una densidad óptica (DO<sub>600</sub>) de aproximadamente 0,2. Los cultivos fueron incubados a 28 °C, durante siete días, en recipientes cerrados completamente llenos y en atmósfera enriquecida con 5% CO<sub>2</sub>. Transcurrido este tiempo, se retiraron las células por centrifugación (10000 rpm, 15 min) y los sobrenadantes se mantuvieron almacenados a -20 °C hasta su posterior análisis.

### **2.2.3. Detección de la actividad glicerol deshidratasa**

La actividad enzimática glicerol deshidratasa se examinó mediante el método espectrofotométrico de la 3-metil-2-benzotiazolinona hidrazina, que se basa en la capacidad de los aldehídos de reaccionar con este compuesto formando derivados de azinas que absorben a 310 nm (Toraya et al., 1977).

Los ensayos se realizaron en células permeabilizadas según lo descrito por Claisse y Lonvaud-Funel (2001). Para ello, se recogieron las células (10000 rpm, 10 min) de un cultivo en MRS-m, a una DO<sub>600</sub> del orden de 2, se lavaron con 1 mL de NaCl al 0,9% (p/v) y se permeabilizaron incubándolas en 1 mL de tolueno al 2% (v/v), a temperatura ambiente durante 10 min. Una vez permeabilizadas, se recogieron las células (10000 rpm, 10 min) y se incubaron en 1 mL de solución tampón Tris-glicina 100 mM (pH 9) que contenía 20 mM de glicerol, durante 10 min en un baño a 30 °C. Transcurrido este tiempo, se añadieron 0,2 nmol de coenzima B<sub>12</sub> para iniciar la reacción enzimática y se incubó 1 min en oscuridad a 30 °C. La reacción se detuvo añadiendo 0,8 mL de tampón citrato fosfato 100 mM (pH 3,6). Posteriormente, se recogió el sobrenadante (10000 rpm, 10 min), se añadieron 200 µL de una solución de 3-metil-2-benzotiazolinona hidrazina al 0,1% (p/v) y se incubó durante 10 min a 100 °C. Una vez concluida la reacción, se dejó enfriar, se añadieron 4 mL de agua destilada y se midió la absorbancia a 310 nm (Heliosα, Thermo

Spectronic). Como referencia, se utilizaron los controles negativos para cada cepa en estudio. Para ello, fueron sometidas al tratamiento descrito anteriormente, aunque incubadas en ausencia de glicerol. Por otra parte, *Lactobacillus reuteri* CECT 925<sup>T</sup> fue utilizada como control positivo.

#### 2.2.4. Detección por PCR del gen glicerol deshidratasa

Para la extracción del ADN bacteriano, las cepas se propagaron en el medio MRS para lactobacilos (Difco) (pH 5) suplementado con 5 g L<sup>-1</sup> de ácido DL-málico, y se incubaron durante 10 días, a 28 °C en atmósfera enriquecida con 5% CO<sub>2</sub>. Transcurrido este tiempo, las células se recogieron (10000 rpm, 30 min a 4 °C), se lavaron con 2 mL de solución tampón TE (Anexo I) y se volvieron a recoger (10000 rpm, 30 min a 4 °C). Las células lavadas se resuspendieron en 300 µL de EDTA 0,5 mM (pH 8), se añadió 300 µL de esferas de cristal (Ø 0,1 mm) y se mezcló a 1000 rpm durante 15 min. Posteriormente, se añadieron 300 µL de solución de lisis nuclear (Promega) y 200 µL de solución precipitante de proteínas (Promega) y se incubó en hielo durante 5 min, para precipitar los fragmentos celulares, antes de ser centrifugado (10000 rpm, 5 min a 4 °C). A continuación, se transfirió el sobrenadante a un microtubo de 1,5 mL que contenía 300 µL de isopropanol y se mezcló por inversión hasta que precipitó el ADN, que se mantuvo a -20 °C durante 2 h antes de ser centrifugado (10000 rpm, 20 min a 4 °C). Finalmente, se lavó el ADN con 300 µL de etanol al 70% (v/v) a temperatura ambiente, se recogió por centrifugación (10000 rpm, 5 min) y se secó. Para rehidratar el ADN, se añadieron 50 µL de agua PPI (para preparaciones inyectables) que contenía 1 µL de RNase (Promega) y se incubó durante la noche a 4 °C. Una vez rehidratado, el ADN se conservó congelado a -20 °C.

Se examinó el ADN genómico para detectar el gen glicerol deshidratasa con los cebadores específicos GD1 (5'-AAA/GGAC/TAAA/C/TCCIGTICAA/GATA/C/TGCIGC-3') y GD2 (5'-CCAIGGIGTA/GTCA/GTCICCA/GTCIGTA/GAAIAC-3') (Claisse y Lonvaud-Funel, 2001). La mezcla de reacción se preparó en un volumen final de 50 µL que contenía: 2,5 U de BIOTaq DNA polimerasa (Bioline), 1x del tampón de PCR (Bioline), 200 µM de cada desoxinucleótido (dATP, dCTP, dTTP y dGTP), 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 µM de cada cebador y 5 µL de ADN diana. La amplificación se realizó en un termociclador Gene Amp PCR System 2400 (Perkin-Elmer) con el siguiente programa:

una primera etapa de desnaturalización de 5 min a 95 °C, seguido de 35 ciclos de 95 °C durante 30 s, 57 °C durante 30 s y 72 °C durante 30 s, y una etapa final de elongación de 10 min a 72 °C. El ADN de *L. reuteri* CECT 925<sup>T</sup> se utilizó como control positivo.

Los productos de PCR se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa (0,8%, p/v) teñido con bromuro de etidio (0,2 µg mL<sup>-1</sup>). Para ello, se mezclaron 10 µL del amplificado y 1,5 µL de tampón de carga y se hicieron migrar a 90 V durante 50 min. El tamaño de los fragmentos se estimó por comparación con el marcador de pesos moleculares de 1 Kb Plus DNA Leader (Invitrogen). La visualización de los amplicones se realizó por exposición a luz ultravioleta en un transiluminador (Gel-Doc, Bio-Rad).

### **2.2.5. Identificación de las cepas de bacterias lácticas productoras de 3-HPA**

La identificación a nivel de especie de las cepas BAL productoras de 3-HPA se realizó mediante dos técnicas: a) secuenciación de un fragmento del gen ARNr 16S amplificado mediante PCR, y b) electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización (DGGE), de un fragmento del gen que codifica para la subunidad β de la ARN-polimerasa (*rpoB*), amplificado por PCR (Renouf et al., 2006).

#### **2.2.5.1. Identificación mediante secuenciación de un fragmento del gen ANRr 16S amplificado**

Se amplificó un fragmento del gen ARNr 16S mediante PCR con los cebadores PA (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y UP1R (5'-TACCGCGGCTGCTGGCAC-3'). La mezcla de reacción de 50 µL estaba compuesta por: 2,5 U de Taq DNA polimerasa (Sigma), 1x del tampón de PCR (Sigma), 200 µM de cada desoxinucleótido (dATP, dCTP, dTTP y dGTP), 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,5 µM de cada cebador y 5 µL de ADN diana. La amplificación se realizó con el siguiente programa: una primera etapa de desnaturalización de 5 min a 94 °C, seguido de 25 ciclos de 1 min a 94 °C, 1 min a 55 °C y 2 min a 72 °C, finalizando con una etapa de elongación de 10 min a 72 °C. En esta reacción se obtuvo un amplicón de 530 pb que se visualizó mediante electroforesis en gel de agarosa.

La banda de 530 pb se extrajo del gel y se purificó utilizando el kit comercial QIAquick Gel Extraction (Qiagen), para ser secuenciado en el Servicio de Genómica, Unidad de Secuenciación y Genotipado de la Facultad de Ciencia y Tecnología de la UPV/EHU. La identificación de las cepas se estableció mediante comparación de las secuencias de ARNr 16S obtenidas, con las presentes en las bases de datos del NCBI. La comparación entre las distintas secuencias nucleotídicas se realizó mediante el programa BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>) mostrando niveles de homología superiores al 97%.

#### 2.2.5.2. Identificación mediante PCR-DGGE *rpoB*

Los cebadores *rpoB1* (5'-ATTGACCACTTGGGTAACCGTCG-3'), *rpoB1o* (5'-ATCGATCACTTAGGCAATCGTCG-3'), *rpoB2* (5'-ACGATCACGGGTCAAACCACC-3') se utilizaron para la amplificación de una región del gen *rpoB* de 250 pb. La reacción de PCR se realizó en 50 µL de volumen de reacción compuesto por: 1 µL de ADN diana, 4 µL de la solución comercial de PCR (Invitrogen), 3 mM de MgCl<sub>2</sub> y 0,1 µM de cada cebador. La amplificación de las muestras se realizó en un termociclador IQ (Bio-Rad) según el programa descrito por Renouf et al. (2006). Posteriormente, los productos de amplificación se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa (1,5%, p/v), teñido con bromuro de etidio. El tamaño de los fragmentos de ADN se estimó por comparación con los del marcador de pesos moleculares 100 pb Ladder (Invitrogen).

La electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización, se realizó en un sistema DGGE (Bio-Rad). Se cargaron 10 µL de cada producto de PCR (a una concentración de 50 ng µL<sup>-1</sup>) junto con 4 µL de una mezcla compuesta por glicerol (80%, v/v), tampón TE (20%, v/v) y azul de bromofenol, en un gel de poliacrilamida (QBIOgene) que contenía un gradiente de desnaturalización del 25% al 55% (urea-formamida). La electroforesis se realizó en solución tampón TAE 1x (40 mM Tris-acetato, 1 mM EDTA) y constaba de una primera etapa de 10 min a 20 V, seguida de otra de 16 h a 85 V, todo ello a una temperatura constante de 60 °C. Finalizada la electroforesis, los ADNs se tiñeron durante 10 min con SYBR Green I (Molecular Probes) y se fotografiaron bajo luz ultravioleta.

### 2.2.6. Cuantificación de sustratos y productos de fermentación

Las cantidades de glucosa, fructosa, glicerol, etanol, ácido láctico, ácido acético, 1,3-propanodiol (1,3-PDL) y ácido 3-hidroxi propiónico (3-HP) de la muestra (20 L), se determinaron mediante un sistema HPLC compuesto por dos columnas de intercambio iónico (Aminex HPX-87, Bio-Rad) colocadas en serie y termostatzadas a 65 °C. Como fase móvil se empleó H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5 mM a una velocidad de flujo de 0,6 mL min<sup>-1</sup> (Palmfeldt et al., 2004). Los componentes de las muestras fueron cuantificados mediante un detector de índice de refracción (IR) y otro de ultravioleta-visible (UV-Vis), a una longitud de onda de 210 nm. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

La concentración de 3-HPA, se cuantificó mediante el método colorimétrico de Circle (Circle et al., 1945), específico para la determinación de acroleína. Este método, se basa en la deshidratación de 3-HPA a acroleína, que forma complejos de color morado al reaccionar con el reactivo de triptófano, que absorben a una longitud de onda de 560 nm. La cuantificación se realizó según lo descrito por Slininger et al. (1983). A 2 mL de muestra se añadieron 4 mL de HCl al 37% y 1 mL de reactivo de triptófano (Anexo I). La mezcla se incubó a 40 °C en un baño durante 35 min, hasta que se desarrolló y estabilizó el color morado. Una vez enfriada la muestra, se determinó la absorbancia a 560 nm.

### 2.2.7. Influencia de factores medioambientales sobre el metabolismo del glicerol y producción y acumulación de 3-HPA en *Lactobacillus collinoides* 17

Con el objeto de estudiar la influencia de las diferentes variables experimentales, concentración de fructosa, pH y temperatura, sobre el metabolismo del glicerol y la producción y acumulación de 3-HPA, se seleccionó la cepa *L. collinoides* 17. Para adaptar la cepa almacenada a -80 °C a las nuevas condiciones de cultivo, se propagó dos veces en medio Carr-m (pH 4,8) en ausencia de glicerol y 10 g L<sup>-1</sup> de cada azúcar (glucosa y fructosa). Los cultivos se incubaron durante 24 h a 28 °C en atmósfera enriquecida con 5% CO<sub>2</sub> y las células en fase exponencial fueron recogidas por centrifugación (10000 rpm, 10 min) para inocular los medios de ensayo a una DO<sub>600</sub> del orden de 0,2.

Con el fin de estudiar la influencia de la concentración de fructosa sobre el metabolismo del glicerol, se cultivó *L. collinoides* 17 en medio Carr-m (pH 4,8), sin glucosa, y a seis concentraciones de fructosa diferentes (0, 11,1, 22,2, 33,3, 44,4 y 55,5 mM). Por otro lado, se evaluó en el mismo medio (con 5,55 mM de glucosa y 5,55 mM de fructosa) la influencia del pH (3,3, 3,6, 3,9 y 4,8) y la temperatura (15 y 28 °C a pH 3,9).

Todos los ensayos, a no ser que se especifique lo contrario, se realizaron por duplicado, sin agitación, en tubos completamente llenos y a 28 °C en atmósfera suplementada con 5% CO<sub>2</sub>. Por otro lado, con el fin de evitar la aireación durante el proceso de toma de muestras, para cada condición estudiada se incubaron diferentes tubos de forma simultánea. El crecimiento celular se monitorizó mediante la medida de la DO<sub>600</sub>. Además, se recogieron los medios libres de células (10000 rpm, 10 min) para determinar los sustratos residuales, así como los productos finales del metabolismo del glicerol.

## 2.3. RESULTADOS

### 2.3.1. Aislamiento y detección de bacterias lácticas productoras de 3-HPA

En la Tabla 2.1 se muestran los resultados obtenidos en el análisis químico y microbiológico de seis sidras amargas. En relación a la caracterización microbiológica de las muestras, la mayoría presentaron poblaciones elevadas de BAL, del orden de  $10^7$  UFC  $\text{mL}^{-1}$ , que constituyó su microbiota principal, a excepción de las muestras 1 y 4, en la que no se detectaron poblaciones viables de BAL. Por otro lado, ninguna de las sidras presentó poblaciones viables de bacterias acéticas, mientras que las poblaciones de levaduras se detectaron, únicamente, en dos de ellas.

**Tabla 2.1.** Caracterización química y microbiológica de las sidras alteradas

Sidra	$\text{g L}^{-1}$					$\text{UFC mL}^{-1}$		
	Glicerol	1,3-PDL	Ác.málico	Ác.láctico	Ác.acético	BAL	Bacterias acéticas	Levaduras
1	1,11	0,74	0,31	4,21	0,89	n.d	0	0
2	0,40	1,46	0,03	4,57	2,97	$2,1 \times 10^7$	0	0
3	1,40	0,53	0,13	5,31	1,47	$1,6 \times 10^7$	0	$6,8 \times 10^3$
4	0,14	2,24	0,11	3,95	1,57	n.d	0	0
5	2,73	0,37	1,03	4,89	0,54	$1,2 \times 10^7$	0	0
6	1,43	0,51	0,05	4,79	0,86	$2,2 \times 10^7$	0	$1,4 \times 10^4$

La caracterización química reveló que en todas las sidras se había realizado la fermentación maloláctica, ya que el contenido de ácido málico fue muy reducido en todas ellas. Por otra parte, se detectaron en todas las muestras contenidos reducidos de glicerol (entre 0,14 y  $2,73 \text{ g L}^{-1}$ ) y cantidades variables de 1,3-propanodiol. Estos resultados indicaban que el glicerol (entre 3 y  $6 \text{ g L}^{-1}$  en sidras no alteradas) había sido degradado, al menos en parte, mediante la intervención de bacterias lácticas con actividad glicerol deshidratasa.

Se aislaron y purificaron 67 cepas BAL a partir de las seis sidras alteradas. Éstas fueron evaluadas en relación a su capacidad para consumir glicerol por la vía glicerol deshidratasa y producir 3-hidroxi-propanal (3-HPA), ácido 3-hidroxi-propiónico (3-

HP) y 1,3-propanodiol (1,3-PDL) (Tabla 2.2). Entre las 67 cepas estudiadas, 55 fueron capaces de degradar el glicerol a diferentes niveles (entre el 6% y el 100%), de las cuales, únicamente, 22 cepas presentaron actividad glicerol deshidratasa. Además, todas ellas amplificaron el fragmento de 279 pb correspondiente a dicho gen, en la reacción de PCR realizada con los cebadores específicos GD1 y GD2. Posteriormente, estas cepas fueron identificadas mediante la técnica PCR-DGGE y secuenciación de un fragmento del gen ARNr 16S. 20 de ellas fueron identificadas como *Lactobacillus collinoides*, mientras que las dos restantes lo fueron como *Lactobacillus diolivorans*.

Por otro lado, el análisis de los medios fermentados reveló que las 22 cepas degradaban el glicerol y producían 1,3-PDL y 3-HP, mientras que la acumulación del 3-HPA se detectó en 17 de ellas. Finalmente, se seleccionó la cepa *L. collinoides* 17, debido a que mostraba la mayor acumulación de 3-HPA en el medio de cultivo.

**Tabla 2.2.** Bacterias lácticas aisladas de sidras amargas que degradaban glicerol por la vía glicerol deshidratasa.

Cepa	Identificación	Consumo de glicerol (%)	3-HPA (mM)	3-HP (mM)	1,3-PDL (mM)	Actividad GDH	PCR
1	<i>L. diolivorans</i>	84,3	0	22,0	39,2	+	+
2	<i>L. diolivorans</i>	88,4	0	22,6	40,2	+	+
3	<i>L. collinoides</i>	77,6	10,1	16,4	23,5	+	+
4	<i>L. collinoides</i>	82,5	11,5	13,4	16,1	+	+
5	<i>L. collinoides</i>	88,4	0,5	14,2	21,6	+	+
6	<i>L. collinoides</i>	87,8	6,6	14,2	22,5	+	+
7	<i>L. collinoides</i>	100	0	31,3	37,1	+	+
8	<i>L. collinoides</i>	83,6	10,2	15,1	23,9	+	+
9	<i>L. collinoides</i>	74,9	10,4	15,0	21,9	+	+
10	<i>L. collinoides</i>	90,6	7,1	19,6	25,3	+	+
11	<i>L. collinoides</i>	77,3	9,2	14,9	23,9	+	+
12	<i>L. collinoides</i>	90,8	8,5	15,9	24,2	+	+
13	<i>L. collinoides</i>	78,4	10,2	12,4	20,2	+	+
14	<i>L. collinoides</i>	63,2	8,6	9,8	16,8	+	+
15	<i>L. collinoides</i>	100	0	28,7	41,5	+	+
16	<i>L. collinoides</i>	92,4	10,5	17,5	26,1	+	+
17	<i>L. collinoides</i>	87,3	12,3	10,9	21,4	+	+
18	<i>L. collinoides</i>	89,6	9,7	13,8	21,9	+	+
19	<i>L. collinoides</i>	81,9	10,5	11,7	20,3	+	+
20	<i>L. collinoides</i>	100	0	27,4	40,8	+	+
21	<i>L. collinoides</i>	83,2	10,1	13,0	22,1	+	+
22	<i>L. collinoides</i>	88,3	2,0	11,7	20,7	+	+
23	<i>L. reuteri</i> CECT 925 <sup>T</sup>	12,9	3,1	3,5	6,0	+	+

GDH, glicerol deshidratasa.



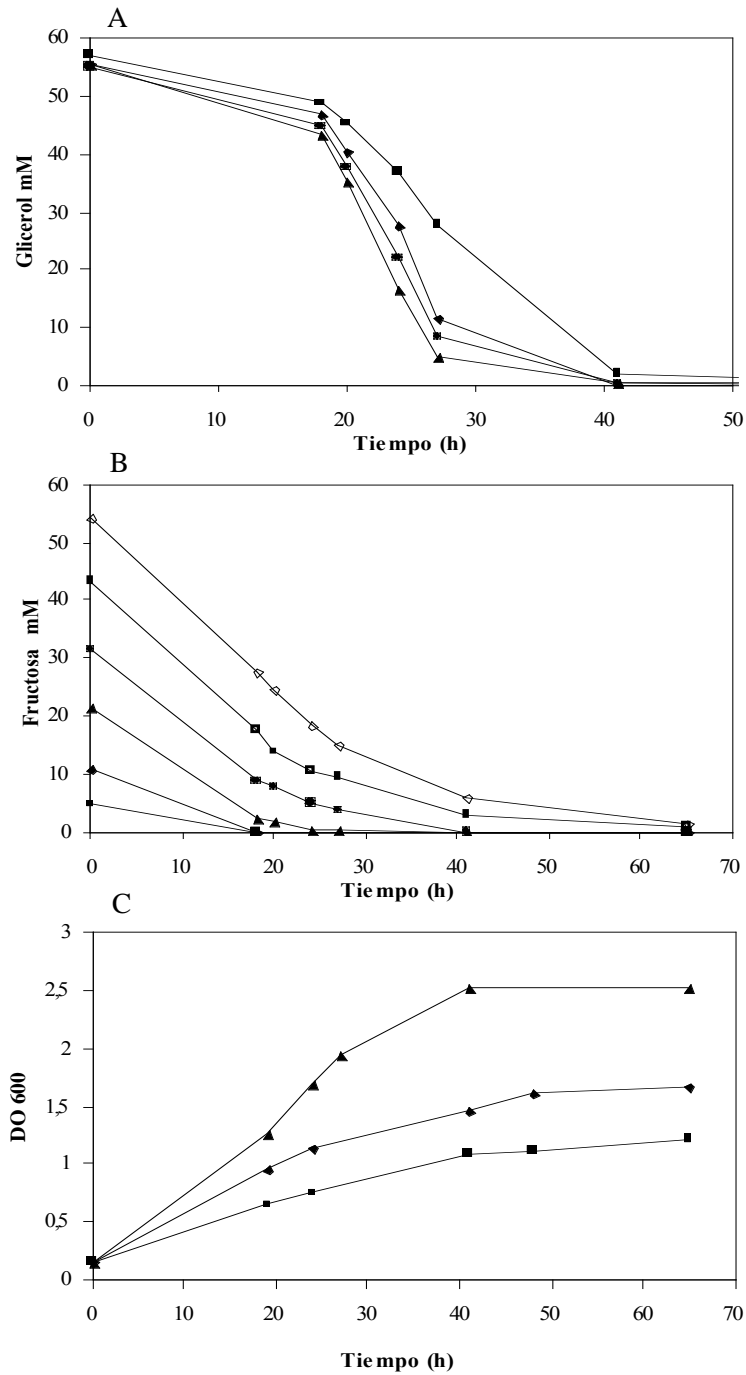
### 2.3.2. Influencia de la concentración de fructosa sobre el metabolismo del glicerol en *L. collinoides* 17

Dado que la fructosa es el azúcar residual mayoritario en la fermentación de los mostos de manzana, *L. collinoides* 17 se creció en medios con concentraciones variables de fructosa (de 0 a 55,5 mM) a pH 4,8 y en presencia de 55,5 mM de glicerol. En ausencia de fructosa no se detectó consumo del poliol ni crecimiento bacteriano (datos no mostrados). Por el contrario, la adición de fructosa estimuló el consumo de glicerol, siendo éste totalmente degradado, independientemente de la concentración inicial de fructosa en el medio de cultivo (Figura 2.1 A). En todos los casos, la fructosa fue totalmente consumida (Figura 2.1 B) y se observó un mayor crecimiento a medida que aumentaba la concentración de fructosa, en concentraciones desde 5,5 mM a 22,2 mM. A esta última o a concentraciones superiores no se observaron variaciones ni en el perfil de crecimiento ni en el rendimiento en biomasa, con densidades ópticas máximas ( $DO_{600}$ ) cercanas a 2,5 (Figura 2.1 C).

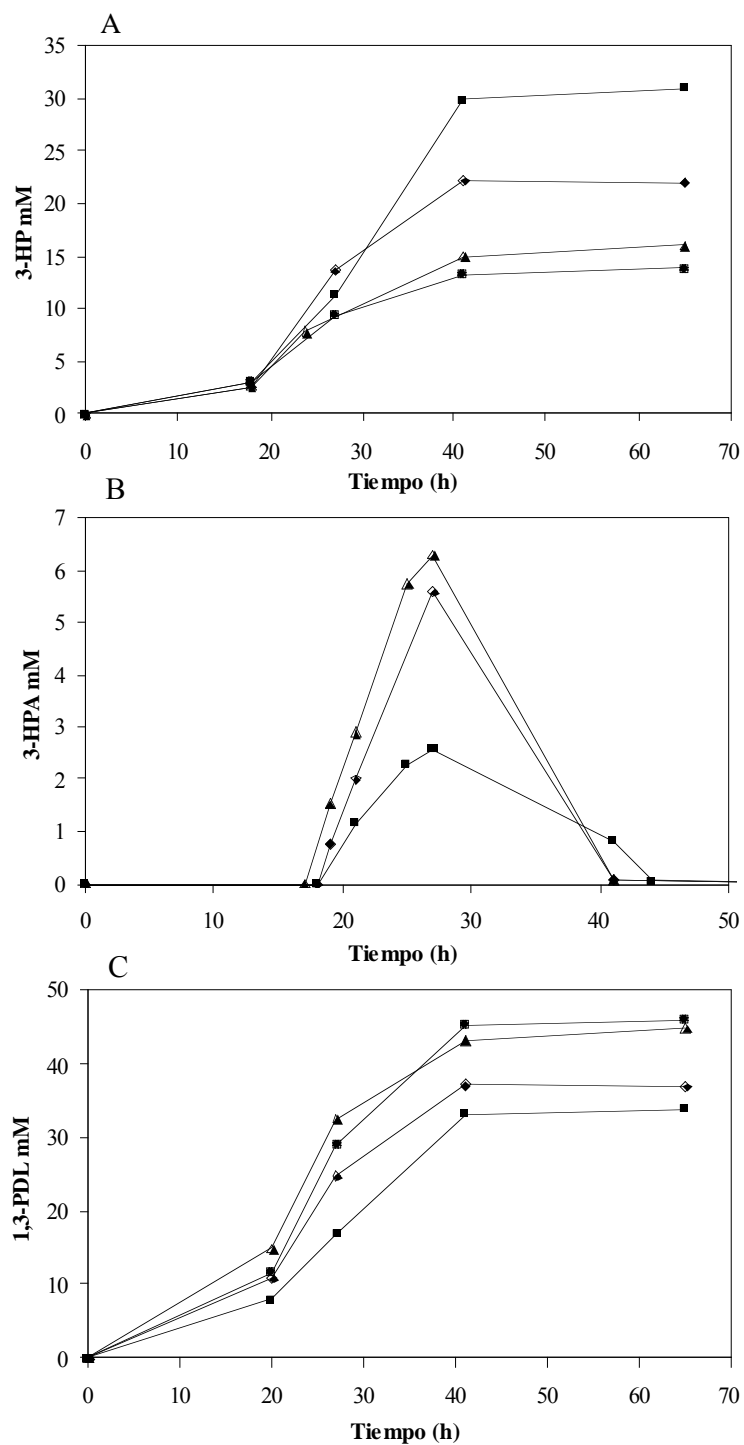
El consumo de glicerol comenzó al inicio de la fase exponencial de crecimiento y su mayor parte se degradó entre las 18 y 27 h de cultivo. En el ensayo realizado con 5,5 mM de fructosa, el crecimiento fue muy limitado y en consecuencia la velocidad de degradación del glicerol fue más lenta. Sin embargo, en las experiencias con concentraciones de fructosa superiores a 22,2 mM, el glicerol fue degradado rápidamente, incluso en presencia de cantidades elevadas de fructosa en el medio. Con respecto a los productos de fermentación, los compuestos 1,3-propanodiol y ácido 3-hidroxi propiónico se detectaron tan pronto como comenzó el consumo de glicerol, pero a diferencia de los anteriores, el 3-hidroxi propionaldehído no fue detectado en este periodo (Figuras 2.2 A, B y C).

Con respecto a la acumulación de 3-HPA, ésta comenzó en la fase exponencial tardía y su concentración máxima se alcanzó a las 27 h de incubación (Figura 2.2 B). Esta concentración fue similar en todas las condiciones (en torno a 6 mM), independientemente de la concentración inicial de fructosa, con la única excepción de la fermentación realizada con 5,55 mM de fructosa, en la que el 3-HPA sólo alcanzó una concentración máxima de 2,6 mM. En todas las experiencias, los contenidos de 3-HPA disminuyeron, hasta

desaparecer completamente tras una prolongada incubación. La desaparición del 3-HPA, junto con el consumo del glicerol residual, fue acompañada por un aumento de la concentración de 1,3-PDL y 3-HP. Las proporciones relativas de estos dos productos finales dependieron de la concentración inicial de fructosa: con 5.55 mM de este azúcar, su producción fue casi equimolar; sin embargo, en las experiencias con concentraciones superiores de fructosa, 1,3-PDL fue siempre el producto final mayoritario.



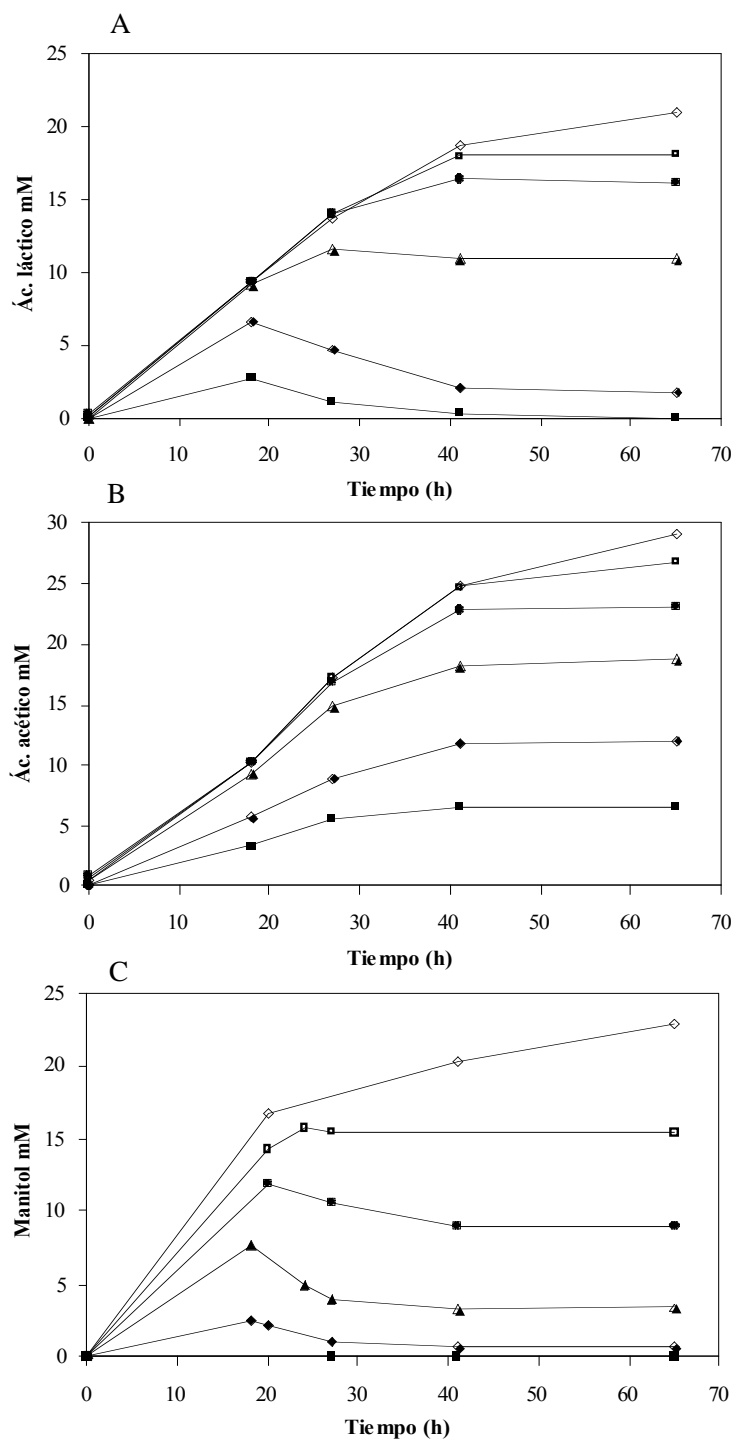
**Figura 2.1.** Influencia de la concentración de fructosa (5,5 mM ■, 11,1 mM ◆, 22,2 mM ▲, 33,3 mM ●, 44,4 mM □, y 55,5 mM ◇) sobre A) la degradación del glicerol (55,5 mM), B) el consumo de fructosa y C) el crecimiento de *L. collinoides* 17. Con el fin de mejorar las figuras, los resultados correspondientes a las concentraciones de fructosa superiores a 33,3 mM y 22,2 mM fueron omitidos de las representaciones gráficas A y C, respectivamente.



**Figura 2.2.** Influencia de las diferentes concentraciones de fructosa (5,5 mM ■, 11,1 mM ◆, 22,2 mM ▲, 33,3 mM ●) sobre los productos finales del metabolismo del glicerol (55,5 mM) por *L. collinoides* 17: A) 3-HP, B) 3-HPA y C) 1,3-PDL. Para mejorar las figuras, los resultados correspondientes a las concentraciones de fructosa superiores a 33,3 mM (A y C) y 22,2 mM (B) fueron omitidos de las representaciones gráficas.

En cuanto al metabolismo de los azúcares, *L. collinoides* 17 metaboliza glucosa y fructosa por la vía heteroláctica, produciendo ácido láctico, ácido acético y etanol como productos finales de la fermentación, cuyos contenidos relativos dependen del tipo de azúcar. La adición de glicerol provocó una disminución sustancial en la producción de etanol, detectándose únicamente trazas de éste (>1 mM). En cuanto a la producción de ácido láctico y ácido acético, *L. collinoides* 17 sintetizó cantidades similares de ambos productos, cuando se utilizaron concentraciones bajas de fructosa (5,55 mM y 11,1 mM) (Figuras 2.3 A y B). Tras la desaparición del azúcar tuvo lugar una cofermentación glicerol-ácido láctico. Como consecuencia se detectó una disminución del contenido en ácido láctico con un incremento inversamente correlacionado de ácido acético ( $R^2 = 0,834$  y  $0,984$  a 5,55 y 11,1 mM de fructosa, respectivamente). Sin embargo, no se detectó degradación de ácido láctico cuando *L. collinoides* 17 fue cultivada con concentraciones iniciales de fructosa superiores a 11,1 mM.

Además de los productos finales anteriores, se observó una conversión de fructosa en manitol cuando *L. collinoides* 17 se cultivó con concentraciones de fructosa superiores a 5,55 mM, (Figura 2.3 C). Esta transformación fue del 35 al 41%, para concentraciones de fructosa comprendidas entre 22,2 y 55,5 mM. La síntesis de manitol se produjo principalmente en los periodos iniciales de la fermentación y su posterior evolución varió según la concentración inicial del azúcar en el medio. Así, en presencia de 11,1, 22,2 y 33,3 mM de fructosa, este polialcohol fue parcialmente consumido cuando la concentración de fructosa se hizo limitante (Figura 2.3 C). La reducción de la concentración de manitol se correlacionó con el aumento de la concentración de ácido acético ( $R^2 = 0,936$ ,  $0,967$  y  $0,981$ , respectivamente). Sin embargo, a concentraciones superiores de fructosa (44,4 y 55,5 mM) y en condiciones de disponibilidad de fructosa, se detectaron ligeros incrementos del contenido en manitol.



**Figura 2.3.** Influencia de las diferentes concentraciones de fructosa (5,5 mM ■, 11,1 mM ◆, 22,2 mM ▲, 33,3 mM ●, 44,4 mM □, y 55,5 mM ◇) sobre la concentración de productos de fermentación por *L. collinoides* 17. A) ácido láctico, B) ácido acético y C) manitol.

### 2.3.3. Influencia del pH

Con el objeto de evitar el desarrollo de la alteración del amargor, se estudió la influencia de algunas variables (temperatura de almacenamiento y pH de la sidra) sobre la síntesis y acumulación del 3-HPA. La selección de estas variables se realizó debido a que son controlables por el productor sidrero en condiciones de bodega. Para estudiar la influencia de la acidez, se seleccionaron valores de pH habituales en sidra natural (3,3, 3,6 y 3,9), y los ensayos se realizaron en medio de Carr-m que contenía 5,55 mM de fructosa, 5,55 mM de glucosa y 55,5 mM de glicerol, a 28 °C en atmósfera enriquecida con un 5% CO<sub>2</sub>.

**Tabla 2.3.** Influencia del pH sobre el metabolismo del glicerol y los productos finales de la fermentación de azúcares por *L. collinoides* 17.

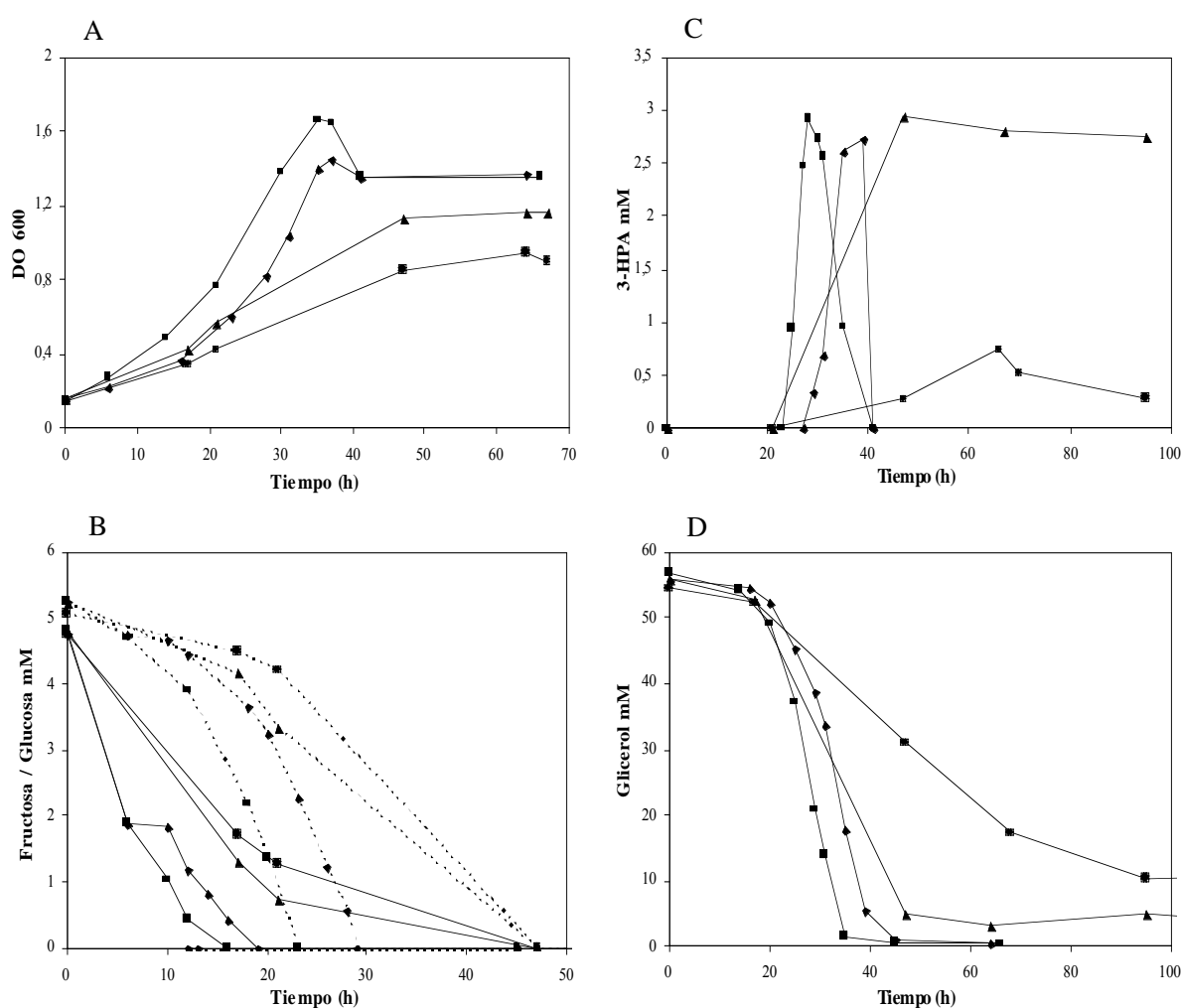
pH	Incubación (h)	DO <sub>600</sub>	Consumo de glicerol (%)	Productos finales (mM)				
				Ácido láctico Máximo	Ácido láctico Final	Ácido acético	1,3-PDL	3-HP
4,8	66	1,66	100	7,54	1,08	11,5	39,0	23,7
3,9	64	1,45	100	6,47	0,61	12,5	39,2	21,7
3,6	160	1,26	93,4	n.d*	1,06	13,6	36,9	15,2
3,3	160	0,95	79,6	n.d*	0,88	14,4	34,9	13,3

n.d.\*, no determinado;

Como se muestra en la Figura 2.4 A, a medida que disminuyó el pH de 4,8 a 3,3 se observó una reducción del crecimiento bacteriano y una ralentización del consumo de azúcares y de glicerol. Éste fue totalmente consumido en las experiencias a pH 4,8 y 3,9, mientras que a pHs de 3,6 y 3,3 se metabolizó el 93,4 y el 79,5%, respectivamente (Tabla 2.3). La velocidad de degradación de fructosa fue superior a la de glucosa y ambos fueron totalmente consumidos en todos los casos (Figura 2.4 B). A ninguno de los pHs examinados se detectó la formación de manitol. Tras el consumo total de azúcares, *L. collinoides* 17 comenzó a cometabolizar lactato y glicerol, produciéndose un aumento de la concentración de ácido acético.

La producción de 1,3-propanodiol fue similar bajo las diferentes condiciones de pH (entre 35 y 39 mM), siendo el principal producto del metabolismo del glicerol (Tabla 2.3). Sin embargo, se observó que la síntesis de 3-HP fue dependiente del pH, ya que se

detectaron contenidos ligeramente inferiores a pHs 3,3 y 3,6 (Tabla 2.3). En consecuencia, la relación cuantitativa 1,3-propanodiol/3-ácido hidroxipropiónico se incrementó de 1,64 a 2,62 al reducirse el pH de 4,8 a 3,3. También se observó una relación entre el pH, y la acumulación y posterior desaparición del 3-HPA. Así, a pHs 3,6 y 3,3 se retrasó el inicio de su acumulación y la producción fue muy reducida a pH 3,3 (Fig 2.4 C). Por otra parte, se detectó una desaparición completa de 3-HPA a pHs 4,8 y 3,9 tras periodos prolongados de incubación, mientras que a pHs más bajos (3,6 y 3,3) no se observó reducción alguna de los niveles de 3-HPA.



**Figura 2.4.** Influencia del pH (4,8 ■, 3,9 ◆, 3,6 ▲, 3,3 ●) sobre: A) crecimiento celular, B) consumo de azúcares, C) producción de 3-HPA y D) consumo de glicerol (55,5 mM) por *L. collinoides* 17. Las líneas continuas representan DO<sub>600</sub> y concentración de 3-HPA, fructosa y glicerol, mientras que las líneas discontinuas representan la concentración de glucosa.



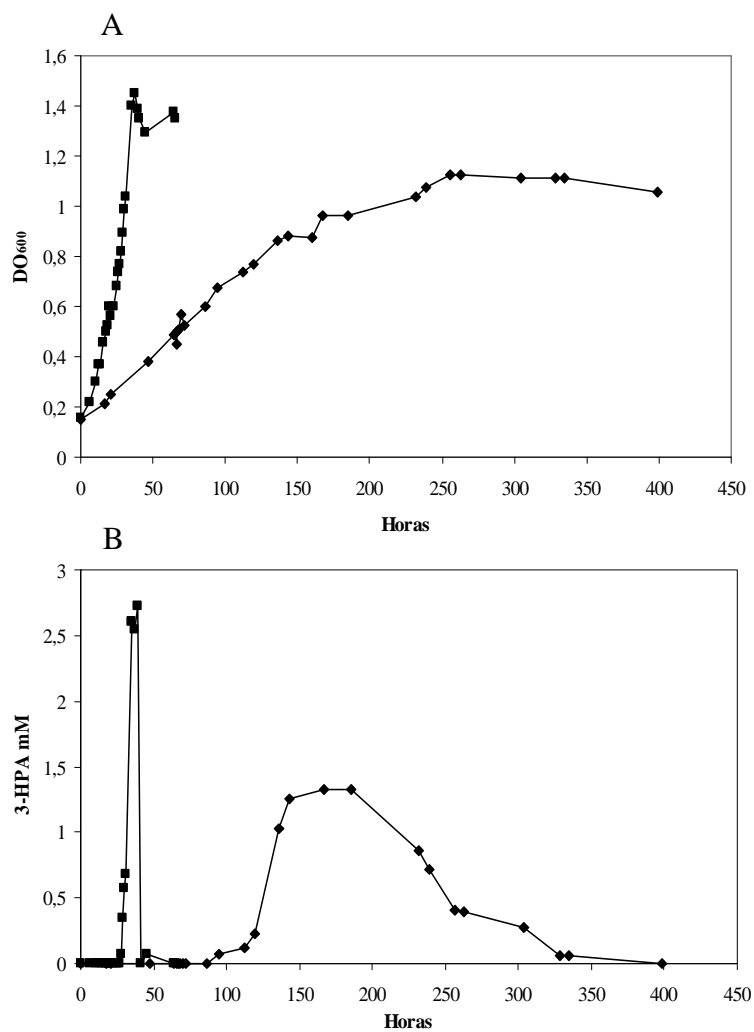
### 2.3.4. Influencia de la temperatura

En estos ensayos se evaluó la interacción entre una temperatura baja de almacenamiento y un pH de 3,9, sobre la acumulación y estabilidad del 3-HPA en la sidra natural. Para ello, la cepa *L. collinoides* 17 fue inoculada en el medio Carr-m en presencia de 5,55 mM de fructosa, 5,55 mM de glucosa y 55,5 mM de glicerol, a pH 3,9 e incubada a 15 o 28 °C.

En las experiencias realizadas a 15 °C se observó una drástica reducción de la velocidad de consumo de azúcares y glicerol con respecto a lo obtenido a 28 °C, lo cual se debió a la disminución de la velocidad de crecimiento (Figura 2.5 A). En consecuencia, la velocidad de síntesis de 1,3-PDL y 3-HP también se vio ralentizada. A pesar de ello, finalizado el periodo de incubación, se cuantificaron concentraciones similares de 1,3-PDL y 3-HP a ambas temperaturas (Tabla 2.5), siendo siempre el 1,3-PDL el producto final mayoritario. Por otro lado, la producción de 3-HPA a 15 °C se redujo a la mitad, aunque se mantuvo constante durante un periodo de tiempo más prolongado, hasta que finalmente desapareció tras 400 h de cultivo (Figura 2.5 B).

**Tabla 2.5.** Influencia de la temperatura sobre el metabolismo del glicerol y de los productos finales de la fermentación de azúcares en *L. collinoides* 17

Temp. °C	Incubación (h)	DO <sub>600</sub>	Consumo glicerol (%)	Productos finales (mM)						
				Ácido láctico		Ácido acético	1,3-PDL	3-HP	3-HPA	
				Máximo	Final				Máximo	Final
28	66	1,45	100	6,47	0,61	12,5	39,0	6,47	2,72	0
15	399	1,12	97,9	8,04	2,25	12,5	39,2	8,04	1,33	0



**Figura 2.5.** Influencia de la temperatura (28 °C ■ y 15 °C ◆) sobre el A) crecimiento y B) producción de 3-HPA por *L. collinoides* 17

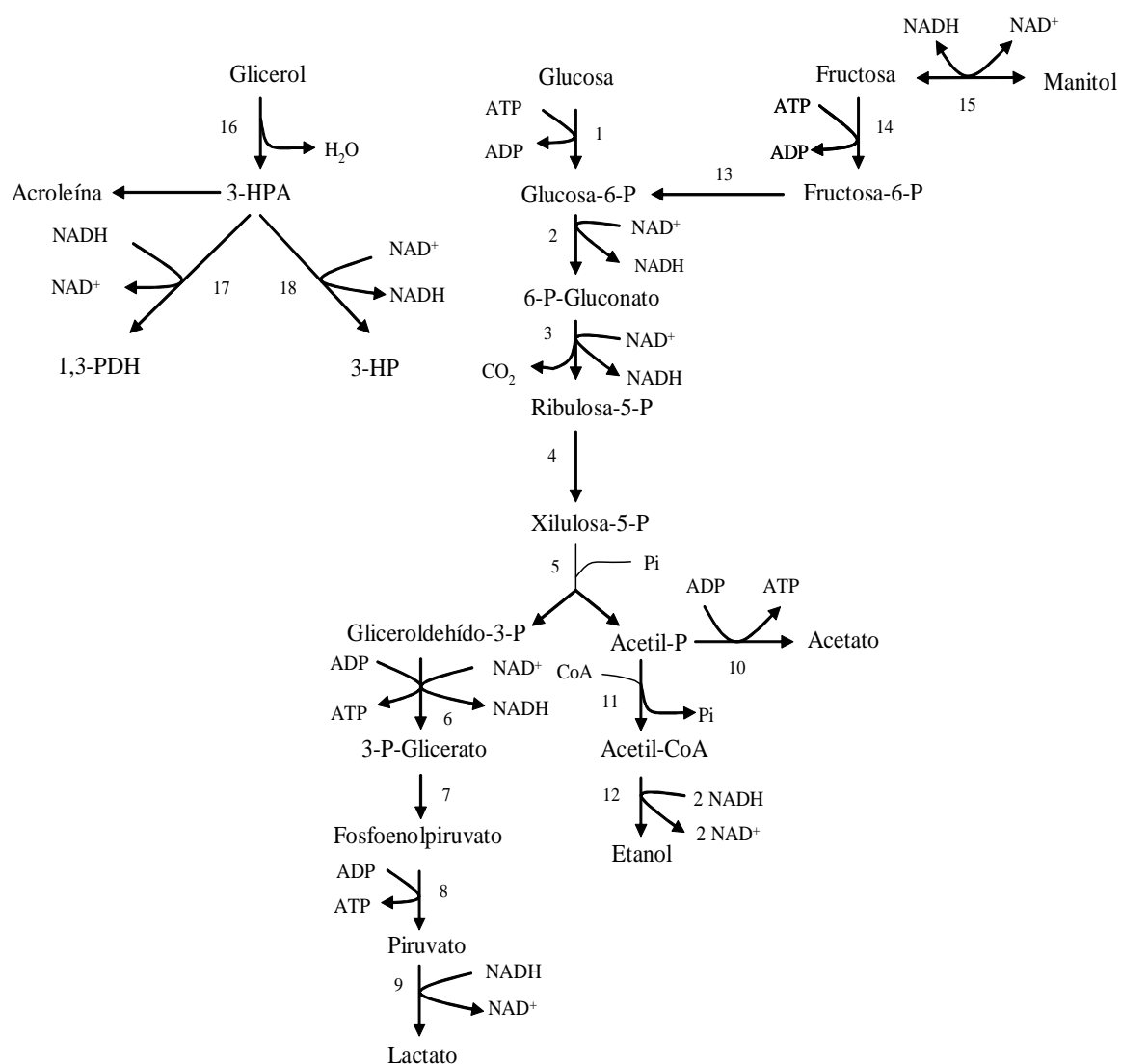
## 2.4. DISCUSIÓN

En este trabajo se estudiaron varias sidras alteradas con sabores amargos, en que se detectó degradación total o parcial del glicerol, además de concentraciones variables de 1,3-propanodiol, indicando la presencia de bacterias lácticas con actividad glicerol deshidratasa. Esta vía metabólica del glicerol es la responsable de la síntesis de 3-HPA, la cual se puede deshidratar a acroleína y dar lugar al picado acroleico por combinación con los polifenoles de la sidra (Lonvaud-Funel, 2002). En la mayoría de las muestras se detectaron poblaciones elevadas de BAL (entre 1,2 y 2,2 x 10<sup>7</sup> UFC mL<sup>-1</sup>), que suelen ser habituales en sidra natural (Dueñas et al., 1995). Sorprendentemente, en dos de ellas no se detectaron poblaciones viables de microorganismos, lo que podría indicar la inhibición del crecimiento debido al efecto tóxico del 3-HPA (Vollenweider y Lacroix, 2004).

A partir de estas sidras alteradas se aislaron 67 cepas de bacterias lácticas, a las que se examinó su capacidad para degradar glicerol. Para ello fueron cultivadas en anaerobiosis en un medio que contenía 55,5 mM de glicerol, cantidad que se encuentra habitualmente en las sidras, y diferentes cantidades de glucosa y fructosa, azúcares residuales de esta bebida. Entre las cepas analizadas, el 82% presentó la capacidad de consumir glicerol, aunque sólo el 40% lo hicieron a través de la vía glicerol deshidratasa. Entre éstas y al igual que en sidras francesas (Sauvageot et al., 2000; Claisse y Lonvaud-Funel, 2000), *L. collinoides* fue la especie predominante, aunque también se detectaron 2 cepas de *L. diolivorans*. La presencia de esta última especie no ha sido descrita en sidras francesas alteradas, pero sí en un vino con acroleína (Gorga et al., 2002). En sidras vascas, ambas especies han sido también relacionadas con la alteración del ahilado (Werning et al., 2006). El resto de las cepas que degradan el glicerol (60%) lo habrían consumido a través de la vía glicerol quinasa y/o glicerol deshidrogenasa (Pasteris y Strasser de Saad, 2009).

La cepa *L. collinoides* 17 fue seleccionada para examinar la influencia de diferentes factores (concentración de fructosa, pH y temperatura) sobre el metabolismo del glicerol y síntesis y acumulación del 3-HPA. Esta cepa no fue capaz de crecer en presencia de glicerol como única fuente carbonada, indicando la ausencia de las vías glicerol quinasa y glicerol deshidrogenasa, al igual que en otros *Lactobacillus* aislados de sidras francesas (Claisse y Lonvaud-Funel, 2000; Sauvageot et al., 2000) y vinos (Schütz y Radler, 1984). Sin embargo, la presencia de fructosa estimuló el consumo de glicerol por la vía glicerol

deshidratasa. En ésta, el glicerol se deshidrata a 3-hidropropionaldehído (Enzima 16, Figura 2.6), que actúa como aceptor de hidrógeno y se reduce a 1,3-propanodiol mediante una 1,3-propanodiol deshidrogenasa (Enzima 17, Figura 2.6). De esta forma se regenera el  $\text{NAD}^+$  necesario para continuar con el catabolismo de los azúcares por la vía de la 6-fosfogluconato/fosfocetolasa y en consecuencia no se sintetiza etanol pero sí acetato, similar a lo descrito en *L. reuteri* por Lüthi-Peng et al. (2002).



**Figura 2.6.** Ruta heteroláctica del metabolismo de azúcares y vía de la glicerol deshidratasa. (1) glucoquinasa, (2) glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, (3) 6-fosfogluconato deshidrogenasa, (4) epimerasa, (5) fosfocetolasa, (6) gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa y fosfoglicerato quinasa, (7) fosfogliceromutasa y enolasa, (8) piruvato quinasa, (9) lactato deshidrogenasa, (10) acetato quinasa, (11) fosfato acetiltransferasa, (12) acetaldehído deshidrogenasa y alcohol deshidrogenasa, (13) glucosa fosfato isomerasa, (14) fructoquinasa, (15) manitol deshidrogenasa, (16) glicerol deshidratasa, (17) 1,3-propanodiol deshidrogenasa y (18) aldehído deshidrogenasa

Por otro lado, se observó que *L. collinoides* 17 también oxidaba el 3-HPA a 3-HP, contrariamente a lo reportado para *L. collinoides*, aislado de sidras francesas (Gorga et al., 2002) y *L. brevis* y *L. buchneri* aislados de vino y masa ácida de panadería, respectivamente (Schutz y Radler, 1984). Sin embargo, estos resultados estaban en consonancia con lo descrito por Sobolov y Smiley (1960) y Talarico et al. (1988) para *L. brevis* y *L. reuteri*. En estas bacterias, el 3-HPA se convertía en cantidades equimolares de 1,3-PDL y 3-HP mediante una dismutación aldehídica, cuando el glicerol era fermentado en ausencia de azúcares. En *L. collinoides* 17, este comportamiento se observó únicamente cuando fue cultivada con una concentración limitante de fructosa (5,55 mM), pero no así a concentraciones superiores. En estas condiciones, el compuesto 1,3-propanodiol fue siempre el producto mayoritario, de forma similar a lo descrito para *L. reuteri* (Talarico et al., 1988).

La presencia de concentraciones apreciables de 3-HP en todas las condiciones sugirió que la enzima 1,3-propanodiol deshidrogenasa (Enzima 17, Figura 2.6), además de reducir el 3-HPA a 1,3-PDL era también capaz de catalizar la dismutación del 3-HPA a 1,3-PDL y 3-HP. En este sentido, se han descrito varias alcohol deshidrogenasas que catalizan la dismutación de aldehídos con producción de cantidades equimolares del alcohol y ácido correspondiente (Velonia y Smonou, 2000; Mee et al., 2005). Tanto la reducción como la dismutación de 3-HPA podrían proporcionar a la bacteria un mecanismo para disminuir la concentración intracelular del aldehído tóxico 3-HPA. Sin embargo, tampoco se podría descartar la existencia de una aldehído deshidrogenasa que tuviese como sustrato el 3-HPA y lo oxidara a 3-HP.

En relación al 3-HPA, precursor de la acroleína, éste se acumuló transitoriamente en el medio de cultivo, alcanzando niveles máximos de 6 mM. Se ha descrito que su acumulación comienza una vez que cesa la producción de NADH, lo que ocurre tras la degradación de los azúcares presentes en el medio de cultivo (Sauvageot et al., 2000; Lüthi-Peng et al., 2002). Sin embargo, los resultados obtenidos en este trabajo mostraron que la acumulación de 3-HPA comenzó cuando todavía existía fructosa en el medio. En estas condiciones, este azúcar fue utilizada como aceptor de electrones para reoxidar el NADH, produciéndose manitol. Como consecuencia, tendría lugar un incremento de la relación  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$ , favoreciéndose así la acumulación de 3-HPA. Estos resultados están de acuerdo con lo reportado por Lüthi-Peng et al. (2002), quienes demostraron que el

ratio intracelular  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  estaba positivamente correlacionado con la acumulación del 3-HPA en *L. reuteri*.

Tras su acumulación transitoria, el 3-HPA desapareció finalmente en la mayoría de las condiciones medioambientales ensayadas, siendo la velocidad de degradación muy lenta en los ensayos realizados a 15 °C. En ausencia de fructosa, el coenzima NADH, necesario para la reducción del 3-HPA, pudo provenir de la degradación del lactato (en fermentaciones con concentraciones de fructosa de 5,5 y 11,1 mM) o del manitol (en fermentaciones con 11,1, 22,2 y 33,3 mM), tal y como se ha descrito en otros *Lactobacillus* (Veiga da Cunha y Foster, 1992; Claisse y Lonvaud-Funel, 2000). Además de eliminar 3-HPA, el cometabolismo lactato-glicerol y manitol-glicerol podría proporcionar una fuente adicional de ATP para continuar con el crecimiento celular. Sin embargo, desde un punto de vista enológico estas cofermentaciones resultan perjudiciales, ya que generan ácido acético a partir de acetil-fosfato, lo que provocaría un aumento de la acidez volátil. En la sidra natural, se ha constatado una reducción del contenido en glicerol a lo largo del periodo de maduración. Teniendo en cuenta los niveles elevados de bacterias lácticas en este periodo (Dueñas et al., 2002) estos resultados sugerirían la presencia de cepas capaces de degradar glicerol, lo que podría contribuir a la acetificación y a la aparición de la alteración del picado acroléico o amargor en estas bebidas.

Finalmente, es destacable que los pHs bajos (3,6 y 3,3) fueron las únicas condiciones en las que el 3-HPA no desapareció del medio de cultivo. Por consiguiente, el pH del medio de cultivo influyó de manera decisiva en la acumulación de 3-HPA en *L. collinoides* 17. Esta mayor estabilidad del 3-HPA podría deberse a que las condiciones más ácidas favorecen la transformación de 3-HPA en acroleína (Vollenweider y Lacroix, 2004) o ser el resultado de la carencia de fuentes carbonadas durante el periodo de acumulación del 3-HPA.

## 2.5. CONCLUSIONES

En este trabajo se ha puesto de manifiesto que lactobacilos heterofermentativos, mayoritariamente de la especie *L. collinoides*, están implicados en la alteración del amargor en la sidra natural, habiéndose detectado únicamente dos cepas de la especie *L. diolivorans*. Esta microbiota tiene la capacidad de degradar el glicerol a través de la vía glicerol deshidratasa, produciéndose el compuesto 3-hidroxi propionaldehído, precursor de la acroleína, que por combinación con los polifenoles de la bebida origina compuestos de sabor muy amargo. Se pierde además el glicerol, compuesto que aporta cuerpo y suavidad a la bebida.

*L. collinoides* 17 degrada el glicerol por la vía glicerol deshidratasa en presencia de glucosa y/o fructosa. Por ello, la composición de la sidra natural durante el periodo de maduración o tras el embotellado, es favorable a la degradación del glicerol y a la acumulación del 3-hidroxi propionaldehído, ya que contiene fructosa, como azúcar residual y glicerol, como producto de la fermentación gliceropirúvica. El compuesto 3-HPA tóxico para la célula, puede ser eliminado mediante la degradación de manitol y/o ácido láctico, metabolitos que pueden utilizarse como sustratos energéticos. Sin embargo, estas transformaciones tienen la desventaja del incremento simultáneo del contenido en ácido acético.

Los resultados obtenidos apoyan la idea de que los pHs más ácidos en la sidra pueden potenciar el mantenimiento del 3-HPA en el medio y como consecuencia, contribuir a su transformación en acroleína y al desarrollo del picado acroleico. Igualmente, las bajas temperaturas durante el periodo de maduración y tras el embotellado pueden ralentizar la desaparición del 3-HPA. Teniendo en cuenta estos resultados, para evitar el desarrollo de la alteración, la sidra debería de ser estabilizada microbiológicamente una vez realizada la fermentación maloláctica, mediante el empleo de técnicas enológicas tales como un sulfitado adecuado y/o filtración.

## 2.6. BIBLIOGRAFÍA

- Circle S. J., Stone L. y Boruff C. S. 1945. Acrolein determination by means of tryptophane. *Industrial and Engineering Chemistry, Analytical Edition*. 17: 259-262.
- Claisse O. y Lonvaud-Funel A. 2000. Assimilation of glycerol by a strain of *Lactobacillus collinoides* isolated from cider. *Food Microbiology*. 17: 513-519.
- Claisse O. y Lonvaud-Funel A. 2001. Primers and a specific DNA probe for detecting lactic acid bacteria producing 3-Hydroxypropionaldehyde from glycerol in spoiled ciders. *Journal of Food Protection*. 64: 833-837.
- Daniel R., Bobik T. A. y Gottschalk G. 1999. Biochemistry of coenzyme B<sub>12</sub>-dependent glycerol and diol dehydratase and organization of the encoding genes. *FEMS Microbiology Letters*. 22:553-566.
- Del Campo G., Santos J. I., Berregi I., Velasco S., Ibarburu I., Dueñas M. T. e Irastorza A. 2003. Ciders produced by two types of presses and fermented in stainless steel and wooden vats. *Journal of the Institute of Brewing*. 109: 342-348.
- Dueñas M., Irastorza A., Fernández C., Bilbao A. y Huerta A. 1994. Microbial populations and malolactic fermentation of apple cider using traditional and modified methods. *Journal of Food Science*. 59: 1060-1064.
- Dueñas M., Irastorza A., Fernández C. y Bilbao A. 1995. Heterofermentative lactobacilli causing ropiness in Basque Country ciders. *Journal of Food Protection*. 58: 76-80.
- Dueñas M., Irastorza A., Munduate A., Santos J. I., Berregi I. y Del Campo G. 2002. Influence of enzymatic clarification with a pectin methylesterase on cider fermentation. *Journal of the Institute of Brewing*. 108: 243-247.
- Gorga A., Claisse O. y Lonvaud-Funel A. 2002. Organisation of the genes encoding glycerol dehydratase of *Lactobacillus collinoides*, *Lactobacillus hilgardii* and *Lactobacillus diolivorans*. *Sciences des Aliments*. 22: 151-160.
- Lonvaud-Funel A. 2002. Lactic acid bacteria in winemaking: Influence on sensorial and hygienic quality. Pp. 231-262. En: Singh, V.P. y Stapleton, R.D. (eds), *Biotransformations: bioremediation technology for health and environmental protection*. Progress in Industrial Microbiology, vol 36. Elsevier Science, Amsterdam,
- Lüthi-Peng Q., Dileme F. B. y Puhan Z. 2002. Effect of glucose on glycerol bioconversion by *Lactobacillus reuteri*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 59: 289-296.



- De Man J. C., Rogosa M. y Sharpe, M. E. 1960. A medium for de cultivation of lactobacilli. *Journal of Applied Bacteriology*. 23: 130-135.
- Mee B., Kelleher D., Frias J., Malone R., Tipton K. F., Henehan G. T. M. y Windle H. J. 2005. Characterization of cinnamyl alcohol dehydrogenase of *Helicobacter pylori*. *FEBS Journal*. 272: 1255-1264.
- Palmfeldt J., Paese M., Hahn-Hägerdal B. y Van Niel E. W. J. 2004. The pool of ADP and ATP regulates anaerobic product formation in resting cells of *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*. 70: 5477-5484.
- Pasteris S. E. y Strasser de Saad A. M. 2009. Sugar-glycerol cofermentations by *Lactobacillus hilgardii* isolated from wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 57: 3853-3858.
- Renouf V., Claisse O. y Lonvaud-Funel A. 2006. *rpoB* gene: A target for identification of LAB cocci by PCR-DGGE and melting curves analyses in real time PCR. *Journal of Microbiological Methods*. 67: 162-170.
- Sauvageot N., Gouffi K., Laplace J. M. y Auffray Y. 2000. Glycerol metabolism in *Lactobacillus collinoides*: production of 3-hydroxypropionaldehyde, a precursor of acrolein. *International Journal of Food Microbiology*. 55: 167-170.
- Sauvageot N., Muller C., Hartke A., Auffray Y. y Laplace J. M. 2002a. Characterisation of the diol dehydratase *pdu* operon of *Lactobacillus collinoides*. *FEMS Microbiology Letters*. 209: 69-74.
- Sauvageot N., Pichereaur V., Louarme L. C., Hartke A., Auffray Y. y Laplace J. M. 2002b. Purification, characterization and subunits identification of diol dehydratase of *Lactobacillus collinoides*. *European Journal of Biochemistry*. 269: 5731-5737.
- Schutz H. y Radler F. 1984. Anaerobic reduction of glycerol to propanediol 1,3 by *Lactobacillus brevis* and *Lactobacillus buchneri*. *Systematic and Applied Microbiology*. 5: 169-178.
- Slininger P., Bothast R. J. y Smiley K. 1983. Production of 3- hydroxypropionaldehyde from glycerol. *Applied and Environmental Microbiology*. 46: 62-67.
- Sobolov M. y Smiley F. A. 1960. Metabolism of glycerol by an acrolein-forming *Lactobacillus*. *Journal of Bacteriology*. 79: 261-266.
- Talarico T. D., Casas I. A., Chung T. C. y Dobrogosz W. J. 1988. Production and isolation of reuterin, a growth inhibitor produced by *Lactobacillus reuteri*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 33: 674-679.

- Toraya T., Ushio K., Fukui S. y Hogenkamps H. P. C. 1977. Studies on the mechanism of adenosylcobalamin-dependent diol dehydratase reaction by the use of analogs of the coenzyme. *Journal of Biochemistry*. 252: 963-970.
- Veiga da Cunha M. y Foster M. A. 1992. Sugar-glycerol cofermentation in lactobacilli: the fate of lactate. *Journal of Bacteriology*. 174: 1013-1019.
- Velonia K. y Smonou I. 2000. Dismutation of aldehydes by alcohol dehydrogenases. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*. 2283-2287.
- Vollenweider S. y Lacroix C. 2004. 3-hydroxypropionaldehyde: applications and perspectives of biotechnological production. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 64: 16-27.
- Werning M. L., Ibarburu I., Dueñas M. T., Irastorza A., Navas J. y López P. 2006. *Pediococcus parvulus* *gtf* gene encoding the GTF glycosyltransferase and its application for specific PCR detection of  $\beta$ -D-glucan-producing bacteria in foods and beverages. *Journal of Food Protection*. 69: 161-169.

### **3. Aminas biógenas en sidra natural del País Vasco**

---

### 3.1. INTRODUCCIÓN

Los problemas relacionados con la formación de aminas biógenas afectan a numerosos alimentos fermentados como quesos (Novella-Rodríguez et al., 2000), embutidos (Suzzia y Gadrini, 2003) y pescados (Lehane y Olley, 2000). Sin embargo, la presencia de estos compuestos en bebidas alcohólicas, como vinos (Marcobal et al., 2006; Moreno-Arribas y Polo, 2008), cervezas (Izquierdo-Pulido et al., 1996) o sidras (Zee et al., 1983; Vidal-Carou et al., 1989), ha recavado mayor atención, debido a que el etanol puede incrementar el efecto nocivo de las aminas sobre la salud del consumidor. En este sentido, aunque no se han establecido oficialmente los límites permitidos de la concentración de aminas biógenas en bebidas alcohólicas, en el caso del vino algunos países imponen sus propias recomendaciones con respecto a la cantidad máxima de histamina permitida. Entre estos países se encuentran Suiza (10 mg L<sup>-1</sup>), Austria (10 mg L<sup>-1</sup>), Francia (8 mg L<sup>-1</sup>), Bélgica (entre 5 y 6 mg L<sup>-1</sup>), Finlandia (5 mg L<sup>-1</sup>), Holanda (3mg L<sup>-1</sup>) y Alemania (2 mg L<sup>-1</sup>) (Lehtonen, 1996).

En los últimos años se han realizado numerosos estudios para conocer en profundidad el origen y los factores implicados en la producción de aminas biógenas en distintos alimentos y bebidas. En el vino, se considera que éstas pueden tener dos orígenes, algunas proceden de la materia prima, como cadaverina y putrescina, y han sido asociadas con las condiciones sanitarias de la uva (Leitão et al., 2005), mientras que otras se han relacionado con el proceso de fermentación. En este sentido, aunque se ha descrito síntesis de aminas biógenas por parte de levaduras durante la fermentación alcohólica (Lafon-Lafourcade, 1975; Torrea y Ancín, 2002; Caruso et al., 2002), generalmente su producción se asocia a la acción de las bacterias lácticas durante la fermentación maloláctica (Landete et al., 2005a; Marcobal et al., 2006). Además, se ha observado que existen diversos factores que pueden influir en la producción y abundancia de aminas biógenas en el vino. Entre ellos se encuentran la presencia y concentración de los aminoácidos precursores (Herbert et al., 2006), el pH y la concentración de etanol (Izquierdo-Pulido et al., 1996; Moreno-Arribas et al., 2003; Marcobal et al., 2006), la cantidad de anhídrido sulfuroso (SO<sub>2</sub>) adicionado (Vidal-Carou et al., 1990), así como las condiciones y prácticas empleadas durante el proceso de elaboración (Martín-Álvarez et al., 2006).

En cuanto al contenido de aminas biógenas de la sidra, existen muy pocos estudios en la bibliografía (Zee et al., 1983; Vidal-Carou et al., 1989), a pesar de que se trata de un producto sensible a sufrir este problema. En el caso de la sidra natural del País Vasco podría deberse, fundamentalmente, a su falta de estabilización microbiológica después de la fermentación maloláctica, lo que conlleva que, por lo general, en la sidra se mantengan poblaciones elevadas de bacterias lácticas (en torno a  $10^7$  UFC mL<sup>-1</sup>) (Dueñas et al., 1994), entre las que podrían encontrarse cepas con actividad aminoácido descarboxilasa. Además, a pesar de que la sidra natural del País Vasco se embotella completamente fermentada, mantiene pequeñas cantidades de fructosa y glicerol como fuentes carbonadas residuales, lo que posibilita el mantenimiento de poblaciones viables de estas bacterias. Por otro lado, el reducido pH de la sidra podría ser otro factor que contribuyera a la producción de aminas biógenas, ya que ésta se ha relacionado con los mecanismos de defensa de los microorganismos frente a condiciones ácidas del medio (Arena y Manca de Nadra, 2001).

Con el objeto de conocer el contenido en aminas biógenas de la sidra natural del País Vasco, y evaluar el potencial riesgo para la salud que supondría el consumo de este producto, se ha realizado un estudio sistemático sobre la producción de estas aminas en la sidra natural producida de manera industrial en el País Vasco. Para ello, además de determinar la incidencia de la presencia de aminas en sidra natural comercializada, se han identificado las especies de bacterias lácticas con capacidad para producir estos compuestos en sidras, y se ha estudiado la evolución de la concentración de aminoácidos libres y aminas biógenas a lo largo del proceso de elaboración industrial de la sidra natural.

## 3.2. MATERIAL Y MÉTODOS

### 3.2.1. Muestras de sidra natural comercializada

Con el objeto de estudiar la incidencia de las aminos biógenas en sidra natural del País Vasco comercializada, se analizaron 24 sidras naturales de la cosecha 2004 adquiridas en establecimientos comerciales. Para los análisis químicos, las muestras se centrifugaron (16000 rpm, 30 min) y los sobrenadantes fueron filtrados (0,22 m, Millipore).

### 3.2.2. Elaboración de sidra natural y toma de muestras

Para estudiar la evolución de aminos biógenas y aminoácidos libres durante el proceso de elaboración de la sidra, se recogieron 76 muestras en las cosechas 2005 y 2006 de 14 sidrerías a lo largo de las diferentes etapas de elaboración (Tabla 3.1).

Los mostos fueron extraídos a partir de mezclas de variedades de manzana sidrera mediante prensa tradicional o neumática (Tabla 3.1). Posteriormente, las sidras se elaboraron de forma tradicional, sin adición de SO<sub>2</sub>, levaduras seleccionadas o clarificación enzimática. Se realizaron entre cuatro y seis muestreos en cada sidrería dependiendo de la cosecha y las muestras se mantuvieron a 4 °C hasta su análisis. Todas las determinaciones se realizaron, como mínimo, por duplicado.

**Tabla 3.1.** Variables tecnológicas consideradas en este estudio y número de muestras analizadas

Variable	Nº de muestras
<b>Cosecha</b>	
2005	26
2006	50
<b>Tipo de prensa</b>	
1) Tradicional (extracción lenta)	30
2) Neumática (extracción rápida)	46
<b>Etapas de elaboración</b>	
1) Mosto de manzana	17
2) Fermentación alcohólica	16
3) Final de fermentaciones (alcohólica y FML)	17
4) Antes de embotellar	16
5) Después de 3 meses en botella	4
6) Después de 4 o 5 meses en botella	6
<b>Nº total de muestras analizadas</b>	<b>76</b>

### 3.2.3. Bacterias lácticas y medios de cultivo

Para el estudio de la capacidad de producir aminas biógenas, se analizaron un total de 54 cepas de diferentes especies de bacterias lácticas aisladas de sidras naturales: *L. collinoides* (15), *L. diolivorans* (16), *L. plantarum* (2), *L. suebicus* (3), *O. oeni* (10) y *P. parvulus* (8). Además, como controles positivos se analizaron las cepas de referencia *L. brevis* CECT 216 (productora de tiramina) y *Lactobacillus* 30a ATCC 33222 (productora de histamina y putrescina). Las cepas se mantuvieron congeladas a -80 °C en los medios de cultivo óptimos para cada microorganismo suplementados con glicerol al 20% (v/v).

Las cepas de *Lactobacillus* y *Pediococcus* se cultivaron en medio MRS (pH 4,8) (Anexo I), mientras que las de *O. oeni* se crecieron en el medio MLO (pH 4,8) (Anexo I). Todas las incubaciones se realizaron a 28 °C bajo atmósfera suplementada con 5% CO<sub>2</sub>.

### 3.2.4. Identificación de las cepas de bacterias lácticas

La identificación de las cepas se realizó mediante la amplificación por PCR de un fragmento del gen ARNr 16S y su posterior secuenciación, según lo descrito en el apartado 2.2.5.1 de material y métodos del Capítulo 2. Además, la identidad de las cepas de *O. oeni* se confirmó mediante la reacción de PCR utilizando los cebadores específicos para la especie (On1 y On2) según el protocolo descrito por Zapparoli et al. (1998).

### 3.2.5. Determinación de los parámetros convencionales de la sidra natural

Con el término parámetros convencionales, se denomina a las determinaciones que se realizan en las bodegas y sidrerías, y que dan una idea global de la composición de la sidra (pH, densidad, acidez total, grado alcohólico y contenido de SO<sub>2</sub>). Éstas se realizaron de acuerdo a la metodología de la Organización Internacional de la Viña y el Vino (OIV, 2009).

### 3.2.6. Nitrógeno total

La determinación del nitrógeno total se realizó mediante el método Kjeldahl, con un sistema de digestión DK 20 (VELP Scientifica) y un sistema automático de destilación UDK 142 (VELP Scientifica). La valoración de las muestras se realizó mediante un sistema automático Tritino 702 SM (Metrohn).

### 3.2.7. Análisis de aminas biógenas

Las aminas biógenas se analizaron por duplicado, mediante HPLC en fase inversa (RP-HPLC) en un cromatógrafo líquido compuesto por una bomba Waters 600, un detector de fluorescencia HP 1046-A (Hewlett-Packard), y un inyector automático WISP 710B (Waters) conectado a un ordenador personal. El control del equipo se realizó utilizando el programa Millennium32 (Waters). La separación se llevó a cabo en una columna Waters Nova-Pack C18 (300 x 3,9 mm i.d., 60 Å, a 4 µm).

La concentración de aminas biógenas se determinó según el método previamente descrito por Marcobal et al. (2005). Para la derivatización precolumna de las aminas, se preparó el reactivo disolviendo 350 mg de ortoftaldialdehído (OPA) (Fluka) y 2,5 mL de 2-β-mercaptoetanol (MEC) (Merck) en 47,5 mL de metanol. Este reactivo debe ser preparado como mínimo 24 h antes de su uso y mantenerse a resguardo de la luz. Antes de usar el reactivo se filtró y desgasificó. Para la reacción de derivatización se mezclaron de forma automática 16 µL de muestra con 6 µL de tampón borato (0,4 M, pH 10,5) y 12 µL de la solución derivatizante. Para garantizar una adecuada reacción, la mezcla recorrió un tubo de 3 m x 0,5 mm de diámetro interno, durante 1 min antes de llegar a la columna. La detección de las aminas derivatizadas se realizó mediante un detector de fluorescencia (longitud de onda de excitación 340 nm y longitud de onda de emisión 425nm)

Para la separación de las aminas se generó un gradiente mediante la mezcla de los eluyentes A (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 12H<sub>2</sub>O, 3,6 mg L<sup>-1</sup>, pH 8,3) y B (1% de 2-octanol en acetonitrilo y eluyente A, en una proporción 70:30, v/v). El flujo de la fase móvil se inició a 0,1 mL min<sup>-1</sup> y la separación se realizó mediante el programa expuesto en la Tabla 3.2.



**Tabla 3.2.** Programa de gradiente utilizado para la separación de aminas biógenas

Tiempo (min)	Flujo (mL min <sup>-1</sup> )	%A	%B
0,00	0,01	70,0	30,0
5,00	0,10	70,0	30,0
6,00	0,80	70,0	30,0
20,00	0,80	50,0	50,0
60,00	0,80	20,0	80,0
61,00	0,80	70,0	30,0
80,00	0,80	70,0	30,0
82,00	0,00	70,0	30,0

Para determinar la concentración de aminas biógenas, se preparó una solución patrón de las aminas a determinar (1,2 g L<sup>-1</sup> de diclorhidrato de histamina, 0,2 g L<sup>-1</sup> de clorhidrato de metilamina, 0,2 g L<sup>-1</sup> de clorhidrato de etilamina, 0,8 g L<sup>-1</sup> de tiramina, 1 g L<sup>-1</sup> de clorhidrato de 2-feniletilamina, 3 g L<sup>-1</sup> de diclorhidrato de 1,4-diaminobutano o putrescina y 3 g L<sup>-1</sup> de diclorhidrato de 1,5-diaminopentano o cadaverina) en etanol al 40% (v/v) y se mantuvo a 4 °C protegida de la luz. Las soluciones estándares se prepararon diariamente, diluyendo el patrón en etanol al 10% (v/v).

### 3.2.8. Análisis de aminoácidos

La separación e identificación de los aminoácidos existentes en las muestras se realizó mediante RP-HPLC en el cromatógrafo descrito en el apartado 3.2.7, mediante una reacción de derivatización precolumna en la que los aminoácidos primarios reaccionan con OPA en presencia de  $\beta$ -mercaptoetanol para formar un complejo detectable por fluorescencia. El método empleado fue descrito previamente por Moreno-Arribas et al. (1998).

Para la derivatización precolumna de los aminoácidos se preparó el reactivo disolviendo 200 mg de OPA en 9 mL de metanol y se enrasaron a 10 mL con una solución de tampón borato (0,4 M, pH 10). Se añadieron 160  $\mu$ L de MEC, y cada dos días, se adicionaron 16  $\mu$ L más para reponer las pérdidas producidas por la evaporación. Este reactivo debe ser preparado como mínimo 24 h antes de su uso y mantenerse a resguardo de la luz. Antes de usar el reactivo se filtró y desgasificó.

El análisis de los aminoácidos se realizó en muestras diluidas (1:2, v/v) en tampón borato (0,4 M, pH 10). La reacción de derivatización se realizó de forma automática mezclando 12  $\mu\text{L}$  de la solución derivatizante y 20  $\mu\text{L}$  de la muestra diluida. La detección se realizó mediante un detector de fluorescencia (longitud de onda de excitación 340 nm y longitud de onda de emisión 425nm).

Para la separación de los aminoácidos se generó un gradiente mediante la mezcla de los eluyentes A: metanol, 10 mM de fosfato sódico (pH 7,3) y tetrahidrofurano en una relación de 19:80:1 (v/v/v), y B: metanol y 10 mM de fosfato sódico (pH 7,3) en una relación de 80:20 (v/v). La separación se realizó mediante el programa expuesto en la Tabla 3.3.

**Tabla 3.3** Programa de gradiente utilizado para la detección de aminoácidos

Tiempo (min)	Flujo ( $\text{mL min}^{-1}$ )	% A	% B
0,00	0,01	100,0	0,0
2,00	0,10	100,0	0,0
2,50	1,50	100,0	0,0
7,50	1,50	85,0	15,0
12,50	1,50	85,0	15,0
17,50	1,50	70,0	30,0
21,50	1,50	60,0	40,0
33,50	1,30	20,0	80,0
39,50	1,30	20,0	80,0
41,00	1,50	100,0	0,0
57,00	1,50	100,0	0,0
60,00	0,00	100,0	0,0

Los aminoácidos se cuantificaron mediante el método de calibrado externo. Para ello, se generó una recta de calibrado para cada aminoácido a determinar. El patrón de calibrado se preparó añadiendo ácido glutámico, asparragina,  $\beta$ -alanina,  $\alpha$ -alanina,  $\gamma$ -aminobutírico (GABA), triptófano y ornitina a una solución de aminoácidos estándar (Sigma).

### 3.2.9. Caracterización microbiológica de mostos y sidras

El análisis de las poblaciones de bacterias lácticas, bacterias acéticas y levaduras se realizó mediante recuento en placas de MRS-m agar, agar mosto y agar malta, respectivamente, según lo descrito en la sección 2.2.1 de material y métodos del Capítulo 2.

### 3.2.10. Detección de bacterias lácticas productoras de aminas biógenas

La capacidad de las bacterias lácticas aisladas de sidra para producir aminas biógenas se estudió en dos medios diferentes. En el medio sintético semidefinido de Bover-Cid (Bover-Cid y Holzapfel, 1999) (pH 5,2) (Anexo I), previamente evaluado para la detección de bacterias lácticas con actividad aminoácido descarboxilasa (Moreno-Arribas et al., 2003), y en sidra natural modificada. Esta última compuesta por sidra natural filtrada (0,45  $\mu$ m, Millipore) y enriquecida con glucosa (0,5 g L<sup>-1</sup>), clorhidrato de L-ornitina (1 g L<sup>-1</sup>), clorhidrato de L-histidina (1 g L<sup>-1</sup>) y sal disódica de L-tirosina (0,4 g L<sup>-1</sup>) Los ensayos en este medio se realizaron a pH 4 y 5,2 y en presencia y ausencia de 0,05 g L<sup>-1</sup> de piridoxal-5-fosfato.

Para inocular el medio de Bover-Cid, las cepas se propagaron dos veces en medio MRS (pH 5,2) suplementado con 0,1 g L<sup>-1</sup> de fructosa, 20 % de jugo de tomate (v/v) y 0,005% de piridoxal-5-fosfato. Por otro lado, para evitar la pérdida de viabilidad del inóculo en los ensayos realizados en sidra natural modificada, las cepas fueron precultivadas dos veces en sidra natural filtrada (pH 4,8) suplementada con glucosa (5 g L<sup>-1</sup>), extracto de levadura (5 g L<sup>-1</sup>), ácido pantoténico (0,01 g L<sup>-1</sup>) y tween 80 (1 g L<sup>-1</sup>), todo ello esterilizado por filtración (0,45  $\mu$ m).

Todas las incubaciones se realizaron a 28 °C durante 7 días en atmósfera enriquecida con 5% CO<sub>2</sub>. Transcurrido este tiempo, se centrifugaron los medios de cultivo (10000 rpm, 10 min) y los sobrenadantes se almacenaron a -20 °C hasta su posterior análisis por RP-HPLC. Todos los ensayos y análisis se realizaron por duplicado.

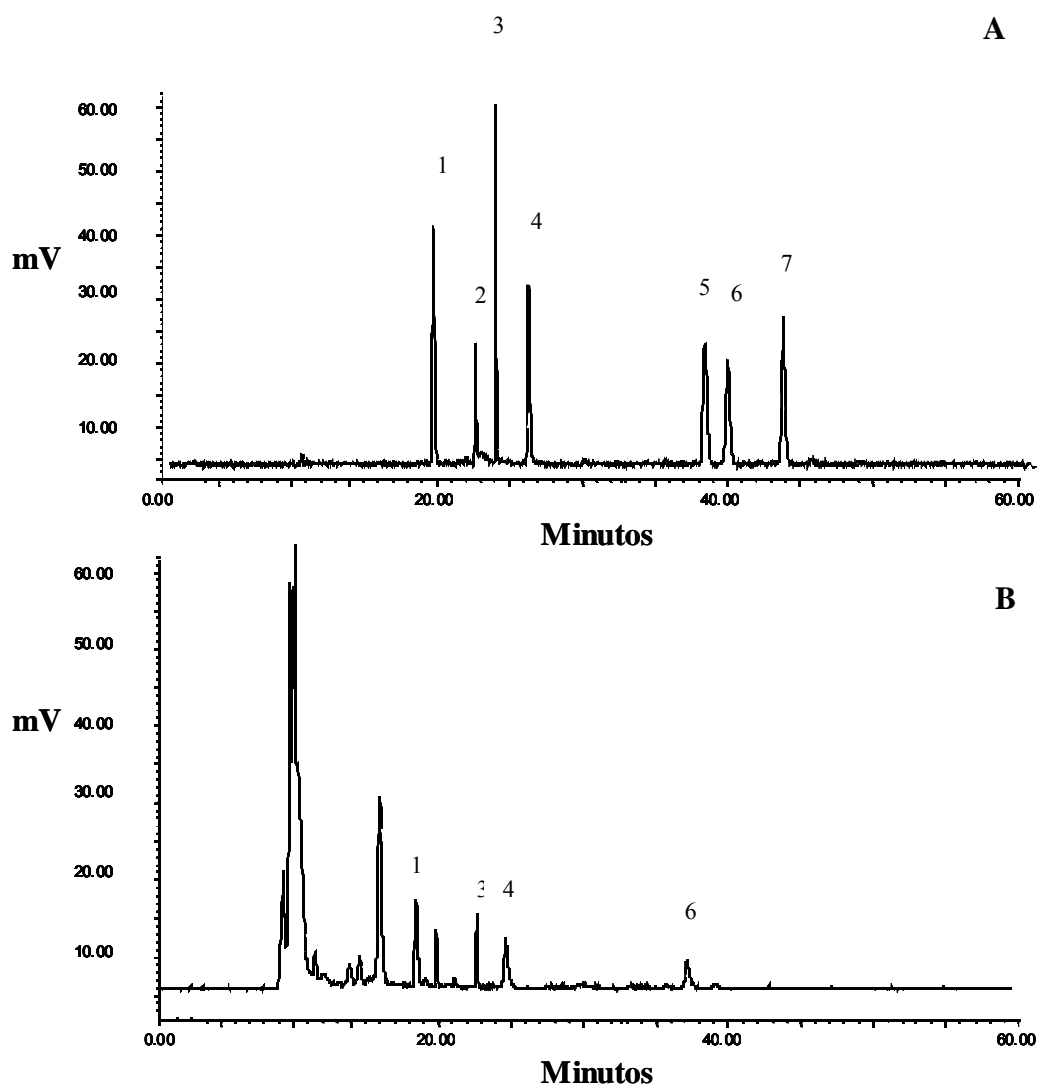
Para el análisis de los resultados se utilizaron los siguientes métodos estadísticos: el análisis de componentes principales, el análisis multifactorial de varianzas y el análisis de agrupamientos. Para el procesado de los datos se utilizaron los programas STATISTICA y SPSS para Windows, versión 7.1 y 12.0 respectivamente.

### 3.3. RESULTADOS

#### 3.3.1. Determinación de aminas biógenas en sidra natural comercializada

Para conocer el contenido en aminas biógenas de la sidra natural, se utilizó un método de RP-HPLC desarrollado para la determinación de aminas en vinos (Marcobal et al., 2005). Esta técnica es la más utilizada para la determinación de estos compuestos en alimentos y bebidas, y un método basado en RP-HPLC ha sido recientemente aprobado como método de referencia para la determinación de aminas biógenas en vinos por la OIV. El método empleado en el presente trabajo requiere para su empleo, de columnas estacionarias de fase reversa, una etapa de derivatización precolumna mediante el empleo del reactivo OPA/MEC y la detección de las aminas derivadas mediante fluorescencia. La Figura 3.1 muestra a modo de ejemplo el cromatograma de una solución estándar de aminas biógenas y de una de las muestras de sidra analizadas.

Las condiciones analíticas de este método fueron previamente validadas en vino (Marcobal et al., 2005), por lo que para su aplicación en sidras se evaluó el efecto de la matriz. Para ello, se añadieron diferentes concentraciones de las aminas a determinar (entre 0,25 y 30 mg L<sup>-1</sup>) a una sidra natural y se calculó su recuperación. Estos ensayos se realizaron en cinco sidras y, al compararlos con los blancos realizados con agua, se obtuvieron valores elevados de recuperación para todas las aminas (entre 96% y 105%). Una vez confirmada la idoneidad del método, se analizaron las 24 sidras naturales y se obtuvieron los resultados que se muestran en la Tabla 3.2.



**Figura 3.1.** Cromatograma obtenido por RP-HPLC para A) solución estándar y B) muestra de sidra natural. 1) histamina, 2) metilamina, 3) etilamina, 4) tiramina, 5) feniletilamina, 6) putrescina y 7) cadaverina.

En las sidras analizadas no se detectó presencia de cadaverina ni metilamina, aunque si bajas concentraciones de etilamina ( $5,38 \text{ mg L}^{-1}$ ) en una sidra y feniletilamina ( $2,11 \text{ mg L}^{-1}$ ) en otra. Putrescina, histamina y tiramina fueron las aminas biógenas detectadas con mayor frecuencia (50, 37,5 y 33,3 % de las sidras, respectivamente) y a concentraciones más elevadas. Se detectaron concentraciones medias de putrescina de  $3,56 \pm 4,15 \text{ mg L}^{-1}$  (entre 0 y  $12,25 \text{ mg L}^{-1}$ ), mientras que las de histamina y tiramina fueron de  $1,08 \pm 1,92 \text{ mg L}^{-1}$  (entre 0 y  $6,93 \text{ mg L}^{-1}$ ) y  $1,30 \pm 1,95 \text{ mg L}^{-1}$  (entre 0 y  $5,03 \text{ mg L}^{-1}$ ), respectivamente. Cabe destacar que en las muestras en las que se detectó una elevada concentración de alguna de estas aminas, también se observaron concentraciones

generalmente elevadas de las otras dos, al igual que ocurre en vinos (Soufleros et al., 1998; Vazquez-Lasa et al., 1998; Marcobal et al., 2005) y en otras sidras españolas (Vidal-Carou et al., 1989).

**Tabla 3.2.** Contenido en aminas biógenas de las sidras naturales comercializadas.

Muestra de sidra	Histamina (mg L <sup>-1</sup> )	Tiramina (mg L <sup>-1</sup> )	Putrescina (mg L <sup>-1</sup> )	Suma (mg L <sup>-1</sup> )
1	3,03	4,81	9,39	17,23
2	n.d.	n.d.	7,31	7,31
3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
4	3,29	5,03	10,82	19,25
5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
6	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
7	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
8	n.d.	2,01	4,89	6,91
9	1,64	n.d.	3,32	4,92
10	1,08	n.d.	4,27	5,35
11	1,03	3,95	5,21	10,19
12	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
13	5,83	4,25	10,08	20,16
14	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
15	0,93	3,03	4,51	8,47
16	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
17	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
18	n.d.	4,03	7,31	11,34
19	2,21	n.d.	6,01	8,22
20	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
21	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
22	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
23	6,93	4,08	12,25	23,26
24	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Media	1,08	1,30	3,56	5,94
Desviación estándar	1,92	1,95	4,15	7,49

n.d. no detectado

La Tabla 3.3 resume los otros parámetros analíticos determinados en estas sidras. Las sidras naturales del País Vasco, a diferencia de las sidras francesas (Leguerinel et al., 1987) e inglesas (Beech y Carr, 1977) que suelen contener cantidades elevadas de azúcares reductores, se embotellan una vez completadas las fermentaciones, por lo que solo se detectaron pequeñas cantidades de fructosa (entre 0,01 y 1,54 g L<sup>-1</sup>). El grado alcohólico se situó entre 5,6% y 7,6% (v/v) y se registraron valores de pH cercanos a 4. En relación a la

fermentación maloláctica, se detectaron niveles muy reducidos de ácido L-málico (entre 0,01 y 0,24 g L<sup>-1</sup>) en comparación con los de ácido L-láctico (entre 2,93 y 4,56 g L<sup>-1</sup>). Además, todas las sidras mostraron niveles relativamente elevados de acidez volátil (entre 1,33 y 3,28 g L<sup>-1</sup> de ácido acético), baja concentración de glicerol (entre 0,01 y 3,69 g L<sup>-1</sup>) y cantidades variables de 1,3-propanodiol (entre 0,58 y 3,22 g L<sup>-1</sup>).

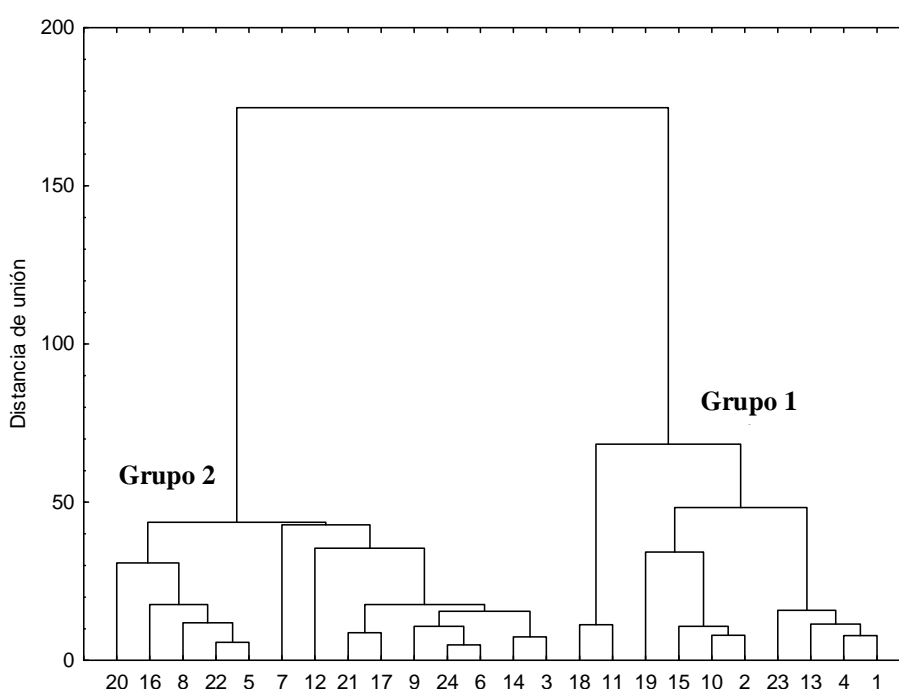
**Tabla 3.3.** Parámetros determinados en la sidra natural del País Vasco comercializada

Muestra de sidra	Etanol % (v/v)	pH	SO <sub>2</sub> total	Acidez total (meq L <sup>-1</sup> )	Fructosa (g L <sup>-1</sup> )	Ácido málico (g L <sup>-1</sup> )	Ácido láctico (g L <sup>-1</sup> )	Glicerol (g L <sup>-1</sup> )	Ácido acético (g L <sup>-1</sup> )	1,3-propanodiol (g L <sup>-1</sup> )
1	6,20	3,89	19,01	99,98	n.d.	n.d.	3,96	n.d.	2,12	2,46
2	7,05	3,99	25,34	81,46	n.d.	n.d.	3,52	0,11	1,69	1,98
3	6,90	3,85	19,01	96,28	n.d.	0,06	3,75	2,58	2,20	0,92
4	6,60	3,98	19,01	83,94	n.d.	0,03	3,07	0,04	2,25	2,28
5	6,50	3,89	12,67	79,01	0,63	0,03	3,34	1,46	1,52	1,02
6	6,20	3,87	19,01	86,41	n.d.	0,01	3,27	0,86	1,53	1,57
7	6,50	3,93	19,01	76,53	0,01	0,24	3,08	1,08	1,35	1,11
8	6,03	3,83	12,67	82,95	0,75	0,01	3,75	1,58	1,33	1,15
9	5,90	3,84	19,01	94,31	n.d.	n.d.	3,51	2,09	2,55	1,53
10	6,50	4,02	12,67	77,52	0,29	0,01	2,93	0,18	1,66	2,37
11	5,60	3,86	12,67	111,59	n.d.	n.d.	3,96	n.d.	3,28	3,22
12	6,30	3,80	19,01	98,75	n.d.	0,13	5,27	1,39	1,81	0,66
13	6,20	3,93	12,67	100,17	n.d.	n.d.	2,95	0,01	1,42	1,56
14	6,30	3,82	25,34	95,79	0,61	0,01	3,93	2,46	1,88	0,58
15	7,20	3,94	12,67	95,30	n.d.	n.d.	3,05	0,14	1,52	2,13
16	7,05	3,98	19,01	72,58	0,42	n.d.	3,75	3,69	1,33	0,59
17	6,20	3,95	19,01	70,36	n.d.	0,01	4,21	2,09	1,43	0,94
18	5,70	3,91	19,01	92,33	n.d.	n.d.	3,01	0,01	2,56	2,42
19	6,70	4,08	50,69	81,47	n.d.	0,01	3,71	0,13	1,81	2,01
20	6,70	3,96	25,34	102,71	1,54	n.d.	4,42	1,14	2,11	1,87
21	5,60	3,83	12,67	87,40	n.d.	n.d.	4,56	2,43	1,77	1,28
22	6,60	4,04	19,01	77,03	0,96	0,01	3,58	1,44	1,59	1,09
23	6,90	4,03	25,34	79,50	n.d.	n.d.	3,94	0,21	1,65	1,96
24	6,20	3,90	25,34	95,29	n.d.	0,01	4,01	1,13	1,79	1,08
Media	6,40	3,92	19,80	88,28	0,22	0,02	3,69	1,09	1,84	1,57
Desviación estándar	0,45	0,08	8,00	10,77	0,40	0,05	0,57	1,05	0,47	0,70

n.d. no detectado



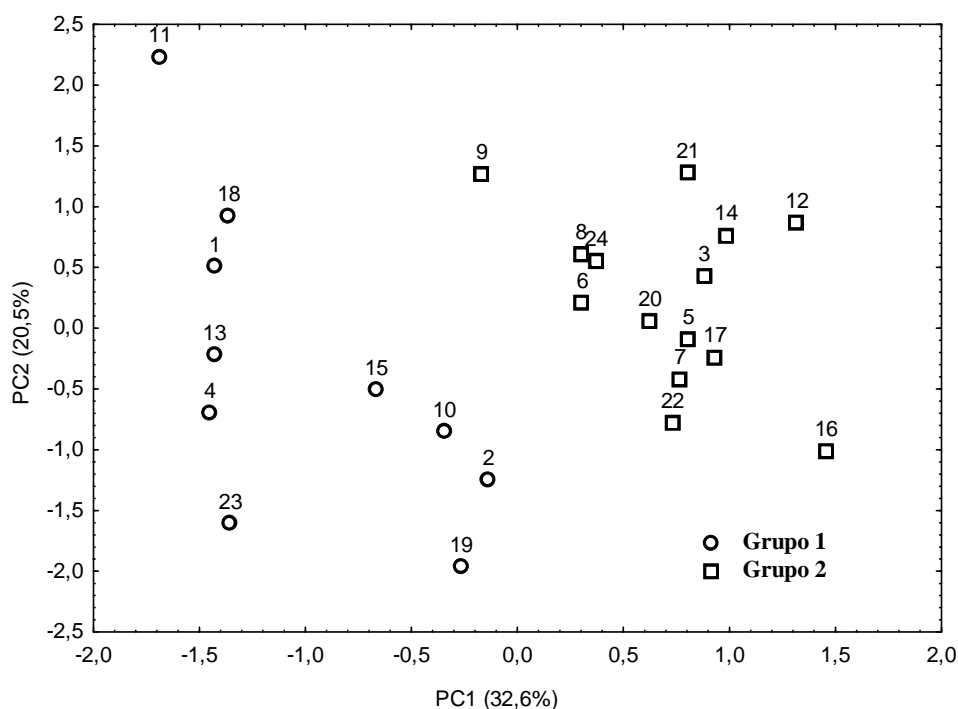
Para conocer el patrón de agrupamiento de las muestras en función de la información recabada a partir las 14 variables analizadas en las Tablas 3.1 y 3.2, se aplicó el análisis cluster. El dendrograma obtenido se muestra en la Figura 3.2. La distancia euclídea se toma como medida de proximidad entre las muestras y el método de unión es el de Ward. Las muestras se agruparon en dos grandes grupos. En general, en las 10 muestras del grupo 1 se detectaron, en comparación con las muestras del grupo 2, niveles superiores de 1,3-propanodiol, putrescina, tiramina e histamina, y concentraciones inferiores de glicerol y ácido láctico.



**Figura 3.2.** Dendrograma obtenido a partir de los parámetros analizados en las muestras de sidra comercializada.

También se realizó un análisis de componentes principales para establecer las relaciones entre la concentración de aminas biógenas y los parámetros químicos analizados. En este análisis se obtuvieron cuatro componentes principales que explicaron el 73% de la varianza total de los datos. El primero, explicaba el 32,6% de la varianza total y estaba estrechamente correlacionado con putrescina (-0,89), tiramina (-0,88), 1,3-propanodiol (-0,86), glicerol (0,82) e histamina (-0,70). Y el segundo, que explicaba el 20,5% de la varianza total, estaba correlacionado, principalmente, con el pH (-0,87) y grado alcohólico (-0,78). La Figura 3.3 muestra la representación de las 24 muestras de

sidra en el plano definido por ambos componentes principales. Las 10 muestras del grupo 1 se agruparon en la parte izquierda del plano, mientras que las 14 del grupo 2 lo hicieron en la parte derecha del plano siguiendo el mismo patrón de la Figura 3.2. Las muestras del grupo 1 mostraron valores más bajos del primer componente principal, lo que sugería que era éste el que diferencia las sidras en dos grupos.



**Figura 3.3.** Representación de las muestras de sidra comercializada en el plano definido por las dos primeras componentes principales.

Por último, se estudiaron los coeficientes de correlación entre la histamina, tiramina y putrescina, y el resto de parámetros analizados con el fin de determinar una posible relación entre ellos. Los valores de los coeficientes de correlación ( $r$ ) significativamente diferentes de cero ( $P < 0,05$ ) se recogen en la Tabla 3.4.

**Tabla 3.4.** Coeficientes de correlación ( $r$ ) entre aminas biógenas y otros parámetros químicos analizados.

Variables	$r^*$
Histamina - Tiramina	0,67
Histamina - Putrescina	0,81
Tiramina - Putrescina	0,83
Histamina - Glicerol	-0,49
Tiramina - Glicerol	-0,62
Putrescina - Glicerol	-0,72
Tiramina - 1,3-Propanodiol	0,64
Putrescina - 1,3-Propanodiol	0,67
Glicerol - 1,3-Propanodiol	-0,81

\*  $P < 0,05$  todos los coeficientes son significativamente diferentes de cero

Se observó una correlación positiva ( $P < 0,05$ ) entre las aminas tiramina y putrescina (0,83), histamina y putrescina (0,81) e histamina y tiramina (0,67). También se comprobó que la acumulación de éstas, estaba correlacionada con el glicerol y 1,3-propanodiol. Se observó que las tres aminas estaban negativamente correlacionadas con el glicerol ( $r = -0,49$ ,  $-0,62$  y  $-0,72$  para histamina, tiramina y putrescina, respectivamente), mientras que la tiramina y putrescina se encontraban positivamente correlacionadas con el 1,3-propanodiol ( $r = 0,64$  y  $0,67$ , respectivamente), uno de los productos finales del metabolismo del glicerol en bacterias lácticas. Además, se detectó una correlación negativa entre glicerol y 1,3-propanodiol ( $-0,81$ ), lo que indicaba que en las sidras naturales analizadas el glicerol había sido degradado a 1,3-propanodiol.

### 3.3.2. Detección de bacterias lácticas productoras de aminas biógenas aisladas de sidra natural del País Vasco

Debido a la falta de estudios sobre la producción de aminas biógenas por bacterias lácticas de la sidra, en este trabajo se analizó la actividad aminoácido descarboxilasa de 54 de estas cepas: 15 *L. collinoides*, 16 *L. diolivorans*, 2 *L. plantarum*, 3 *L. suebicus*, 10 *O. oeni* y 8 *P. parvulus*, empleando el medio de Bover-Cid y sidra natural. La producción de aminas biógenas por parte de estas cepas en el medio de Bover-Cid se muestra en la Tabla 3.5.

**Tabla 3.5.** Producción de aminas biógenas por las cepas de bacterias lácticas aisladas de sidra natural.

Bacterias lácticas <sup>a</sup>	N <sup>b</sup>	Histamina		Tiramina		Putrescina	
		BC <sup>c</sup>	HPLC <sup>d</sup>	BC	HPLC	BC	HPLC
<i>L. brevis</i> CECT216		0	--	1	1	1	--
<i>Lactobacillus</i> 30a		1	1	0	--	1	1
<i>L. collinoides</i>	15	1	1	0	--	0	--
<i>L. diolivorans</i>	16	3	3	1	1	0	--
<i>L. plantarum</i>	2	0	--	0	--	0	--
<i>L. suebicus</i>	3	0	--	0	--	0	--
<i>O. oeni</i>	10	0	--	1	1	0	--
<i>P. parvulus</i>	8	0	--	0	--	0	--

<sup>a</sup>Taxón confirmado por secuenciación 16S rRNA. <sup>b</sup>N, número de cepas analizadas. <sup>c</sup>BC, Número de cepas positivas en el medio de Bover-Cid (BC). <sup>d</sup>HPLC, Número de cepas positivas mediante RP-HPLC.

La mayor parte de los procedimientos de identificación de microorganismos con actividad aminoácido descarboxilasa, se realizan en medios de cultivo diferenciales que contienen un indicador de pH. En estos medios, un resultado positivo se observa como un cambio del color del indicador hacia púrpura, debido a la variación del pH, que es consecuencia de la producción aminas, las cuales son más alcalinas que sus aminoácidos precursores. En este trabajo, se utilizó un medio descarboxilasa modificado, suplementado con piridoxal-5-fosfato, el cual tiene un efecto potenciador de la actividad aminoácido descarboxilasa de los microorganismos (Gale, 1946). Este medio fue desarrollado por Bover-Cid y Holzapfel (1999) y, posteriormente, utilizado con éxito para el estudio de un gran número de bacterias lácticas de cultivo exigente, como son las cepas de *O. oeni* aisladas de vinos y mostos de uva (Moreno-Arribas et al., 2003).

La idoneidad de este medio de cultivo para la identificación de bacterias lácticas productoras de aminas biógenas, se demostró comparando los resultados obtenidos mediante el indicador de pH con los determinados por RP-HPLC (Tabla 3.5). En trabajos anteriores se habían reportado falsos positivos como consecuencia de la formación de otros compuestos alcalinos en los medios sintéticos (Rodríguez-Jerez et al., 1994; Roig-Sagues et al., 1996; Moreno-Arribas et al., 2003). Sin embargo, en este estudio se obtuvieron idénticos resultados mediante ambas técnicas (Tabla 3.5).

Entre las cepas *O. oeni* y *P. parvulus* analizadas no se reportó producción de histamina (Tabla 3.5), mientras que se detectaron tres cepas de *L. diolivorans* y una de *L. collinoides* capaces de producirla. La actividad tirosina descarboxilasa fue detectada en una cepa de *O. oeni* y en otra de *L. diolivorans*. Sin embargo, entre las cepas analizadas no se encontró ninguna capaz de sintetizar putrescina, amina mayoritaria en sidra natural (Tabla3.2).

La capacidad de sintetizar histamina y tiramina de las cepas productoras de aminas en medios de cultivo, fue confirmada en los ensayos realizados en sidra natural modificada (pH 4 y 5,2) (Tabla 3.6). La producción de aminas fue significativamente inferior en sidra y la mayor productora de histamina fue *L. diolivorans* 18. Además, las cepas de esta especie mostraron una gran variabilidad en relación a la producción de esta amina. En relación a la producción de tiramina, la cepa *O. oeni* 38 fue la que produjo las mayores concentraciones en sidra. Por otro lado, tanto la síntesis de histamina como de tiramina en las cepas productoras fue superior a pH 5,2 que a pH 4, debido a que se trata de condiciones más favorables para el crecimiento y la actividad enzimática aminoácido descarboxilasa (Bover-Cid y Holzapfel, 1999).

**Tabla 3.6.** Producción de aminas biógenas en medio Bover-Cid y sidra natural enriquecida (media  $\pm$  desviación estándar)

<b>Cepas bacterianas</b>	Producción de aminas biógenas en el medio de Bover-Cid (mg L <sup>-1</sup> )		Producción de histamina en sidra natural (mg L <sup>-1</sup> )		Producción de tiramina en sidra natural (mg L <sup>-1</sup> )	
	Histamina	Tiramina	pH 4	pH 5,2	pH 4	pH 5,2
<i>Lactobacillus</i> 30a	1402,01 $\pm$ 3,22	n.d.	-	-	-	-
<i>L. brevis</i> CECT216	n.d.	854,01 $\pm$ 3,38	-	-	-	-
<i>L. diolivorans</i> 18	1232,4 $\pm$ 3,17	-	152,09 $\pm$ 0,98	284,32 $\pm$ 0,84	n.d.	n.d.
<i>L. diolivorans</i> 20	793,2 $\pm$ 4,32	-	35,22 $\pm$ 0,87	77,33 $\pm$ 0,43	n.d.	n.d.
<i>L. diolivorans</i> 22	602,23 $\pm$ 7,09	-	15,31 $\pm$ 0,65	27,55 $\pm$ 0,21	n.d.	n.d.
<i>L. diolivorans</i> 54	-	746,92 $\pm$ 2,13	n.d.	n.d.	5,02 $\pm$ 0,11	8,54 $\pm$ 0,44
<i>O. oeni</i> 38	-	543,99 $\pm$ 3,11	n.d.	n.d.	21,33 $\pm$ 0,09	22,11 $\pm$ 0,99
<i>L. collinoides</i> 13	1207,3 $\pm$ 9,34	-	12,34 $\pm$ 0,54	13,21 $\pm$ 0,32	n.d.	n.d.
n.d. no detectado						

### 3.3.3. Evolución de los aminoácidos y aminos biógenas a lo largo del proceso de elaboración de la sidra natural del País Vasco

Para estudiar la evolución de los compuestos nitrogenados a lo largo de la elaboración de sidra se analizaron 76 muestras obtenidas a escala industrial. Éstas fueron producidas en 14 sidrerías, en las cosechas 2005 y 2006, mediante dos tipos de prensa (tradicional o neumática) y recogidas en las diferentes etapas de la elaboración. En cada una de estas muestras, se realizó el análisis de aminoácidos libres, aminos biógenas y de otros parámetros químicos y microbiológicos según se describe en el apartado de materiales y métodos. Los valores de la media, desviación estándar y el rango de cada variable analizada se muestran en la Tabla 3.7.

Sobre los datos obtenidos se aplicó un análisis multifactorial de varianzas con el fin de conocer la influencia de la cosecha (2005 y 2006) y de los factores tecnológicos estudiados como el tipo de prensa (extracción lenta o rápida) y la etapa de elaboración, sobre cada una de las variables analizadas (Tabla 3.7). Como se puede observar, la etapa de elaboración presentó un efecto estadísticamente significativo ( $P < 0,05$ ) sobre la mayoría de las variables analizadas a excepción de la metilamina, etilamina, tiramina, cadaverina y la población de bacterias lácticas. La cosecha, también, tuvo una influencia significativa ( $P < 0,05$ ) sobre muchas de las variables analizadas, mientras que el tipo de prensa no presentó efecto estadísticamente significativo ( $P < 0,05$ ) sobre la mayoría de ellas.

Existe poca información disponible acerca de los compuestos nitrogenados y la concentración de aminoácidos libres como precursores de aminos biógenas en la elaboración de sidra. En este estudio, se observaron diferencias significativas en las concentraciones de la mayoría de aminoácidos en relación al año de vendimia, a excepción de asparragina, treonina,  $\alpha$ -alanina, ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA), valina, fenilalanina y leucina. En general, la concentración de la mayoría de los aminoácidos fue superior en las muestras de la cosecha 2005 que en las de 2006 (Tabla 3.7). Por otro lado, las diferencias fueron significativas para todos los aminoácidos en relación a la etapa de elaboración, mientras que el tipo de prensa no produjo efecto significativo sobre la mayoría de aminoácidos.

**Tabla 3.7.** Número de muestras (n), media, desviación estándar y rangos de la concentración de aminoácidos, aminas biógenas y otras variables analizadas, y resultados de la aplicación del análisis multifactorial de las varianzas para los 3 factores estudiados (cosecha, tipo de prensa y etapa de elaboración).

	Efecto de los factores más importantes							
	n	Media	Desviación estándar	Mínimo	Máximo	Cosecha	Tipo de prensa	Etapa de elaboración
<b>Aminoácidos (mg L<sup>-1</sup>)</b>								
Ácido aspártico (Asp)	76	5,05	5,44	0,00	34,64	*	ns	*
Ácido glutámico (Glu)	76	2,49	2,56	0,00	18,70	*	ns	*
Asparagina (Asn)	76	4,10	8,72	0,00	67,94	ns	ns	*
Serina (Ser)	76	1,07	1,19	0,00	5,73	*	ns	*
Glutamina (Gln)	76	2,17	4,01	0,00	22,41	*	ns	*
Histidina (His)	76	0,58	0,94	0,00	3,36	*	ns	*
Glicina (Gly)	76	0,98	1,23	0,00	5,92	*	ns	*
Treonina (Thr)	76	1,88	1,90	0,00	13,00	ns	ns	*
Arginina (Arg)	76	1,36	1,67	0,00	7,36	*	ns	*
β-alanina (β-ala)	76	0,55	0,82	0,00	2,98	*	ns	*
α-alanina (α-ala)	76	2,74	3,06	0,00	19,76	ns	*	*
Ácido γ-aminobutírico (Gaba)	76	1,45	2,44	0,00	16,03	ns	ns	*
Tirosina (Tyr)	76	1,34	1,73	0,00	6,56	*	ns	*
Ácido α-aminobutírico (α-aba)	76	2,57	2,94	0,00	16,11	*	*	*
Metionina (Met)	76	0,46	0,79	0,00	3,59	*	ns	*
Valina (Val)	76	0,18	0,40	0,00	1,67	ns	ns	*
Triptófano (Trp)	76	0,64	0,98	0,00	3,32	*	ns	*
Fenilalanina (Phe)	76	0,60	0,79	0,00	2,90	ns	ns	*
Isoleucina (Ile)	76	0,54	0,76	0,00	2,34	*	ns	*
Leucina (Leu)	76	1,51	1,24	0,00	4,61	ns	*	*
Ornitina (Orn)	76	0,81	1,19	0,00	5,04	*	ns	*
Lisina (Lys)	76	1,55	1,48	0,00	5,24	*	ns	*
Prolina (Pro)	76	2,15	2,25	0,00	9,84	*	ns	*
<b>Suma de aminoácidos libres</b>	76	36,77	34,25	1,95	204,77	*	ns	*
<b>Nitrógeno total (mg L<sup>-1</sup>)</b>	76	56,82	44,80	5,88	197,70	ns	*	*

Nota: la tabla continúa en la siguiente página.



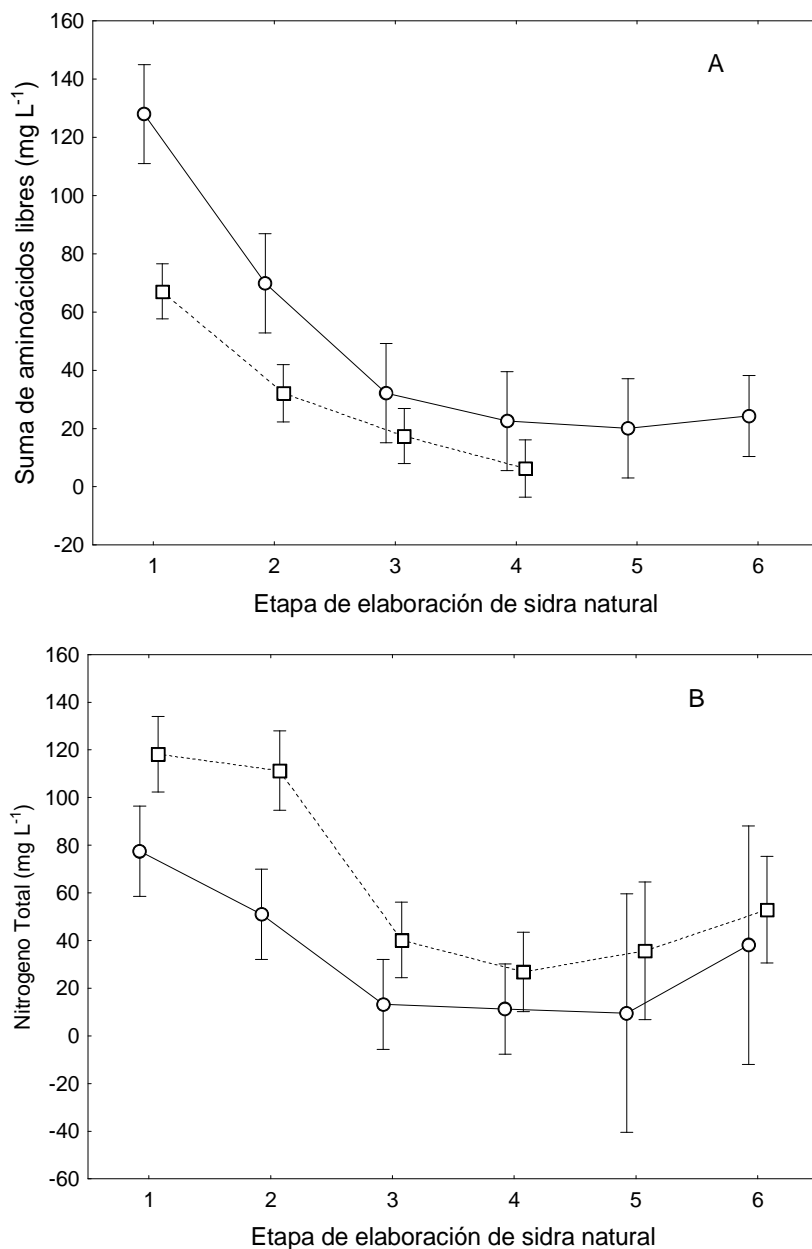
		Efecto de los factores más importantes						
		Cosecha	Tipo de prensa	Etapa de elaboración				
n	Media	Desviación estándar	Mínimo	Máximo				
<b>Aminas Biógenas (mg L<sup>-1</sup>)</b>								
76	1,13	0,69	0,00	1,78	*	ns	*	
76	0,38	0,23	0,00	0,91	*	ns	ns	
76	0,16	0,13	0,00	0,55	ns	ns	ns	
76	0,03	0,21	0,00	1,36	ns	ns	ns	
76	0,11	0,65	0,00	4,03	*	ns	*	
76	3,42	1,76	0,00	6,65	*	ns	*	
76	0,19	1,02	0,00	6,10	*	ns	ns	
<b>Otros parámetros (excepto pH el resto en g L<sup>-1</sup>)</b>								
76	3,84	0,15	3,43	4,12	*	ns	*	
76	1012,9	18,60	995,0	1052,0	ns	ns	*	
76	0,92	1,39	0,00	4,87	ns	*	*	
76	2,50	1,36	0,00	5,81	*	*	*	
76	0,70	0,72	0,00	3,30	*	ns	*	
76	6,18	9,01	0,00	33,75	ns	*	*	
76	24,00	27,58	0,00	94,67	ns	*	*	
76	2,55	1,48	0,00	5,22	ns	ns	*	
76	0,25	0,59	0,00	2,91	*	ns	*	
76	37,43	19,41	0,00	62,70	ns	ns	*	
<b>Poblaciones microbianas (UFC mL<sup>-1</sup>)</b>								
76	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,6 x 10 <sup>7</sup>	0,00	6,8 x 10 <sup>7</sup>	*	*	*	
76	6,2 x 10 <sup>5</sup>	1,1 x 10 <sup>6</sup>	0,00	5,5 x 10 <sup>6</sup>	*	ns	*	
76	1,9 x 10 <sup>5</sup>	2,9 x 10 <sup>6</sup>	3,3 x 10 <sup>4</sup>	1,8 x 10 <sup>8</sup>	*	ns	ns	

el factor presenta un efecto estadísticamente significativo sobre la variable,  $P < 0,05$ ; ns, el factor no presenta un efecto estadísticamente significativo sobre la variable.

Respecto a la concentración inicial de aminoácidos de los mostos de manzana, fueron asparragina y ácido aspártico los más abundantes, seguidos del ácido glutámico, glutamina, ácido  $\alpha$ -aminobutírico (aba) y  $\alpha$ -alanina. Las concentraciones medias de estos compuestos en los mostos de manzana de los dos años estudiados fueron 12,34, 11,12, 4,87, 5,28, 6,29 y 6,42 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente. Para tener una visión global de la evolución de los aminoácidos durante el proceso de elaboración, la Figura 3.4 A muestra la evolución de la suma de aminoácidos libres en este periodo. Es de destacar la drástica reducción de la suma de aminoácidos libres en las primeras etapas de elaboración (entre las etapas 1 y 3), así como su posterior aumento en la sidra embotellada (etapas 5 y 6) de la cosecha 2005.

El nitrógeno total fue la única variable influenciada por el tipo de prensa, además de por la etapa de elaboración, registrándose valores inferiores de este parámetro en los mostos obtenidos mediante la extracción rápida (Tabla 3.7). En este caso, también se detectó un aumento de la concentración de nitrógeno total en las sidras embotelladas (Figura 3.4 B).

En la Figura 3.5, se representa la evolución de algunos aminoácidos (treonina, serina, arginina y ornitina) a lo largo del proceso de elaboración de la sidra. Se observa una progresiva reducción de todos los aminoácidos durante este periodo hasta desaparecer prácticamente del medio en las últimas etapas. Es de señalar, que en algunas de las muestras de la cosecha 2005, se observa un ligero aumento de las concentraciones de treonina y serina una vez embotelladas las sidras.

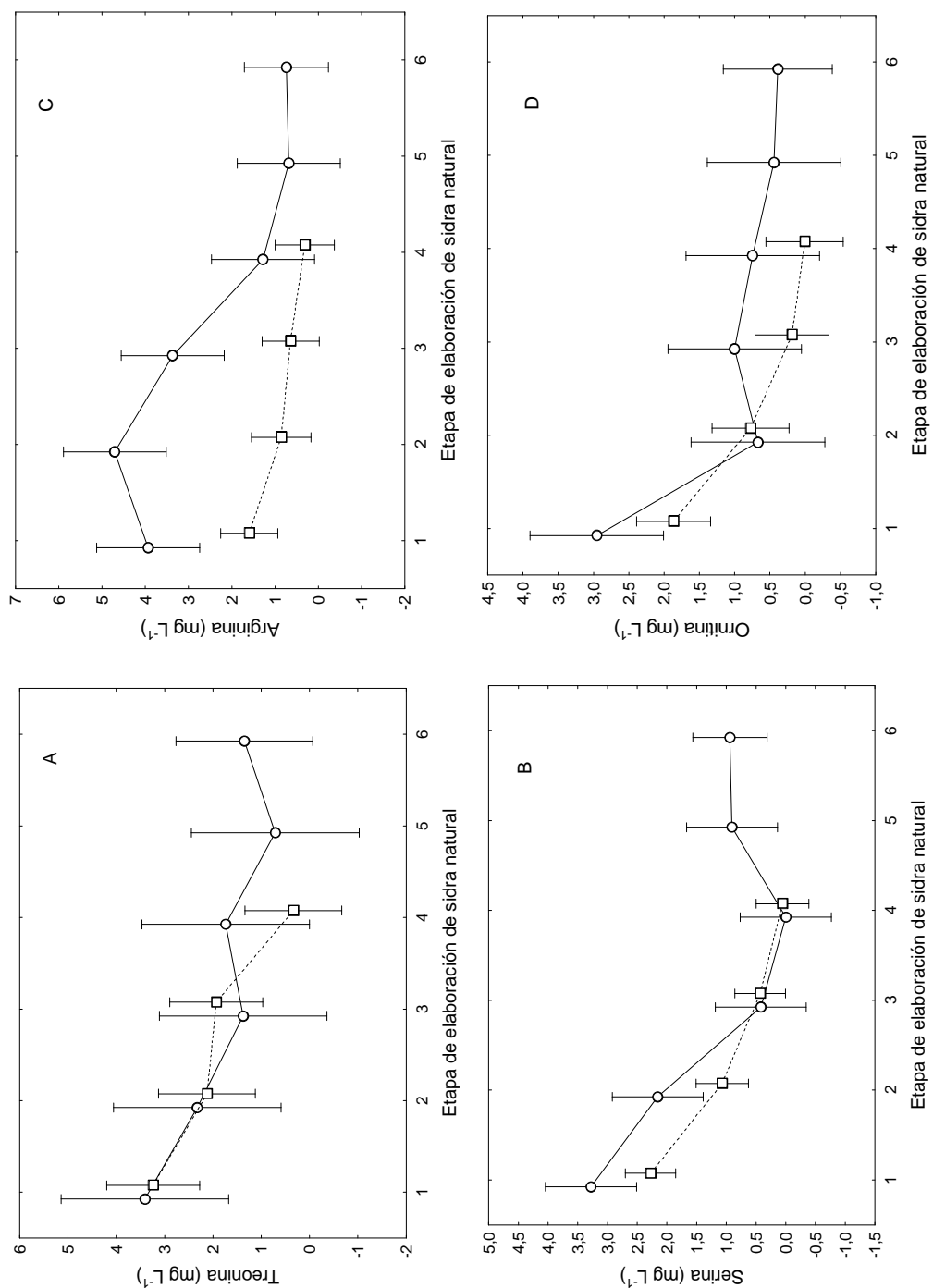


**Figura 3.4.** Medias e intervalos de confianza del 95% para A) la suma de aminoácidos libres (en líneas continuas (—), los resultados obtenidos para la cosecha 2005 y líneas discontinuas (- - -), para la cosecha 2006) y B) contenido del nitrógeno total de las muestras durante el proceso de elaboración de la sidra natural (en líneas continuas (—), resultados obtenidos para el prensado con prensa tradicional (prensado lento) y líneas discontinuas (- - -) para el prensado con prensa neumática (prensado rápido)

En relación a la evolución de aminas biógenas, no se apreciaron grandes cambios en su contenido durante la elaboración de sidra natural, si se comparan con los registrados para la concentración de aminoácidos (Tabla 3.8). La putrescina fue la única amina presente en todos los mostos de las dos cosechas analizadas, con unos valores máximos de  $6,65 \text{ mg L}^{-1}$  en 2005 y  $3,17 \text{ mg L}^{-1}$  en 2006. El análisis estadístico mostró diferencias significativas de putrescina en relación a la etapa de elaboración y el año de vendimia (Tabla 3.7). En los mostos iniciales del 2005, se detectaron cantidades de putrescina del orden de  $6 \text{ mg L}^{-1}$ , que se mantuvieron inalterables durante las primeras etapas de la elaboración, aunque posteriormente su concentración se redujo a la mitad (Figura 3.6). Los mostos de la cosecha 2006, presentaron niveles de putrescina notablemente inferiores a los de 2005 (entre  $2,19$  y  $2,91 \text{ mg L}^{-1}$ ) y se mantuvieron constantes durante todo el proceso de elaboración.

La histamina fue la segunda amina biógena más abundante en la sidra de los dos años estudiados ( $1,03$  y  $1,53 \text{ mg L}^{-1}$ , respectivamente), mientras que la tiramina solo se detectó en una única muestra de sidra ( $1,36 \text{ mg L}^{-1}$ ). En relación a los factores que influyen sobre la formación de histamina, se observó que tanto la etapa de elaboración como la cosecha eran estadísticamente significativos (Tabla 3.7). En la sidra de la cosecha 2005, solo se detectó histamina al final del proceso (Figura 3.6 B). Sin embargo, en la cosecha 2006 ya se detectaron pequeñas cantidades de histamina en el mosto de manzana (entre  $1,4$  y  $1,55 \text{ mg L}^{-1}$ ) y no se observaron posteriores variaciones en su contenido.

Las aminas feniletilamina y cadaverina ( $4$  y  $6 \text{ mg L}^{-1}$ , respectivamente) se detectaron únicamente durante la elaboración de la sidra en dos de las sidrerías estudiadas en la cosecha 2005, aunque desaparecieron antes de ser embotelladas. Además, se encontraron cantidades muy pequeñas de metilamina y etilamina ( $<1 \text{ mg L}^{-1}$ ) y no se apreciaron cambios en su contenido durante la elaboración de la sidra ni en relación a la cosecha.



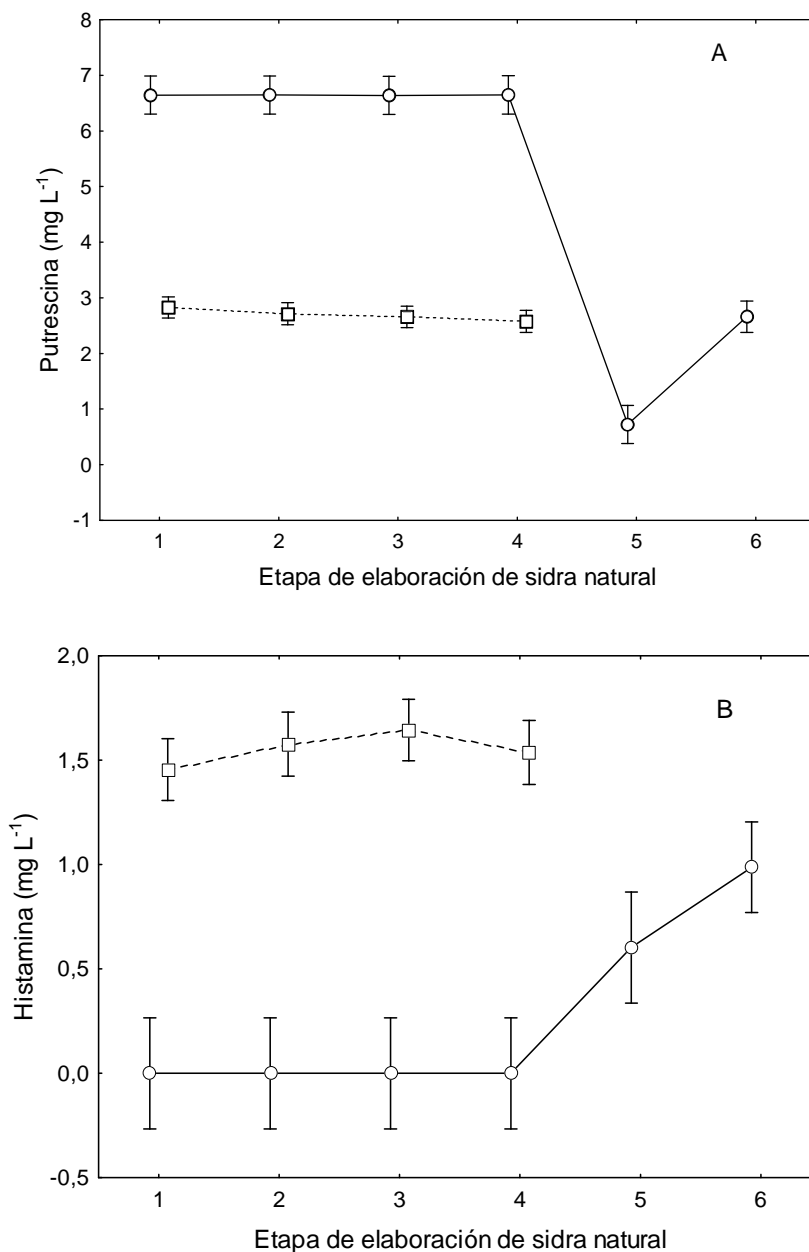
**Figura 3.5.** Medias e intervalos de confianza del 95% para el contenido en los aminoácidos A) treonina, B) serina, C) arginina y D) ornitina en las muestras a lo largo del periodo de elaboración de la sidra natural. En líneas continuas (—), los resultados obtenidos para la cosecha 2005 y líneas discontinuas (- - -) para la cosecha 2006.

**Tabla 3.8.** Media  $\pm$  desviación estándar de la concentración de aminas biógenas ( $\text{mg L}^{-1}$ ) y resultados de la aplicación del análisis multifactorial de las varianzas para los 3 factores estudiados (cosecha, tipo de prensa y etapa de elaboración)

Cosecha	n	Histamina	Metilamina	Etilamina	Tiramina	Feniletilamina	Putrescina	Cadaverina
2005	26	0,32 $\pm$ 0,61	0,30 $\pm$ 0,45	0,19 $\pm$ 0,22	0,10 $\pm$ 0,36	0,31 $\pm$ 1,10	4,81 $\pm$ 2,49	0,57 $\pm$ 1,70
2006	50	1,55 $\pm$ 0,09	0,46 $\pm$ 0,07	0,15 $\pm$ 0,01	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	2,70 $\pm$ 0,17	0,00 $\pm$ 0,00
<b>Tipo de prensa</b>								
1) Tradicional (extracción lenta)	30	1,32 $\pm$ 0,54	0,40 $\pm$ 0,29	0,17 $\pm$ 0,11	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	3,14 $\pm$ 1,50	0,00 $\pm$ 0,00
2) Neumática (extracción rápida)	46	1,01 $\pm$ 0,75	0,40 $\pm$ 0,27	0,16 $\pm$ 0,14	0,06 $\pm$ 0,27	0,18 $\pm$ 0,83	3,61 $\pm$ 1,91	0,32 $\pm$ 1,30
<b>Etapa de elaboración</b>								
1) Inicial	17	1,11 $\pm$ 0,64	0,37 $\pm$ 0,23	0,15 $\pm$ 0,12	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	3,72 $\pm$ 1,68	0,00 $\pm$ 0,00
2) Durante fermentación alcohólica	16	1,18 $\pm$ 0,71	0,42 $\pm$ 0,24	0,15 $\pm$ 0,12	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	3,70 $\pm$ 1,76	0,00 $\pm$ 0,00
3) Final fermentación alcohólica y FML	17	1,26 $\pm$ 0,72	0,49 $\pm$ 0,23	0,21 $\pm$ 0,16	0,00 $\pm$ 0,00	0,47 $\pm$ 1,34	3,59 $\pm$ 1,74	0,71 $\pm$ 2,01
4) Antes de embotellar	16	1,15 $\pm$ 0,69	0,37 $\pm$ 0,22	0,14 $\pm$ 0,12	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	3,59 $\pm$ 1,83	0,00 $\pm$ 0,00
5) 3 meses después de embotellar	4	0,60 $\pm$ 0,70	0,09 $\pm$ 0,10	0,14 $\pm$ 0,10	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,72 $\pm$ 1,45	0,67 $\pm$ 1,35
6) de 4 a 5 meses después de embotellar	6	0,99 $\pm$ 0,78	0,47 $\pm$ 0,60	0,18 $\pm$ 0,02	0,44 $\pm$ 0,68	0,00 $\pm$ 0,00	2,66 $\pm$ 0,30	0,00 $\pm$ 0,00

\*\* El factor presenta efecto estadísticamente significativo sobre la variable,  $P < 0,01$ ; \* El factor presenta efecto estadísticamente significativo sobre la variable,  $P < 0,05$ ; ns, el factor no presenta efecto estadísticamente significativo sobre la variable

n: Número de muestras



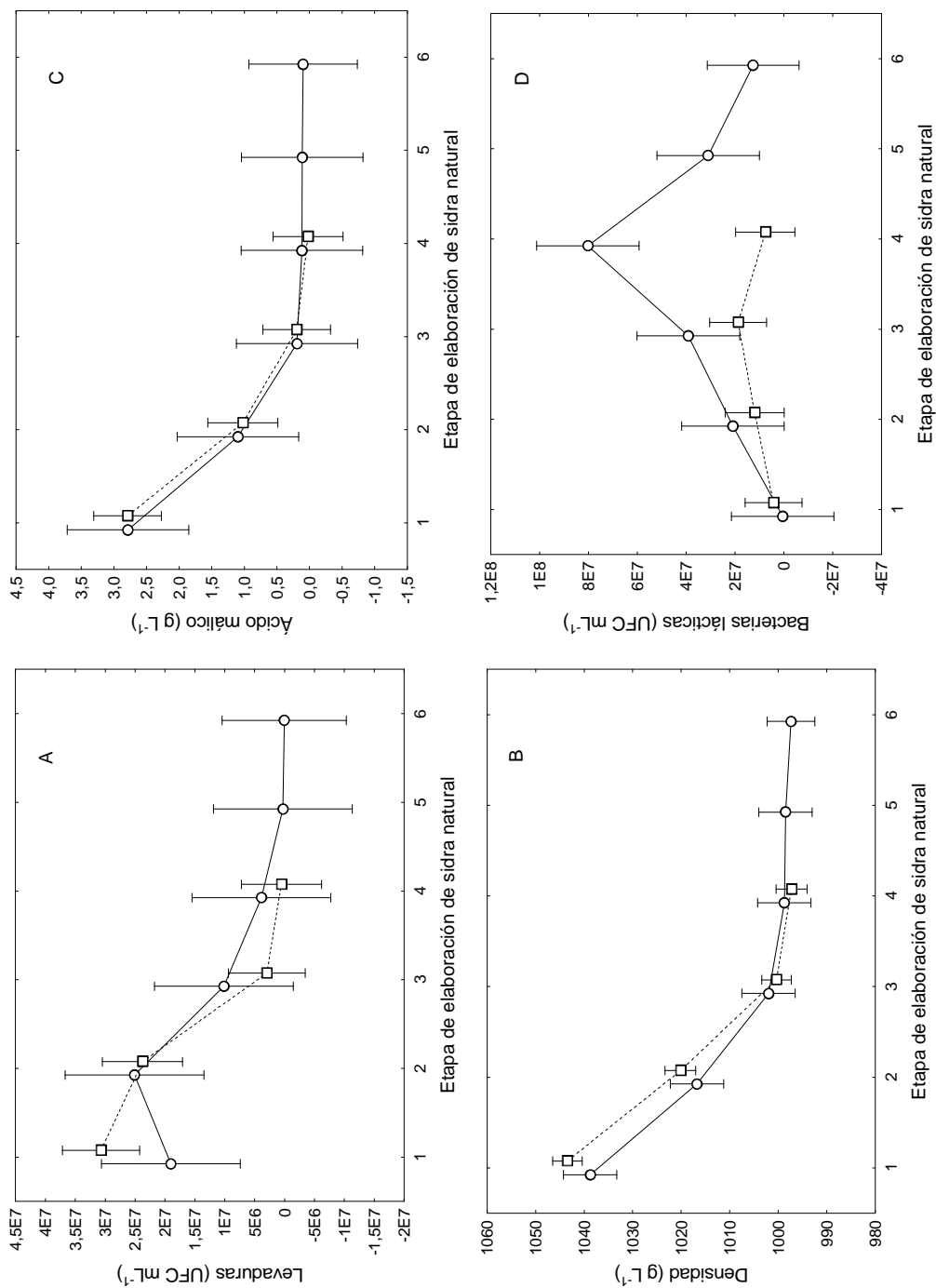
**Figura 3.6.** Medias e intervalos de confianza del 95% para el contenido en los aminoácidos A) putrescina e B) histamina en las muestras a lo largo del periodo de elaboración de la sidra natural. En líneas continuas (—), los resultados obtenidos para la cosecha 2005 y líneas discontinuas (- - -) para la cosecha 2006.

En lo que se refiere a la evolución de las poblaciones microbianas, en los mostos de manzana se observaron poblaciones elevadas de levaduras. Éstas sufrieron un repunte durante la fermentación alcohólica, seguido de un posterior declive (Figura 3.7 A). Sin embargo, las bacterias lácticas se mantuvieron en poblaciones elevadas durante todo el proceso de elaboración (entre  $10^5$ - $10^7$  UFC mL<sup>-1</sup>) (Figura 3.7 D). Además, es de señalar la reducción simultánea de la densidad y del contenido en ácido L-málico que se detectó en las etapas iniciales de la elaboración (Figura 3.7 B, C).

Los aminoácidos (histidina, tirosina y ornitina) precursores de las aminas biógenas mayoritarias en la sidra natural (histamina, tiramina y putrescina, respectivamente), se detectaron en concentraciones muy reducidas en los mostos de manzana. Se encontraron niveles de histidina entre 0,36 y 3,21 mg L<sup>-1</sup> en 9 de las 13 muestras de la cosecha 2006 y entre 2,4 y 2,7 mg L<sup>-1</sup> en la de 2005. Después de su completa desaparición asociado al crecimiento de levaduras y bacterias lácticas, se detectó un ligero aumento de histidina en las últimas etapas de la elaboración (etapas 5 y 6). En concreto, la histidina se detectó en dos sidras de la cosecha 2005, en las que, a su vez, se observó formación de histamina. En relación a la evolución del aminoácido tirosina, precursor de la tiramina, se observó un comportamiento similar al de la histidina. Se observó un ligero aumento de la concentración de tirosina en las etapas finales de la elaboración, aunque solo una de las sidras presentó trazas de tiramina (1,3 mg L<sup>-1</sup>). En estas etapas la microbiota predominante estaba compuesta por bacterias lácticas en poblaciones entre  $10^6$  y  $10^7$  UFC mL<sup>-1</sup>, posiblemente con actividad histidina descarboxilasa, las cuales podrían utilizar los compuestos nitrogenados excretados por las levaduras al final de la fermentación (Beech, 1972).

Otro hallazgo relevante fue la reducción o desaparición de la arginina durante la elaboración de la sidra (Figura 3.5 C). Se ha descrito que las bacterias lácticas heterofermentativas, microbiota principal de la sidra (Dueñas et al., 1994), pueden degradar este aminoácido produciendo ornitina mediante la vía arginina deiminasa (Liu et al., 1995). Sin embargo, se detectó una reducción de la concentración de ornitina similar a la de la arginina durante este periodo (Figura 3.5 D).





**Figura 3.7.** Medias e intervalos de confianza del 95% para A) levaduras, B) densidad, C) ácido málico y D) bacterias lácticas, a lo largo del periodo de elaboración de la sidra natural. En líneas continuas (—), los resultados obtenidos para la cosecha 2005 y líneas discontinuas (- -) para la cosecha 2006.

### 3.4. DISCUSIÓN

Como se observa en la Figura 1, la técnica de RP-HPLC proporcionó una buena separación de las aminas biógenas de posibles interferencias, principalmente de aminoácidos que eluyen en los primeros minutos del cromatograma y que, por tanto, no causan problemas en el análisis de las aminas. La identificación de las aminas biógenas en las sidras se realizó en base a los tiempos de retención mediante la comparación con los de las soluciones de referencia.

La cantidad total de aminas biógenas detectada en la sidra comercializada fue inferior a los niveles reportados por diferentes autores en vinos (Marcobal et al., 2005; Marcobal et al., 2006) o cervezas (Izquierdo-Pulido et al., 1996) (Tabla 3.9). La histamina se ha relacionado a menudo con la intoxicación histamínica o escombroidosis (Hálasz et al., 1994). No obstante, la cantidad máxima de histamina detectada en las sidras fue inferior al umbral de toxicidad propuesto para otros alimentos. Incluso tomando en cuenta el hecho de que la sidra natural es una bebida alcohólica, el nivel de monoaminas aromáticas fue inferior al considerado necesario para producir un efecto fisiológico (histamina 20 mg L<sup>-1</sup>, tiramina entre 25 y 40 mg L<sup>-1</sup> y feniletilamina 3 mg L<sup>-1</sup>) según los datos de la bibliografía (Bauza et al., 1995).

**Tabla 3.9.** Contenido en aminas biógenas de diferentes bebidas fermentadas

Bebida	Aminas biógenas (mg L <sup>-1</sup> )			Referencia
	Putrescina	Histamina	Tiramina	
Sidra	n.d.	0,40 ± 0,42	0,8 ± 1,13	Vidal-Carou et al., 1989
Vino tinto	6,05 ± 10,6	4,46 ± 5,70	3,13 ± 4,42	Marcobal et al., 2006
Cerveza	4,8 ± 2,3	1,2 ± 2,4	6,5 ± 9,0	Izquierdo-Pulido et al., 1996
Sidra Natural	3,56 ± 4,15	1,08 ± 1,92	1,30 ± 1,95	Garai et al., 2006

n.d. No determinado

La putrescina fue la amina mayoritaria y la que más contribuyó al contenido total de aminas de las sidras, de forma similar a lo que ocurre en vinos (Landete et al., 2005a; Marcobal et al., 2005; González-Marco y Ancín-Azpilicueta 2006; Martín-Álvarez et al., 2006) y cervezas (Izquierdo-Pulido et al., 1996; Slomkowska y Ambroziak, 2002). En estas bebidas, la putrescina se considera, en parte, un constituyente natural, debido a que procede de la materia prima utilizada en su elaboración, aunque también puede originarse como consecuencia de la actividad aminoácido descarboxilasa de bacterias lácticas que contienen los genes correspondientes (Marcobal et al., 2004). Los niveles de putrescina detectados en el presente trabajo fueron notablemente superiores a los reportados por Zee et al. (1983) en sidras canadienses, en las que la concentración de putrescina fue de 0,2 mg L<sup>-1</sup> y no se encontró histamina ni tiramina. La cantidad de estas dos aminas, también fue superior a la cuantificada por Vidal-Carou et al. (1989) en 10 sidras españolas analizadas. Según Zee et al. (1983), la baja cantidad de aminas detectadas en las sidras canadienses, podría deberse al hecho de que los mostos de manzana se pasteurizan antes de la fermentación, con lo que se eliminarían los microorganismos responsables de la actividad descarboxilasa. Es más, las sidras canadienses raramente realizan la fermentación maloláctica, indicativo de la no existencia de grandes poblaciones de bacterias lácticas, principales microorganismos con actividad aminoácido descarboxilasa. Este no es el caso de las sidras analizadas en este trabajo, en las cuales la relación entre el ácido L-láctico y L-málico indicó que todas habían realizado la fermentación maloláctica, como se ha descrito en sidras asturianas (Piccinelli et al., 2000). Esta fermentación es sumamente importante desde el punto de vista de las cualidades sensoriales del producto, ya que reduce la acidez y la astringencia de las sidras (Piccinelli et al., 2000). Además, estas sidras no se estabilizan microbiológicamente antes de ser embotelladas, por lo que pueden contener diferentes especies de bacterias lácticas, mayoritariamente especies de *Lactobacillus* heterofermentativos y *O. oeni*, capaces de producir aminas biógenas, como ya se ha reportado anteriormente (Del Campo et al., 2003).

En relación al resto de parámetros analizados en estas sidras, otra característica común entre las sidras vascas fueron los niveles, relativamente, elevados de acidez volátil (expresado como g L<sup>-1</sup> de ácido acético) que también fueron observados en sidras asturianas (Piccinelli et al., 2000). Éstos afectan negativamente a las cualidades organolépticas de la sidra como resultado del picado acético; el código alimentario español

permite concentraciones inferiores a  $2,2 \text{ g L}^{-1}$  de ácido acético. El ácido acético se puede sintetizar en todas las etapas de elaboración de la sidra, por tratarse de un producto metabólico de diferentes tipos de microorganismos. En sidra natural su máxima producción se detecta después de la fermentación maloláctica (Dueñas et al., 1994), debido a la falta de estabilización microbiológica del producto después de esta fermentación. Otra consecuencia de la no estabilización microbiológica del producto es el consumo de glicerol, formado por las levaduras durante la fermentación y que contribuye a las cualidades sensoriales de sidras y vinos, ya que aporta cuerpo y untuosidad a la bebida. Es por ello que su degradación tiene una influencia negativa sobre la calidad del producto (Picinelli et al., 2000). Las pequeñas cantidades de glicerol detectadas en las sidras analizadas, eran indicativo de la actividad microbiana de bacterias lácticas heterofermentativas, las cuales pueden consumir glicerol por diferentes vías metabólicas (Pasteris y Strasser de Saad, 2009). Sin embargo, la presencia 1,3-propanodiol en las muestras indicaba que era degradada, al menos en parte, a través de la vía glicerol deshidratasa.

El análisis de componentes principales puso de manifiesto que en las sidras con concentraciones de 1,3-propanodiol más elevadas, también se encontraban mayores cantidades de histamina, tiramina y putrescina. Esto podría indicar que las bacterias lácticas responsables de la degradación del glicerol son, a su vez, las principales responsables de la producción de aminas biógenas en sidra natural. Para confirmar esta hipótesis se evaluó la capacidad de las BAL aisladas de sidra para producir putrescina, tiramina e histamina (aminas biógenas más prevalentes en sidra natural). Existen estudios donde se aislaron e identificaron las especies responsables de la acumulación de aminas en bebidas fermentadas como vinos (Moreno-Arribas et al., 2000; Constantini et al., 2006) y cervezas (Izquierdo-Pulido et al., 1996). Sin embargo, las especies de bacterias lácticas comúnmente aisladas de sidras no habían sido incluidas en trabajos previos.

Entre la microbiota de bacterias lácticas de la sidra, la especie *L. diolivorans*, la cual no había sido descrita como productora de aminas biógenas previamente, fue la que mostró la mayor proporción de aislados con actividad aminoácido descarboxilasa. Se detectaron tres cepas, productoras de histamina (*L. diolivorans* 18, 20 y 22) y una de tiramina (*L. diolivorans* 54). Es de destacar que, previamente, Del Campo et al. (2000) también detectaron la capacidad de producir histamina en seis cepas de *Lactobacillus* spp. aislados

de sidra. Estos resultados sugieren que la especie *L. diolivorans* podría realizar una contribución considerable a la acumulación de aminas durante la elaboración de sidra. Por otro lado, también se detectó una cepa de *L. collinoides* capaz de sintetizar esta amina, lo que tampoco había sido reportado previamente. *L. collinoides* y *L. diolivorans* habían sido relacionadas previamente con diferentes alteraciones bacterianas de vinos y sidras, como el picado acroléico (Claisse y Lonvaud-Funel, 2001; Gorga et al., 2002; Sauvageot et al., 2002), o el ahilado (Werning et al., 2006), pero nunca con la producción de aminas biógenas.

Por el contrario, no se detectó producción de histamina por *O. oeni*, a diferencia de lo mostrado por otros autores en sidra (Del Campo et al., 2000) y vino (Coton et al., 1998; Guerrini et al., 2002; Landete et al., 2005b), ni por *P. parvulus*, principal responsable de la acumulación de esta amina en vino (Delfini 1989; Landete et al., 2005b). La razón de esta discordancia podría deberse, en parte, al hecho de que la capacidad de producción de aminas es una característica asociada a la cepa y no a la especie, y que pudiera estar, además, influenciada por otros factores (como la disponibilidad de sustratos, condiciones de cultivo y nutrientes, pH o etanol) que interactuaran favoreciendo la producción de aminas biógenas. Además, tampoco se podría descartar la aparición de falsos positivos en los métodos de detección de la actividad descarboxilasa como consecuencia de la formación de otros compuestos alcalinos (Rodríguez-Jerez et al., 1994; Roig-Sagues et al., 1996; Moreno-Arribas et al., 2003).

Por otro lado, se detectó producción de tiramina en una cepa de *O. oeni*, lo que no es muy común en esta especie. Esta amina, a pesar de ser la más frecuentemente producida por las bacterias lácticas (Silla-Santos, 1996; Bover-Cid y Holzappel, 1999), hasta la fecha solo se habían detectado dos cepas de *O. oeni* con actividad tirosina descarboxilasa, *O. oeni* DSM20252 (Choudhury et al., 1990) y otra cepa aislada de vino (Gardini et al., 2005).

Finalmente, ninguna de las cepas analizadas en este trabajo presentó la capacidad de contribuir a la acumulación de putrescina, amina predominante tanto en vino (Marcobal et al., 2006) como en sidra natural (Tabla 3.2). Sin embargo, los trabajos de Straub et al. (1995) y Moreno-Arribas et al. (2003) mostraron la capacidad de ciertas cepas de *L. buchneri* de producir putrescina mediante la descarboxilación de ornitina, más

recientemente, se detectó producción de putrescina por parte de cepas de *O. oeni* aislados de vino (Coton et al., 1999; Guerrini et al., 2002; Marcobal et al., 2004).

Para confirmar la capacidad de las bacterias lácticas de contribuir a la acumulación de aminas biógenas en condiciones reales, las cepas productoras de tiramina e histamina fueron cultivadas en sidra natural. Los resultados mostraron que a pesar de las condiciones más ácidas de la sidra (pH 4), las cepas mantenían la capacidad de producir aminas, aunque fuera en cantidades notablemente inferiores a los registrados en los medios de cultivo (Tabla 3.6).

Una vez determinado el contenido en aminas biógenas de la sidra natural e identificadas algunas de las especies de bacterias lácticas responsables de su síntesis y acumulación, se estudió la evolución de aminoácidos y aminas biógenas durante el proceso de elaboración de la sidra natural, y la influencia de diferentes factores tecnológicos (etapa de elaboración, cosecha y tipo de prensa) sobre ellas.

Los aminoácidos mayoritarios de los mostos de manzana fueron asparragina y ácido aspártico, seguidos de ácido glutámico, glutamina, ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) y  $\alpha$ -alanina. Estos resultados fueron similares a los reportados previamente por otros autores que mostraron que el ácido aspártico, asparragina y ácido glutámico eran los aminoácidos principales de las manzanas (Beech y Carr, 1977; Baron et al., 1982; Blanco-Gomis et al., 1990) y concentrados de zumo de manzana (Elkins et al., 1996). Los aminoácidos asparragina y ácido aspártico, también, fueron descritos como los predominantes en la sidra base utilizada para la elaboración de sidra espumosa (Suárez Valles et al., 2005).

En relación a la suma de aminoácidos libres, se observó una drástica reducción al inicio de la fermentación, debido a que juegan un papel importante en la nutrición de todos los microorganismos presentes en el mosto de manzana (Beech y Carr, 1977). Es más, los aminoácidos, también, podrían estar implicados en las reacciones de descarboxilación o en la formación de ésteres, como se ha descrito en el proceso de vinificación (Herraiz y Ough, 1993; Martínez-Rodríguez et al., 2002; Alcaide-Hidalgo et al., 2007). Posteriormente, en las muestras embotelladas de la cosecha 2005 se observó un ligero aumento de ciertos aminoácidos, y más concretamente de treonina y serina, los cuales forman parte de las

uniones O-glicosídicas de las manoproteínas de las levaduras. El incremento de la concentración de estos aminoácidos podría explicarse por la excreción y la autólisis de las levaduras al final de la fermentación (Beech y Carr, 1977). Este hecho también ha sido constatado durante la crianza de sidras espumosas (Suárez Valles et al., 2005) y es habitual durante la elaboración y envejecimiento con las levaduras de vinos espumosos (Moreno-Arribas et al., 1998).

El contenido en nitrógeno total, fue una de las pocas variables influenciada por el tipo de prensa utilizada para la extracción del mosto de manzana. Se observaron valores de nitrógeno total más reducidos en las muestras extraídas con la prensa neumática. Esto puede deberse a que en el prensado tradicional las mismas manzanas se prensan sucesivas veces, lo que podría contribuir a una mejor extracción de los compuestos nitrogenados de la fruta. Por otro lado, el aumento de la suma de aminoácidos registrado en las sidras embotelladas, no se correspondió con el incremento en el nitrógeno total, el cual fue superior. Esto podría ser debido a la falta de clarificación del producto previo al embotellado, lo que provoca que la sidra se mantenga en contacto con las levaduras y lías bacterianas durante el periodo de maduración y almacenamiento. En estas condiciones, podría ocurrir la autólisis de las levaduras, con lo que se liberarían simultáneamente proteínas y/o péptidos y aminoácidos, de forma similar a lo que ocurre durante la crianza de vinos con lías de levaduras (Moreno-Arribas et al., 1998; Alcaide-Hidalgo et al., 2007).

Por otro lado, no se observaron grandes variaciones en el contenido de aminas biógenas durante la elaboración de la sidra. La putrescina, al igual que en las sidras comerciales, fue la amina biógena mayoritaria y la única presente en todos los mostos iniciales. En la cosecha 2005 su concentración inicial se mantuvo estable durante las primeras etapas de la elaboración, aunque posteriormente su concentración se redujo un 50%. Este hecho pudo ser debido a la incorporación de la putrescina al metabolismo de las levaduras como precursor de espermina o espermidina o a su reacción con otros componentes de la sidra. Además, los resultados sugieren que la presencia de putrescina en estas bebidas podría proceder de la materia prima utilizada en su elaboración, de forma similar a lo detectado en vino (Marcobal et al., 2006; del Prete et al., 2009).

Por lo que respecta al resto de aminas, la histamina fue cuantitativamente la segunda amina más importante de las sidras, mientras que se detectaron concentraciones muy reducidas ( $<1\text{mg L}^{-1}$ ) de metilamina y etilamina en todas ellas. La tiramina, se detectó únicamente en una de las sidras estudiadas. Por otro lado, aunque se detectaron pequeñas cantidades de feniletilamina y cadaverina durante el periodo de elaboración, éstas no se encontraron en ninguna de las sidras en las etapas finales.

Las bacterias lácticas han sido asociadas, generalmente, a la formación de aminas biógenas durante la fermentación maloláctica en vinos. Los resultados sobre la evolución del ácido láctico y ácido L-málico del presente estudio, indicaron que esta fermentación ocurría de forma simultánea a la fermentación alcohólica en todos los mostos analizados. Esto se explica por los elevados niveles iniciales de bacterias lácticas, los cuales habitualmente no se controlan mediante la adición dióxido de azufre ( $\text{SO}_2$ ), ya que esta práctica es rara en la elaboración de sidra natural, donde se minimiza al máximo la adición de compuestos químicos para mantener las características organolépticas del producto (Del Campo et al., 2008). Es por ello que son las bacterias lácticas las poblaciones predominantes del producto final. Además, como se ha comprobado anteriormente, estas bacterias pueden consumir el glicerol producido por las levaduras durante la fermentación glicero-pirúvica y alterar la calidad de la sidra.

Finalmente, en este trabajo se observó una reducción del contenido en arginina a lo largo del periodo de elaboración de la sidra, el cual no fue acompañado del subsiguiente aumento de la concentración de ornitina ni por la producción de putrescina. Una posible explicación de este resultado, podría ser la transformación simultánea de arginina en ornitina y de ornitina en putrescina, mediante cepas de bacterias lácticas con actividad ornitina descarboxilasa, seguido de la transformación de putrescina en otras poliaminas. No obstante, según los resultados obtenidos en el presente trabajo, la presencia de bacterias productoras de putrescina no parece común en sidras naturales, ya que no se detectó actividad ornitina descarboxilasa entre las cepas estudiadas. Por otro lado, y puesto que, en la elaboración de sidra la fermentación alcohólica y maloláctica ocurren de forma espontánea, es común que las actividades metabólicas de levaduras y bacterias sucedan simultáneamente. Estas interacciones microbiológicas complejas, podrían explicar, al menos en parte, la disminución de la cantidad de arginina observado en este estudio.



### 3.5. CONCLUSIONES

Este trabajo constituye la aportación más completa realizada hasta el momento sobre la producción de aminas biógenas en sidra natural. Se ha determinado el contenido en aminas biógenas de 24 sidras naturales adquiridas en establecimientos comerciales del País Vasco. Las aminas mayoritarias fueron putrescina, tiramina e histamina y se detectaron en el 50, 33,3 y 37,5 % de las sidras, respectivamente. Además, mediante el análisis de otros parámetros químicos, se estableció una relación entre el contenido en aminas predominantes, glicerol y 1,3-propanodiol. En este sentido, se observó que las sidras con niveles de glicerol reducidos y cantidades elevadas de 1,3-propanodiol mostraban niveles superiores de estas aminas, lo que sugería una mayor actividad de las bacterias lácticas en las mismas.

Por otro lado, se han establecido las principales especies bacterianas implicadas en la producción de aminas biógenas en sidras. Para ello, se determinó la existencia de actividad ornitina, histidina y tirosina descarboxilasa en 54 cepas de bacterias lácticas aisladas de sidras naturales. Los ensayos se realizaron tanto en medios de cultivo como en sidra natural modificada, obteniéndose en ambos los mismos resultados, aunque los niveles de aminas fueran notablemente inferiores en los ensayos realizados en sidra.

Entre las especies analizadas *L. diolivorans* resultó ser la mayor productora de histamina (3 cepas), aunque, también se detectó una cepa de *L. collinoides* capaz de sintetizarla. Por otro lado se detectaron dos cepas productoras de tiramina, un *L. diolivorans* y un *O. oeni*, mientras que ninguna fue capaz de descarboxilar ornitina. Estos resultados contribuyen al conocimiento existente sobre la actividad metabólica de las bacterias lácticas.

Para finalizar, se estudió la evolución de la concentración de aminoácidos libres y aminas biógenas durante el proceso de elaboración de la sidra natural. Los aminoácidos asparragina y ácido aspártico fueron los más abundantes en los mostos de manzana, seguidos de ácido glutámico, glutamina, ácido  $\gamma$ -aminobutírico y  $\alpha$ -alanina. Por otro lado, en los mostos se detectaron pequeñas cantidades ornitina, tirosina e histidina (precursores de las aminas biógenas mayoritarias de las sidras) lo que podría ser la razón de los

reducidos niveles de aminas biógenas en las sidras. Sin embargo, en todos los mostos se encontraron pequeñas cantidades de putrescina, lo que indica que esta amina, tendría su origen en la materia prima utilizada en la elaboración de la sidra.

Con los resultados obtenidos a lo largo de este trabajo, se puede concluir que en la sidra natural, al igual que en otros productos fermentados, se encuentran aminas biógenas de forma habitual. Además, se ha comprobado que en la sidra pueden desarrollarse cepas de bacterias lácticas con capacidad de producir estos compuestos. A pesar de ello, es de destacar la baja concentración de aminas biógenas detectada en sidra natural, especialmente si se compara con la reportada en otros alimentos y bebidas. Este hecho puede ser debido a la baja concentración de los correspondientes aminoácidos precursores en los mostos de manzana.

### 3.6. BIBLIOGRAFÍA

- Alcaide-Hidalgo J. M., Moreno-Arribas M. V., Martín-Álvarez P. J. y Polo M. C. 2007. Influence of malolactic fermentation, postfermentative treatments and ageing with lees on nitrogen compounds of red wines. *Food Chemistry*. 103: 572-581.
- Arena M. E. y Manca de Nadra M. C. 2001. Biogenic amine production by *Lactobacillus*. *Journal of Applied Microbiology*. 90: 158-62
- Baron A., Goas J. M y Drilleau J. M. 1982. Evolution au cours de la maturation des fractions azotées et des acides aminés dans la pomme et dans le moût correspondant. *Sciences des Aliments*. 2: 15-23.
- Bauza T., Blaise A., Teissedre P. L., Cabanis J. C., Kanny G., Moneret-Vautrin D. A. y Daumas F. 1995. Biogenic amines in wine. Metabolism and toxicity. *Bull OIV*. 68: 42-67.
- Beech F. W. 1972. Cider making and cider research. A review. *Journal of Institute of Brewing* . 78: 477-491.
- Beech F. W. y Carr J. 1977. Economic Microbiology in Alcoholic beverages, vol 1. pp 139-313. A.H. Rose (ed). Cider and Perry. Academic Press, London.
- Blanco-Gomis D., Picinelli-Lobo A. M., Gutiérrez-Alvarez M. D. y Mangas-Alonso J. J. 1990. Determination of amino acids in apple extracts by high performance chromatography. *Chromatographia*. 29: 155-160.
- Bover-Cid S. y Holzapfel W. H. 1999. Improved screening procedure for biogenic amine production by lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*. 53: 33-41.
- 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 Journal of Microbiology & Biotechnology*. 18: 159-163
- Choudhury N., Hansen W., Engesser D., Hammes W. P. y Holzapfel W. H. 1990. Formation of histamine and tyramine by lactic acid bacteria in decarboxylase assay medium. *Letters in Applied Microbiology*. 11: 278-281.
- Claisse O. y Lonvaud-Funel A. 2001. Primers and a specific DNA probe for detecting lactic acid bacteria producing 3-hydroxypropionaldehyde from glycerol in spoiled ciders. *Journal of Food Protection*. 64: 833-837.

- Constantini A., Cersosimo M., del Prete V. y García-Moruno E. 2006. Production of biogenic amines by lactic acid bacteria: screening by PCR, thin-layer chromatography, and high-performance liquid chromatography of strains isolated from wine and must. *Journal of Food Protection*. 69: 391-396
- Coton E., Rollan G., Bertrand A. y Lonvaud-Funel A. 1998. Histamine-producing lactic acid bacteria in wines: early detection, frequency, and distribution. *American Journal of Enology and Viticulture*. 49: 199-204.
- Coton E., Torlois S., Bertrand A. y Lonvaud-Funel A. 1999. Biogenic amines and wine lactic acid bacteria. *Bull' OIV* 815-816: 2-35
- del Campo G., Lavado I., Duenas M. e Irastorza A. 2000. Histamine production by some lactic acid bacteria isolated from ciders. *Food Science and Technology International*. 6: 117-121.
- del Campo G., Santos J. J., Berregi I., Velasco S., Ibarburu I., Dueñas M. T. e Irastorza A. 2003. Ciders produced by two types of presses and fermented in stainless steel and wooden vats. *Journal of the Institute of Brewing*. 109: 342-348.
- del Campo G., Berregi I., Santos J. I., Dueñas M. e Irastorza A. 2008. Development of alcoholic and malolactic fermentations in highly acidic and phenolic apple musts. *Bioresource Technology*. 99: 2857-2863.
- del Prete V., Costantini A., Cecchini F., Morassut M. y García-Moruno E. 2009. Occurrence of biogenic amines in wine: The role of grapes. *Food Chemistry*. 112: 474-481.
- Delfini C. 1989. Ability of wine malolactic bacteria to produce histamine. *Sciences des Aliments*. 9: 413-416.
- Dueñas M., Irastorza A., Fernández C., Bilbao A. y Huerta A. 1994. Microbial populations and malolactic fermentation of apple cider using traditional and modified methods. *Journal of Food Science*. 59: 1060-1064.
- Elkins R. E., Matthys A., Lyon R. y Huang C. J. 1996. Characterization of commercially produced apple juice concentrate. *Journal of Food Composition and Analysis*. 9: 43-56.
- Gale E. F. 1946. The bacterial amino acid decarboxylases. En: Nord, F.F. (ed.), *Advances in Enzymology*, vol. 6. Interscience Publishers, New York.

- Gardini F., Zaccarelli A., Belletti N., Faustini F., Cavazza A., Martuscelli M., Mastrocola D. y Suzzi G. 2005. Factors influencing biogenic amine production by a strain of *Oenococcus oeni* in a model system. *Food Control*. 16: 609-616.
- González-Marco A. y Ancín-Azpilicueta C. 2006. Amine concentrations in wine stored in bottles at different temperatures. *Food Chemistry*. 99: 680-685
- Gorga A., Claisse O. y Lonvaud-Funel A. 2002. Organisation of the genes encoding glycerol dehydratase of *Lactobacillus collinoides*, *Lactobacillus hilgardii* and *Lactobacillus diolivorans*. *Sciences des Aliments*. 22: 151-160.
- Guerrini S., Mangani S., Granchi L. y Vencenzini M. 2002. Biogenic amine production by *Oenococcus oeni*. *Current Microbiology*. 44: 374-378.
- Hálasz A., Barath A., Simon-Sarkadi L. y Holzapfel W. 1994. Biogenic amines and their production by microorganism in food. *Trends in Food Science and Technology*. 5: 42-49.
- Herbert P., Cabrita M. J., Ratola N., Laureano O. y Alves, A. 2006. Relationship between biogenic amines and free amino acid contents of wines and musts from Alentejo (Portugal). *Journal of Environmental Science and Health, Part B*. 41: 1171-1186
- Herraiz T. y Ough C. 1993. Formation of ethyl esters of amino acids by yeasts Turing the alcoholic fermentation of grape juice. *American Journal of Enology and Viticulture*. 44: 41-48.
- Izquierdo-Pulido H., Hernández-Jover T., Mariné-Font A. y Vidal-Carou M. C. 1996. Biogenic amines in European beers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 44: 3159-3163.
- Lafon-Lafourcade S. 1975. Histamine in wines. *Connaissance de la Vigne et du Vin*. 9: 103-15.
- Landete J. M., Ferrer S., Polo L. y Pardo I. 2005 a. Biogenic amines in wines from three Spanish regions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53:1119-1124.
- Landete J. M., Ferrer S., Polo L. y Pardo I. 2005 b. Which lactic acid bacteria are responsible for histamine production in wine? *Journal of Applied Microbiology*. 99: 580-586.
- Leguerinel I., Cleret J. J., Bourgeois C. N. y Mafart P. 1987. Essai d'évaluation des caractéristiques organoleptiques des cidres par analyses instrumentales. *Sciences des Aliments*. 7: 223-230.

- Lehane L. y Olley J., 2000. Histamine fish poisoning revisited. *International Journal of Food Microbiology*. 58: 1–37.
- Lehtonen P. 1996. Determination of amines and amino acids in wine - a review. *American Journal of Enology and Viticulture*. 47: 127-133
- Leitão M., Marques A. P. y San Romao M. V. 2005. A survey of biogenic amines in commercial Portuguese wines. *Food Control*. 16: 199-204.
- Liu S. Q., 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. *Applied and Environmental Microbiology*. 61: 310-316.
- Marcobal A., de las Rivas B., Moreno-Arribas M. V. y Muñoz R. 2004. Identification of the ornithine decarboxylase gene in the putrescine-producer *Oenococcus oeni* BIFI-83. *FEMS Microbiology Letters*. 239: 213-220.
- Marcobal A., Polo M. C., Martín-Alvarez P. J. y Moreno-Arribas, M. V. 2005. Biogenic amines content of red Spanish wines. Comparison of a Direct ELISA and an HPLC method for the determination of histamine in wines. *Food Research International*. 38: 387-394.
- Marcobal A., Martín-Álvarez P. J., Polo M. C., Muñoz R. y Moreno-Arribas M. V. 2006. Formation of biogenic amines throughout the industrial manufacture of red wine. *Journal of Food Protection*. 69: 397-404.
- Martín-Álvarez P. J., Marcobal A., Polo C. y Moreno-Arribas M. V. 2006. Influence of technological practices on biogenic amine contents in red wines. *European Food Research and Technology*. 222: 420-424.
- Martínez-Rodríguez A. J., Carrascosa A. V., Martín-Álvarez P. J., Moreno-Arribas V. y Polo M. C. 2002. Influence of the yeast strain on the changes of the amino acids, peptides and proteins during sparkling wine production by the traditional method. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 29: 314-322.
- Moreno-Arribas M. V., Pueyo E., Polo M. C. y Martín-Álvarez P. J. 1998. Changes in the amino acid composition of the different nitrogenous fractions during the aging of wine with yeast. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. 46: 4042-4051.
- Moreno-Arribas V., Torlois S., Joyeux A., Bertrand A. y Lonvaud-Funel A. 2000. Isolation, properties and behaviour of tyramine-producing lactic acid bacteria from wine. *Journal of Applied Microbiology*. 88: 584-593.

- Moreno-Arribas M. V., Polo M.C., Jorganes F., y Muñoz R. 2003. Screening of biogenic amine production by lactic acid bacteria isolated from grape must and wine. *International Journal of Food Microbiology*. 84: 117-123.
- Moreno-Arribas M. V. y Polo M. C. 2008. Occurrence of lactic acid bacteria and biogenic amines in biologically aged wines. *Food Microbiology*. 25: 875-881.
- Novella-Rodríguez S., Veciana-Nogues M. T. y Vidal-Carou M. C. 2000. Biogenic amines and polyamines in milks and cheeses by ion-pair high performance liquid chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 48: 5117-5123.
- OIV (Organisation Internationale de la Vigne et du Vin), Compendium of International methods of wine and must analysis. Vol 1. [Internet]. France. Available from: <http://www.oiv.int/uk/accueil/index.php> (2009).
- Pasteris S. E. y Strasser de Saad A. M. 2009. Sugar-glycerol cofermentations by *Lactobacillus hilgardii* isolated from wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 57: 3853-3858.
- Piccinelli A., Suárez B., Moreno J., Rodríguez R., Caso-Garcia L. M. y Mangas J. J. 2000. Chemical characterization of Asturian cider. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 48: 3997-4002.
- Rodríguez-Jerez J. J., Mora-Ventura M. T., López-Sabater E. I. y Hernandez-Herrero M. M. 1994. Histidine, lysine and ornithine decarboxylase bacteria in Spanish salted semi-preserved anchovies. *Journal of Food Protection*. 57: 784-787.
- Roig-Sagues A. X., Hernandez-Herrero M. M., López-Sabater E. I., Rodríguez-Jerez J. J. y Mora-Ventura M. T. 1996. Histidine-decarboxylase activity of bacteria isolated from raw and ripened "Salchichon", a Spanish cured sausage. *Journal of Food Protection*. 59: 516-520.
- Sauvageot N., Pichereau V., Louarme V. L., Hartke A., Auffray Y. y Laplace J. M. 2002. Purification, characterization and subunits identification of the diol dehydratase of *Lactobacillus collinoides*. *European Journal of Biochemistry*. 269: 5731-5737.
- Silla-Santos M.H. 1996. Biogenic amines: their importance in foods. *International Journal of Food Microbiology*. 29: 213-231.
- Slomkowska A. y Ambroziak W. 2002. Biogenic amine profile of the most popular Polish beers. *European Food Research and Technology*. 215: 380-383.

- Soufleros E., Barrios M. L. y Bertrand A. 1998. Correlation between the content of biogenic amines and other wine compounds. *American Journal of Enology and Viticulture*. 49: 266-278.
- Straub B. W., Kicherer M., Schilcher S. M. y Hammes W. P. 1995. The formation of biogenic amines by fermentation organisms. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung*. 201: 79-82.
- Suárez Valles B., Palacios García N., Rodríguez Madrera R. y Picinelli Lobo A. 2005. Influence of yeast strain and aging time on free amino acid changes in sparkling ciders. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53: 6408-6413.
- Suzzi G. y Gardini F. 2003. Biogenic amines in dry fermented sausages: a review. *International Journal of Food Microbiology*. 88: 41-54
- Torrea D. y Ancín C. 2002. Content of biogenic amines in a chardonnay wine obtained through spontaneous and inoculated fermentations. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50: 4895-4899.
- Vázquez-Lasa M. B., Iñiguez-Crespo M., González-Larraina M. y González-Guerrero A. 1998. Biogenic amines in Rioja wines. *American Journal of Enology and Viticulture*. 49: 229.
- Vidal-Carou M. C., Isla-Gavin M.J., Mariné-Font A. y Codony-Salcedo R. 1989. Histamine and tyramine in natural sparkling wine, vermouth, cider, and vinegar. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2: 210-218.
- Vidal-Carou M. C., Codony-Salcedo R. y Marine-Font A. 1990. Histamine and tyramine in Spanish wines: relationships with total sulfur dioxide level, volatile acidity and malo-lactic fermentation intensity. *Food Chemistry*. 35: 217-27
- Werning M. L., Ibarburu I., Dueñas M. T., Irastorza A., Navas J. y López P. 2006. The *Pediococcus parvulus* *gtf* gene encoding the GTF glycosyltransferase and its application for PCR detection of  $\beta$ -glucan producer bacteria in foods. *Journal of Food Protection*. 69: 161-169.
- Zapparoli G., Torriani S., Presente P. y Dellaglio F. 1998. Design and evaluation of malolactic enzyme targeted primers for rapid identification and detection of *Oenococcus oeni* in wine. *Letters in Applied Microbiology*. 27: 243-246.
- Zee J. A., Simard R. E., Heures L. L. y Tremblay J. 1983. Biogenic amines in wines. *American Journal of Enology and Viticulture*. 34: 6-9.



**4. Detección y selección de cepas de bacterias lácticas productoras de (1,3)(1,2)- $\beta$ -D-glucanos aisladas de sidra natural y análisis de su potencial probiótico**

---

## 4.1. INTRODUCCIÓN

En los últimos años, la demanda creciente por parte de los consumidores de alimentos con valores nutricionales añadidos y efectos positivos sobre la salud ha conducido al desarrollo de nuevos alimentos funcionales. Una línea de investigación muy activa en la industria alimentaria es el desarrollo de nuevas cepas probióticas, con la finalidad de obtener microorganismos más activos desde el punto de vista de sus efectos saludables (Salminen et al., 1998).

Las especificaciones de un producto probiótico requieren que las cepas sean examinadas individualmente, que sean clasificadas apropiadamente a nivel de especie y que mantengan un nivel de viables aceptable en el momento de caducar el producto (FAO/WHO, 2002). En este sentido, el CODEX estándar para leches fermentadas establece que el recuento mínimo de estos microorganismos en el momento del consumo debe ser superior a  $10^6$  UFC  $g^{-1}$  (CODEX Alimentarius Commission, 2003). Además de su capacidad para sobrevivir en el producto, se han sugerido diversos criterios para la selección de los probióticos entre los que se encuentran:

- 1) La tolerancia ante el estrés gastrointestinal (ácidos y sales biliares). Para ejercer su efecto beneficioso el microorganismo debe ser capaz de resistir las condiciones del tracto gastrointestinal y llegar a su centro de acción (intestino delgado) en número y condiciones adecuadas (Ouwehand et al., 2002).
- 2) La capacidad de adhesión a la mucosa intestinal. Éste es considerado como un prerrequisito permitiendo la colonización del tracto intestinal. En este contexto, se ha observado que el EPS producido y excretado por las BAL puede estar implicado en el reconocimiento celular y la formación de biofilms, facilitando la colonización del intestino y protegiéndola ante patógenos (Ruas-Madiedo et al., 2002). La dificultad de estudiar la adhesión bacteriana *in vivo* ha llevado al desarrollo de sistemas modelo *in vitro* en los estudios preliminares sobre la capacidad de adherencia. Estos modelos están basados en la adhesión a líneas celulares tales como células Caco-2, las cuales se asemejan estrechamente a los enterocitos del intestino delgado.

- 3) Actividad inmunomoduladora. Se ha observado que los microorganismos probióticos y sus componentes de paredes celulares (peptidoglicanos, lipopolisacáridos), ADN y metabolitos presentan propiedades inmunomoduladoras en humanos, tales como la estimulación de fagocitos/macrófagos y células asesinas naturales, el incremento de la liberación de citoquinas y defensinas y la producción incrementada de anticuerpos específicos, entre otras actividades (de Vrese, 2008).

En la actualidad, ciertas bacterias lácticas productoras de exopolisacáridos se utilizan en la industria alimentaria como cultivos iniciadores o coadyuvantes para la elaboración de alimentos fermentados, no sólo por sus propiedades como bioespesantes naturales, sino también por el hecho de que a los exopolisacáridos se les han atribuido efectos positivos sobre la salud (Ruas-Madiedo et al., 2008). En la línea de nuevos alimentos funcionales, las bacterias lácticas productoras de (1,3)- $\beta$ -D-glucanos, aisladas de sidra, representan una alternativa muy interesante, ya que estos polisacáridos tienen capacidad gelificante y son de particular interés sus efectos positivos sobre la salud, avalados por numerosos trabajos (Zekovic et al., 2005; Sletmoen y Stokke, 2008). Sus propiedades dependen de su masa molecular, estructura y conformación. Los más estudiados son los (1,3)- $\beta$ -D-glucanos lineales (curdlano, producido por *Agrobacterium*), o con ramificaciones 1  $\rightarrow$  6 (hongos) o 1  $\rightarrow$  2 (bacterias lácticas). En cereales, estos polímeros son lineales y tienen además enlaces 1  $\rightarrow$  4 en la cadena principal.

La característica más importante que presenta este grupo heterogéneo de polisacáridos es su capacidad para estimular el sistema inmune en animales y humanos. Y así, se han descrito diferentes efectos fisiológicos tales como actividad antitumoral, antibacteriana y antifúngica, y de aumento de la resistencia a las infecciones (Schorey y Lawrence, 2008; Soltanian et al., 2009; Wichers, 2009). Además, se ha indicado la capacidad de reducir los niveles de colesterol LDL (Varady y Jones, 2005).

Los (1,3)- $\beta$ -D-glucanos, no presentan efectos citotóxicos por sí mismos frente a células cancerosas o agentes infecciosos, sino que los efectos beneficiosos reportados son debidos a su capacidad para modular la respuesta inmunitaria, tanto innata como adaptativa (Chan et al., 2009). En este sentido, la actividad inmunomoduladora de los (1,3)- $\beta$ -D-glucanos se debe a su capacidad para activar leucocitos (Brown y Gordon, 2003), mediante

la unión a receptores de la superficie celular, conocidos como receptores de reconocimiento de patrones (PRRs). Éstos detectan estructuras esenciales para la supervivencia de los patógenos, entre las que se encuentran los (1,3)-β-D-glucanos, y que se denominan patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs).

Los receptores de los (1,3)-β-D-glucanos han sido identificados tanto en células inmunitarias como en no inmunitarias, entre las que se incluyen monocitos, macrófagos, neutrófilos, células de Langerhans, eosinófilos, células asesinas naturales y fibroblastos (Brown y Gordon, 2005). En relación a esta actividad se han asociado diferentes receptores como la lactosilceramida (LacCer), el receptor del complemento 3 (CR3), el receptor scavenger (SR-A), los receptores tipo Toll (*Toll like receptors*, TLR), y el Dectin-1. Sin embargo, entre todos ellos, el receptor Dectin-1 ha sido el único sobre el que se ha demostrado, claramente, que participa en la respuesta celular frente a los (1,3)-β-D-glucanos (Brown y Gordon, 2005). Este receptor es una glicoproteína transmembrana (Reid et al., 2009), que en humanos y ratones, se expresa en la superficie de varios tipos de células, incluyendo células dendríticas, macrófagos, monocitos, neutrófilos y algunos tipos de células-T (Soltanian et al., 2009). El receptor Dectin-1 reconoce β-glucanos solubles y particulados, con enlaces (1→3) y (1→6) e induce diferentes respuestas celulares incluyendo maduración de células dendríticas, captura del ligando mediante endocitosis y fagocitosis, explosión oxidativa, síntesis de metabolitos del ácido araquidónico y numerosas citoquinas y quimiocinas (TNFα, CXCL2, IL-23, IL-6 e IL-10) (Brown, 2006). Sin embargo, la capacidad de Dectin-1 para inducir directamente estas respuestas es dependiente del tipo de célula, por lo que podría requerir de, o ser aumentada su capacidad por la señalización cooperativa con receptores tipo Toll (Reid et al., 2009).

Con respecto a las propiedades tecnológicas y bioactivas de las cepas BAL productoras de (1,3)(1,2)-β-D-glucanos aisladas de sidra, estudios previos mostraron que *P. parvulus* 2.6 y *L. diolivorans* G-77 fueron capaces de fermentar un producto basado en leche de avena y producir EPS, lo que reveló su potencial como cultivos iniciadores para la elaboración de un nuevo tipo de producto fermentado no lácteo (Mårtensson et al., 2003). Ensayos posteriores en humanos mostraron que la ingesta de productos basados en avena fermentados con *P. parvulus* 2.6, además de reducir los niveles de colesterol sérico, incrementaban los recuentos de *Bifidobacterium* ssp en muestras fecales humanas

(Mårtensson et al., 2005). Además, se ha descrito que en ratas alimentadas con un concentrado de fibra de avena fermentada por *P. parvulus* 2.6, se encontraron cambios en la síntesis de ácidos grasos de cadena corta (SCFA) en el intestino ciego, colon distal y heces, que pueden resultar beneficiosos para mantener un colon saludable (Lambo-Fodje et al., 2006).

Por otro lado, estudios *in vitro* con *P. parvulus* 2.6 revelaron su tolerancia al estrés gastrointestinal, adhesión a células Caco-2 y su capacidad inmunoestimuladora (Fernández de Palencia et al., 2009). Por ello, las cepas BAL productoras de (1,3)- $\beta$ -glucanos, podrían ser utilizadas como cultivos iniciadores funcionales para la elaboración de alimentos (Leroy y De Vuyst, 2004). Finalmente y en cuanto a las propiedades texturizantes, se ha descrito que el (1,3)(1,2)- $\beta$ -glucano sintetizado por *P. parvulus* 2.6 tiene capacidad bioespesante (Velasco et al., 2009).

Teniendo en cuenta todos estos antecedentes, en este trabajo se ha planteado la detección de nuevas cepas productoras de (1,3)(1,2)- $\beta$ -glucanos a partir de nuestra colección de cepas BAL aisladas de sidra, y la caracterización de sus exopolisacáridos. Para la búsqueda de estas cepas, se ha utilizado la técnica de PCR convencional para la detección del gen *gtf* (Werning et al., 2006), ya que este gen parece estar altamente conservado en las cepas productoras del (1,3)(1,2)- $\beta$ -glucano procedentes de sidras y vinos (Walling et al., 2005; Werning et al., 2006). Entre las nuevas cepas identificadas como productoras de  $\beta$ -glucanos, se seleccionaron tres, a las que se evaluó su potencial probiótico dada su posible aplicación como cultivo iniciador. Para ello, se analizaron las siguientes características: 1) Tolerancia al estrés gastrointestinal, 2) Capacidad de adhesión a las células epiteliales Caco-2, y 3) Capacidad inmunomoduladora utilizando macrófagos M1 y M2.

## 4.2. MATERIAL Y MÉTODOS

### 4.2.1. Cepas bacterianas y condiciones de cultivo

Se analizó la producción de EPS en 147 cepas de bacterias lácticas, aisladas de sidra natural ahilada o no ahilada, y procedentes de la colección de cultivos de la UPV/EHU. Las cepas se mantuvieron congeladas a -80 °C en medio líquido MRS suplementado con 20% de glicerol (v/v). Como cepa de referencia se incluyó *P. parvulus* 2.6 que sintetiza el polisacárido (1,3)(1,2)-β-D-glucano.

Para facilitar la adaptación de las cepas congeladas a las condiciones del ensayo, éstas se inocularon en medio MRS (Anexo I) e incubaron durante la noche a 28 °C, en atmósfera enriquecida con 5% CO<sub>2</sub>.

Para la producción y caracterización de EPS, las cepas de *P. parvulus* se cultivaron en el medio semidefinido MST (Anexo I) (pH 6,6) (Velasco et al., 2006), mientras que *L. suebicus* se cultivó en el medio semidefinido SMD (Anexo I) (pH 6) (Velasco et al., 2009). Las fermentaciones se realizaron en discontinuo y por duplicado, sin control de pH, en frascos roscados de 250 mL completamente llenos durante 96 h a 28 °C, bajo atmósfera enriquecida con 5% CO<sub>2</sub>. El crecimiento celular se monitorizó mediante la medida de la densidad óptica a 600 nm (DO<sub>600</sub>).

### 4.2.2. Detección y caracterización de bacterias lácticas productoras de exopolisacáridos

La producción de EPS por las 147 cepas se examinó en medio MRS-T-F (Anexo I) (pH 4,8). Los tubos se incubaron a 28°C durante 48 h bajo atmósfera enriquecida con 5% CO<sub>2</sub>. La capacidad de producción de EPS (fenotipo ropy) se determinó visualmente, mediante la observación del aumento de la viscosidad del medio o de la apariencia viscosa de la biomasa sedimentada.

#### **4.2.2.1. Extracción de ADN e identificación de cepas productoras de exopolisacáridos**

Para la extracción del ADN se recogieron las células de 1 mL del medio MRS mediante centrifugación (13000 rpm, 3 min), se lavaron con 0,5 mL de solución tampón TE (Anexo I) y se recogieron por centrifugación (13000 rpm, 3 min). Posteriormente, las células se resuspendieron en 180  $\mu$ L de tampón de lisis enzimático (Anexo I). Tras 30 min de incubación a 37 °C, el ADN bacteriano se aisló mediante el DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen), según lo descrito por el fabricante, y se mantuvo a -20 °C hasta su utilización.

La identificación de las cepas se realizó mediante la amplificación por PCR de un fragmento del gen ARNr 16S y su posterior secuenciación, según lo descrito en la sección 2.2.5.1 de material y métodos del Capítulo 2.

#### **4.2.2.2. Detección y caracterización del gen *gtf* en cepas productoras de exopolisacáridos**

Para examinar la presencia del gen glicosiltransferasa (*gtf*) en el genoma bacteriano se utilizaron los cebadores específicos GTFF (5'-CGGTAATGAAGCGTTTCCTG-3') y GTFR (5'-GCTAGTACGGTAGACTTG-3') diseñados por Werning et al. (2006) y que amplifican un fragmento de 417 pb. La reacción se realizó en un volumen total de 50  $\mu$ L, compuesto por: 1,25 U de BIOTAQ DNA polimerasa (Bioline), 0,2 M de cada cebador, 3,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 20 mM de Tris HCl (pH 8,4), 50 mM de KCl, 25  $\mu$ M de cada dNTP (Bioline) y 5  $\mu$ L de muestra. Las condiciones de reacción fueron las siguientes: una etapa de desnaturalización de 5 min a 94 °C, 25 ciclos de 94 °C durante 1 min, 55 °C durante 1 min y 72 °C durante 2 min. Para finalizar se añadió una etapa de 72 °C durante 10 min.

El producto de PCR se visualizó mediante electroforesis en gel de agarosa. Para ello, se mezclaron 10  $\mu$ L de cada producto de PCR con 1,5  $\mu$ L del tampón de carga, y se hicieron migrar en un gel de agarosa al 0,8% teñido con bromuro de etidio (0,2  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>), durante 50 min a 90V. El tamaño de los fragmentos de ADN amplificados se estimó por comparación con el marcador de peso molecular de 1 Kb Plus DNA Leader (Invitrogen). La visualización de los amplicones se realizó por exposición a luz ultravioleta en un Gel-Doc (Bio-Rad).

Para la caracterización del gen *gtf* en tres cepas seleccionadas se amplificó todo el gen mediante los cebadores 5'-TTAATCATTCCAATCAACTGTTTCCGTGTT-3' y 5'-ATGTTAAATGAGATAATGATTCAGAACTAAAAAATTTC-3', y estos cebadores, junto con los internos, se utilizaron para determinar la secuencia de ADN de los 1704 nucleótidos del gen *gtf*, según lo descrito por Werning et al. (2006). Las secuencias de ADN obtenidas fueron depositadas en el GenBank (*P. parvulus* CUPV1, GU174475; *P. parvulus* CUPV22, GU174476; *L. suebicus* CUPV221 GU174474).

#### 4.2.2.3. Fermentación de azúcares

Para conocer el perfil de fermentación de azúcares de las cepas EPS<sup>+</sup>, se cultivaron en 5 mL de medio MRS (Anexo I) sin glucosa (pH 6,22), suplementado con 0,04% (p/v) de rojo de clorofenol, a los que se añadió un 2% (p/v) del azúcar (glucosa, fructosa, galactosa, lactosa, sacarosa, maltosa, sorbitol, rafinosa, manitol, ramnosa, trehalosa o xilosa). Los medios fueron inoculados a una DO<sub>600</sub> del orden de 0,6 a 28 °C durante 7 días bajo atmósfera enriquecida con 5% CO<sub>2</sub>.

#### 4.2.2.4. Aislamiento y cuantificación del exopolisacárido

Para el aislamiento del EPS se retiraron las células del medio de cultivo por centrifugación (10000 rpm, 30 min a 4 °C) y se recogieron en microtubos de 1,5 mL tres alícuotas de 0,5 mL del sobrenadante libre de células. A continuación, para precipitar el polisacárido, se añadieron dos volúmenes de acetona fría al 100% (v/v) y se mantuvo toda la noche a 4 °C. El EPS precipitado se recogió por centrifugación (15000 rpm, 20 min a 4 °C) y se lavó tres veces con acetona fría al 66% (v/v). Tras 3 lavados, el precipitado se secó en estufa y se resuspendió en 0,5 mL de agua destilada.

La cuantificación del EPS se determinó mediante el método del fenol-sulfúrico descrito por Dubois et al. (1956), utilizando D-glucosa como estándar. El contenido del microtubo se trasvasó a un tubo de vidrio, se añadieron 0,5 mL de fenol (5%, v/v) y 2,5 mL de ácido sulfúrico (95,5%, v/v). Los tubos se incubaron en un baño a 100 °C durante 5 min y transcurrido este tiempo, la reacción se detuvo sumergiendo los tubos en un baño de agua



con hielo. Una vez enfriada la muestra, se procedió a la medida de la absorbancia a 490 nm. Los valores de EPS mostrados son la media de las tres determinaciones.

#### **4.2.2.5. Análisis de aglutinación para la detección de cepas productoras de (1,3)(1,2)- $\beta$ -D-glucano**

La técnica de aglutinación con el antisuero específico de *Streptococcus pneumoniae* tipo 37 (Statens Serum Institut) se utilizó como método alternativo de detección de bacterias lácticas productoras de (1,3)(1,2)- $\beta$ -D-glucanos. Se recogieron células de 1 mL de medio de cultivo en MRS en fase exponencial por centrifugación (10000 rpm, 10 min) y se resuspendieron en PBS (Anexo I) (pH 8) hasta obtener una DO<sub>600</sub> de 0,4. A continuación, se mezclaron 5 L de la suspensión de células y 5 L del antisuero y se incubaron a 4 °C durante 2 h. Transcurrido este tiempo, la preparación se observó al microscopio óptico de contraste de fase (Nikon, AFX-DVX).

#### **4.2.3. Tipificación de cepas de *P. parvulus* productoras de exopolisacárido**

##### **4.2.3.1. RAPD-PCR (Amplificación al azar de fragmentos polimórficos de ADN)**

Las cepas de *P. parvulus* productoras de (1,3)(1,2)- $\beta$ -D-glucano se tipificaron mediante la técnica RAPD-PCR, utilizando tres cebadores diferentes; M13 (5'-GAGGGTGGCGGTTCT-3') (Pinto et al., 2005), P1 (5'-ACGCGCCCT-3') y P2 (5'-ATGTAACGCC-3') (Simpson et al., 2002). Cada reacción de PCR se llevó a cabo con un único cebador en un volumen final de 50  $\mu$ L que contenía: 1x del tampón de PCR (Bioline), 5  $\mu$ M del cebador, 1 U de BIOTAQ DNA polimerasa (Bioline), 5 mM de MgCl<sub>2</sub> para P1 y P2, y 2,5 mM para M13, 100  $\mu$ M de cada dNTP (Bioline) y 200 ng de DNA. El programa de amplificación comenzó con un ciclo de 94 °C durante 5 min, 40 °C durante 5 min y 72 °C durante 5 min, seguido de 33 ciclos de 94 °C durante 30 s para M13 o 1 min para P1 y P2, 40 °C durante 1 min y 72 °C durante 1 min, para finalizar con un ciclo de 72 °C durante 5 min.

Tras la amplificación, se mezclaron 20 L del amplicón con 1,5 L del tampón de carga y se hicieron migrar en un gel de agarosa al 1,8% (p/v) en solución tampón TAE (Anexo I) a 80V durante 90 min. La comparación y normalización de los geles se realizó por análisis de los marcadores de pesos moleculares presentes en cada gel, para lo cual se dispuso una calle por cada seis con el marcador de pesos moleculares, 1 Kb Plus DNA Leader (Invitrogen). Los geles teñidos con bromuro de etidio ( $0,2 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) fueron visualizados bajo luz UV y digitalizados utilizando un Gel-Doc (BioRad). Para valorar la reproducibilidad del ensayo, cada reacción de amplificación se realizó por duplicado, utilizando ADN obtenido de cultivos independientes.

#### **4.2.3.2. Análisis estadístico de los perfiles genotípicos y fenotípicos**

Las imágenes digitalizadas fueron convertidas, normalizadas, analizadas y combinadas mediante el Software package BioNumerics 2.5 (Applied Maths). Los diferentes perfiles RADP obtenidos con cada cebador (M13, P1 y P2) se compararon y combinaron usando el coeficiente de correlación de Pearson y se realizó un análisis de agrupamiento utilizando el algoritmo UPGMA (*unweighted pair or group method with arithmetic averaging*) (Sneath y Sokal, 1973).

Para agrupar la información proveniente de los RAPDs con otros datos genotípicos (detección del gen *gtf*) y fenotípicos (perfil de fermentación de azúcares, producción de EPS y aglutinación), se empleó la herramienta “*composite data set*” del programa BioNumerics. La similitud entre las cepas se calculó mediante el coeficiente binario de Jaccard (Sneath y Sokal, 1973). La consistencia de las agrupaciones se estimó calculando los valores de correlación cofenética correspondientes a los dendrogramas.

#### **4.2.4. Caracterización de exopolisacáridos**

##### **4.2.4.1. Viscosidad del medio de cultivo**

La evolución de la viscosidad del medio se monitorizó a lo largo del proceso de fermentación (181 h) de tres cepas seleccionadas. La viscosidad del sobrenadante libre de

células se determinó mediante un viscosímetro capilar Cannon-Fenske (0.3 mm Ø) a 26 °C, según lo descrito por Dueñas et al. (2003). Todas las medidas fueron realizadas al menos por triplicado y expresadas en centistocks ( $\text{cSt}=\text{mm}^2 \text{seg}^{-1}$ ).

#### **4.2.4.2. Aislamiento y purificación del exopolisacárido**

Los polisacáridos se aislaron a partir de los sobrenadantes libres de células mediante la adición de 3 volúmenes de etanol frío al 96% (v/v). Tras la incubación durante 24 h a 4 °C, el precipitado se recogió por centrifugación (10000 rpm, 20 min a 4 °C) y se lavó tres veces con etanol frío al 80% (v/v). Finalmente, el precipitado se disolvió en agua destilada, se dializó (3500 Da, Medicell International, Ltd.) durante 3 días, y finalmente se liofilizó (Cryodos, Telstar).

#### **4.2.4.3. Resonancia Magnética Nuclear (RMN)**

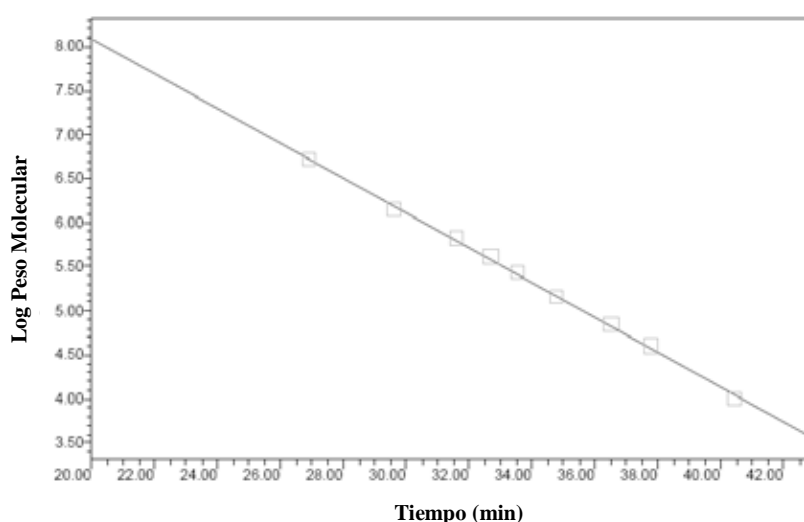
Para la determinación estructural de los EPSs, se resuspendieron 0,6 mg del liófilo en 0,6 mL de agua deuterada (óxido de deuterio, 99 atom % D, Aldrich) y se agitaron hasta su completa homogeneización. Los análisis  $^1\text{H}$  RMN y 2D-COSY de las diferentes muestras se realizaron en un espectrómetro Bruker Avance 500 a 30°C, según lo descrito por Dueñas-Chasco et al. (1998). Los desplazamientos químicos se expresaron en ppm, utilizando la señal del agua semipesada (HDO) como referencia interna. El tratamiento de los datos se realizó con el programa MestReNova v 5.1.0 (Magnetic Resonance Companion).

#### **4.2.4.4. Composición monosacáridica y análisis de metilación**

La composición en monosacáridos se determinó y cuantificó por cromatografía de gases tras la hidrólisis de los polisacáridos con ácido trifluoroacético (TFA) 3 M, según lo descrito por Leal et al. (2008). Para el análisis de los tipos de unión entre monosacáridos, las muestras se metilaron de acuerdo a Ciucanu y Kerek. (1984). Las muestras permetiladas fueron hidrolizadas con ácido trifluoroacético 3 M (1 h, 120 °C) y posteriormente reducidas, acetiladas y analizadas por cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS), según lo reportado por Leal et al. (2008).

#### 4.2.4.5. Determinación de la masa molecular

El tamaño molecular de las muestras de EPS se examinó mediante cromatografía de exclusión molecular (SEC). Se empleó un GPCV 2000 (Waters) equipado con un detector de índice de refracción y tres columnas PL-aquagel-OH 40, 50 y 60, 15  $\mu\text{m}$ , (Polymer Laboratories) colocadas en serie y termostalizadas a 30  $^{\circ}\text{C}$ . El polisacárido se disolvió en el eluyente ( $\text{NaNO}_3$  0,2 M y  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0,01 M, pH 7) a una concentración de 0,05% (p/v) y se utilizó un flujo de  $0,7 \text{ mL min}^{-1}$ . La curva de calibrado se construyó con los siguientes dextranos comerciales:  $10^4$ ,  $4 \times 10^4$ ,  $7 \times 10^4$ ,  $1,5 \times 10^5$ ,  $2,7 \times 10^5$ ,  $4,1 \times 10^5$ ,  $6,7 \times 10^5$ ,  $1,4 \times 10^6$  y  $2 \times 10^6$  Da (Fluka), disueltos en el eluyente (Figura 4.1).



**Figura 4.1.** Curva de calibrado construida con dextranos estándar con rangos de  $10^4$  a  $5,3 \times 10^6$  Da.

### 4.2.5. Caracterización del potencial probiótico de cepas seleccionadas

#### 4.2.5.1. Cepas bacterianas y condiciones de cultivo

Para el estudio del potencial probiótico se seleccionaron tres cepas productoras del (1,3)(1,2)- $\beta$ -D-glucano, dos de ellas pertenecientes a la especie *Pediococcus parvulus* (CUPV1 y CUPV22) y la tercera a *Lactobacillus suebicus* (CUPV221). Estas tres cepas, junto con las probióticas *Lactobacillus acidophilus* LA-5 y *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 (Chr. Hansen A/S) se resuspendieron en medio MRS (Anexo I). La

incubación se realizó a 30 °C (cepas seleccionadas) o 37 °C (probióticas) durante una noche, en jarras de anaerobiosis (AnaeroGen<sup>TM</sup>, Oxoid).

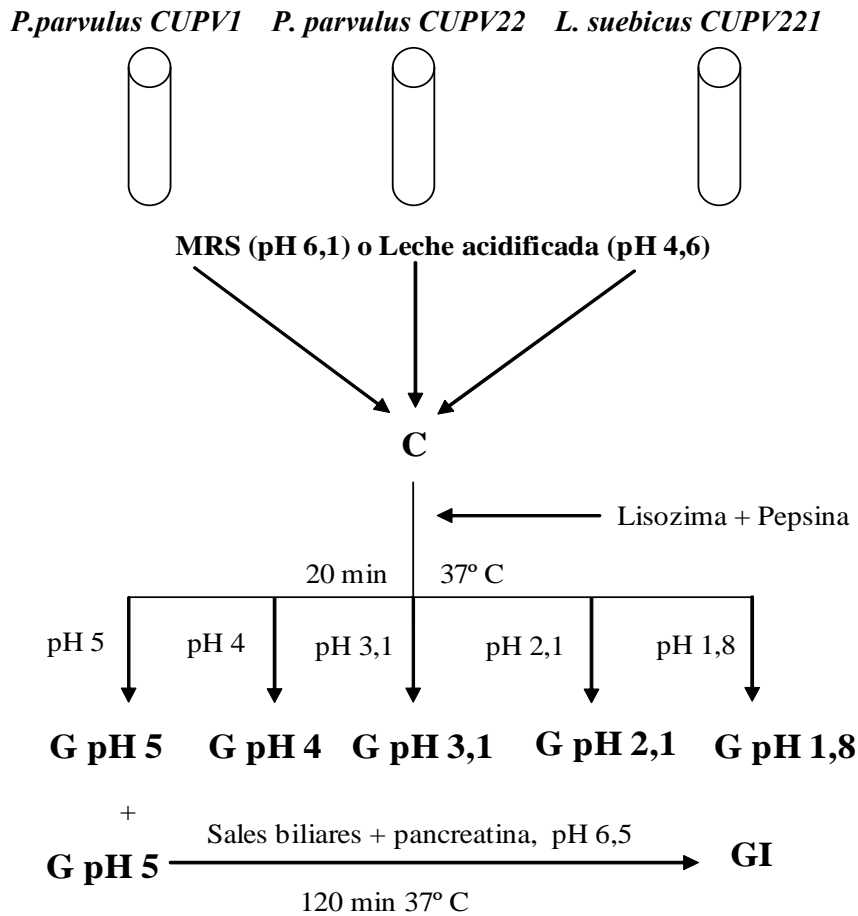
#### 4.2.5.2. Ensayos de tolerancia al estrés gastrointestinal

Las condiciones del tracto gastrointestinal humano se simularon según lo descrito por Fernández de Palencia et al. (2008), con ligeras modificaciones. El esquema del modelo utilizado se resume en la Figura 4.2. Para el análisis del estrés gástrico (G), las bacterias expuestas a lisozima y pepsina, fueron incubadas a pH 5, 4, 3,1, 2,1 y 1,8 durante 20 min a 37 °C. El estrés intestinal (GI) se simuló exponiendo la muestra G pH 5 a una mezcla de sales biliares y pancreatina a pH 6,5 (120 min a 37 °C). En cada una de las etapas del ensayo se recogieron muestras de 2,5 mL para determinar la viabilidad celular.

Estos ensayos se realizaron tanto en MRS como en una matriz alimentaria (leche desnatada en polvo reconstituida (10%, p/v) y acidificada a pH 4,6 (HCl 1 M). En ambos casos, las cepas se propagaron previamente en medio MRS hasta una fase exponencial tardía y las células se recogieron por centrifugación (10000 rpm, 10 min). Posteriormente, se inocularon 15 mL de medio MRS o leche acidificada para obtener una población de  $10^9$  UFC mL<sup>-1</sup>. Todos los ensayos se realizaron por triplicado y con cultivos independientes.

Para simular el estrés gástrico, a la muestra C (12,5 mL) se le añadió 1,35 mL de solución de lisozima (100mg mL<sup>-1</sup>) 1,8 mL de solución de pepsina (30 mg mL<sup>-1</sup>) y 1,65 mL de solución electrolítica G (Anexo I). Inmediatamente, se tomaron alícuotas de 2,5 mL, a las que se ajustó el pH a 5, 4, 3,1, 2,1 o 1,8, se incubaron a 37 °C en agitación durante 20 min y se obtuvieron las muestras G pH 5, G pH 4, G pH 3,1, G pH 2,1 y G pH 1,8, respectivamente.

El estrés intestinal se simuló únicamente a partir de la muestra G pH 5. Para ello, se ajustó su pH a 6,5 mediante NaHCO<sub>3</sub> 1 M y se añadieron 200 L de solución electrolítica estéril I (Anexo I), 400 L de una solución de sales biliares (40 mg mL<sup>-1</sup> de sales biliares en solución electrolítica I) y 400 L de una solución de pancreatina (20 mg mL<sup>-1</sup> de pancreatina en 50% solución solución electrolítica I y 50% NaCl (0,5% p/v), ajustada a pH 8). La incubación se realizó con agitación a 37 °C durante 120 minutos.

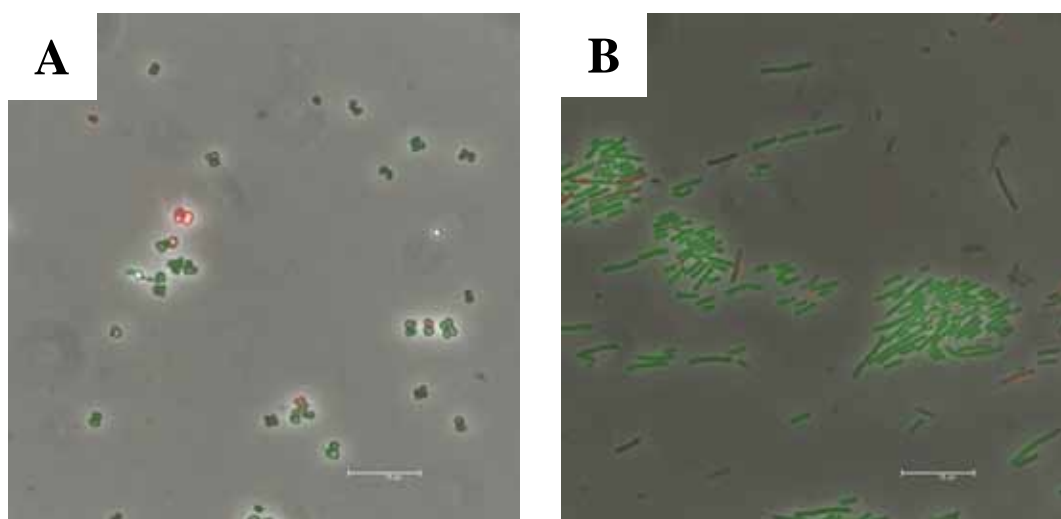


**Figura 4.2.** Representación esquemática del modelo *in vitro* del estrés gastrointestinal.

La determinación de la viabilidad celular no se puede realizar directamente en muestras de leche acidificada, debido a la interferencia provocada por la caseína. Por ello, las muestras en leche se neutralizaron a pH 6,5 con NaOH 1 M y se dispersaron las micelas de caseína mediante la adición de 500  $\mu$ L de citrato de sodio 2-hidrato al 60% (p/v) frío e incubación posterior en hielo durante 15 min. Una vez clarificadas, tanto estas muestras como las incubadas en MRS se trataron de la misma forma. Se recogieron las células de 1 mL de muestra (10000 rpm, 10 min), se lavaron dos veces con solución tampón PBS (Anexo I) y se resuspendieron en 650  $\mu$ L de la misma solución tampón para el análisis de la viabilidad celular.

#### 4.2.5.2.1. Análisis de viabilidad celular

La determinación de la viabilidad celular se realizó mediante la tinción fluorescente LIVE/DEAD BacLight (Bacterial Viability Kits, Molecular Probes) (Alakomi et al., 2005). El método se basa en la utilización conjunta de dos fluoróforos, SYTO 9 y yoduro de propidio (PI). El primero es un fluoróforo permeable que se une al ADN y emite fluorescencia verde, mientras que el segundo penetra únicamente en células con membranas dañadas y se combina con el ADN, emitiendo fluorescencia roja. En este último caso, el ADN bacteriano se encuentra en contacto con ambos fluoróforos, pero como el yoduro de propidio presenta mayor afinidad por el ADN que SYTO 9, desplaza a éste, por lo que las células viables serán vistas como verdes, y las células muertas como rojas (Figura 4.3)



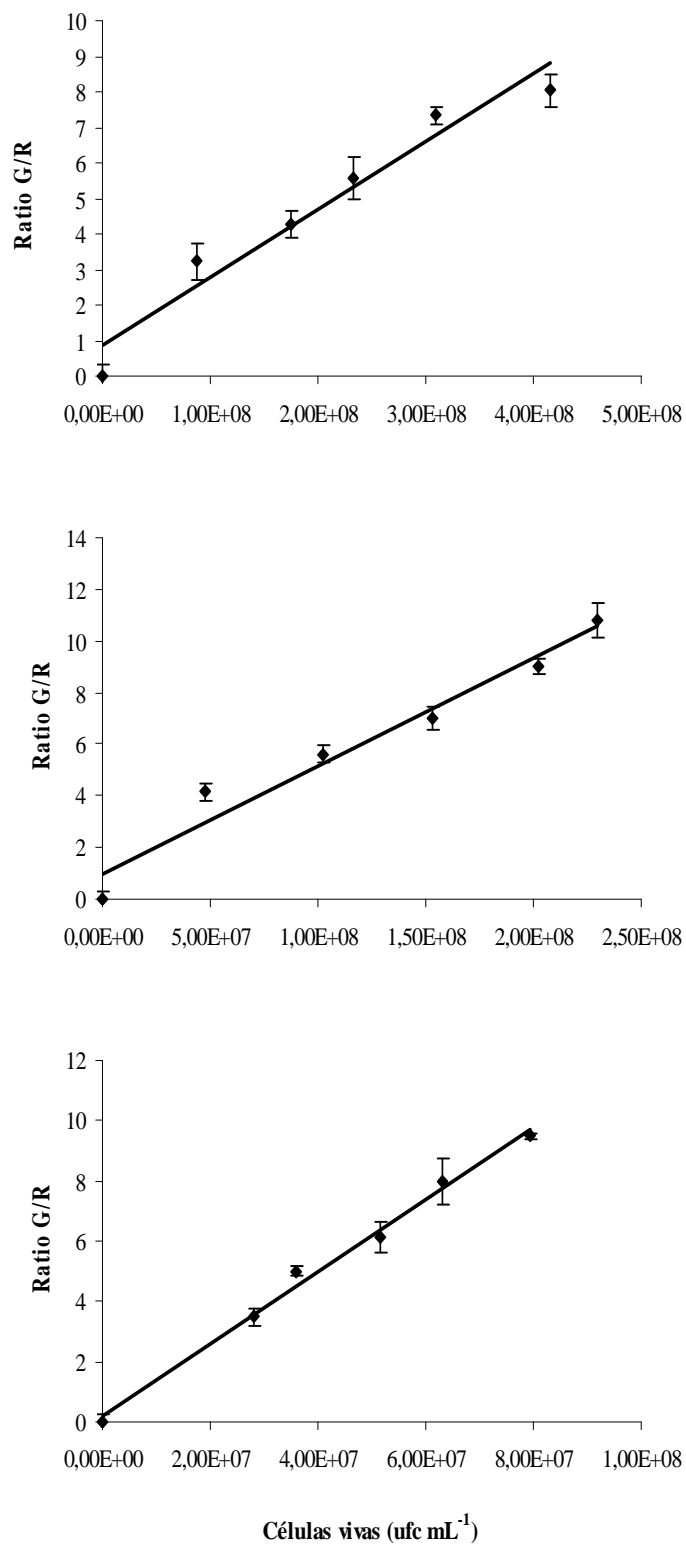
**Figura 4.3** Cepas A) *P. parvulus* CUPV22 y B) *L. suebicus* CUPV221 teñidas mediante tinción LIVE/DEAD después de ser expuestas a estrés gastrointestinal. Verde, células vivas, teñidas con SYTO9 y rojo, células muertas, con membranas dañadas, teñidas con PI. Imágenes obtenidas mediante microscopía confocal.

La solución de tinción se preparó diluyendo 300  $\mu$ L del stock comercial en 5,7 mL de NaCl 0,085% (p/v). A 1 mL de cada muestra en solución tampón PBS a pH 7,5 se añadieron 33  $\mu$ L de la solución de tinción y se incubaron a temperatura ambiente, en oscuridad, durante 15 min. Transcurrido este tiempo, se midió la fluorescencia excitando las muestras a 488 nm y detectando la emisión a 530 nm y 620 nm, para SYTO9 y PI,

respectivamente. Las medidas se realizaron mediante un fluorímetro LS-50B (Perkin-Elmer) con un ancho de rendija de 5,0 nm.

Antes de cuantificar la viabilidad celular se realizó un calibrado entre la relación de fluorescencia verde y roja (G/R) y el número de células viables, determinado mediante recuento en placa (Figura 4.4). Para ello, se prepararon en PBS soluciones estándar de mezclas de células viables e inviables en diferentes proporciones. Las células inviables se obtuvieron mediante incubación a 70 °C durante 30 min. Los ensayos se realizaron por duplicado con cultivos bacterianos independientes y cada medida fluorimétrica representa la media de tres lecturas distintas.





**Figura 4.4.** Correlación entre la fluorescencia verde/roja (G/R) y la supervivencia celular cuantificada mediante recuento en placa de células viables de las cepas: A) *P. parvulus* CUPV1 ( $R^2= 0,970$ ), B) *P. parvulus* CUPV22 ( $R^2= 0,988$ ) y C) *L. suebicus* CUPV221 ( $R^2= 0,992$ ).

#### 4.2.5.3. Cultivo de células Caco-2 y ensayos de adhesión

Con el objeto de evaluar la capacidad de las cepas seleccionadas de adherirse y colonizar el epitelio del colon, se utilizaron células Caco-2 diferenciadas y polarizadas. Estas células fueron obtenidas del banco de células del Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC).

Las células Caco-2 se inocularon en medio Men-Alpha (MAM) (Invitrogen), suplementado con 10% (v/v) de suero fetal bovino inactivado térmicamente e incubaron a 37 °C en atmósfera enriquecida con 5% CO<sub>2</sub>. Posteriormente, las células se sembraron en placas de 96 pocillos (Falcon Microtest, BD) a una concentración de  $1,25 \times 10^4$  células por pocillo. Las placas se incubaron durante 15 días para obtener una monocapa de células Caco-2 diferenciadas y polarizadas y durante este periodo, el medio de cultivo fue reemplazado cada dos días. La concentración de células Caco-2 se determinó antes y después de los ensayos de adhesión mediante una cámara Neubauer (profundidad 0,100 mm, 0,0025 mm<sup>2</sup>) utilizando un microscopio Nikon Eclipse TS 100.

Para realizar los ensayos de adhesión, se recogieron las bacterias de 1 mL del cultivo en fase exponencial tardía mediante centrifugación (12000 rpm, 10 min) y se resuspendieron en medio DMEM (Invitrogen) a una concentración de  $5 \times 10^6$  UFC mL<sup>-1</sup>. Los ensayos de adhesión consistieron en la exposición de las células Caco-2 a las bacterias lácticas (ratio 1:10) durante una hora a 37 °C en un volumen final de 100 L por pocillo. Tras una hora de incubación a 37 °C se eliminaron las bacterias no adheridas, mediante tres lavados sucesivos con 200 L de solución tampón PBS (pH 7,1). A continuación, se despegaron las células Caco-2 incubando cada pocillo con 200 L de 0,05% Tripsina-EDTA (GIBCO) durante 10 min, tras lo cual se detuvo la reacción mediante la adición de 100 L de solución tampón PBS (pH 7,1) a 0 °C. Finalmente, para determinar el número de bacterias adheridas a las células Caco-2, se realizaron diluciones seriadas y se sembraron en placas de MRS. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

Por otro lado, se estudió la influencia del  $\beta$ -glucano sintetizado por *P. parvulus* CUPV22, sobre la capacidad de adhesión de esta cepa a las células Caco-2. Para ello, se determinó la adhesión de dos subpoblaciones de esta cepa: 1) células no lavadas y 2)

células lavadas dos veces con PBS para eliminar el polisacárido unido a la bacteria (CUPV22\*).

La capacidad de adhesión se determinó cuantificando la relación del número de bacterias adheridas a las células Caco-2 con respecto al total de bacterias inoculadas. Para cuantificar el inóculo inicial, los pocillos no fueron lavados con PBS tras el ensayo de adhesión.

#### **4.2.5.4. Detección del exopolisacárido por microscopía electrónica de transmisión**

Se determinó la presencia o ausencia del EPS unido a *P. parvulus* CUPV22 mediante microscopía electrónica de transmisión (JEOL 1230 operado a 100KV). Para la preparación de la muestra, la rejilla recubierta de formvar y carbón sobre la que previamente se había realizado una descarga luminiscente, se colocó hacia abajo durante 1 min sobre una gota del cultivo celular, previamente concentrado cinco veces en  $\text{AcNH}_4$  0,1 M (pH 7). Transcurrido este tiempo, se secó ligeramente con papel de filtro, se tiñó negativamente con un 2% (p/v) de acetato de uranilo durante 40 s y se secó mediante aire caliente.

#### **4.2.5.5. Cultivo, diferenciación de macrófagos y ensayos de inmunoestimulación**

Estos ensayos se realizaron con el objeto de determinar si las cepas de *P. parvulus* CUPV22 y *L. suebicus* CUPV221 presentaban la capacidad de estimular la producción de citoquinas proinflamatorias (IL-6, IL-8 y  $\text{TNF}\alpha$ ) y antiinflamatorias (IL-10) por macrófagos M1 y M2, derivados de monocitos. Los macrófagos se obtuvieron a partir de células sanguíneas mononucleares periféricas humanas (PBMC) aisladas de donantes sanos, mediante el gradiente Lymphoprep (Nycomed Pharma) de acuerdo a protocolos estándar. Los monocitos fueron purificados mediante microesferas magnéticas recubiertas de anticuerpos monoclonales anti-CD14 y se separaron mediante selección positiva utilizando un separador de células (Miltenyi Biotech). Las células CD14+ (>95% monocitos) se cultivaron en RPMI (Invitrogen) suplementado con 10% (p/v) de suero fetal bovino (FCS), que contenía  $1000 \text{ U mL}^{-1}$  de factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) para generar macrófagos M1, o de  $10 \text{ ng mL}^{-1}$  de factor

estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF) (ImmunoTools ) para generar macrófagos M2. La incubación se realizó 37 °C en atmósfera enriquecida con 5% CO<sub>2</sub> durante 7 días, con adición de las citoquinas cada dos días.

Los macrófagos M1 y M2 ( $5 \times 10^5$  células mL<sup>-1</sup>, según recuento en cámara de Neubauer) se estimularon con 10 ng mL<sup>-1</sup> de LPS de *Escherichia coli* 055:B5 (Sigma) o exponiéndolas a  $1,25 \times 10^7$  UFC mL<sup>-1</sup> (relación bacterias: macrófagos 25:1,) de *P. parvulus* CUPV 22 o *L. suebicus* CUPV221 en atmósfera enriquecida con 5 % CO<sub>2</sub> durante 18 h. Posteriormente, los sobrenadantes de los macrófagos M1 y M2 no tratados (basal) y tratados, fueron testados mediante ELISA utilizando kits comerciales (ImmunoTools) para la determinación de las citoquinas IL-6, IL-8, IL-10 y TNFα, según lo descrito por el fabricante. Todos los ensayos y determinaciones se realizaron por triplicado en líneas celulares independientes.

#### **4.2.5.6. Análisis estadístico**

Los análisis estadísticos se realizaron mediante el Software SPSS-PC 17.0 (SPSS Inc.). Para la comparación de las medias se aplicó un análisis ANOVA de un factor, así como el método de la mínima diferencia significativa (LSD).

## 4.3. RESULTADOS

### 4.3.1. Detección e identificación de las cepas de bacterias lácticas productoras de exopolisacáridos

Para la detección de nuevas cepas EPS<sup>+</sup> se analizó la producción de polisacáridos en 147 cepas de bacterias lácticas procedentes tanto de sidras ahiladas como no ahiladas. Tras el crecimiento de estas cepas en el medio MRS-T-F se examinó visualmente el fenotipo rop y este carácter fue encontrado en 32 cepas (Tabla 4.1).

Su identificación se realizó mediante la amplificación y secuenciación de un fragmento del gen ARNr 16S de 530 pb. Tras la secuenciación, todas las cepas fueron identificadas como *P. parvulus*, con una homología en nucleótidos superior al 98%.

Con el fin de conocer la capacidad de las cepas EPS<sup>+</sup> de utilizar diferentes materias primas de uso alimentario se estudió el patrón de fermentación de carbohidratos. Como se observa en la Tabla 4.1, todas las cepas fueron capaces de crecer y fermentar glucosa, fructosa y trehalosa. Sin embargo, ninguna de ellas consumió lactosa, sacarosa, sorbitol, rafinosa, manitol o ramnosa. Por otro lado, se apreció un comportamiento variable en relación a la fermentación de galactosa, maltosa y xilosa. Galactosa y maltosa fueron fermentadas por el 56% y 75% de las cepas, respectivamente; y la xilosa fue utilizada únicamente por el 14% de las cepas

### 4.3.2. Producción de exopolisacáridos

La capacidad de producir EPS se determinó en el medio semidefinido MST para evitar la interferencia asociada a ingredientes tales como extracto de levadura y mananos presentes en los medios complejos. La mayoría de las cepas de *P. parvulus* produjeron EPS con rendimientos entre 18 y 243 mg L<sup>-1</sup> (Tabla 4.1). Entre éstas, 13 cepas sintetizaron cantidades superiores a 100 mg L<sup>-1</sup> (entre 104 y 243 mg L<sup>-1</sup>), 7 entre 50 y 100 mg L<sup>-1</sup> y 8 produjeron cantidades inferiores a 50 mg L<sup>-1</sup>. Las cepas CUPV1, 22 y 23 produjeron las mayores concentraciones de EPS (alrededor de 250 mg L<sup>-1</sup>). Por el contrario, las cepas CUPV14, 19, 20 y 21 no sintetizaron o lo hicieron en cantidades muy pequeñas (< 15 mg L<sup>-1</sup>), por lo que no se caracterizaron sus EPSs

**Tabla 4.1.** Caracterización de cepas BAL productoras de EPS.

CEPAS	DO <sub>600</sub>	pH Final	F-S mg L <sup>-1</sup>	Peso liofilo mg L <sup>-1</sup>	Aglut. PCR	gff	gluc	fruc	gal	lact	Fermentación de azúcares						
											sac	malt	sorb	rafin	manit	ramn	treha
CUPV1	2,04	3,62	233,0	227,7	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-
CUPV2	2,06	3,67	123,6	113,9	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-
CUPV3	1,60	3,64	148,6	155,7	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-
CUPV4	0,87	3,74	44,4	45,7	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+
CUPV5	0,96	3,72	41,8	43,7	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+
CUPV6	1,84	3,56	127,2	133,3	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-
CUPV7	1,61	3,6	106,4	101,3	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-
CUPV8	2,02	3,61	124,6	138,4	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-
CUPV9	1,91	3,61	119,3	120,5	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-
CUPV10	1,81	3,55	121,5	112,6	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+
CUPV11	1,87	3,55	101,5	94,5	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-
CUPV12	1,95	3,65	43,7	43,7	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-
CUPV13	1,07	3,65	49,1	28,7	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-
CUPV14	1,50	3,6	10,7	n.d	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-
CUPV15	1,50	n.d.	21,8	19,1	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+
CUPV16	1,63	3,57	25,2	22,7	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-

*Nota: la tabla continúa en la siguiente página.*

CEPAS	DO <sub>600</sub>	pH Final	F-S mg L <sup>-1</sup>	Peso liofilo mg L <sup>-1</sup>	Aglut.	PCR		gluc	fruc	gal	lact	Fermentación de azúcares										
						gff	+					sac	malt	sorb	rafin	manit	ramn	treha	xil			
CUPV17	1,48	n.d.	18,0	18,2	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	
CUPV18	1,51	n.d.	20,9	30,2	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
CUPV19	1,40	3,56	n.d.	n.d.	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
CUPV20	1,65	n.d.	5,6	n.d.	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
CUPV21	1,47	3,55	1,9	n.d.	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
CUPV22	2,37	3,54	228,4	239,6	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
CUPV23	2,29	3,55	243,4	240,8	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
CUPV24	2,37	3,52	140,2	133,7	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
CUPV25	1,59	3,48	92,9	77,7	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
CUPV26	2,38	3,52	134,7	114,0	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
CUPV27	1,64	3,6	58,0	57,8	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
CUPV28	2,20	3,41	61,6	76,2	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
CUPV29	2,19	3,42	63,0	60,2	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
CUPV30	2,21	3,43	78,9	92,2	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
CUPV31	2,30	3,44	75,3	102,4	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
CUPV32	2,21	3,48	75,3	75,9	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>P. parvulus</i> 2.6	1,92	3,51	193,2	189,7	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-

n.d. No determinado; F-S fenol sulfúrico (expresado como mg glucosa L<sup>-1</sup>); aglut. aglutinación; gluc. glucosa; fruc. fructosa; gal. galactosa; lact. lactosa; sac. sacarosa; malt. maltosa; sorb. sorbitol; rafin. rafinosa; manit. manitol; ramn. ramnosa; treha. trehalosa; xil. xilosa.

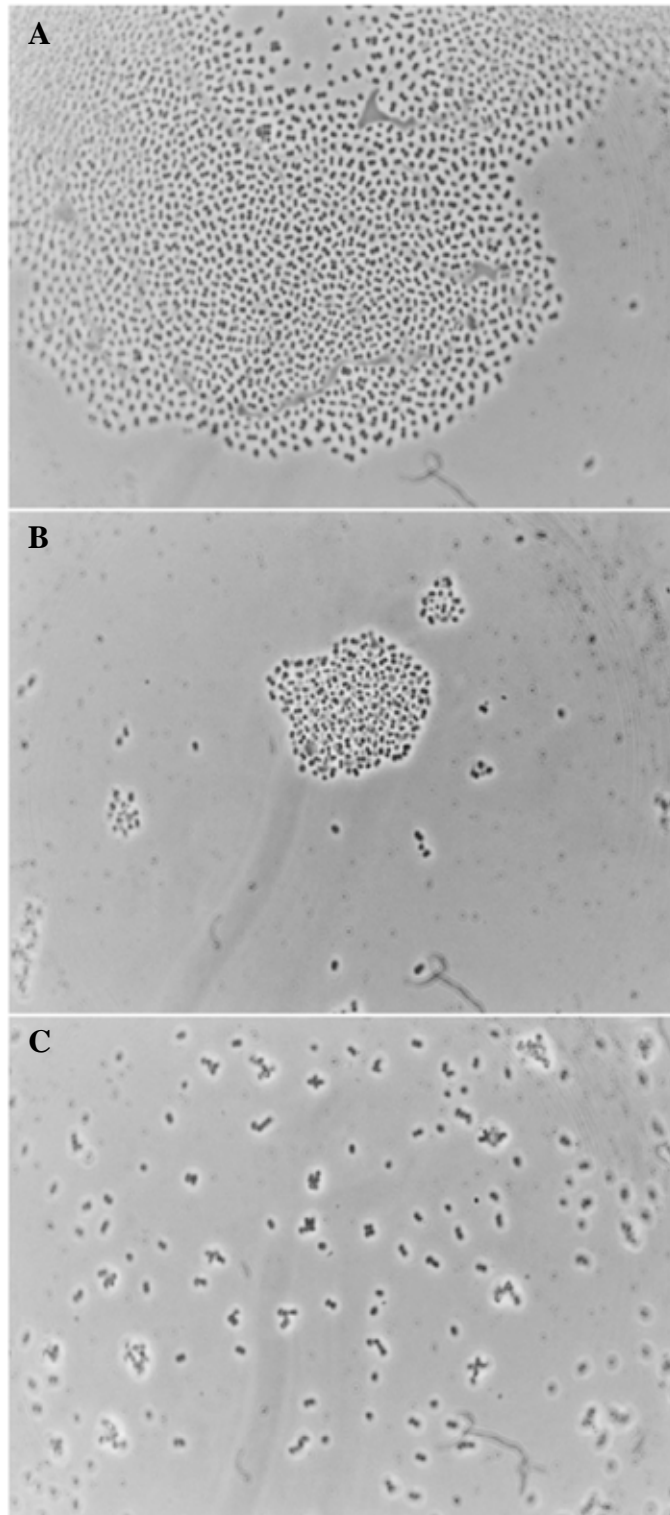
### 4.3.3. Detección por PCR e inmunológica de cepas productoras de (1,3)(1,2)- $\beta$ -D-glucanos

Se utilizó la técnica de PCR para la detección del gen *gtf* en las cepas productoras de EPS. Este gen codifica para la enzima glicosiltransferasa, responsable de la síntesis de (1,3)(1,2)- $\beta$ -D-glucano en *P. parvulus* 2.6. El amplicón de 417 bp se detectó en todas las cepas, sugiriendo que todas ellas eran productoras (1,3)(1,2)- $\beta$ -D-glucano.

Como método complementario para la detección rápida de cepas productoras de (1,3)(1,2)- $\beta$ -D-glucanos, se utilizó la reacción de aglutinación con el antisuero específico frente al polisacárido capsular de *Streptococcus pneumoniae* tipo 37. Éste es un  $\beta$ -glucano ramificado cuya cadena principal está formada por restos de glucosa unidos por enlaces  $\rightarrow 3$ - $\beta$ -D-Glcp-(1 $\rightarrow$  y con uniones  $\beta$ -D-Glcp-(1 $\rightarrow$  en el carbono 2 de cada glucosa (subunidad soforosa). Esta ramificación es el principal determinante inmunológico del polisacárido (Allen et al., 1988) que es, además, la parte que reconoce preferentemente el antisuero (Llull et al., 2001). En estos ensayos se utilizó *P. parvulus* 2.6 como control positivo de aglutinación, mientras que la cepa EPS<sup>-</sup> *L. reuteri* CECT925<sup>T</sup> fue utilizada como control negativo.

La mayoría de las cepas *gtf*-positivas (25 de *P. parvulus*) aglutinaron en presencia del antisuero y se observaron dos patrones de aglutinación (Figura 4.5). En las cepas que produjeron cantidades superiores a 100 mg L<sup>-1</sup> de EPS se detectaron grandes agregados celulares (Figura 4.5 A), mientras que éstos fueron de menor tamaño entre las productoras de entre 30 y 100 mg L<sup>-1</sup> (Figura 4.5 B) Además, se observó que las cepas que no produjeron EPS o que lo hicieron en cantidades muy pequeñas (entre 0 y 30 mg L<sup>-1</sup>), no aglutinaron en presencia del antisuero (Figura 4.5 C)





**Figura 4.5.** Ensayos de inmunoaglutinación con cepas de *P. parvulus* productoras de EPS, con antisuero específico frente al polisacárido capsular de *S. pneumoniae* tipo 37: A) agregados grandes (CUPV22), B) agregados pequeños (CUPV25) y C) no existe aglutinación (CUPV17).

### 4.3.4. Caracterización de los exopolisacáridos

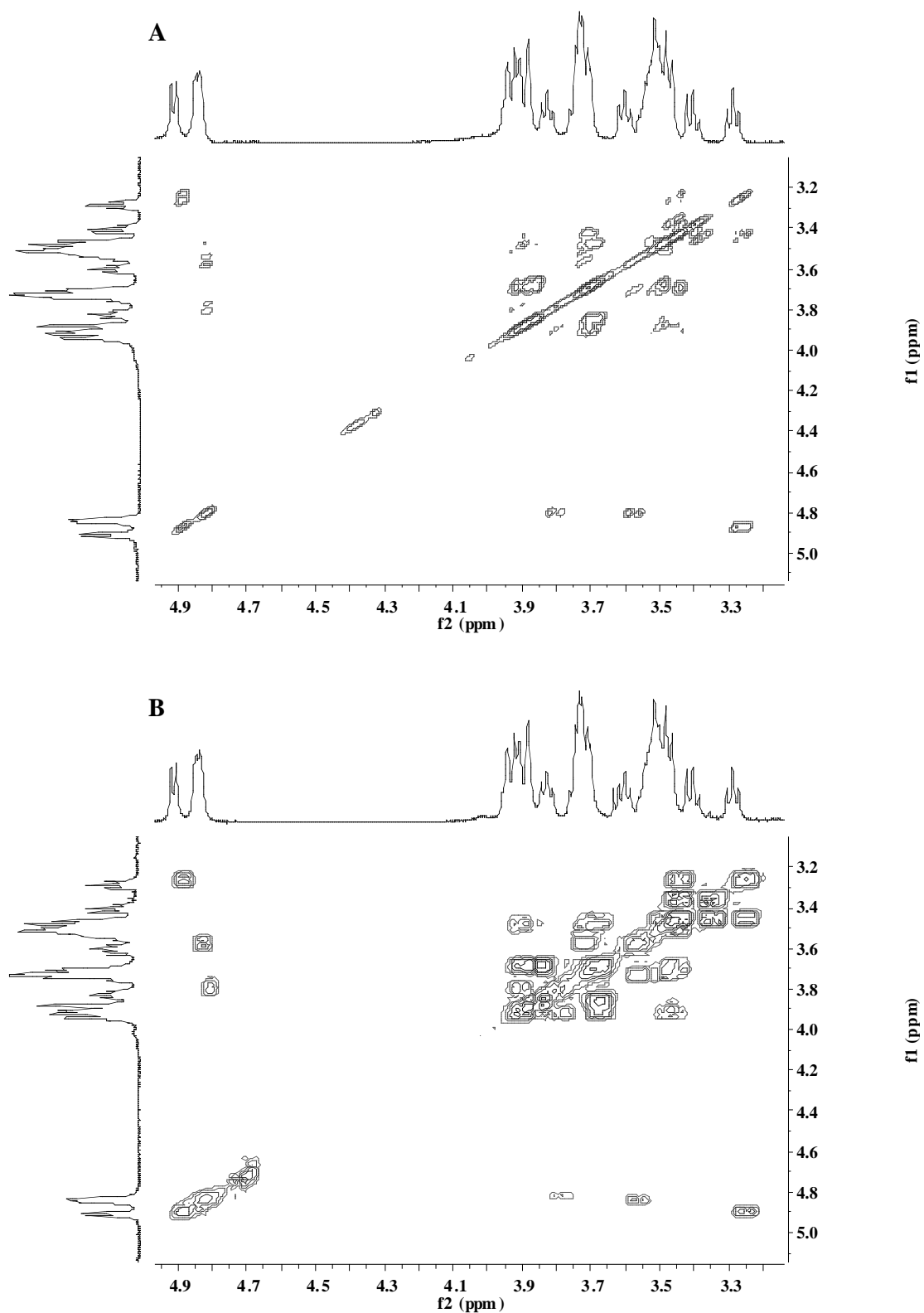
#### 4.3.4.1. Análisis estructural

La caracterización estructural de los 28 EPSs se realizó mediante el análisis de los espectros de  $^1\text{H}$ -RMN. Los EPS producidos por *P. parvulus* presentaron un conjunto de señales en la región entre 3,1 y 4 ppm y dos señales en la región anomérica idénticas a las mostradas en el espectro de  $^1\text{H}$ -RMN del  $\beta$ -glucano producido por *P. parvulus* 2.6 (Dueñas-Chasco et al., 1997). En la Figura 4.6 se muestran los espectro de  $^1\text{H}$  y COSY-RMN de los EPSs producidos por *P. parvulus* 2.6 (Figura 4.6 A), así como por *P. parvulus* CUPV1 (Figura 4.6 B) y 22 (Figura 4.6 C), como representativos de este grupo. Estos resultados indicaron que todas las cepas de *P. parvulus* producían un  $\beta$ -glucano con la misma estructura primaria: una unidad repetitiva formada por un trisacárido, con una cadena principal compuesta por dos glucosas unidas a través de un enlace  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3), una de las cuales está sustituida por una glucosa terminal en posición 2 (Figura 1.6). Además, en los EPSs de *P. parvulus* CUPV1 y CUPV22, se analizó su composición monosacáridica y el tipo de unión entre los monosacáridos para confirmar los resultados de RMN. Tras la hidrólisis ácida de los polisacáridos se obtuvo glucosa como monosacárido único. Por otro lado, en los análisis de metilación se obtuvieron acetatos de alditol parcialmente metilados correspondientes a glucopiranosas terminales, 3-*O*-sustituidas y 2,3-di-*O*-sustituidas en proporciones relativas 1:1:1 (Tabla 4.2). Estos resultados son los esperados para el trisacárido que constituye la estructura repetitiva descrita anteriormente.

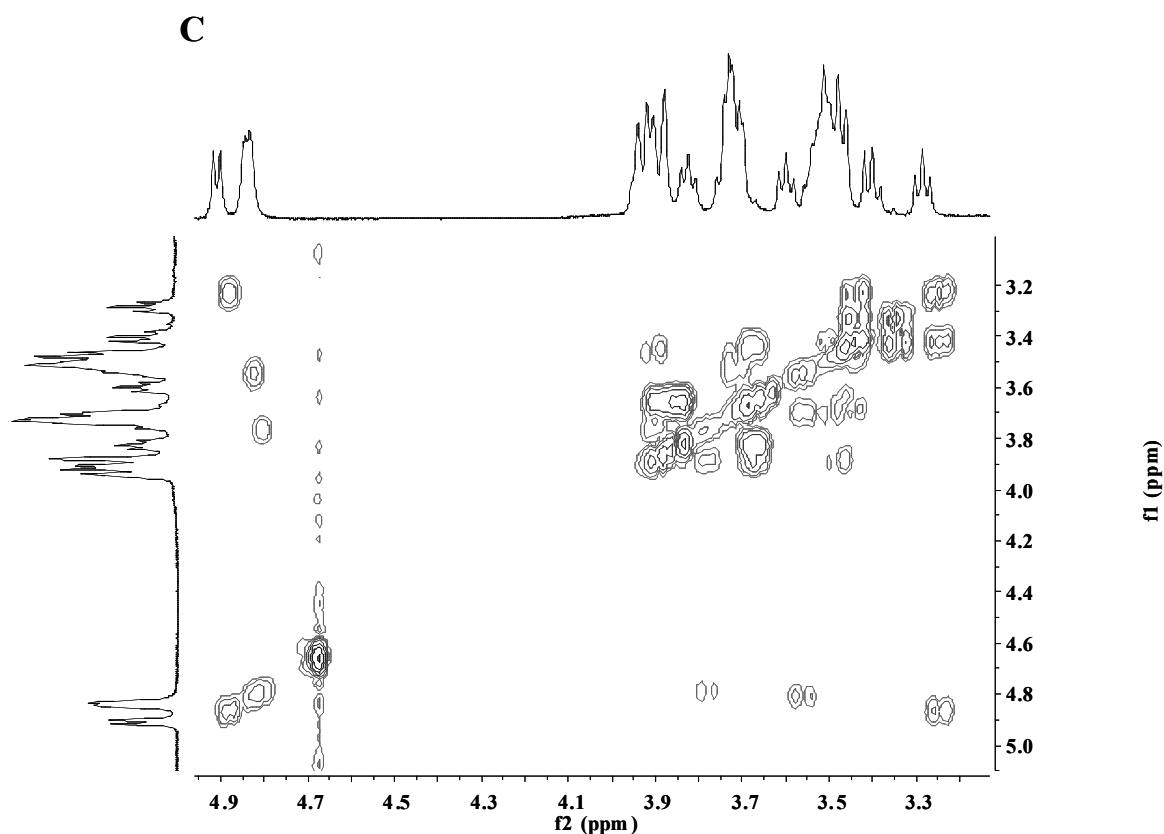
**Tabla 4.2.** Proporción de tipos de enlaces deducidos a partir del análisis de metilación de los  $\beta$ -glucanos producidos por *P. parvulus* CUPV1 y CUPV22

T. R. (min)	Tipo de enlace deducido	Fragmentos característicos (m/z)	Proporción relativa	
			CUPV1	CUPV22
6,701	Glc $p$ -(1 $\rightarrow$	87, 102, 118, 129, 145, 161, 162, 205	1	1
8,716	$\rightarrow$ 3)-Glc $p$ -(1 $\rightarrow$	101, 118, 129, 161, 173, 233	1	1
10,958	$\rightarrow$ 2,3)-Glc $p$ -(1 $\rightarrow$	87, 101, 129, 161, 202, 262	1	1

T. R., tiempo de retención



*Nota: la figura continúa en la siguiente página*



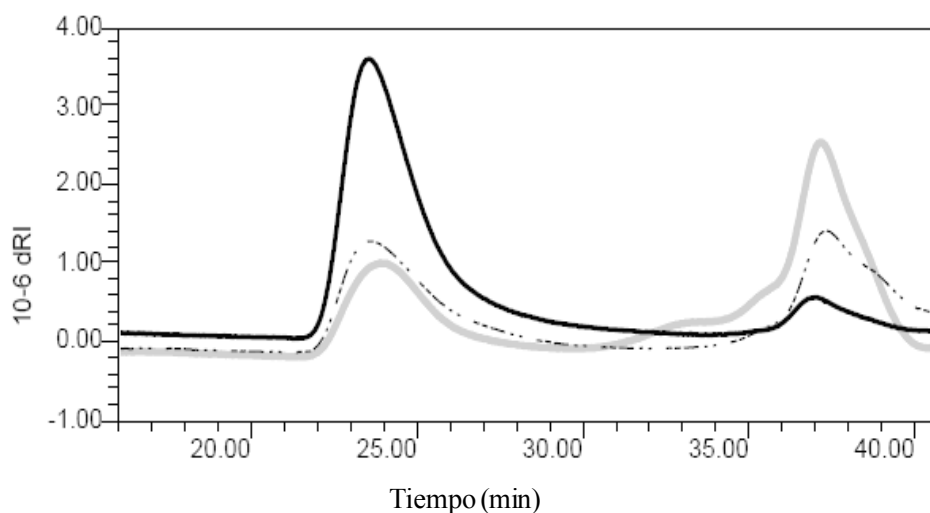
**Figura 4.6.** Espectro de  $^1\text{H}$  y COSY RMN (500 MHz) de los EPS producido por A) *P. parvulus* 2.6, B) *P. parvulus* CUPV1, C) *P. parvulus* CUPV22.

#### 4.3.4.2. Determinación del peso molecular

El peso molecular de los  $\beta$ -glucanos producidos por las cepas de *P. parvulus* se determinó mediante cromatografía de exclusión molecular (SEC). La recta de calibrado se calculó utilizando diferentes dextransos estándar. Este análisis reveló la presencia de dos fracciones de diferente peso molecular en todas las muestras. En *P. parvulus*, los de alto peso molecular presentaban un rango comprendido entre  $11,1$  y  $7,1 \times 10^6$  Da, mientras que los de bajo peso molecular entre  $5,3$  y  $2,7 \times 10^4$  Da.

Como se aprecia en la Tabla 4.3, la mayoría de cepas de *P. parvulus* (22) produjeron principalmente la fracción de mayor peso molecular. Además, es de destacar la correlación entre las cantidades de EPS y las proporciones correspondientes de la fracción de elevado peso molecular ( $R^2 = 0,799$ ,  $P < 0,001$ ). Así, las cepas con un rendimiento en EPS crudo superior a  $100 \text{ mg L}^{-1}$  (13) produjeron casi exclusivamente la fracción de elevado peso

molecular (entre 96% y 82%), mientras que las que produjeron entre 100 mg L<sup>-1</sup> y 40 mg L<sup>-1</sup> mostraron esta misma fracción de forma mayoritaria, pero en menor proporción (entre 79% y 60%). Por el contrario, las cepas con muy bajo rendimiento (<25 mg L<sup>-1</sup>), sintetizaron ambas fracciones en cantidades similares (entre 55% y 42%). En la Figura 4.7 se muestran los cromatogramas característicos para cada grupo mencionado.



**Figura 4.7.** Cromatogramas de exclusión molecular de las diferentes distribuciones de EPS detectados en las muestras de *P. parvulus*. *P. parvulus* CUPV22 (línea continua), *P. parvulus* CUPV15 (línea discontinua) y *P. parvulus* CUPV5 (línea gris)

**Tabla 4.3.** Pesos moleculares (Mw) y proporciones relativas de los diferentes EPS producidos por cepas BAL.

Cepas	EPS (mg L <sup>-1</sup> )	Peso molecular promedio (Mw)			
		Mw F1 (10 <sup>6</sup> Da)	Proporción relativa de F1 (%)	Mw F2 (10 <sup>4</sup> Da)	Proporción relativa de F2 (%)
CUPV1	233	10,2	95,8	3,0	4,2
CUPV2	124	8,2	87,5	3,0	12,5
CUPV3	149	9,3	95,3	2,7	4,7
CUPV4	44	8,6	38,6	4,9	61,4
CUPV5	42	10,3	31,4	5,3	68,6
CUPV6	127	9,4	81,8	3,1	18,2
CUPV7	106	8,8	88,9	3,4	11,1
CUPV8	125	9,7	89,4	3,8	10,6
CUPV9	119	9,4	86,4	3,9	13,9
CUPV10	121	9,3	91,0	3,4	9,0
CUPV11	102	7,4	85,9	3,4	14,1
CUPV12	44	8,6	70,9	3,3	29,1
CUPV13	49	7,1	74,6	3,0	25,4
CUPV14	11	n.d	n.d	n.d	n.d
CUPV15	22	9,5	49,5	2,8	50,5
CUPV16	25	9,1	42,3	2,8	57,7
CUPV17	18	9,6	54,6	2,8	45,4
CUPV18	21	9,3	51,7	3,5	48,3
CUPV19	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
CUPV20	6	n.d	n.d	n.d	n.d
CUPV21	2	n.d	n.d	n.d	n.d
CUPV22	228	10,5	91,2	3,1	8,8
CUPV23	243	9,9	94,2	2,9	5,8
CUPV24	140	10,1	94,9	3,1	5,1
CUPV25	93	8,4	66,4	2,9	33,6
CUPV26	135	10,2	90,5	3,1	9,5
CUPV27	58	11,1	60,1	3,2	39,9
CUPV28	62	10,0	68,3	3,4	31,7
CUPV29	63	9,9	79,0	3,5	21,0
CUPV30	79	8,6	62,7	3,4	37,3
CUPV31	75	10,0	62,6	3,4	37,4
CUPV32	75	10,0	70,1	3,4	29,9
<i>P. parvulus</i> 2.6	193	9,3	90,6	4,1	9,4

F1, Fracción de elevado peso molecular; F2, fracción de reducido peso molecular

### 4.3.5. Tipificación de las cepas de *P. parvulus* productoras de exopolisacáridos

#### 4.3.5.1. Análisis de los perfiles RAPD

Se generaron perfiles RAPD mediante los cebadores M13, P1 y P2, de las 32 cepas de *P. parvulus* productoras de EPS, así como de las cepas de referencia, *P. parvulus* 2.6, *P. parvulus* CECT7350<sup>T</sup>, *P. damnosus* CECT4694 y *P. damnosus* CECT793<sup>T</sup>. Con los perfiles RAPD obtenidos, se realizó un análisis de agrupamientos tanto para cada cebador, como de los tres cebadores de forma combinada. En todos los casos se observó que las cepas de *P. damnosus* se separaban claramente de las de *P. parvulus*. Se detectaron al menos cuatro grupos con un único cebador y de ellos, el cebador P1 fue el que mostró una menor capacidad de discriminación intraespecífica, ya que de las 34 cepas de *P. parvulus* analizadas, 21 se agrupaban juntas. Los valores de correlación cofenética para los agrupamientos con los perfiles generados por los cebadores M13, P1 y P2 fueron de 90%, 96% y 77%, respectivamente y del 90% para el análisis global, combinando los tres perfiles RAPD. La capacidad de discriminación intraespecífica más elevada se consiguió mediante la combinación de los perfiles RAPD obtenidos con los tres cebadores, mostrando 17 patrones diferentes, entre las cepas.

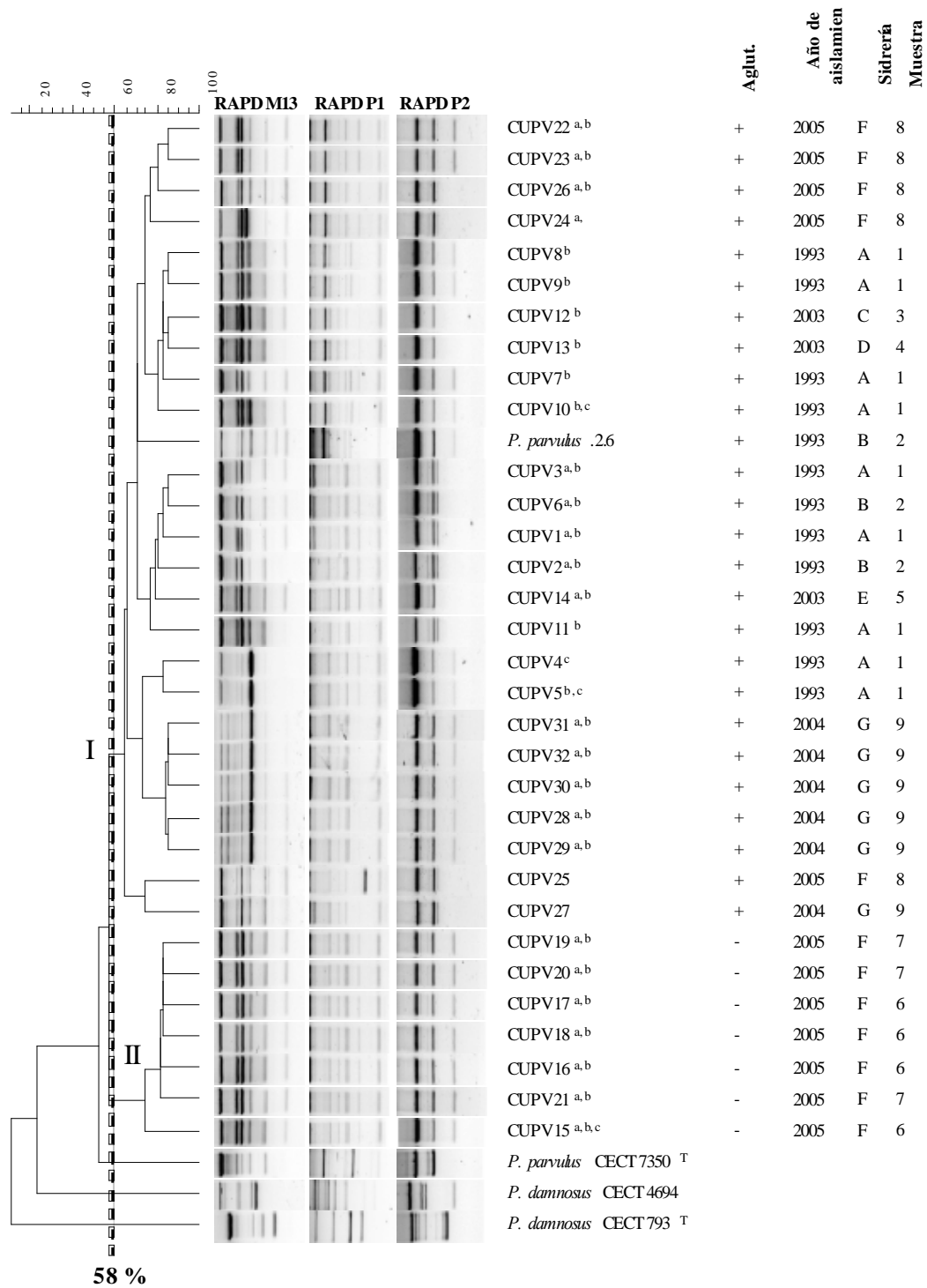
#### 4.3.5.2. Análisis combinado de datos genotípicos y fenotípicos

Como se observa en la Figura 4.8, todas las cepas analizadas (34 *P. parvulus* y 2 *P. damnosus*) se agruparon a un 10,5% de similaridad, con un valor de correlación cofenética del 97%. A un nivel de similaridad del 58%, se forman dos grupos que engloban todos los *P. parvulus*, excepto *P. parvulus* CECT7350<sup>T</sup>. El grupo I agrupa a *P. parvulus* 2.6 junto a 25 cepas aisladas de sidra y presenta características en común como aglutinación positiva, amplificación del fragmento de 417 pb del gen *gff* y la producción de las cantidades más elevadas de EPS. Dentro de este grupo, a un nivel de similaridad del 85%, se unen desde la cepa 28 a la 32, las cuales provenían de la misma muestra, lo que sugiere su clonalidad. Por otro lado, al mismo nivel de similaridad, se agrupan desde la cepa 7 a la 10, obtenidas de la misma sidrería (1993), con las cepas 12 y 13, aisladas 10 años más tarde en sidrerías

diferentes. Este hecho indicaría la clonalidad de las cepas productoras de EPS implicadas en la producción de sidra. Además, es de señalar que dentro de este grupo, la cepa *P. parvulus* 2.6 está claramente separada de las demás.

Por otra parte, el cluster II agrupa siete aislados que amplifican el gen *gtf*, pero que son negativos respecto al test de aglutinación y no producen EPS o lo hacen en cantidades muy reducidas. Todos los aislados de este grupo fueron obtenidos de la misma sidrería en la cosecha del 2005, seis de ellos se unen con un 85% de similaridad, pero la cepa 15 es claramente diferente.

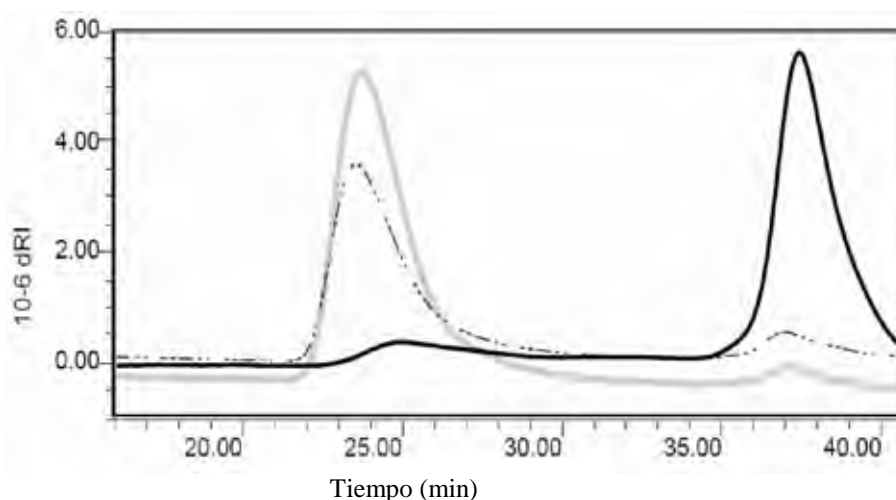




**Figura 4.8.** Dendrograma derivado del agrupamiento UPGMA basado en la matriz de similitud obtenida con 34 *P. parvulus* (1 cepa de referencia y 33 aislados de sidra) y 2 cepas de referencia *P. damnosus*: los perfiles RADP M13, P1 y P2, la amplificación del gen *gtf*, el patrón de fermentación de azúcares, el test de aglutinación y la producción de EPS. La escala indica el porcentaje de similitud. Los patrones de fermentación de azúcares se indican como <sup>a</sup>galactosa, <sup>b</sup>maltosa, <sup>c</sup>xilosa.

### 4.3.6. Caracterización del potencial probiótico de cepas de bacterias lácticas productoras de (1,3)(1,2)- $\beta$ -D-glucanos

El potencial probiótico se examinó en las cepas *P. parvulus* CUPV1, CUPV22, que se seleccionaron en base a su alto rendimiento de EPS (alrededor de 250 mg L<sup>-1</sup>), masas moleculares y una proporción elevada de la fracción de 10<sup>7</sup> Da (alrededor del 94%) (Figura 4.9). Además, estas dos cepas no son de origen clonal, lo que facilita su diferenciación rápida mediante RAPD-PCR con los cebadores P1 o P2. Además se incluyó la cepa *L. suebicus* CUPV221 productora del mismo tipo de  $\beta$ -glucano, pero que presenta la particularidad de que el EPS crudo presenta como mayoritaria (88%) la fracción de bajo peso molecular (Figura 4.9).



**Figura 4.9.** Cromatogramas de exclusión molecular de los  $\beta$ -glucanos sintetizados por *P. parvulus* CUPV1 (línea continua gris), *P. parvulus* CUPV22 (línea discontinua) y *L. suebicus* CUPV221 (línea continua negra).

#### 4.3.6.1. Caracterización de bacterias lácticas y producción de exopolisacáridos

Como se ha mencionado anteriormente, la presencia del gen *gtf* se detectó en el genoma de las tres cepas seleccionadas mediante la amplificación de un fragmento del gen. Posteriormente, éste fue secuenciado en su totalidad (1704 nt) en las tres cepas, observándose que los genes de *P. parvulus* CUPV1 y CUPV22 son idénticos entre si y diferían únicamente en 3 nucleótidos del gen de *L. suebicus* CUPV221 (Anexo II). La comparación de las secuencias aminoacídicas deducidas mediante el programa BLAST

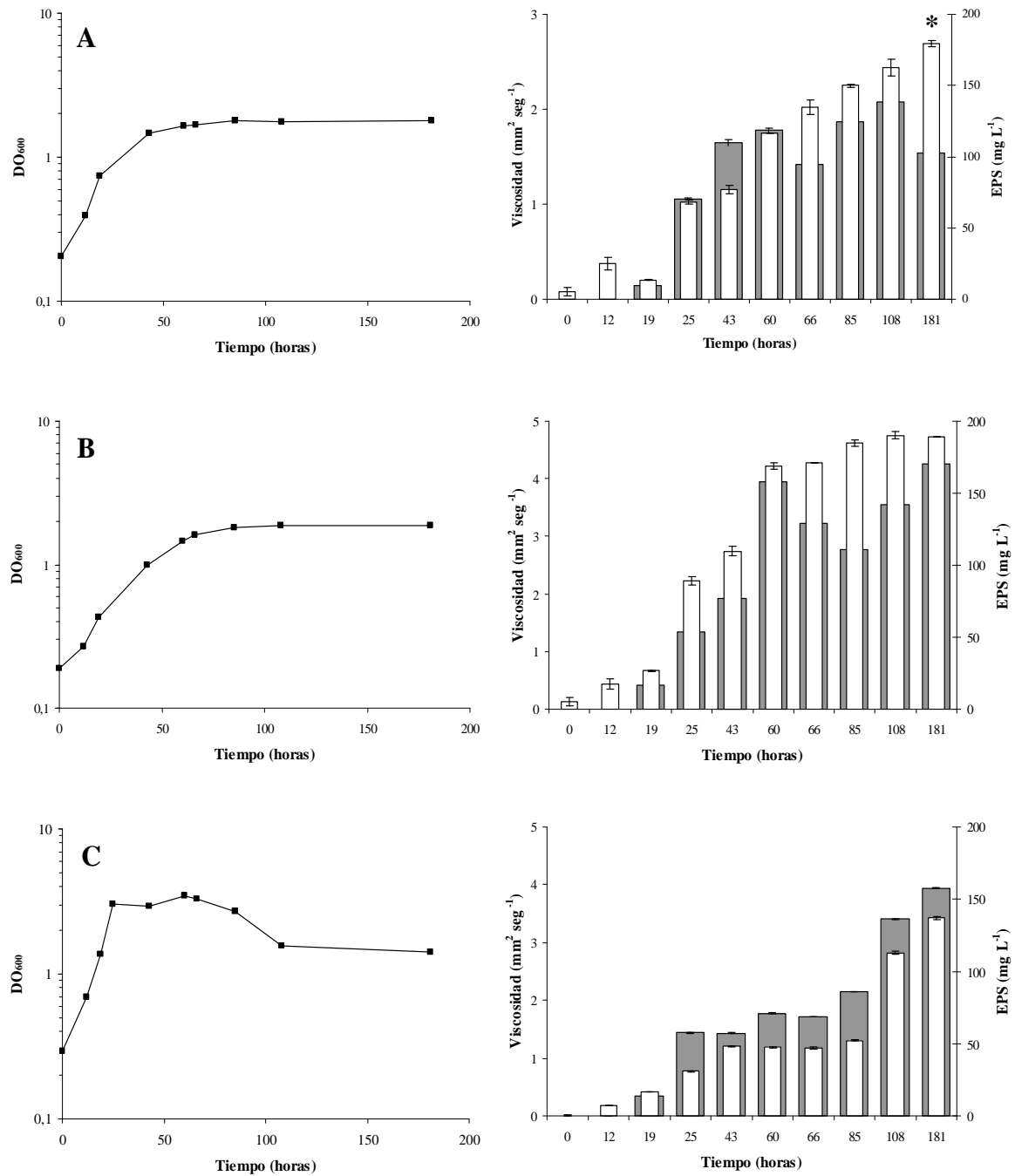
(NCBI) mostró que la enzima GTF de *L. suebicus* CUPV221 difería únicamente en 2 aminoácidos (A91V y L126I) de la de *P. parvulus* 2.6 (Werning et al., 2006), mientras que las GTFs de *P. parvulus* CUPV1 y CUPV22 diferían en un solo aminoácido (A489T).

Estas enzimas ligadas a membrana pertenecen a la superfamilia de glicosiltransferasas de clase A (c111394, base de datos CDD, NCBI). Esta superfamilia incluye familias diversas de glicosiltransferasas, con un plegamiento estructural común de tipo GT-A. Las secuencias aminoacídicas deducidas de las glicosiltransferasas de las tres cepas seleccionadas se alinearon con otras secuencias de glicosiltransferasas de la misma superfamilia. Su comparación mostró que la región de homología se expandía desde los aminoácidos 109 al 354, por lo que la mutación L126I de *L. suebicus* CUPV221 en la región homóloga se encontraba localizada en el centro activo de la enzima, próxima al motivo DXD (aminoácidos 198-200 en GTF). Este motivo es el sitio putativo de unión del ion metálico, que se utiliza para coordinar los fosfatos del NDP-azúcar en el centro activo de la enzima (Unligil y Rini, 2000). Además, el análisis de las GTFs con el programa TMpred ([http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED\\_form.html](http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html)) reveló que la mutación A489T está posicionada en el bucle entre las hélices transmembrana quinta y sexta de la GTF y que ninguna de las otras dos mutaciones está incluida en regiones transmembrana. Estos resultados nos indican que A91V y A489T podrían ser mutaciones neutras para la actividad de la enzima, mientras que la mutación L126I podría alterar su actividad, razón por la cual *L. suebicus* CUPV221 sintetizaría un  $\beta$ -glucano de peso molecular inferior al producido por las cepas CUPV1 y CUPV22.

Con respecto a la producción de polisacárido, ésta se examinó en medios semidefinidos suplementados con glucosa, ya que se conocía previamente que este azúcar constituye la mejor fuente carbonada para la producción de EPS en *P. parvulus* 2.6 (Velasco et al., 2007). Las tres cepas seleccionadas sintetizaron entre 137 y 180 mg L<sup>-1</sup> tras 181 h de incubación. Las tres produjeron polisacárido durante la fase exponencial del crecimiento, aunque en la fase estacionaria el patrón de producción y secreción de EPS varió en función de la especie. Como se observa en la Figura 4.10 A y B, las cepas de *P. parvulus* CUPV1 y CUPV22 sintetizaron EPS casi exclusivamente durante la fase exponencial, alcanzando niveles de 123 y 159 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente, al inicio de la fase estacionaria (a las 60 h). Posteriormente, a lo largo de esta fase ambas cepas sintetizaron

pequeñas cantidades de EPS, llegando a valores de 167 y 179 mg L<sup>-1</sup>. Por el contrario, *L. suebicus* CUPV221 mostró una producción inferior de EPS durante la fase exponencial, alcanzando una concentración de 48 mg L<sup>-1</sup> al inicio de la fase estacionaria. Estas cantidades se mantuvieron constantes hasta la fase estacionaria tardía, en la que se detectó un aumento pronunciado de la concentración de EPS, llegándose a acumular 137 mg L<sup>-1</sup> a las 181 h (Figura 4.10 C). Para las tres cepas, la producción de EPS y el incremento de la viscosidad del medio de cultivo (Figura 4.10) estuvieron estadísticamente correlacionados ( $P < 0,001$ ), con un R<sup>2</sup> de 0,792, 0,933 y 0,952 para CUPV1, CUPV22 y CUPV221, respectivamente.

Tras 181 h de cultivo, las cepas *P. parvulus* CUPV22 y *L. suebicus* CUPV221 sintetizaron cantidades similares de EPS (alrededor de 150 mg L<sup>-1</sup>), que provocaron un incremento en la viscosidad del medio de cultivo de aproximadamente 4 mm<sup>2</sup> seg<sup>-1</sup>. Sin embargo, aún siendo producido en condiciones y cantidades similares a las de *P. parvulus* CUPV22, el EPS sintetizado por *P. parvulus* CUPV1 (167 mg L<sup>-1</sup>) determinó un aumento de la viscosidad del medio de únicamente 1,5 mm<sup>2</sup> seg<sup>-1</sup>, el cual fue significativamente inferior ( $P < 0,001$ ) al producido por los  $\beta$ -glucanos de las otras dos cepas.



**Figura 4.10.** Análisis del crecimiento ( $DO_{600}$ ), producción de  $\beta$ -glucanos (barras blancas) e incremento de la viscosidad del medio de cultivo (barras grises) de: A) *P. parvulus* CUPV1, B) *P. parvulus* CUPV22, y C) *L. suebicus* CUPV221. \* La relación viscosidad/EPS a las 181h para la cepa CUPV21 muestra una diferencia significativa ( $P < 0,001$ ) con las obtenidas para las cepas CUPV22 y CUPV221.

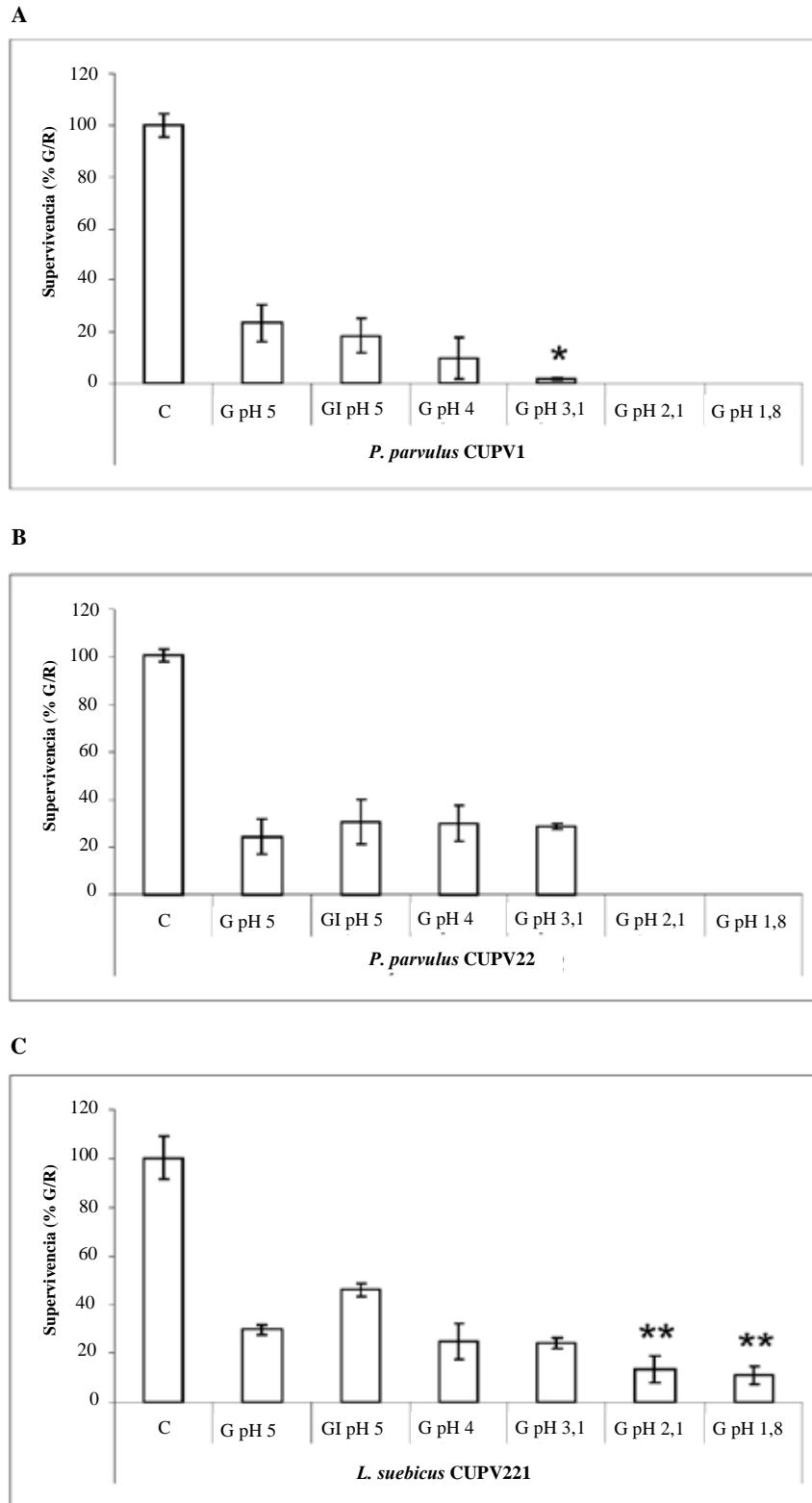
#### 4.3.6.2. Tolerancia al estrés gastrointestinal

La tolerancia al estrés gastrointestinal de las tres cepas seleccionadas se investigó en un sistema modelo que simulaba las condiciones propias del tracto gastrointestinal humano. Se consideraron los siguientes factores: efecto de la lisozima y pepsina a los diferentes valores de pH (5, 4, 3,1, 2,1 y 1,8) del estómago en digestión (estrés gástrico) y la acción posterior de sales biliares y pancreatina (estrés gastrointestinal). Los ensayos se realizaron con las bacterias resuspendidas en dos medios diferentes: i) MRS, por ser el medio óptimo de crecimiento de estos microorganismos, y ii) en leche descremada acidificada (pH 4,6), por ser leches fermentadas y yogures los vehículos habituales para la ingesta de probióticos, así como por haber sido descrito que la leche descremada aumenta la tolerancia de las BAL ante el estrés gástrico (Charteris et al., 1998).

La respuesta ante el estrés gástrico varió en función del medio de ensayo. En los realizados en MRS fresco, la primera etapa del estrés gástrico (G pH 5) redujo la viabilidad celular de las tres cepas a niveles inferiores al límite de detección del ensayo LIVE/DEAD ( $1 \times 10^5$  UFC mL<sup>-1</sup>). Por el contrario, al realizar los ensayos de tolerancia con las cepas resuspendidas en leche acidificada (pH 4,6) se observaron diferencias de comportamiento entre las tres cepas. La supervivencia de las tres cepas se vio afectada principalmente durante la exposición a las condiciones de saliva y estrés gástrico. Tras la exposición a pH 5 (G pH 5), las tres cepas exhibieron una importante reducción de la viabilidad celular, pero con niveles de supervivencia entre 23% y 30% (Figura 4.11). Los tratamientos a pHs más bajos, hicieron disminuir progresivamente la viabilidad celular de *P. parvulus* CUPV1, hasta quedar por debajo del límite de detección, tras su incubación a pH 2,1 (G pH 2,1), aunque esta cepa todavía exhibía una supervivencia celular del 1,6 % a pH 3,1 (Figura 4.11 A).

La tolerancia al estrés ácido fue más pronunciada en *P. parvulus* CUPV22 y *L. suebicus* CUPV221. La primera cepa mantuvo un nivel de supervivencia cercano al 30% tras exposición a pHs entre 5 y 3,1 (Figura 4.11 B). Sin embargo, la supervivencia de estas cepas se situó por debajo del límite de detección al ser expuestas a pHs más ácidos. *L. suebicus* CUPV221 resultó ser significativamente más resistente ante el estrés ácido ( $P < 0,05$ ), ya que mostró un nivel de supervivencia del 11% a pH 1,8 (Figura 4.11 C). Este

nivel resultó ser similar al detectado para la cepa probiótica *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 (Fernández de Palencia et al., 2008). Para determinar la tolerancia de las cepas ante el estrés intestinal, las muestras G pH 5 fueron incubadas en presencia de sales biliares y pancreatina a pH 6,5 (GI). Estas condiciones no produjeron alteración alguna en su viabilidad celular.



**Figura 4.11.** Análisis de la supervivencia celular (%) de las cepas A) *P. parvulus* CUPV1, B) *P. parvulus* CUPV22 y C) *L. suebicus* CUPV221 resuspendidas en leche descremada (pH 4,6), frente a condiciones simuladas de estrés gastrointestinal \*  $P < 0,01$  en comparación con *P. parvulus* CUPV22 y *L. suebicus* CUPV221, \*\*  $P < 0,05$  en comparación con *P. parvulus* CUPV1 y *P. parvulus* CUPV22.

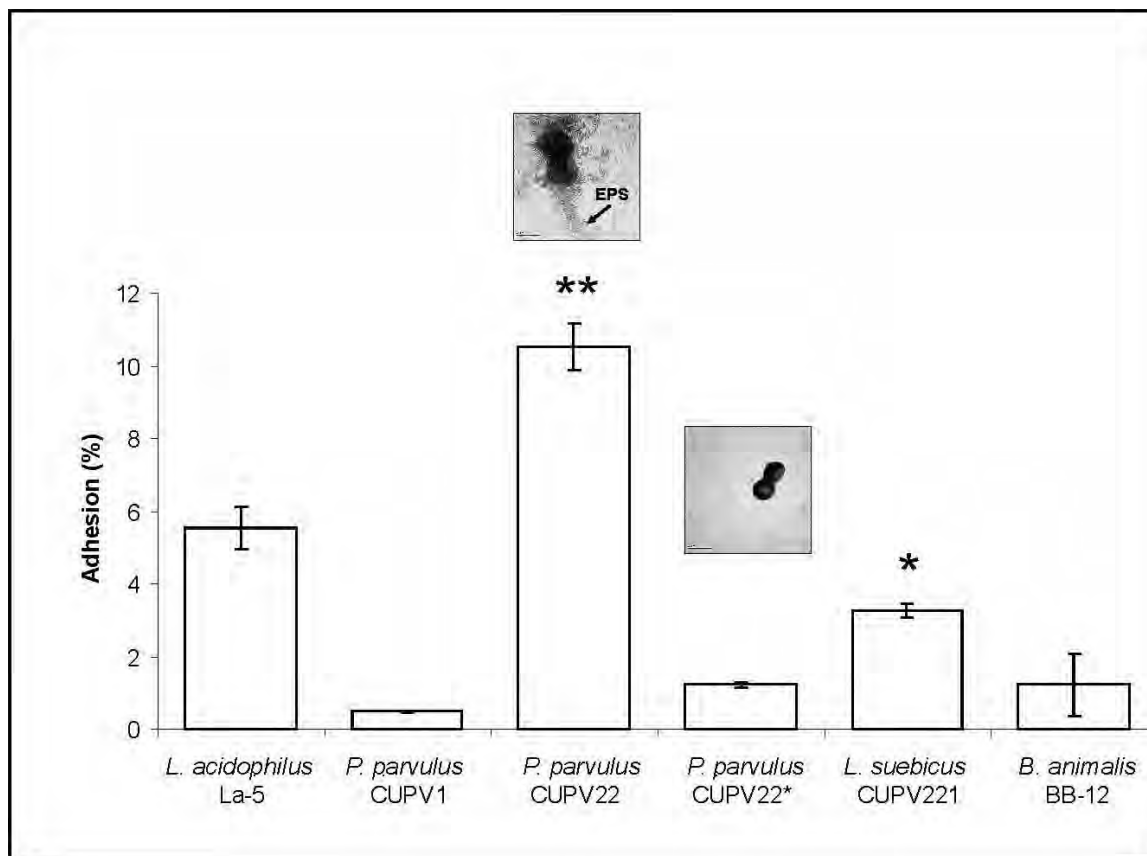


#### 4.3.6.3. Adhesión de las cepas seleccionadas a células Caco-2

Se investigó asimismo la capacidad de las tres cepas seleccionadas para adherirse a las células epiteliales del intestino humano, usando la línea celular Caco-2 como modelo *in vitro* del epitelio del colon. Mediante cuantificación con cámara Neubauer, se comprobó en primer lugar que las tres bacterias no exhibían efecto perjudicial alguno sobre las células Caco 2, ya que el número de éstas en la muestra control ( $1,72 \times 10^5 \pm 2,14 \times 10^4$  células  $\text{mL}^{-1}$ ) era muy similar al de las muestras tratadas con *P. parvulus* CUPV1 ( $1,76 \times 10^5 \pm 1,59 \times 10^4$  células  $\text{mL}^{-1}$ ), *P. parvulus* CUPV22 ( $1,99 \times 10^5 \pm 4,7 \times 10^4$  células  $\text{mL}^{-1}$ ) y *L. suebicus* CUPV221 ( $1,43 \times 10^5 \pm 1,06 \times 10^4$  células  $\text{mL}^{-1}$ ).

Como se muestra en la Figura 4.12, las cepas examinadas presentaron grandes diferencias en relación a su capacidad de adhesión a las células Caco-2. Así, *P. parvulus* CUPV22 exhibió el nivel de adhesión más elevado (10,5%). Con el objeto de examinar la contribución de su β-glucano a la capacidad de adhesión, se realizó un ensayo adicional con esta cepa consistente en el lavado de las células con PBS (para eliminar el EPS adherido a la superficie celular y obtener la subpoblación CUPV22\*) y ensayo suplementario de adhesión. El análisis por microscopía electrónica de las células lavadas reveló la eficacia de este tratamiento para eliminar el EPS adherido, como se observa en las imágenes incluidas en la Figura 4.12. En estas condiciones, la adhesión a células Caco-2 se redujo drásticamente, pasando de un 10,5% a tan solo un 1,2% en la subpoblación CUPV22\*, lo que puso de manifiesto la contribución del β-glucano en la adhesión bacteriana a las células epiteliales.

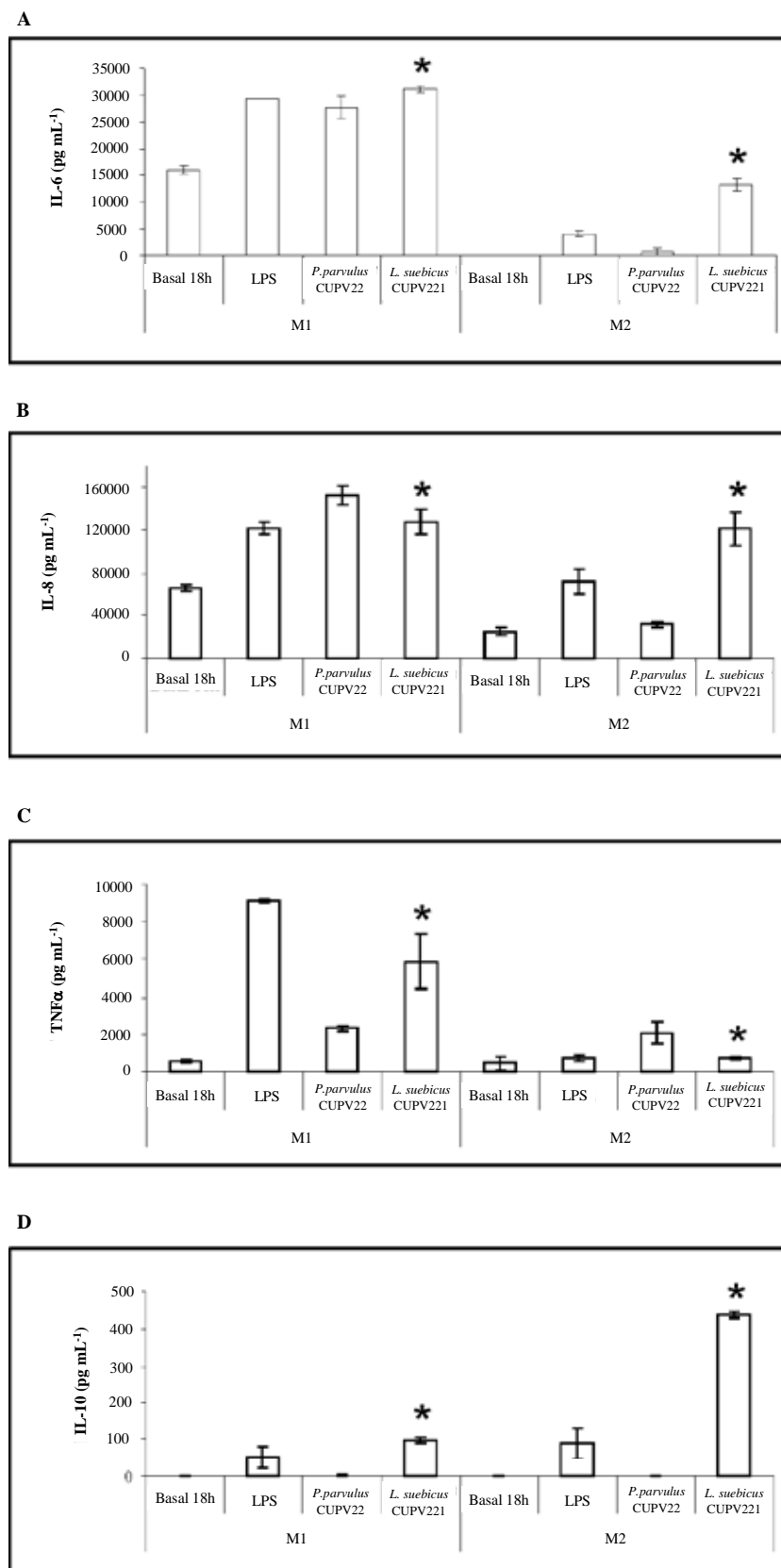
En comparación con la capacidad de adhesión de cepas probióticas comerciales, *P. parvulus* CUPV22 presentó un nivel de adhesión significativamente superior ( $P < 0,05$ ) que el de las cepas probióticas *Lactobacillus acidophilus* LA-5 (5,5%) y *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 (1,2%). Con respecto a *L. suebicus* CUPV221, mostró una capacidad de adhesión superior a la de *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 ( $P < 0,05$ ) y similar a *L. acidophilus* LA-5 (Figura 4.12).



**Figura 4.12.** Adhesión de las cepas bacterianas a las células Caco-2 tras la infección con 10 bacterias por célula epitelial. Se incluyen fotos de microscopía electrónica de transmisión de la cepa *P. parvulus* CUPV22 lavada (*P. parvulus* CUPV22\*) y sin lavar (*P. parvulus* CUPV22). \*  $P < 0,05$  comparado con *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12; \*\*  $P < 0,05$  comparado con *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 y *Lactobacillus acidophilus* LA-5.

#### 4.3.6.4. Capacidad inmunoestimuladora de las cepas *P. parvulus* CUPV22 y *L. suebicus* CUPV221

Se evaluó también la capacidad inmunomoduladora de estas dos cepas mediante la determinación de su habilidad para modular la producción de citoquinas en macrófagos proinflamatorios M1, estimulados por el factor M-CSF y macrófagos antiinflamatorios M2, estimulados por el factor GM-CSF. Como se observa en la Figura 4.13, ambas cepas indujeron la producción de citoquinas proinflamatorias IL-6, IL-8 y TNF- $\alpha$  en macrófagos M1. Por el contrario, la producción de IL-10 por ambos tipos de macrófagos resultó significativamente inducida sólo por la cepa *L. suebicus* CUPV221 ( $P < 0,05$ ). Por lo tanto, *P. parvulus* CUPV22 y *L. suebicus* CUPV221 inducen la producción de un perfil distinto de citoquinas tras el contacto con los macrófagos, y en consecuencia promueven de forma diferente la activación de macrófagos humanos.



**Figura 4.13.** Producción de citoquinas: A) IL-6, B) IL-8, C) TNF- $\alpha$  y D) IL-10 por macrófagos M1 y M2 en respuesta a la presencia de *P. parvulus* CUPV22 y *L. suebicus* CUPV221. \* $P < 0,05$  en comparación a *P. parvulus* CUPV22.

## 4.4. DISCUSIÓN

En este trabajo se ha abordado la detección y caracterización de nuevas cepas productoras de (1,3)(1,2)- $\beta$ -D-glucanos entre 147 bacterias lácticas aisladas de sidra natural. Posteriormente, las cepas *P. parvulus* CUPV1, *P. parvulus* CUPV22 y *L. suebicus* CUPV221 fueron seleccionadas para el estudio de su potencial probiótico en vistas a su posible utilización en la elaboración de alimentos funcionales.

Entre las cepas analizadas, 32 mostraron fenotipo ropy en medio MRS y todas fueron identificadas como *P. parvulus*. La capacidad de producción de EPS varió mucho entre los diferentes aislados, aunque casi la mitad de las cepas (13) sintetizó cantidades superiores a 100 mg L<sup>-1</sup> (entre 100 y 250 mg L<sup>-1</sup>). Estos niveles eran relativamente superiores a los reportados para otras cepas BAL EPS<sup>+</sup> aisladas de otros alimentos (Vanigelgem et al., 2004; Mozzi et al., 2006), con excepción de las elevadas cantidades que se obtienen en la producción de dextranos o fructanos por ciertas cepas de *Leuconostoc* (Van der Meulen et al., 2007).

En relación a la naturaleza del polisacárido producido por las 32 cepas, es de destacar que la reacción de PCR con los cebadores específicos para la detección del gen *gtf* (Werning et al., 2006) fue positiva para todas las cepas, sugiriendo que todas ellas eran productoras de  $\beta$ -glucanos. Como método suplementario de detección de cepas productoras de (1,3)(1,2)- $\beta$ -D-glucanos se utilizó el test de aglutinación con el antisuero específico frente al polisacárido capsular de *Streptococcus pneumoniae* tipo 37. Este anticuerpo reconoce específicamente las ramificaciones glucosa  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 2) (LLul et al., 2001), lo que hace que reaccione con *P. parvulus* 2.6 (Fernández de Palencia et al., 2009) y otros productores de (1,3)- $\beta$ -glucanos sustituidos en posición 2 (Walling et al., 2005; Dols-Lafargue et al., 2008). Los resultados obtenidos confirmaron que este ensayo de aglutinación puede ser usado como un método rápido de detección de cepas productoras de (1,3)(1,2)- $\beta$ -D-glucanos, siempre y cuando éstas produzcan cantidades superiores a 20-30 mg L<sup>-1</sup>, de acuerdo a lo reportado por Dols-Lafargue et al. (2008).

La síntesis de este tipo particular de (1,3)- $\beta$ -D-glucanos sustituidos en posición 2 fue confirmada mediante <sup>1</sup>H RMN, tras el aislamiento y la purificación de los polisacáridos

producidos por las 28 cepas que sintetizaron cantidades superiores a 15 mg L<sup>-1</sup>. Además, los resultados del análisis de metilación de los EPSs producidos por las cepas 1 y 22 mostraron claramente que sus EPS crudos estaban constituidos únicamente por este tipo de polisacárido, en contraposición a lo descrito para *Lactobacillus* G-77 (Dueñas-Chasco et al., 1998) y *O. oeni* (Ibarburu et al., 2007; Dols-Lafargue et al., 2008), las cuales sintetizan, además del  $\beta$ -glucano, un  $\alpha$ -glucano y heteropolisacáridos, respectivamente. La producción de un único exopolisacárido, representa una interesante característica cuando se pretenden determinar las actividades biológicas o el potencial probiótico de estos  $\beta$ -glucanos.

La actividad biológica de los (1,3)- $\beta$ -glucanos depende de su peso molecular, así como de su estructura primaria y conformación. Estas características determinan su grado de afinidad a receptores y su capacidad para modular la respuesta inmune (Sletmoen y Stokke, 2008). En relación al peso molecular, se demostró previamente que la composición del medio de cultivo influye decisivamente sobre el tamaño del (1,3)(1,2)- $\beta$ -D-glucano sintetizado por *P. parvulus* 2.6, siendo la glucosa la fuente carbonada en la que el peso molecular y el rendimiento en EPS son más elevados (Velasco et al., 2009).

Teniendo en cuenta esta influencia, se utilizó glucosa como fuente energética para crecer los nuevos aislados de *P. parvulus* y obtener sus EPSs. El análisis de éstos mediante SEC puso de manifiesto que todas los  $\beta$ -glucanos estaban constituidos por dos fracciones, una de elevado peso molecular (alrededor de  $10^7$  Da) y otra de peso molecular muy inferior (alrededor de  $10^4$  Da). Las proporciones relativas de las dos fracciones variaban ampliamente en función de la cepa y estaban significativamente correlacionadas con el rendimiento en EPS.

Según de Vuyst et al. (2001), el peso molecular del EPS tiene gran importancia a la hora de determinar la viscosidad intrínseca de un polímero. Por consiguiente, las cepas *P. parvulus* CUPV1 y CUPV22 podrían considerarse como bioespesantes potenciales, dado el elevado peso molecular de sus EPSs. En ambos casos, la fracción de elevada masa molecular era casi exclusivamente la mayoritaria y su peso molecular fue superior al de los (1,3)- $\beta$ -glucanos comerciales escleroglucano y curdlano, que presentan pesos moleculares con rangos de  $1,3 \times 10^5$  a  $6 \times 10^6$  Da (Survase et al., 2007) y de  $5,3 \times 10^4$  a  $2,0 \times 10^6$  Da (Nakata et al., 1998), respectivamente. Sin embargo, otros factores tales como la

conformación del polisacárido o las interacciones que establece con el medio de cultivo pueden también, contribuir a las características reológicas de los medios fermentados. Por lo tanto, será necesaria una investigación posterior para determinar sus propiedades como texturizantes en matrices alimentarias particulares.

Con respecto a la caracterización genotípica de los nuevos aislados de *P. parvulus*, se observó que los perfiles RAPD obtenidos con cada cebador eran muy similares entre ellos, a pesar de que fueran cepas obtenidas a lo largo de 13 años. Sin embargo, el análisis combinado de los tres perfiles RAPD y las características fenotípicas agrupó a los aislados de sidra, separándolos de la cepa tipo *P. parvulus* CECT7350<sup>T</sup>, aislada de un ensilado. Además, los perfiles RAPD distinguieron los aislados clonales de otras cepas particulares, tales como *P. parvulus* 2.6, (Werning et al., 2006), por lo que han sido aplicados para la selección de cepas. Además, los perfiles RAPD obtenidos en este estudio permiten una diferenciación clara entre *P. parvulus* y *P. damnosus*, especies estrechamente relacionadas. A este respecto es destacable que la cepa *P. parvulus* 2.6 fue inicialmente descrita como perteneciente a la especie *P. damnosus* (Dueñas-Chasco et al., 1997), pero posteriormente fue asignada a la especie *P. parvulus* en base a la secuenciación de su gen ARNr 16S (Werning et al., 2006).

Para los ensayos del potencial probiótico se seleccionaron las cepas *P. parvulus* CUPV1 y *P. parvulus* CUPV22 en base a sus características fenotípicas y genotípicas: producción elevada del  $\beta$ -glucano con una proporción casi exclusiva de la fracción de elevado peso molecular y de que se trataran de clones diferentes y discriminables de *P. parvulus* 2.6. Con la finalidad de examinar el carácter probiótico en cepas de especies diferentes, estos ensayos se realizaron también con la cepa *L. suebicus* CUPV221 productora del mismo  $\beta$ -glucano, pero cuya fracción mayoritaria es la de reducido peso molecular. Como referencia se tomaron las cepas probióticas comerciales *L. acidophilus* LA-5 y *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12.

Los análisis de estas tres cepas con respecto a su tolerancia al estrés gastrointestinal y capacidad de adhesión a células Caco-2 revelaron un comportamiento diferente entre ellas, aunque las tres compartían la característica de presentar una tolerancia elevada al estrés intestinal. *P. parvulus* CUPV1 presentó la sensibilidad más acusada frente al estrés gástrico (reducción de la viabilidad celular de 98.4% a pH 3,1) y una menor capacidad de

adhesión a las células epiteliales (0,5%). Por el contrario, *P. parvulus* CUPV22 presentó una supervivencia del 29% al ser expuesta a pH 3,1, siendo superior a la detectada previamente para *P. parvulus* 2.6 (10%) (Fernández de Palencia et al., 2009). Con respecto a *L. suebicus* CUPV221, el 11% de la población sobrevivió a las condiciones de pH más extremas (pH 1,8) del gradiente de pH gástrico.

Por otro lado, *P. parvulus* CUPV22 exhibió la mayor capacidad de adhesión a células Caco-2 (10,5%), valor que fue similar al detectado con la cepa probiótica comercial *L. rhamnosus* GG (9,7%) (Tuomola y Salminen, 1998), pero superior al detectado en *P. parvulus* 2.6 (6,1%) (Fernández de Palencia et al., 2009) y *L. acidophilus* LA-5 (5,5%) (Figura 4.12). El  $\beta$ -glucano que envuelve a la cepa CUPV22 podría contribuir a mejorar su capacidad de adhesión a las células epiteliales, mediante su unión a los receptores de estas células, como sugirieron Ruas-Madiedo et al. (2006). Como confirmación de esta hipótesis, la adhesión a las células epiteliales se redujo del 10,5% al 1,2% cuando se eliminó el polisacárido mediante lavado con PBS (Figura 4.12). Fernández de Palencia et al. (2009) mostraron resultados similares para *P. parvulus* 2.6, cuya capacidad de adhesión tras el lavado con PBS, disminuyó a los niveles detectados para la cepa isogénica (no productora del  $\beta$ -glucano). Estos resultados, junto a los obtenidos por Dols-Lafargue et al. (2008), que demostraron la contribución del (1,3)(1,2)- $\beta$ -D-glucano en la formación de biofilms por BAL, refuerzan la idea de que este biopolímero juega un papel importante en el reconocimiento celular y la colonización del intestino por cepas BAL.

Con respecto a *L. suebicus* CUPV221, esta cepa presentó un nivel de adhesión a células Caco-2 (3,2%), superior al de la cepa probiótica *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 (1,8%) (Figura 4.12). Además, exhibió una resistencia al estrés gastrointestinal superior a la de *P. parvulus* CUPV22. Los resultados anteriores indicaron que una parte importante de la población de *P. parvulus* CUPV22 y *L. suebicus* CUPV221 podría sobrevivir a su paso por el tracto digestivo humano y adherirse a la mucosa intestinal. Al igual que lo demostrado para otras cepas de BAL adherentes (Ramiah et al., 2008), estas propiedades podrían contribuir a la protección de las células intestinales frente a infecciones por bacterias patógenas y las dos cepas podrían actuar como agentes inmunomoduladores en el colon humano.

En relación al potencial efecto inmunomodulador de las cepas *P. parvulus* CUPV 22 y *L. suebicus* CUPV 221, conviene destacar que aunque la capacidad para inducir la

producción de citoquinas proinflamatorias fue muy similar en ambas cepas, únicamente *L. suebicus* CUPV221 provocó la liberación de la citoquina antiinflamatoria IL-10. Este efecto se observó usando tanto macrófagos proinflamatorios M1 como antiinflamatorios M2. En la actualidad, está aceptado que la citoquina antiinflamatoria IL-10 juega un papel crítico en la regulación de la respuesta inmune en los procesos infecciosos y en la resolución de la respuesta inflamatoria. Este hecho se debe a su capacidad para reducir la actividad de las células inmunitarias que causan daño tisular durante la eliminación de patógenos e inflamación (Couper et al., 2008). La acción de esta interleuquina es debida fundamentalmente a su efecto directo sobre monocitos y macrófagos, donde limita la producción de citoquinas proinflamatorias (IL-1, IL-6, IL-12 y TNF $\alpha$ ) (Moore et al., 2001). Por consiguiente, la propiedad de la cepa *L. suebicus* CUPV221 de inducir la expresión de IL-10 en macrófagos podría ser indicativo de su capacidad para limitar el daño tisular. A este respecto, dada la mayor capacidad inductora de la producción de IL-10 de la cepa *L. suebicus* CUPV221, ésta sería la más adecuada para favorecer la resolución del proceso inflamatorio y mantener la homeostasis de los tejidos, dos efectos que serían compatibles con una acción probiótica. Según nuestro conocimiento, éste es el primer ejemplo de una cepa de *L. suebicus* con propiedades inmunomoduladoras potencialmente beneficiosas. Los resultados anteriores sugieren que ambas cepas son probióticos potenciales que podrían ser utilizadas para la elaboración de alimentos funcionales.

Las cepas seleccionadas fueron también caracterizadas en cuanto a sus propiedades tecnológicas, ya que los (1,3)- $\beta$ -glucanos, además de por su interés terapéutico, han sido extensamente estudiados por sus propiedades fisicoquímicas, especialmente su capacidad gelificante, lo que ha conducido a su aplicación en alimentos. En este contexto, el potencial bioespesante del (1,3)(1,2)- $\beta$ -glucano de *P. parvulus* 2.6 ya había sido demostrado (Velasco et al., 2009). Por esta razón, se determinó el aumento de viscosidad del medio de cultivo provocado por el EPS sintetizado por las tres cepas seleccionadas. Éstas produjeron cantidades elevadas de  $\beta$ -glucano, comprendidas entre 137 y 180 mg L<sup>-1</sup> en el medio semidefinido y mostraron patrones de producción diferentes según la especie. Las cepas de *P. parvulus* comenzaron la producción de  $\beta$ -glucano durante la fase exponencial del crecimiento, siguiendo el patrón de otras cepas productoras del (1,3)(1,2)- $\beta$ -D-glucanos, como *P. parvulus* 2.6 (Velasco et al., 2006) y *P. damnosus* IOEB8801 (Walling et al., 2005). Por el contrario, *L. suebicus* CUPV221 produjo la mayor parte del polisacárido



durante la fase estacionaria, lo que podría suponer una ventaja a la hora de su aplicación como coadyuvante durante las fermentaciones.

Con respecto al potencial bioespesante de los  $\beta$ -glucanos, los resultados mostraron que los EPSs producidos por *P. parvulus* CUPV22 y *L. suebicus* CUPV221 conferían una viscosidad elevada al medio de cultivo ( $4 \text{ mm}^2 \text{ seg}^{-1}$ ), mientras que el sintetizado por *P. parvulus* CUPV1 sólo provocaba un aumento moderado del mismo ( $1,5 \text{ mm}^2 \text{ seg}^{-1}$ ). Tras la determinación de los pesos moleculares de los tres  $\beta$ -glucanos, se mostró que el polisacárido crudo de *P. parvulus* CUPV22 estaba constituido principalmente por un polímero de elevado peso molecular. Este resultado podría ser indicativo de la relación entre la presencia de una proporción elevada de la fracción de alto peso molecular y una capacidad significativa como bioespesante. Sin embargo, *L. suebicus* CUPV221 presentaba como fracción mayoritaria la de reducido peso molecular, lo que podría estar relacionado con los cambios genéticos de la región catalítica del enzima. Por consiguiente, las fracciones de elevado y reducido peso molecular originaron un incremento similar de la viscosidad. Estos resultados están de acuerdo con lo descrito por Petry et al. (2003), que no encontraron una correlación directa entre la cantidad de EPS producido, la proporción relativa de las diferentes fracciones y las propiedades reológicas de las leches fermentadas. Estos resultados sugieren que, además del peso molecular de los  $\beta$ -glucanos, otros factores como su conformación o las interacciones entre el EPS y la microestructura del medio de cultivo podrían afectar a las características reológicas del medio fermentado (Vaningelgem et al., 2004). No obstante, los resultados globales indican que *P. parvulus* CUPV22 y *L. suebicus* CUPV221 exhiben potencial como cepas probióticas, y que sus polímeros podrían tener utilidad como viscosificantes de alimentos fermentados.

Con el objeto de conocer las materias primas que podrían ser fermentadas por las tres cepas seleccionadas, se analizó su patrón de fermentación de azúcares. Los resultados mostraron que es una característica dependiente de la cepa. Las cepas de *P. parvulus* fueron capaces de crecer y fermentar glucosa, fructosa, galactosa, trehalosa y maltosa, lo que permitiría su uso en productos lácteos. Además, el hecho de fermentar maltosa, disacárido presente en la avena y otros cereales, indica su potencial para ser utilizados como cultivos iniciadores o coadyuvantes en las fermentaciones de productos no lácteos.

## 4.5. CONCLUSIONES

En este trabajo, con el objeto de aislar nuevas cepas con posible potencial probiótico, se ha abordado la detección y caracterización de nuevas cepas productoras de (1,3)(1,2)- $\beta$ -glucanos entre 147 bacterias lácticas aisladas de sidra natural.

Todos los aislados EPS<sup>+</sup> fueron identificadas como *P. parvulus* (32) y casi la mitad de las cepas (13) sintetizó cantidades superiores a 100 mg L<sup>-1</sup>. Todas las cepas EPS<sup>+</sup> mostraron la presencia del gen *gtf*, indicativa de su posible capacidad de producción del (1,3)(1,2)- $\beta$ -D-glucano. Los espectros RMN de protón de la exopolisacáridos fueron idénticos a los descritos para el  $\beta$ -glucano producido por *P. parvulus* 2.6, resultados que indican la producción del mismo (1,3)- $\beta$ -D-glucano sustituido en posición 2. En los polímeros de dos de ellas CUPV1 y CUPV22, los análisis de metilación y de composición monosacárida así como los espectros COSY-RMN confirmaron la producción de este tipo particular de  $\beta$ -glucano.

El test de aglutinación con el antisuero específico frente al polisacárido capsular de *Streptococcus pneumoniae* tipo 37 mostró su validez como método alternativo y rápido de detección de cepas productoras de (1,3)(1,2)- $\beta$ -D-glucanos, siempre y cuando éstas produzcan cantidades superiores a 20-30 mg L<sup>-1</sup>.

Por otro lado, los cromatogramas de exclusión molecular de los EPSs crudos mostraron dos fracciones muy diferentes, una de elevada masa molecular del orden de 10<sup>7</sup> Da y la otra del orden de 10<sup>4</sup> Da y cuyas proporciones relativas varían en función de la cepa.

Además, en este trabajo se ha abordado el estudio de ciertas propiedades probióticas en tres cepas productoras de este tipo de biopolímeros, *P. parvulus* CUPV1 y CUPV22 y *L. suebicus* CUPV221. Las cepas de *P. parvulus* se seleccionaron en base a su alto rendimiento en el  $\beta$ -glucano, masas moleculares y elevada proporción de la fracción de 10<sup>7</sup> Da. Además, estas dos cepas no son de origen clonal, lo que facilita su diferenciación rápida mediante RAPD-PCR con los cebadores P1 o P2.

En relación a las características tecnológicas de las cepas seleccionadas, se observó que sus correspondientes exopolisacáridos provocaban incrementos significativos de la viscosidad del medio de cultivo. Las dos cepas de *P. parvulus* sintetizaron  $\beta$ -glucano principalmente durante la fase exponencial tardía, mientras que *L. suebicus* produjo la mayor parte en la fase estacionaria. Además, las cepas de *P. parvulus* mostraron la capacidad para fermentar diferentes azúcares incluyendo, glucosa, galactosa y maltosa, lo que las haría adecuadas para su uso como cultivos iniciadores o coadyuvantes en la elaboración de productos fermentados tanto lácteos como no lácteos. El gen *gtf* de estas tres cepas, fue secuenciado en su totalidad (1704 nt) observándose que los genes de *P. parvulus* CUPV1 y CUPV22 son idénticos entre si y diferían únicamente en 3 nucleótidos del gen de *L. suebicus* CUPV221. Una de las mutaciones se encontraba localizada en el centro activo de la enzima y podría explicar la producción casi exclusiva de la fracción de menor masa molecular ( $10^4$  Da) por esta cepa.

En los ensayos de tolerancia al estrés gastrointestinal, se observó que las tres cepas presentaban niveles de supervivencia cercanos al 30% después de su exposición a lisozima y condiciones gástricas a pH 5. La viabilidad de *P. parvulus* CUPV22 y *L. suebicus* CUPV221 se vio afectada en las condiciones más ácidas de pH (pH<3,1), siendo *L. suebicus* la única capaz de sobrevivir (11%) a las condiciones más severas del estrés gástrico (pH 1,8). Los resultados anteriores indicaron que una parte importante de la población de *P. parvulus* CUPV22 y *L. suebicus* CUPV221 podrían sobrevivir a su paso por el tracto digestivo humano y adherirse a la mucosa intestinal. *P. parvulus* CUPV22 presentó la mayor capacidad de adhesión a células Caco-2, que disminuyó de forma acusada tras la eliminación del exopolisacárido adherido a la superficie celular mediante sucesivos lavados con PBS. Finalmente, se determinó que *P. parvulus* CUPV22 y *L. suebicus* CUPV221 inducían de forma diferente la producción de citoquinas relacionadas con los procesos inflamatorios por los macrófagos polarizados M1 y M2.

## 4.6. BIBLIOGRAFÍA

- Alakomi H-L, Mättö J., Virkajärvi I. y Saarela M. 2005. Application of a microplate scale fluorochrome staining assay for the assessment of viability of probiotic preparations. *Journal of Microbiological Methods*. 62: 25-35.
- Allen P. Z. y Bowen W. H. 1988. Immunochemical studies on pneumococcal type 37 capsular polysaccharide. *Molecular Immunology*. 25: 1011-1017.
- Brown G. D. 2006. Dectin-1: a signalling non-TLR pattern-recognition receptor. *Nature Reviews in Immunology*. 6: 33-43
- Brown G. D. y Gordon S. 2003. Fungal beta-glucans and mammalian immunity. *Immunity*. 19: 311-315.
- Brown G.D y Gordon S. 2005. Immune recognition of fungal  $\beta$ -glucans. *Cellular Microbiology*. 7: 471-479.
- Chan G. C., Chan W. K. y Sze D. M. 2009. The effects of  $\beta$ -glucan on human immune and cancer cells. *Journal of Hematology and Oncology*. Doi:10.1186/1756-8722-2-25.
- Charteris W. P., Kelly P. M., Morelli L. y Collins J. K. 1998. Development and application of an in vitro methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in the upper human gastrointestinal tract. *Journal of Applied Microbiology*. 84: 759-768.
- Ciucanu I. y Kerek F. 1984. A simple method for the permethylation of carbohydrates. *Carbohydrate Research*. 131: 209-217.
- CODEX Alimentarius Commission. 2003. Codex Stan 243-2003  
[http://www.codexalimentarius.net/download/standards/400/CXS\\_243e.pdf](http://www.codexalimentarius.net/download/standards/400/CXS_243e.pdf)
- Couper K. N., Blount D. G. y Riley E. M. 2008. IL-10: the master regulator of immunity to infection. *Journal of Immunology*. 180: 5771-5777.
- De Vrese M. y Schrezenmeir J. 2008. Probiotics, prebiotics and synbiotics. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. 111: 1-66.
- De Vuyst L., De Vin F., Vaningelmem F. y Degeest B. 2001. Recent developments in the biosynthesis and applications of heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*. 11: 687-707.

- Dols-Lafargue M., Lee H. Y., Le Marrec C., Heyraud A., Chambat G. y Lonvaud-Funel A. 2008. Characterization of *gtf*, a glucosyltransferase gene in the genomes of *Pediococcus parvulus* and *Oenococcus oeni*, two bacterial species commonly found in wine. *Applied and Environmental Microbiology*. 74: 4079-4090.
- Dubois M., Gilles K. A., Hamilton J. K., Rebers P.A. y Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*. 28: 350-356.
- Dueñas-Chasco M. T., Rodríguez-Carvajal M. A., Tejero P., Franco-Rodríguez G., Espartero J. L., Irastorza-Iribas A. y Gil-Serrano A. M. 1997. Structural analysis of the exopolysaccharide produced by *Pediococcus damnosus* 2.6. *Carbohydrate Research*. 303: 453-458.
- Dueñas-Chasco M. T., Rodríguez-Carvajal M. A., Tejero-Mateo P., Espartero J. L., Irastorza-Iribas A. y Gil-Serrano A. M. 1998. Structural analysis of the exopolysaccharides produced by *Lactobacillus* spp. G-77. *Carbohydrate Research*. 307: 125-133.
- Dueñas M., Munduate A., Perea A. e Irastorza A. 2003. Exopolysaccharide production by *Pediococcus damnosus* 2.6 in a semidefined medium under different growth conditions. *International Journal of Food Microbiology*. 87: 113-20
- FAO/WHO. 2002. <ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/wgreport2.pdf>
- Fernández de Palencia P., López P., Corbí A. L., Peláez C. y Requena T. 2008. Probiotic strains: survival under simulated gastrointestinal conditions, in vitro adhesion to Caco-2 cells and effect on cytokine secretion. *European Food Research and Technology*. 227: 1475–1484.
- Fernández de Palencia P., Werning M. L., Sierra-Filardi E., Dueñas M. T., Irastorza A., Corbí A. L. y López P. 2009. Probiotic properties of the 2-substituted (1,3)-β-D-glucan producing bacterium *Pediococcus parvulus* 2.6. *Applied and Environmental Microbiology*. 75: 4887-4891.
- Ibarburu I., Soria-Diaz M. E., Rodríguez-Carvajal M. A., Velasco S. E., Tejero-Mateo P., Gil-Serrano A. M., Irastorza A. y Duenas M. T. 2007. Growth and exopolysaccharide (EPS) production by *Oenococcus oeni* 14 and structural characterization of their EPSs. *Journal of Applied Microbiology*. 103: 477-486.

- Lambo-Fodje A., Öste R. y Nyman E. G. L. 2006. Short-chain fatty acid formation in the hindgut of rats fed native and fermented oat fiber concentrates. *British Journal of Nutrition*. 96: 47-55.
- Leal J. A., Jiménez-Barbero J., Bernabé M. y Prieto, A. 2008. Structural elucidation of a cell wall fungal polysaccharide isolated from *Ustilagoidea virens*, a pathogenic fungus of *Oriza sativa* and *Zea mays*. *Carbohydrate Research*. 343: 2980-2984.
- Leroy F. y De Vuyst L. 2004. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science and Technology*. 15: 67-78.
- Llull D., García E. y López R. 2001. Tts, a processive  $\beta$ -glucosyltransferase of *Streptococcus pneumoniae*, directs the synthesis of the branched type 37 capsular polysaccharide in *Pneumococcus* and other Gram-positive species. *Journal of Biological Chemistry*. 276: 21053-21061
- Mårtensson O., Dueñas-Chasco M., Irastorza A., Oste R. y Holst O. 2003. Comparison of growth characteristics and exopolysaccharide formation of two lactic acid bacteria strains, *Pediococcus damnosus* 2.6 and *Lactobacillus brevis* G-77, in an oat-based, nondairy medium. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*. 36: 353-357.
- Mårtensson O., Biörklund M., Lambo M. A., Dueñas-Chasco M. T., Irastorza A., Holst O., Norin E., Walling G., Öste R. y Önning G. 2005. Fermented røpy, oat-based products reduce cholesterol levels and stimulate the bifidobacteria flora in humans. *Nutrition Research*. 25: 429-442.
- Moore K. W., de Waal Malefyt R., Coffman R. L. y O'Garra A. 2001. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annual Review of Immunology*. 19: 683-765.
- Mozzi F., Vaningelgem F., Hebert E. M., Van der Meulen R., Moreno M. R. F., Font de Valdez G. y De Vuyst L. 2006. Diversity of heteropolysaccharide-producing lactic acid bacterium strains and their biopolymers. *Applied and Environmental Microbiology*. 72: 4431-4435.
- Nakata M., Kawaguchi T., Kodama Y. y Konno A. 1998. Characterization of curdlan in aqueous sodium hydroxide. *Polymers*. 39: 1475-1481.
- Ouwehand A. C., Salminen S. y Isolauri E. 2002. Probiotics: an overview of beneficial effects. *Antonie van Leeuwenhoek*. 82: 279-289.

- Petry S., Furlan S., Waghorne E., Saulnier L., Cerning J. y Maguin E. 2003. Comparison of the thickening properties of four *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* strains and physicochemical characterization of their exopolysaccharides. *FEMS Microbiology Letters*. 221: 285-291.
- Pinto B., Chenoll E. y Aznar R. 2005. Identification and typing of food-borne *Staphylococcus aureus* by PCR-based techniques. *Systematic and Applied Microbiology*. 28: 340-352.
- Ramiah K., van Reenen C. A. y Dicks L. M. T. 2008. Surface-bound proteins of *Lactobacillus plantarum* 423 that contribute to adhesion of Caco-2 cells and their role in competitive exclusion and displacement of *Clostridium sporogenes* and *Enterococcus faecalis*. *Research in Microbiology*. 159: 470-475.
- Reid D. M., Gow N. A. R. y Brown G. D. 2009. Pattern recognition: recent insights from Dectin-1. *Current Opinion in Immunology*. 21: 30-37
- Ruas-Madiedo P., Hugenholtz J. y Zoon, P. 2002. An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*. 12: 163-171.
- Ruas-Madiedo P., Gueimonde M., Margolles A., De Los Reyes-Gavilan C. G. y Salminen S. 2006. Exopolysaccharides produced by probiotic strains modify the adhesion of probiotics and enteropathogens to human intestinal mucus. *Journal of Food Protection*. 69: 2011-2015.
- Ruas-Madiedo P., Abraham A., Mozzi F. y de los Reyes-Gavilán C. G. 2008. Functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria, pp. 137-166. B. Mayo, P. López, y G. Pérez-Martín (ed.), En: Molecular aspects of lactic acid bacteria for traditional and new applications. Research Signpost, Kerala, India.
- Salminen S., von Wright A., Morelli L., Marteau P., Brassart D., de Vos W. M., Fonden R., Saxelin M., Collins K., Mogensen G., Birkeland S. E. y Mattila-Sandholm T. 1998. Demonstration of safety of probiotics: a review. *International Journal of Food Microbiology*. 44: 93-106.
- Schorey J. S. y Lawrence C. 2008. The pattern recognition receptor Dectin-1: from fungi to mycobacteria. *Current Drug Targets*. 9: 123-129.

- Simpson P. J., Stanton C., Fitzgerald G. F. y Ross R. P. 2002. Genomic diversity within the genus *Pediococcus* as revealed by randomly amplified polymorphic DNA PCR and pulsed-field gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology*. 68: 765-771.
- Sletmoen M. y Stokke B. T. 2008. Higher order structure of (1,3)- $\beta$ -D-glucans and its influence on their biological activities and complexation abilities. *Biopolymers*. 89: 310-21.
- Sneath P. H. A. y Sokal R. R. 1973. Numerical taxonomy. Freeman, San Francisco, CA.
- Soltanian S., Stuyven E., Cox E., Sorgeloos P. y Bossier P. 2009. Beta-glucans as immunostimulant in vertebrates and invertebrates. *Critical Reviews in Microbiology*. 35: 109-38
- Survase S. A., Saudagar P. S., Bajaj I. B. y Singhal R. S. 2007. Scleroglucan: Fermentative production, downstream processing and applications. *Food Technology and Biotechnology*. 45:107-118.
- Tuomola E. M. y Salminen S. J. 1998. Adhesion of some probiotic and dairy *Lactobacillus* strains to Caco-2 cell cultures. *International Journal of Food Microbiology*. 41: 45-51.
- Unligil U. M. y Rini J. M. 2000. Glycosyltransferase structure and mechanism. *Current Opinion in Structural Biology*. 10: 510-517.
- Van der Meulen R., Grosu-Tudor S., Mozzi F., Vaningelgem F., Zamfir M., Font de Valdez G. y De Vuyst L. 2007. Screening of lactic acid bacteria isolates from dairy and cereal products for exopolysaccharide production and genes involved. *International Journal of Food Microbiology*. 118: 250-258.
- Vaningelgem F., Zamfir M., Mozzi F., Adriany T., Vancanneyt M., Swings J. y De Vuyst L. 2004. Biodiversity of exopolysaccharides produced by *Streptococcus thermophilus* strains is reflected in their production and their molecular and functional characteristics. *Applied and Environmental Microbiology*. 70: 900-912.
- Varady K. A. y Jones P. J. H. 2005. Combination diet and exercise interventions for the treatment of dyslipidemia: An effective preliminary strategy to lower cholesterol levels? *Journal of Nutrition*. 135: 1829-1835



- Velasco S., Årskold E., Paese M., Grage A., Irastorza A., Rådstrom P. y van Niel E. W. J. 2006. Environmental factors influencing growth of and exopolysaccharide formation by *Pediococcus parvulus* 2.6. *International Journal of Food Microbiology*. 111: 252-258.
- Velasco S. E., Yebra M. J., Monedero V., Ibarburu I., Duenas M. T. y Irastorza A. 2007. Influence of the carbohydrate source on  $\beta$ -glucan production and enzyme activities involved in sugar metabolism in *Pediococcus parvulus* 2.6. *International Journal of Food Microbiology*. 115: 325-334
- Velasco S. E., Areizaga J., Irastorza A., Dueñas M. T., Santamaria A. y Muñoz M. E. 2009. Chemical and rheological properties of the  $\beta$ -glucan produced by *Pediococcus parvulus* 2.6. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 57: 1827-1834.
- Walling E., Gindreau E. y Lonvaud-Funel A. 2005. A putative glucan synthase gene *dps* detected in exopolysaccharide-producing *Pediococcus damnosus* and *Oenococcus oeni* strains isolated from wine and cider. *International Journal of Food Microbiology*. 98: 53-62.
- Werning M. L., Ibarburu I., Dueñas M. T., Irastorza A., Navas J. y López P. 2006. *Pediococcus parvulus* *gtf* gene encoding the GTF glycosyltransferase and its application for specific PCR detection of  $\beta$ -D-glucan-producing bacteria in foods and beverages. *Journal of Food Protection*. 69: 161-169.
- Wichers H. 2009. Immunomodulation by food: promising concept for mitigating allergic disease?. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 395: 37-45.
- Zekovic D. B., Kwlatkowski S., Vrvic M. M., Jakovijevic D. y Moran C. A. 2005. Natural and modified (1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glucans in health promotion and disease alleviation. *Critical Reviews in Biotechnology*. 25:205-230.

## **5. Conclusiones generales**

---

En la última sección de los capítulos 2, 3 y 4 se han expuesto las conclusiones obtenidas en cada uno de ellos. En este apartado final se destacan las principales conclusiones del conjunto del trabajo.

1. La microbiota implicada en la alteración del picado acroléico en la sidra natural está constituida mayoritariamente por *L. collinoides*. Estas cepas metabolizan el glicerol por la vía glicerol deshidratasa, produciendo el compuesto 3-hidroxi propionaldehído.
2. La composición de la sidra natural, con fructosa como fuente carbonada residual, favorece la degradación del glicerol así como la acumulación de 3-HPA por *L. collinoides*. Este compuesto puede ser eliminado mediante la degradación del manitol y/o ácido láctico, con incrementos simultáneos de la concentración de ácido acético.
3. Los pHs más ácidos en las sidras y las habituales bajas temperaturas durante el periodo de maduración y almacenamiento podrían potenciar el mantenimiento del 3-HPA y en consecuencia, favorecer su transformación en acroleína y la aparición del picado acroléico.
4. Las aminas biógenas más abundantes en las sidras naturales analizadas son putrescina, tiramina e histamina, aunque se encuentran en cantidades inferiores a las reportadas en otras bebidas fermentadas como vino y cerveza. Las pequeñas cantidades de aminoácidos precursores (ornitina, tirosina e histidina) detectados en mostos y sidras naturales parecen ser los responsables de los bajos niveles de aminas presentes en sidras.
5. Entre la microbiota de bacterias lácticas de la sidra natural, se han detectado diferentes especies productoras de aminas biógenas, siendo *L. diolivorans* la más importante. Esta especie es responsable, al menos en parte, de la síntesis tanto de histamina como de tiramina. También se detectó producción de histamina por una cepa de *L. collinoides*. Hasta el presente, la producción de aminas biógenas no había sido descrita en estas especies.

6. Con respecto a la producción de exopolisacáridos por bacterias lácticas aisladas de sidra natural, todas las cepas de *P. parvulus* sintetizan un (1,3)- $\beta$ -D-glucano sustituido en posición 2 y una gran parte de ellas sintetizan cantidades superiores a 100 mg L<sup>-1</sup>. Los EPSs crudos están constituidos por dos fracciones muy diferentes, una de elevada masa molecular del orden de 10<sup>7</sup> Da y la otra del orden de 10<sup>4</sup> Da y cuyas proporciones relativas varían según la cepa.
  
7. Se ha abordado el estudio de varias propiedades probióticas en tres cepas productoras de este tipo de  $\beta$ -glucano, *P. parvulus* CUPV1 y CUPV22 y *L. suebicus* CUPV221. *P. parvulus* CUPV22 y *L. suebicus* CUPV221 presentan una mayor tolerancia frente al estrés gástrico, y *L. suebicus* es la única capaz de sobrevivir a las condiciones más severas del estrés (pH 1,8). *P. parvulus* CUPV22 mostró una mayor capacidad de adhesión a células Caco-2, que disminuyó sensiblemente tras la eliminación del polisacárido. En relación al efecto inmunomodulador, *P. parvulus* CUPV22 y *L. suebicus* CUPV221 inducen de forma diferente la activación de macrófagos polarizados M1 y M2., siendo *L. suebicus* la única que induce la liberación de la citoquina antiinflamatoria IL-10.
  
8. Se ha secuenciado el gen glicosiltransferasa (1704 nt) de las cepas *P. parvulus* CUPV1, *P. parvulus* CUPV22 y *L. suebicus* CUPV221. Los genes de *P. parvulus* CUPV1 y CUPV22 son idénticos entre si, diferenciándose únicamente en 3 nucleótidos del gen de *L. suebicus* CUPV221.

**ANEXO I**

---

## MEDIOS DE CULTIVO Y SOLUCIONES

### MRS

	g L <sup>-1</sup>
Glucosa	20
Peptona	10
Extracto de carne	10
Extracto de levadura	5
Tween 80	1
Citrato diamónico	2
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,1
MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	0,05
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2
Acetato sódico	5

El pH se ajustó a 4,8 y se autoclavó a 120 °C durante 20 min. Para preparar medio sólido se añadió un 3% de agar bacteriológico.

### Medio modificado de Carr (Carr-m)

	g L <sup>-1</sup>
Glucosa	1
Fructosa	1
Extracto de levadura	4
Casaminoácidos	5
Glicerol	5
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,125
MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	0,003
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O	0,55
CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	0,125
KCl	0,425

El pH se ajustó a 4,8 y se autoclavó a 120 °C durante 20 min.

## Reactivo de triptófano

Volumen final (en H <sub>2</sub> O desionizada)	1L
DL-Triptófano	2,05 g
HCl 37%	4,17 mL
Tolueno	2,5 mL

## Medio de Bover-Cid

	g L <sup>-1</sup>
Triptona	5
Glucosa	0,25
Fructosa	0,25
Extracto de carne	5
Extracto de levadura	5
NaCl	2,5
Tween 80	1
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,04
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,2
MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	0,05
Citrato diamónico	2
CaCO <sub>3</sub>	0,1
Tiamina	0,01
K <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2
Piridoxal-5-fosfato	0,05
Púrpura de bromocresol	0,06
Clorhidrato de L-histidina	10
Sal disódica de L-tirosina	5
Clorhidrato de L-ornitina	10

El pH se ajustó a 5,2 y se esterilizó mediante autoclave a 120 °C durante 20 min.

**MST**

	g L <sup>-1</sup>		mg L <sup>-1</sup>
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,5	<b>Elementos traza</b>	
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,5	EDTA	15
Casaminoácidos	7,5	ZnSO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O	2,8
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0,25	MnCl <sub>2</sub> 4 H <sub>2</sub> O	6,11
Glucosa	50	Co Cl <sub>2</sub> 6 H <sub>2</sub> O	0,3
Etanol	50	SO <sub>4</sub> Cu 5 H <sub>2</sub> O	0,3
		Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O	0,43
<b>Amino ácidos</b>		CaCl <sub>2</sub>	3,4
L-alanina	0,06	Fe SO <sub>4</sub> 2 H <sub>2</sub> O	1,88
L-serina	0,2	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1
L-triptofano	0,03	KI	0,1
L-asparragina H <sub>2</sub> O	0,23		
L-cisteina	0,5	<b>Vitaminas</b>	
Glutati6n reducido	0,01	Biotina	0,1
Tween 80	1	Piridoxal-HCl	2,06
		Ac. F6lico	1,015
<b>Bases nitrogenadas</b>		Riboflavina	1
Ur6cilo	0,06	Niacinamida	1
Adenina	0,03	Tiamina-HCl	1,01
Guanina	0,03	6c. Pantot6nico	0,884
		6c. <i>p</i> -aminobenz6ico	0,1

El medio se autoclav6 a 120 °C durante 20 min para esterilizarlo.

**MLO**

H <sub>2</sub> O desionizada	900 mL
Glucosa	10 g L <sup>-1</sup>
Fructosa	5 g L <sup>-1</sup>
Peptona	10 g L <sup>-1</sup>
Extracto de levadura	5 g L <sup>-1</sup>
Tween 80	1 g L <sup>-1</sup>
Citrato diam6nico	3,5 g L <sup>-1</sup>
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,2 g L <sup>-1</sup>
MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	0,05 L <sup>-1</sup>
Zumo de tomate	100 mL

El pH se ajust6 a 4,8 y se esteriliz6 mediante autoclave a 120 °C durante 20 min.



## SMD

	g L <sup>-1</sup>
Glucosa	20
Casaminoácidos	5
Yeast nitrogen base	6,7
Tween 80	1
Citrato diamónico	2
MnSO <sub>4</sub> · 4H <sub>2</sub> O	0,05
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2
Acetato de sodio	5
Adenina	0,005
Guanina	0,005
Xantina	0,005
Uracilo	0,005
Acido L-málico	4

El medio se autoclavó a 120 °C durante 20 min para esterilizarlo.

## Tampón TE

Tris HCl	10 mM
EDTA	1 mM

Ajustar a pH 8, autoclavar durante 15 min a 120 °C y almacenar a 4 °C.

## Tampón de lisis enzimático

Tampón TE (pH 8)	
Triton X-100	1,2 % (v/v)
Lisozima	20 mg mL <sup>-1</sup>

Autoclavar durante 15 min a 121 °C y almacenar en frigorífico en ausencia de lisozima. Añadir esta última en el momento de utilizar el tampón.

## Solución electrolítica G

NaCl	6,2 g L <sup>-1</sup>
KCl	2,2 g L <sup>-1</sup>
CaCl <sub>2</sub>	0,22 g L <sup>-1</sup>
NaHCO <sub>3</sub>	1,2 g L <sup>-1</sup>

El medio se autoclavó a 120 °C durante 20 min

## Solución electrolítica I

NaCl	5 g L <sup>-1</sup>
KCl	0,6 g L <sup>-1</sup>
CaCl <sub>2</sub>	0,3 g L <sup>-1</sup>

El medio se autoclavó a 120 °C durante 20 min

## PBS

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	10 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1 mM
NaCl	140 mM
KCl	3 mM

Ajustar el pH y autoclavar durante 15 min a 120 °C.

## TAE

Tris Base	4,84 g L <sup>-1</sup>
Ácido acético glacial	1,142 mL L <sup>-1</sup>
Na <sub>2</sub> EDTA 2H <sub>2</sub> O 5 mM (pH 8)	200 mL L <sup>-1</sup>

Esterilizar por filtración y almacenar a 4 °C.

**ANEXO II**

---

Comparación de las secuencias aminoacídicas de las glicosil transferasas (GTF) de  
*L. suebicus* CUPV221 y *P. parvulus* CUPV1

CUPV221	1	MLNDNDSSELKKFHLFHSKPVFVFPVILIIWLFIMCLYEYLYTYTDSILPILAKKQPLEVILP	60
		MLNDNDSSELKKFHLFHSKPVFVFPVILIIWLFIMCLYEYLYTYTDSILPILAKKQPLEVILP	
CUPV1	1	MLNDNDSSELKKFHLFHSKPVFVFPVILIIWLFIMCLYEYLYTYTDSILPILAKKQPLEVILP	60
CUPV221	61	IFNQLFVALFFLLGITNIIIAIRYAMIKDK <sup>A</sup> KESELAILAKETPADWHPKVELLYTTYND	120
		IFNQLFVALFFLLGITNIIIAIRYAMIKDK KESELAILAKETPADWHPKVELLYTTYND	
CUPV1	61	IFNQLFVALFFLLGITNIIIAIRYAMIKDK <sup>V</sup> KESELAILAKETPADWHPKVELLYTTYND	120
CUPV221	121	FIPYA <sup>A</sup> AQCLKQTYDNTQGVILDNSTDPKYIKMIDDFVIAHPNVKLVDRSQNKHAKAGNL	180
		FIPYA+AQCLKQTYDNTQGVILDNSTDPKYIKMIDDFVIAHPNVKLVDRSQNKHAKAGNL	
CUPV1	121	FIPYA <sup>A</sup> AQCLKQTYDNTQGVILDNSTDPKYIKMIDDFVIAHPNVKLVDRSQNKHAKAGNL	180
CUPV221	181	NNYLCNGTHDYDYFVILDSDELLENRFVEKCLKMFYYNDIGILQCNHISGQNHNSFMRTF	240
		NNYLCNGTHDYDYFVILDSDELLENRFVEKCLKMFYYNDIGILQCNHISGQNHNSFMRTF	
CUPV1	181	NNYLCNGTHDYDYFVILDSDELLENRFVEKCLKMFYYNDIGILQCNHISGQNHNSFMRTF	240
CUPV221	241	SSSGNIFWPVQNVVRSVEGGWLNKTVSGVSVGQTGGALCIELGHGVMISRECFEDIGQIP	300
		SSSGNIFWPVQNVVRSVEGGWLNKTVSGVSVGQTGGALCIELGHGVMISRECFEDIGQIP	
CUPV1	241	SSSGNIFWPVQNVVRSVEGGWLNKTVSGVSVGQTGGALCIELGHGVMISRECFEDIGQIP	300
CUPV221	301	YAVAEDLCTSIEATLKGWNIKFASQIYGNEAFPVNMAALMIRSSKFCSANFEFFKKYSAR	360
		YAVAEDLCTSIEATLKGWNIKFASQIYGNEAFPVNMAALMIRSSKFCSANFEFFKKYSAR	
CUPV1	301	YAVAEDLCTSIEATLKGWNIKFASQIYGNEAFPVNMAALMIRSSKFCSANFEFFKKYSAR	360
CUPV221	361	IIKSKTISLYQKIDLFCFTLSVPISAFQYISLVITSIICPVLHIPLVTQLFMLLPTLVCY	420
		IIKSKTISLYQKIDLFCFTLSVPISAFQYISLVITSIICPVLHIPLVTQLFMLLPTLVCY	
CUPV1	361	IIKSKTISLYQKIDLFCFTLSVPISAFQYISLVITSIICPVLHIPLVTQLFMLLPTLVCY	420
CUPV221	421	FSQSLVDTVFHLTNGMKFLDLLIYEVESMLLYGSFYFITIKSTVLALMKNKPAKFIVTPKV	480
		FSQSLVDTVFHLTNGMKFLDLLIYEVESMLLYGSFYFITIKSTVLALMKNKPAKFIVTPKV	
CUPV1	421	FSQSLVDTVFHLTNGMKFLDLLIYEVESMLLYGSFYFITIKSTVLALMKNKPAKFIVTPKV	480
CUPV221	481	NEHITFLH <sup>T</sup> IRNHYYQGILFSIFTIIACIAISGSYWVLLSFIPGCFGLFEMQANHRTSEE	540
		NEHITFLH IRNHYYQGILFSIFTIIACIAISGSYWVLLSFIPGCFGLFEMQANHRTSEE	
CUPV1	481	NEHITFLH <sup>A</sup> IRNHYYQGILFSIFTIIACIAISGSYWVLLSFIPGCFGLFEMQANHRTSEE	540
CUPV221	541	QIKADKLQSYNNKALQSGNTETVDWND	567
		QIKADKLQSYNNKALQSGNTETVDWND	
CUPV1	541	QIKADKLQSYNNKALQSGNTETVDWND	567

Se indican en amarillo los aminoácidos diferentes en las secuencias comparadas.

+, indica cambio de aminoácido conservativo.

Comparación de las secuencias aminoacídicas de las glicosil transferasas (GTF) de *L. suebicus* CUPV221 y *P. parvulus* CUPV22

CUPV221	MLNDNDELKFFHLFHSKPVFVPVILI IWLFI MCLYEYLYT TDSILPILAKKQPLEVILP	60
CUPV22	MLNDNDELKFFHLFHSKPVFVPVILI IWLFI MCLYEYLYT TDSILPILAKKQPLEVILP	60
CUPV221	IFNQLFVALFFLLGITNII IAIRYAMIKDK <b>V</b> KESELAILAKETPADWHPKVELLYT TYND	120
CUPV22	IFNQLFVALFFLLGITNII IAIRYAMIKDK <b>A</b> KESELAILAKETPADWHPKVELLYT TYND	120
CUPV221	FIPYA <b>I</b> AQCLKQTYDNTQGVILDNSTDPKYIKMIDDFVIAHPNVKLV RDSQNKHAKAGNL	180
CUPV22	FIPYA <b>I</b> AQCLKQTYDNTQGVILDNSTDPKYIKMIDDFVIAHPNVKLV RDSQNKHAKAGNL	180
CUPV221	NNYLCNGTHDYDYFVILDSDELLENRFVEKCLKMFYNDIGILQCNHISGQNHNSFMRTF	240
CUPV22	NNYLCNGTHDYDYFVILDSDELLENRFVEKCLKMFYNDIGILQCNHISGQNHNSFMRTF	240
CUPV221	SSSGNIFWPVQNVVRSVEGGWLNKTVSGVSVGQTGGALCIELGHGVMISRECFEDIGQIP	300
CUPV22	SSSGNIFWPVQNVVRSVEGGWLNKTVSGVSVGQTGGALCIELGHGVMISRECFEDIGQIP	300
CUPV221	YVAEDLCTSIEATLKGWNIKFASQIYGNEAFPVNMAALMIRSSKFCSANFEFFKKYSAR	360
CUPV22	YVAEDLCTSIEATLKGWNIKFASQIYGNEAFPVNMAALMIRSSKFCSANFEFFKKYSAR	360
CUPV221	IIKSKTISLYQKIDLFCFTLSVPISAFQYISLVITSIIICPVLHIPLVTQLFMLLPTLV CY	420
CUPV22	IIKSKTISLYQKIDLFCFTLSVPISAFQYISLVITSIIICPVLHIPLVTQLFMLLPTLV CY	420
CUPV221	FSQSLVDTVFHLTNGMKFLDLLIYEVE SMLLYGSFYFITIKSTVLALMNKPAKFIVTPKV	480
CUPV22	FSQSLVDTVFHLTNGMKFLDLLIYEVE SMLLYGSFYFITIKSTVLALMNKPAKFIVTPKV	480
CUPV221	NEHITFLH <b>A</b> IRNHYQGILFSIFTTIIACIAISGSYWVLLSFIPGCFGFLFEMQANHRTSEE	540
CUPV22	NEHITFLH <b>T</b> IRNHYQGILFSIFTTIIACIAISGSYWVLLSFIPGCFGFLFEMQANHRTSEE	540
CUPV221	QIKADKLSYNNKALQSGNTETVDWND	567
CUPV22	QIKADKLSYNNKALQSGNTETVDWND	567

Se indican en amarillo los aminoácidos diferentes en las secuencias comparadas.

+, indica cambio de aminoácido conservativo.

Comparación de las secuencias aminoacídicas de las glicosil transferasas (GTF) de *P. parvulus* CUPV1 y *P. parvulus* CUPV22

CUPV1	MLNDNDELKFFHLFHSKPVFVPVILI IWLFI MCLYEYLYTYTDSILPILAKKQPLEVILP	60
CUPV22	MLNDNDELKFFHLFHSKPVFVPVILI IWLFI MCLYEYLYTYTDSILPILAKKQPLEVILP	60
CUPV1	IFNQLFVALFFLLGITNII IAIRYAMIKDKAKESELAILAKETPADWHPKVELLYTTYND	120
CUPV22	IFNQLFVALFFLLGITNII IAIRYAMIKDKAKESELAILAKETPADWHPKVELLYTTYND	120
CUPV1	FIPYALAQLCKQTYDNTQGVILDNSTDPKYIKMIDDFVIAHPNVKLRVDSQNKHAKAGNL	180
CUPV22	FIPYALAQLCKQTYDNTQGVILDNSTDPKYIKMIDDFVIAHPNVKLRVDSQNKHAKAGNL	180
CUPV1	NNYLCNGTHDYDYFVILDSDELLENRFVEKCLKMFYNDIGILQCNHISGQNHNSFMRTF	240
CUPV22	NNYLCNGTHDYDYFVILDSDELLENRFVEKCLKMFYNDIGILQCNHISGQNHNSFMRTF	240
CUPV1	SSSGNIFWPVQNVVRSVEGGWLNKTVSGVSVGQTGGALCIELGHGVMISRECFEDIGQIP	300
CUPV22	SSSGNIFWPVQNVVRSVEGGWLNKTVSGVSVGQTGGALCIELGHGVMISRECFEDIGQIP	300
CUPV1	YAVAEDLCTSIEATLKGWNIK FASQIYGNEAFPVNMAALMIRSSKFC SANFEFFKKYSAR	360
CUPV22	YAVAEDLCTSIEATLKGWNIK FASQIYGNEAFPVNMAALMIRSSKFC SANFEFFKKYSAR	360
CUPV1	IIKSKTISLYQKIDLFCFTLSVPISAFQYISLVITSII CPVLHIPLVTQLFMLLPTLV CY	420
CUPV22	IIKSKTISLYQKIDLFCFTLSVPISAFQYISLVITSII CPVLHIPLVTQLFMLLPTLV CY	420
CUPV1	FSQSLVDTV FHLTNGMKFLDLLIYEVE SMLLYGSFYFITIKSTVLALMNKPAKFIVTPKV	480
CUPV22	FSQSLVDTV FHLTNGMKFLDLLIYEVE SMLLYGSFYFITIKSTVLALMNKPAKFIVTPKV	480
CUPV1	NEHITFLHTIRNHYQGILFSIFTIIACIAISGSYWVLLSFIPGCFGFLFEMQANHRTSEE	540
CUPV22	NEHITFLHTIRNHYQGILFSIFTIIACIAISGSYWVLLSFIPGCFGFLFEMQANHRTSEE	540
CUPV1	QIKADKLQSYNNKALQSGNTETVDWND	567
CUPV22	QIKADKLQSYNNKALQSGNTETVDWND	567

## **ANEXO III**

---







## Glycerol metabolism and bitterness producing lactic acid bacteria in cidermaking

G. Garai-Ibabe <sup>a,\*</sup>, I. Ibarburu <sup>a</sup>, I. Berregi <sup>a</sup>, O. Claisse <sup>b</sup>,  
A. Lonvaud-Funel <sup>b</sup>, A. Irastorza <sup>a</sup>, M.T. Dueñas <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Facultad de Ciencias Químicas, Dpto de Química Aplicada, Paseo Manuel de Lardizabal 3, 20018, San Sebastián, Spain

<sup>b</sup> UMR Oenologie-Ampélogie; INRA; Université Victor Segalen Bordeaux 2, 351, Cours de la Libération, 33405, Talence Cedex, France

Received 21 November 2006; received in revised form 27 September 2007; accepted 2 November 2007

### Abstract

Several lactic acid bacteria were isolated from bitter tasting ciders in which glycerol was partially removed. The degradation of glycerol via glycerol dehydratase pathway was found in 22 out of 67 isolates. The confirmation of glycerol degradation by this pathway was twofold: showing their glycerol dehydratase activity and detecting the presence of the corresponding gene by a PCR method. 1,3-propanediol (1,3-PDL) and 3-hydroxypropionic acid (3-HP) were the metabolic end-products of glycerol utilization, and the accumulation of the acrolein precursor 3-hydroxypropionaldehyde (3-HPA) was also detected in most of them. The strain identification by PCR-DGGE *rpoB* showed that *Lactobacillus collinoides* was the predominant species and only 2 belonged to *Lactobacillus diolivorans*. Environmental conditions conducting to 3-HPA accumulation in cidermaking were studied by varying the fructose concentration, pH and incubation temperature in *L. collinoides* 17. This strain failed to grow with glycerol as sole carbon source and the addition of fructose enhanced both growth and glycerol degradation. Regarding end-products of glycerol metabolism, 1,3-PDL was always the main end-product in all environmental conditions assayed, the only exception being the culture with 5.55 mM fructose, where equimolar amounts of 1,3-PDL and 3-HP were found. The 3-HPA was transiently accumulated in the culture medium under almost all culture conditions, the degradation rate being notably slower at 15 °C. However, no disappearance of 3-HPA was found at pH 3.6, a usual value in cider making. After sugar exhaustion, *L. collinoides* 17 oxidated lactic acid and/or mannitol to obtain energy and these oxidations were accompanied by the removal of the toxic 3-HPA increasing the 1,3-PDL, 3-HP and acetic acid contents.

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** Lactic acid bacteria; Glycerol; Bitterness; 3-Hydroxypropionaldehyde; Cider

### 1. Introduction

In the Basque Country (Northern Spain), natural ciders are produced in small cider factories using exclusively fresh cider apples and without sugar and CO<sub>2</sub> addition. Cidermaking process starts in October–November and apple juices are obtained from the pressing of numerous varieties of cider apples. Juices are fermented in small tanks (5000 to 10,000 l) to dryness and usual oenological procedures (sulphur dioxide treatment, clarification or correction of the acidity) are not applied. The alcoholic and malolactic fermentation occur spontaneously with

indigenous yeasts and lactic acid bacteria of the musts (Del Campo et al., 2003). The content of the main components of apple juices and ciders are showed in Table 1.

After alcoholic and malolactic fermentation, high levels of a fundamentally heterofermentative lactic microbiota is found, with *Lactobacillus* species and *Oenococcus oeni* being the most abundant (Dueñas et al., 1994). Since natural ciders are not microbiologically stabilized, the metabolism of residual carbon sources (fructose, glycerol, lactic acid) by LAB could lead to undesirable alterations such as acetification (Dueñas et al., 1994), ropiness (Dueñas et al., 1995) and bitterness.

In wine and cider, bitterness is an alteration characterized for an unpleasant bitter taste and is associated with the presence of acrolein in these beverages. The combination of acrolein with

\* Corresponding author. Tel.: +34 943 01 5318; fax: +34 943 01 5270.

E-mail address: [gaizka\\_garai@ikasle.ehu.es](mailto:gaizka_garai@ikasle.ehu.es) (G. Garai-Ibabe).

Table 1  
Characteristic values for some chemical parameters of apple musts and ciders

	pH	g l <sup>-1</sup>					
		Density	Fructose	Glycerol	Malic acid	Lactic acid	Acetic acid
Apple must	3.4–3.9	1055–1045	70–95	0	3–8	0	0
Cider	3.5–4.0	1000–997	0–5	3–6	0	3–5	0.5–3

polyphenols leads to the formation of bitter compounds. Lactic acid bacteria belonging to the genus *Lactobacillus* have been described as responsible for this alteration by a particular metabolic pathway of glycerol. This compound is dehydrated to 3-hydroxypropionaldehyde (3-HPA), which can be transformed into acrolein by chemical dehydration under acidic and/or heat conditions (Lonvaud-Funel, 2002). A mixture of monomeric, hydrated monomeric and cyclic dimeric forms of 3-HPA is commonly known as reuterin (Talarico and Dobrogosz, 1989).

Glycerol is, besides ethanol, the main product of fermentation by yeasts during wine and cider production (Lafon-Lafourcade, 1983; Del Campo et al., 2003). It contributes to

smoothness and roundness on the palate and hence, its degradation has a negative influence on the sensorial quality of ciders (Piccinelli, et al., 2000). Glycerol degradation by lactic acid bacteria may occur through two different pathways. It can be assimilated by a glycerol dehydrogenase and a dihydroxyacetone kinase to dihydroxyacetone phosphate (DHAP), which finally reaches the glycolytic pathway ("oxidative branch") (Lonvaud-Funel, 2002). In the reductive branch, however, glycerol is converted into 3-hydroxypropionaldehyde (3-HPA) by coenzyme B<sub>12</sub>-dependent glycerol and diol dehydratases (Talarico and Dobrogosz, 1990; Sauvageot et al., 2002). The 3-HPA can be subsequently reduced to 1,3-propanediol (1,3-PDL)

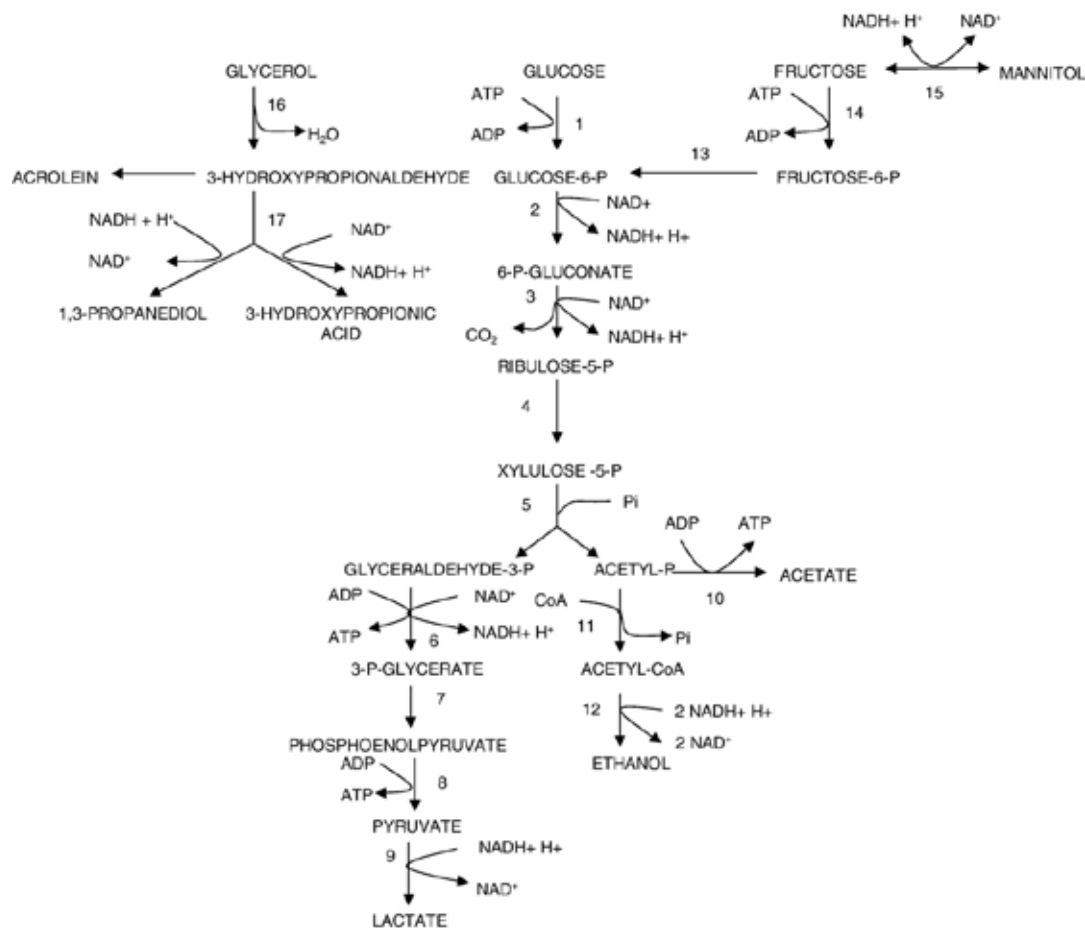


Fig. 1. Proposed pathway of heterolactic fermentation of sugars and glycerol metabolism in *L. collinoides* 17. (1) glucokinase, (2) glucose 6-phosphate dehydrogenase, (3) 6-phosphogluconate dehydrogenase, (4) epimerase, (5) phosphoketolase, (6) glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase and phosphoglycerate kinase, (7) phosphoglyceromutase and enolase, (8) pyruvate kinase, (9) lactate dehydrogenase, (10) acetate kinase, (11) phosphate acetyltransferase, (12) acetaldehyde dehydrogenase and alcohol dehydrogenase, (13) glucose phosphate isomerase, (14) fructokinase, (15) mannitol dehydrogenase, (16) glycerol dehydratase and (17) 1,3-propanediol dehydrogenase.

by a NADH-linked 1,3-propanediol dehydrogenase (Talarico et al., 1990; Veiga da Cunha and Foster, 1992b), or can be oxidized to 3-hydroxypropionic acid (3-HP) (Lonvaud-Funel, 2002) (Fig. 1).

Recently, the study of bitterness in alcoholic beverages has been focused on the lactic acid bacteria involved (Sauvageot et al., 2000; Claisse and Lonvaud-Funel, 2000) and the development of molecular tests to detect lactic acid bacteria producing 3-HPA (Claisse and Lonvaud-Funel, 2001). In the present work, we have studied bitterness producing lactic acid bacteria in natural ciders. Bitter tasting ciders were microbiologically characterized and glycerol-degrading lactobacilli strains were isolated. In order to understand the environmental conditions leading to 3-HPA accumulation in ciders, we studied the influence of the main residual carbon source (fructose) on the glycerol metabolism by *Lactobacillus collinoides* 17. We also examined the effect of the pH and storage temperature of ciders, which are the main variables that could be controlled by the cidemaker.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Microbial counts and isolation of LAB strains from bitter ciders

Six bitter tasting ciders, which showed total or partial degradation of glycerol, were examined. Lactic acid bacteria were quantified in duplicate on Man Rogosa Sharpe (MRS) (Difco, Le Pont de Claix, France) plates (pH 4.8) supplemented with 20% tomato juice and 5 g l<sup>-1</sup> fructose, 50 mg l<sup>-1</sup> pimaricin and 100 mg l<sup>-1</sup> streptomycin were added to eliminate yeasts and acetic acid bacteria respectively. Incubation was done in a CO<sub>2</sub> incubator under air supplemented with 5% CO<sub>2</sub>. Yeast were enumerated in malt agar (Cultimed, Castellar del Vallès, Spain) (pH 4.8) supplemented with 100 mg l<sup>-1</sup> streptomycin and 10 ml l<sup>-1</sup> penicillin G (165,800 UI l<sup>-1</sup>) to inhibit the growth of LAB. Acetic acid bacteria were enumerated in apple juice agar (pH 5) as described by Dueñas et al. (1995). All plates were incubated at 28 °C for 5–8 days.

Approximately 10–12 representative colonies of LAB per sample were selected from the MRS plates and isolates were stored at -80 °C in MRS broth containing 20% glycerol.

### 2.2. Screening of 3-HPA producing lactic acid bacteria

All isolates (67) were tested in duplicate for their ability to consume glycerol and produce 3-HPA in the modified Carr medium described by Claisse and Lonvaud-Funel (2001). All cultures were incubated, unshaken, in completely filled tubes for 7 days, at 28 °C in a CO<sub>2</sub> incubator under air supplemented with 5% CO<sub>2</sub>. Growth was periodically monitored by measuring the optical density at 600 nm. After incubation, cells were harvested by centrifugation and the residual glycerol and their metabolic products (3-HPA, 1,3-PDL and 3-HP) in the supernatants were amounted as indicated below.

### 2.3. Detection of glycerol dehydratase activity

The enzymatic activity of glycerol dehydratase was twice examined in all isolates by the 3-methyl-2-benzothiazolinon hydrazone method (Toraya et al., 1977) and the assays were performed in permeabilized cells, as described by Claisse and Lonvaud-Funel (2001). *Lactobacillus reuteri* CECT 925<sup>T</sup> was used as positive control.

### 2.4. PCR detection of glycerol dehydratase gene

DNAs were extracted from cultures according to the following method. Bacteria were cultivated on MRS liquid medium containing (l<sup>-1</sup> distilled water): Lactobacilli MRS broth (Difco, Le Pont de Claix, France) 27.5 g, D-L malic acid (Prolabo) 5 g, pH 5.0 with 10 N NaOH. After ten days of incubation, biomass was collected by centrifugation (30 min, 10,000 ×g, 4 °C) and the pellet was washed in 2 ml of 10 mM Tris (GenApex)-1 mM EDTA (GenApex) (TE) buffer. After a second centrifugation (10,000 ×g for 15 min at 4 °C), the supernatant was discarded and the pellet re-suspended in 300 µl of 0.5 mM EDTA pH 8. 300 µl of glass beads were added (Ø 0.1 mm) and samples were mixed at 1000 ×g for 15 min. Then 300 µl of nucleolysis (Promega) and 200 µl of protein precipitation solution (Promega) were added and mixed for 20 s. Precipitation of cellular fragments was made on ice for 5 min. After another centrifugation (10,000 ×g for 5 min at 4 °C), the supernatant containing the DNA was transferred to a clean 1.5 ml microcentrifuge tube containing 300 µl of isopropanol. The tube was gently mixed by inversion until a visible mass of DNA could be seen and left at -20 °C for 2 h. After centrifugation (10,000 ×g for 20 min at 4 °C), 300 µl of room temperature 70% ethanol were added to the pellet before a final centrifugation stage (10,000 ×g for 5 min). Ethanol was carefully sucked up and the tube was dried. 50 µl of PPI (Pour Preparation Injectable) water with 1 µl of RNase (Promega) was used to rehydrate DNA overnight at 4 °C. After rehydration, DNAs were stored at -20 °C.

Genomic DNA was examined to detect the glycerol dehydratase encoding gene involved in 3-HPA production, using primers GD1 and GD2 and PCR conditions reported by Claisse and Lonvaud-Funel (2001). DNA from *L. reuteri* CECT 925<sup>T</sup> was used as positive control.

### 2.5. Lactic acid bacteria identification

Identification was done by PCR-DGGE *rpoB* as described by Renouf et al. (2006). *L. collinoides* ATCC 27612 and *Lactobacillus diolivorans* IOEB 0004 were used as references. 16S rRNA sequences of the two *L. diolivorans* strains (listed as 1 and 2 in Table 3) were also produced and compared with the Blast software (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

### 2.6. Analysis of substrates and metabolites

Fructose, glucose, lactic acid, acetic acid, ethanol, glycerol, 1,3-propanediol (1,3-PDL) and 3-hydroxypropionic acid (3-

Table 2  
Microbiological features and some chemical compounds in spoiled ciders

Cider	g l <sup>-1</sup>					CFU ml <sup>-1</sup>		
	Glycerol	1,3-PDL	Malic acid	Lactic acid	Acetic acid	Lactic acid bacteria	Acetic acid bacteria	Yeasts
1	1.11	0.74	0.31	4.21	0.89	0	0	0
2	0.40	1.46	0.03	4.57	2.97	2.10 × 10 <sup>7</sup>	0	0
3	1.40	0.53	0.13	5.31	1.47	1.57 × 10 <sup>7</sup>	0	6.80 × 10 <sup>3</sup>
4	0.14	2.24	0.11	3.95	1.57	0	0	0
5	2.73	0.37	1.03	4.89	0.54	1.24 × 10 <sup>7</sup>	0	0
6	1.43	0.51	0.05	4.79	0.86	2.18 × 10 <sup>7</sup>	0	1.36 × 10 <sup>4</sup>

CFU ml<sup>-1</sup>, colony-forming unit per ml; 1,3-PDL, 1,3-propanediol.

HP) content were measured by HPLC using an ion-exclusion, cation exchange column (Aminex HPX-87H, Biorad) and a UV-VIS and RI detector. The column was eluted with diluted sulphuric acid (pH 2.2) at 65 °C, at a flow rate of 0.6 ml min<sup>-1</sup>. All the analyses were carried out in duplicate.

The quantification of 3-HPA content was based on the colorimetric method of Circle et al. (1945), a method that is specific for acrolein detection. 3-HPA is first dehydrated to acrolein, which in turn reacts with tryptophan to form a purple complex that absorbs light at 560 nm, and the assay was performed according to Slininger et al. (1983). The tubes were incubated at 40 °C in a water bath for 35 min and their absorbance was measured at 560 nm.

### 2.7. Environmental factors influencing glycerol metabolism and 3-HPA production in *L. collinoides* 17

To evaluate the influence of fructose concentrations (5.55, 11.1, 22.2, 33.3, 44.4 and 55.5 mM), the strain was grown in the modified Carr medium at pH 4.8. All other batches were run at different pHs (3.3, 3.6, 3.9 and 4.8) and temperatures (15 or 28 °C) in the same medium, with 5.55 mM of both glucose and fructose. The strain was cultivated in MRS broth and used as preculture to inoculate the fermentation media. The cultures were incubated, unless otherwise indicated, unshaken, in completely filled tubes, at 28 °C in a CO<sub>2</sub> incubator under air supplemented with 5% CO<sub>2</sub>. For each of the conditions examined, several tubes were incubated simultaneously in order to avoid aeration due to sampling. Growth was monitored by measuring the optical density at 600 nm and cells were harvested by centrifugation. Residual substrates and metabolic end-products were determined by HPLC, as indicated above. Duplicate experiments were performed for each culture condition.

## 3. Results

### 3.1. Isolation and screening of 3-HPA producing lactic acid bacteria

Six spoiled ciders were examined for several chemical compounds and microbiological features. The results are shown in Table 2. In some of these ciders, high numbers of lactic acid bacteria around 10<sup>6</sup>–10<sup>7</sup> CFU ml<sup>-1</sup> were accounted as main population, but in ciders 1 and 4 no more viable LAB were found. L-malic acid contents were very low, indicating that all

ciders had undergone the malolactic fermentation. The glycerol produced during apple juice fermentation, which usually ranges between 3 and 6 g l<sup>-1</sup> was partially or totally degraded to levels of 0.14–2.73 g l<sup>-1</sup>. Variable amounts of 1,3-propanediol were detected in all ciders, indicating the presence of LAB with glycerol dehydratase activity.

67 lactic acid bacteria were isolated from these spoiled ciders and isolates were inoculated in the modified Carr medium to evaluate their ability to degrade glycerol and produce 3-hydroxypropionaldehyde (3-HPA), 3-hydroxypropionic acid (3-HP) and 1,3-propanediol (1,3-PDL) (Table 3). Glycerol dehydratase activity was tested in permeabilized cells, grown previously in MRS modified broth. In addition, PCR amplification with primers GD1 and GD2 was used to detect the presence of the glycerol dehydratase gene in the bacterial genome of the glycerol consuming strains. 55 isolates degraded glycerol to various levels (from 6 to 100%), although glycerol dehydratase

Table 3  
LAB strains isolated from bitter ciders showing glycerol metabolism via glycerol dehydratase

Species	Glycerol consumption (%)	3-HPA (mM)	3-HP (mM)	1,3-PDL (mM)	GDH activity	PCR
1 <i>L. diolivorans</i>	84.3	0	22.0	39.2	+	+
2 <i>L. diolivorans</i>	88.4	0	22.6	40.2	+	+
3 <i>L. collinoides</i>	77.6	10.1	16.4	23.5	+	+
4 <i>L. collinoides</i>	82.5	11.5	13.4	16.1	+	+
5 <i>L. collinoides</i>	88.4	0.5	14.2	21.6	+	+
6 <i>L. collinoides</i>	87.8	6.6	14.2	22.5	+	+
7 <i>L. collinoides</i>	100	0	31.3	37.1	+	+
8 <i>L. collinoides</i>	83.6	10.2	15.1	23.9	+	+
9 <i>L. collinoides</i>	74.9	10.4	15.0	21.9	+	+
10 <i>L. collinoides</i>	90.6	7.1	19.6	25.3	+	+
11 <i>L. collinoides</i>	77.3	9.2	14.9	23.9	+	+
12 <i>L. collinoides</i>	90.8	8.5	15.9	24.2	+	+
13 <i>L. collinoides</i>	78.4	10.2	12.4	20.2	+	+
14 <i>L. collinoides</i>	63.2	8.6	9.8	16.8	+	+
15 <i>L. collinoides</i>	100	0	28.7	41.5	+	+
16 <i>L. collinoides</i>	92.4	10.5	17.5	26.1	+	+
17 <i>L. collinoides</i>	87.3	12.3	10.9	21.4	+	+
18 <i>L. collinoides</i>	89.6	9.7	13.8	21.9	+	+
19 <i>L. collinoides</i>	81.9	10.5	11.7	20.3	+	+
20 <i>L. collinoides</i>	100	0	27.4	40.8	+	+
21 <i>L. collinoides</i>	83.2	10.1	13.0	22.1	+	+
22 <i>L. collinoides</i>	88.3	2.0	11.7	20.7	+	+
23 <i>L. reuteri</i>	12.9	3.1	3.5	6.0	+	+
CECT 925 <sup>†</sup>						

3-HPA, 3-hydroxypropionaldehyde; 3-HP, 3-hydroxypropionic acid; 1,3-PDL, 1,3-propanediol and GDH, glycerol dehydratase.

activity was only present in 22 of them. In these last isolates a 279 pb amplicon was also detected, which corresponds to a fragment of glycerol dehydratase gene sequence. They were identified by PCR-DGGE analysis resulting that 20 belonged to *L. collinoides* species and 2 to *L. diolivorans*. In all these isolates, glycerol degradation proceeded with 1,3-PDL and 3-HP production, and 3-HPA accumulation was also detected in 17 of them. Among these, the strain *L. collinoides* 17 was selected for subsequent studies, due to the large amount of 3-HPA found.

### 3.2. Influence of fructose concentration on glycerol metabolism

Since fructose is the residual sugar in the fermentation of apple musts, *L. collinoides* 17 was grown in media containing variable fructose concentrations (from 0 to 55.5 mM, at pH 4.8) and with the same glycerol amount (55.5 mM) (Fig. 2). No glycerol degradation or growth was detected when this compound was used as sole carbon source. The addition of fructose stimulated glycerol degradation which was totally consumed, irrespective of the initial amount of this sugar in the culture

media (Fig. 2E). In all assays, fructose was totally consumed (Fig. 2H) and growth was improved by increasing the fructose concentration from 5.55 to 22.2 mM. At latter or higher concentrations, similar growth patterns and biomass yields close to OD<sub>600</sub> of 2.5 were found (Fig. 2G).

Glycerol bioconversion started at the beginning of the growth phase, although most of it was degraded between 18 and 27 h. For fructose concentration of 5.55 mM, glycerol conversion rate was slower due to a lower biomass. In the cultures with sugar concentrations higher than 22.2 mM, this rapid degradation occurred in presence of large amounts of fructose. 1,3-PDL and 3-HP were detected as soon as the glycerol consumption started, but at this time no extracellular 3-HPA accumulation was noticed (Fig. 2A, B and D). The accumulation of 3-HPA began in the late exponential growth phase and its concentration peaked after 27 h of incubation. Maximal amounts of 3-HPA were similar (around 6 mM), irrespective of the initial fructose concentrations, with the only exception observed for the culture grown with 5.55 mM fructose (2.6 mM). In all assays, 3-HPA levels decreased and disappeared from the growth medium after prolonged incubation. This decrease, together with the degradation of the residual

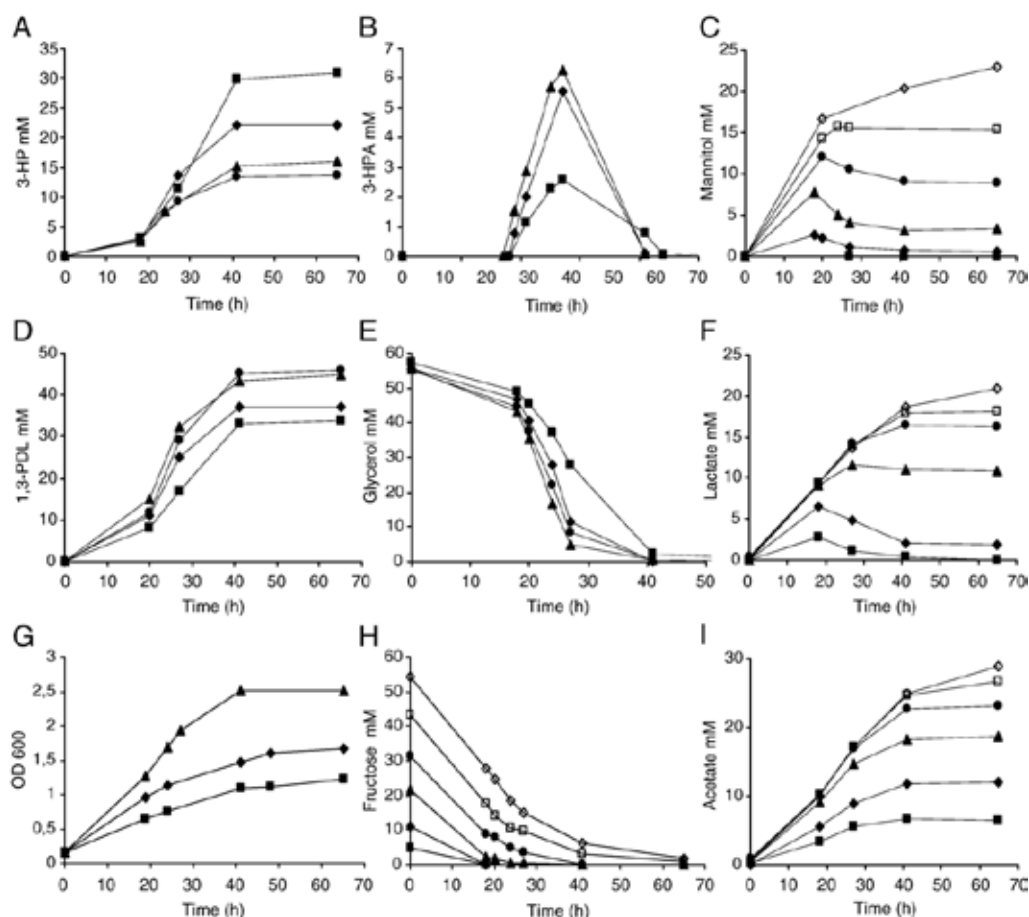


Fig. 2. Influence of different fructose concentrations (5.5 mM ■, 11.1 mM ◆, 22.2 mM ▲, 33.3 mM ●, 44.4 mM □, and 55.5 mM ◇) on growth, metabolism of glycerol (55.5 mM) and fermentation products by *L. collinoides* 17 in modified Carr medium (pH 4.8) at 28 °C. To improve figures, the corresponding results obtained at fructose concentrations higher than 33.3 mM (Fig. 2A, D and E) and 22.2 mM (Fig. 2B and G) were omitted.

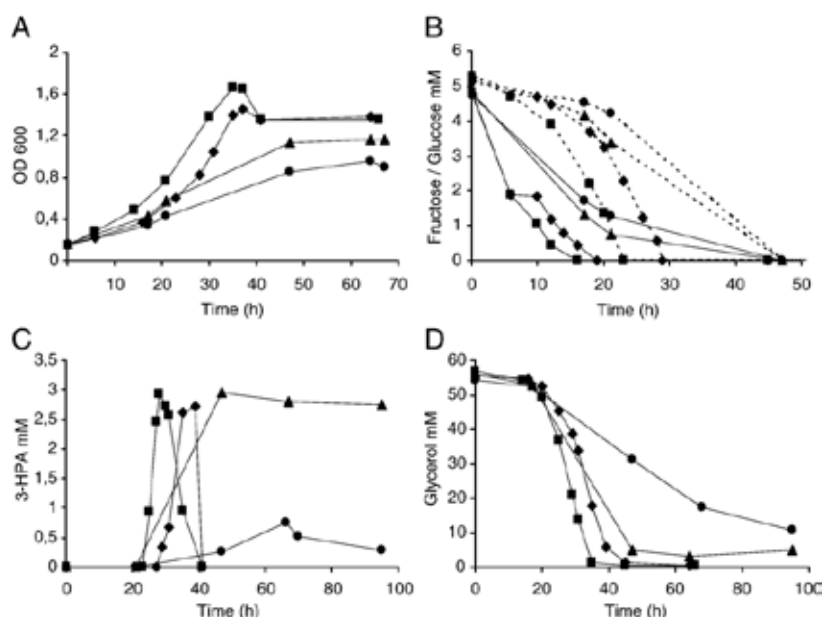


Fig. 3. Influence of different pH values (4.8 ■, 3.9 ◆, 3.6 ▲, 3.3 ●) on growth, sugars evolution and metabolism of glycerol (55.5 mM) by *L. collinoides* 17 in modified Carr medium with 5.5 mM of both fructose and glucose at 28 °C. Solid lines (—) indicate OD<sub>600</sub>, 3-HPA, fructose and glycerol. Dashed line (---) indicates glucose concentration.

glycerol, was accompanied by increasing amounts of 1,3-PDL and 3-HP. With 5.55 mM fructose, the final production of these end-products was almost equimolar. However, in cultures with higher fructose concentrations, 1,3-PDL was always the main end-product.

*L. collinoides* 17 ferments glucose and fructose by the heterolactic pathway with production of ethanol and lactic and acetic acids, and the relative amounts depend on sugar type (data not shown). The addition of glycerol determined a substantial decrease in ethanol production and, hence, very low amounts (<1 mM) were detected. Regarding acetic acid and lactic acid formation (Fig. 2F, and I), similar amounts were synthesized at the lowest fructose concentrations (5.55 and 11.1 mM). After sugar depletion, glycerol-lactic acid cofermentation took place and consequently, lactic acid contents decreased together with inversely correlated increase of acetic acid contents ( $r=0.834$  and  $0.984$  respectively). However, when *L. collinoides* 17 was cultivated with initial concentrations of fructose higher than 11.1 mM, no degradation of lactic acid occurred. In addition, fructose was also converted to mannitol, except in the cells grown with 5.55 mM (Fig. 2C) and this conversion ranged from 35 to 41% for fructose concentrations between 22.2 and 55.5 mM. Mannitol was mainly synthesized during the early fermentation period and its late evolution was related to the initial sugar concentration. Thus, in the assays with 11.1, 22.2 and 33.3 mM of fructose, mannitol was partially removed when the sugar became limited and the decreases correlated well with the concomitant increases of acetic acid ( $r=0.936$ ,  $0.967$  and  $0.981$ , respectively). However, for higher initial concentrations (44.4 and 55.5 mM) slight increases of mannitol were detected while fructose was available.

### 3.3. Influence of pH and temperature on glycerol metabolism

With the aim to avoid 3-HPA formation, we studied the influence of some variables that can be controlled in cidermaking: storage temperature and pH. The control of this last parameter could be accomplished by acidity adjustment of ciders. We tested a pH range from 3.3 to 3.9, covering the values usually found in natural ciders and the assays were performed in a culture medium containing 5.55 mM fructose and glucose, and 55 mM glycerol at 28 °C. This medium was also used to evaluate the interaction between a low storage temperature (15 °C) and a pH of 3.9.

As shown in Fig. 3, a reduction of bacterial growth and a slowing down of the use of sugar and glycerol was observed as pH decreased from 4.8 to 3.3. Indeed, glycerol was not totally consumed at pH 3.3 and 3.6 (Table 4). Fructose consumption rate was higher than that detected for glucose, and both sugars were totally used in all cultures (Fig. 3B). No mannitol

Table 4

Influence of pH on glycerol metabolism and end-product profile from sugars (glucose 5 mM+ fructose 5 mM) by *L. collinoides* 17

pH	Incubation hours	OD <sub>600</sub>	Glycerol consumption (%)	End-products (mM)				
				Lactate		Acetate	1,3-PDL	3-HP
				Maximal	Final			
4.8	66	1.66	100	7.54	1.08	11.5	39.0	23.7
3.9	64	1.45	100	6.47	0.61	12.5	39.2	21.7
3.6	160	1.26	93.4	n.d.*	1.06	13.6	36.9	15.2
3.3	160	0.95	79.6	n.d.	0.88	14.4	34.9	13.3

n.d.\*, not determined; OD<sub>600</sub>, optical density at 600 nm; 1,3-PDL, 1,3-propanediol; 3-HP, 3-hydroxypropionic acid.

Table 5  
Influence of temperature on glycerol metabolism and end-product profile from sugars (glucose 5 mM+ fructose 5 mM) by *L. collinoides* 17

Temp. °C	Incubation hours	OD <sub>600</sub>	Glycerol consumption (%)	End-products (mM)						
				Lactate		Acetate	1,3-PDL	3-HP	3-HPA	
				Maximal	Final				Maximal	Final
28	66	1.45	100	6.47	0.61	12.5	39.0	6.47	2.72	0
15	399	1.12	97.9	8.04	2.25	12.5	39.2	8.04	1.33	0

OD<sub>600</sub>, optical density at 600 nm; 1,3-PDL, 1,3-propanediol; 3-HP, 3-hydroxypropionic acid; 3-HPA, 3-hydroxypropionaldehyde.

formation was detected at the different pHs. After sugar total exhaustion concomitant with glycerol conversion, *L. collinoides* 17 began to consume the lactate formed during the early growth period and its disappearance was well correlated with the production of acetate. 1,3-PDL was the main end-product of glycerol metabolism and the final production, between 35 and 39 mM, was similar at different pHs (Table 4). However, 3-HP synthesis was dependent on pH, since slightly lower amounts of this acid were detected at pHs 3.3 and 3.6 (Table 4). Hence, the ratio 1,3-PDL to 3-HP raised with the decrease of pH value, from 1.64 at pH 4.8 to 2.62 at pH 3.3. Lower pHs also seemed to delay the beginning of 3-HPA accumulation and its production was strongly reduced at pH 3.3 (Fig. 3C). At pHs 3.9 and 4.8, 3-HPA was removed from the culture medium but not at pH 3.6 and 3.3.

Similar to that found for low pHs, decreasing the incubation temperature (15 °C) determined a strong reduction of sugars and glycerol consumption rates, because of the specific growth rate decrease (data not shown). As a consequence, the production rate of 1,3-PDL and 3-HP was slower. Finally and after a prolonged incubation period, similar amounts were found to those obtained at 28 °C, 1,3-PDL being the main end-product of glycerol transformation (Table 5). 3-HPA production at 15 °C was half of that detected at 28 °C. Notably, it was accumulated in the growth medium for a longer extent of time but it finally disappeared after a prolonged incubation period.

#### 4. Discussion

In this work, several spoiled ciders, in which glycerol had been partially or totally degraded and presented bitter taste compounds, were studied. The detection of variable concentrations of 1,3-propanediol indicated that undesirable LAB with an active glycerol dehydratase pathway were present in these ciders. This pathway is responsible for the synthesis of 3-HPA, which in time could form acrolein and generated bitterness. High levels of lactic acid bacteria are usually found in natural ciders (Dueñas et al., 1995), as well as in some of the spoiled ciders examined. Surprisingly, in two of them no viable cells were amount, indicating a possible inhibition of growth by the toxic 3-HPA (Vollenweider and Lacroix, 2004).

Several lactic acid bacteria were isolated from these spoiled ciders. To test their ability to degrade glycerol, isolates were grown, under anaerobic conditions, in a medium with limited sugar concentration and in presence of glycerol amounts that could be found in natural ciders (55 mM). Glycerol utilization was detected in most of them (82%), but only 40% were able to

degrade glycerol through the glycerol dehydratase pathway, with 3-HPA synthesis. The other glycerol consuming strains could use the oxidative branch, which leads to lactic acid production (Lonvaud-Funel, 2002). Similar to that found in French ciders (Sauvageot et al., 2000; Claisse and Lonvaud-Funel, 2000), *L. collinoides* was the predominant 3-HPA producing species in spoiled ciders. But *Lactobacillus diolivorans* was also found as minority ones. Both heterofermentative species have been related with other alterations of natural cider named ropiness (Werning et al., 2006). *L. diolivorans* has also been isolated from wines which contained acrolein (Gorga et al., 2002) but not from French ciders. As end-products of glycerol fermentation, all strains produced 1,3-PDL and 3-HP in appreciable amounts, together with smaller quantities of 3-HPA.

*L. collinoides* 17 was selected to study the influence of fructose concentration, pH and temperature on glycerol catabolism and 3-HPA accumulation. Like other lactobacilli isolated from wine (Lonvaud-Funel, 2002; Schutz and Radler, 1984) and French ciders (Claisse and Lonvaud-Funel, 2000; Sauvageot et al., 2000), this strain failed to grow with glycerol as the sole carbon source, due to the lack of the oxidative pathway of glycerol degradation. However, the presence of sugar stimulated the glycerol metabolism by the glycerol dehydratase pathway. In this way, glycerol is dehydrated to 3-HPA (enzyme 16, Fig. 1), which plays as a hydrogen acceptor, and is subsequently reduced to 1,3-PDL by a 1,3-propanediol dehydrogenase (enzyme 17, Fig. 1), regenerating the NAD<sup>+</sup> necessary to continue the sugar catabolism, via the 6-phosphogluconate pathway. As a consequence, a shift from ethanol to acetate synthesis was detected, similar to that described by Lüthi-Peng et al. (2002) in *L. reuteri*. In addition, *L. collinoides* 17 also oxidized 3-HPA to produce 3-HP, contrarily to that reported for *L. collinoides* isolated from French ciders (Gorga et al., 2002) and for *L. brevis* and *L. buchneri* from wine and sour dough respectively (Schutz and Radler, 1984). Sobolov and Smiley (1960) and Talarico et al. (1988) reported for *L. reuteri* and *L. brevis* that 3-HPA was converted to equimolar quantities of 1,3-PDL and 3-HP by an aldehydic dismutation of 3-HPA when glycerol fermentation occurred in absence of sugar. The same behaviour was found for *L. collinoides* 17 only when cultivated with very low fructose concentration (5.55 mM). However, glycerol cofermentation with higher sugar concentration produced 1,3-propanediol as a main end-product, similar to that observed in *L. reuteri* (Talarico et al., 1988). To explain the presence of the appreciable levels of 3-HP, our results suggest that the 1,3-propanediol dehydrogenase

(enzyme 17, Fig. 1), besides reducing 3-HPA to 1,3-PDL, is also able of catalysing the dismutation of the 3-HPA to 1,3-propanediol and 3-hydroxypropionic acid. In this line, alcohol dehydrogenases producing equimolar contents of the corresponding alcohol and acid by dismutation of aldehydes, have been reported (Mee et al., 2005; Velonia and Smonou, 2000). Both reduction and dismutation of 3-HPA could provide the bacterium with a means of decreasing the concentration of this toxic aldehyde within the cell. Or an aldehyde dehydrogenase may use the 3-HPA as a substrate to generate 3-HP.

Regarding the acrolein precursor 3-HPA, it was transiently accumulated, reaching maximum amounts lower than 6 mM. It has been reported that 3-HPA begins to accumulate when NADH production ceases, which occurs when all sugar is metabolized (Sauvageot et al., 2000). However, our results showed that the accumulation of 3-HPA started while fructose was still present in the growth medium. In these conditions, fructose was used as a main electron acceptor to reoxidate NADH, thus producing mannitol. As a consequence, the NAD<sup>+</sup>/NADH ratio could increase, allowing 3-HPA accumulation. These results agreed with those reported by Lüthi-Peng et al. (2002), who found that the NAD<sup>+</sup>/NADH ratio positively correlated with 3-HPA accumulation in *L. reuteri*.

After transient accumulation, 3-HPA finally disappeared under almost all culture conditions, the degradation rate being notably slower at 15 °C. The NADH necessary for reduction of 3-HPA, after fructose exhaustion, may arise from the removal of lactate (in fermentations with 5.55 and 11.1 mM) or mannitol (in fermentations performed with 11.1, 22.2 and 33.3 mM), as has been described by other authors for lactobacilli (Claisse and Lonvaud-Funel, 2000; Veiga da Cunha and Foster, 1992a). Apart from the reduction of the toxic 3-HPA, lactate and mannitol-glycerol cometabolisms could provide an additional ATP source to continue with the cellular growth and generate acetate from acetyl-phosphate, thus explaining the higher amounts of acetate in pH limiting conditions. In natural ciders, decreases of lactic acid and glycerol content have been reported throughout maturation period, in which lactic acid bacteria constitutes the main microbiote (Dueñas et al., 2002; Garai et al., 2006). These results indicate the usual presence of glycerol using lactic acid bacteria, contributing to the acetification and bitterness of natural ciders.

The only two exceptions, in which no 3-HPA disappearance took place, were the fermentations performed at pHs 3.3 and 3.6. Thus, for *L. collinoides* 17, culture pH appeared as a parameter that strongly influenced 3-HPA accumulation. The stability of the toxic 3-HPA at low pHs might possibly be due to the more acidic conditions that could enhance the transformation of 3-HPA into acrolein (Vollenweider and Lacroix, 2004) and/or the starvation conditions during 3-HPA accumulation period, due to the lack of carbon sources.

In this work, we found that heterofermentative lactobacilli, and mainly *L. collinoides* species, were involved in bitterness production via glycerol dehydratase pathway. The composition of natural cider with fructose and glycerol as residual carbon sources, is favourable to the glycerol metabolism and the accumulation of 3-HPA in *L. collinoides*. However, the toxic 3-HPA

can be eliminated due to the degradation of mannitol and lactic acid with the detrimental increase of acetic acid content. Our results support that the more acidic pH of ciders and/or the usually cold temperatures during the maturation period, could enhance the maintenance of 3-HPA in the medium, and so, contribute to its transformation into acrolein and the appearance of bitterness. Hence, microbiological stabilization must be performed after malolactic fermentation to eliminate spoiling LAB and avoid bitterness in ciders.

#### Acknowledgements

The work at the UPV was partially supported by the Gobierno Vasco, Fondo de Cooperación Aquitania-Euskadi, the Diputación de Gipuzkoa, Programa Red Gipuzkoana de Ciencia, Tecnología e Innovación (cofinanced by the European Union) and UPV-EHU (00221.215-T15899/2004). Gaizka Garai acknowledges the Gobierno Vasco (Dpto. Agricultura, Pesca y Alimentación) for the predoctoral fellowship.

#### References

- Circle, S.J., Stone, L., Boruff, C.S., 1945. Acrolein determination by means of tryptophane. *Industrial and Engineering Chemistry. Analytical Edition* 17, 259–262.
- Claisse, O., Lonvaud-Funel, A., 2000. Assimilation of glycerol by a strain of *Lactobacillus collinoides* isolated from cider. *Food Microbiology* 17, 513–519.
- Claisse, O., Lonvaud-Funel, A., 2001. Primers and a specific DNA probe for detecting lactic acid bacteria producing 3-hydroxypropionaldehyde from glycerol in spoiled ciders. *Journal of Food Protection* 64, 833–837.
- Del Campo, G., Santos, J.I., Berregi, I., Velasco, S., Ibarburu, I., Dueñas, M.T., Irastorza, A., 2003. Ciders produced by two types of presses and fermented in stainless steel and wooden vats. *Journal of the Institute of Brewing* 109, 342–348.
- Dueñas, M., Irastorza, A., Fernández, C., Bilbao, A., Huerta, A., 1994. Microbial populations and malolactic fermentation of apple cider using traditional and modified methods. *Journal of Food Science* 59, 1060–1064.
- Dueñas, M., Irastorza, A., Fernández, C., Bilbao, A., 1995. Heterofermentative lactobacilli causing ropiness in Basque Country Ciders. *Journal of Food Protection* 58, 76–80.
- Dueñas, M., Irastorza, A., Munate, A., Santos, J.I., Berregi, I., del Campo, G., 2002. Influence of enzymatic clarification with a pectin methylsterase on cider fermentation. *Journal of the Institute of Brewing* 108, 243–247.
- Garai, G., Dueñas, M.T., Irastorza, A., Martín-Álvarez, P.J., Moreno-Arribas, M.V., 2006. Biogenic amines in natural ciders. *Journal of Food Protection* 69, 3006–3012.
- Gorga, A., Claisse, O., Lonvaud-Funel, A., 2002. Organisation of the genes encoding glycerol dehydratase of *Lactobacillus collinoides*, *Lactobacillus hilgardii* and *Lactobacillus diolivorans*. *Sciences des Aliments* 22, 151–160.
- Lafon-Lafourcade, S., 1983. Wine and brandy. In: Reed, G. (Ed.), *Biotechnology*, vol. 5. Verlag-Chemie, Heidelberg, pp. 81–163.
- Lonvaud-Funel, A., 2002. Lactic acid bacteria in winemaking: influence on sensorial and hygienic quality. In: Singh, V.P., Stapleton, R.D. (Eds.), *Biotransformations: bioremediation technology for health and environmental protection*. Progress in Industrial Microbiology, vol. 36. Elsevier Science, Amsterdam, pp. 231–262.
- Lüthi-Peng, Q., Dileme, F.B., Puhon, Z., 2002. Effect of glucose on glycerol bioconversion by *Lactobacillus reuteri*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 59, 289–296.
- Mee, B., Kelleher, D., Frias, J., Malone, R., Tipton, K.F., Henahan, G.T.M., Windle, H.J., 2005. Characterization of cinnamyl alcohol dehydrogenase of *Helicobacter pylori*. *FEBS Journal* 272, 1255–1264.



- Piccinelli, A., Suarez, B., Moreno, J., Rodriguez, R., Caso-Garcia, L.M., Mangas, J.J., 2000. Chemical characterization of Asturian cider. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48, 3997–4002.
- Renouf, V., Claisse, O., Lonvaud-Funel, A., 2006. *rpoB* gene: a target for identification of LAB cocci by PCR-DGGE and melting curves analyses in real time PCR. *Journal of Microbiological Methods* 67, 162–170.
- Sauvageot, N., Pichereaur, V., Louarme, L.C., Hartke, A., Auffray, Y., Laplace, J.M., 2002. Purification, characterization and subunits identification of diol dehydratase of *Lactobacillus collinoides*. *European Journal of Biochemistry* 269, 5731–5737.
- Sauvageot, N., Gouffi, K., Laplace, J.-M., Auffray, Y., 2000. Glycerol metabolism in *Lactobacillus collinoides*: production of 3-hydroxypropionaldehyde, a precursor of acrolein. *International Journal of Food Microbiology* 55, 167–170.
- Schutz, H., Radler, F., 1984. Anaerobic reduction of glycerol to propanediol 1,3 by *Lactobacillus brevis* and *Lactobacillus buchneri*. *Systematic and Applied Microbiology* 5, 169–178.
- Slininger, P., Bothast, R.J., Smiley, K., 1983. Production of 3-hydroxypropionaldehyde from glycerol. *Applied and Environmental Microbiology* 46, 62–67.
- Sobolov, M., Smiley, F.A., 1960. Metabolism of glycerol by an acrolein-forming *Lactobacillus*. *Journal of Bacteriology* 79, 261–266.
- Talarico, T.D., Casas, I.A., Chung, T.C., Dobrogosz, W.J., 1988. Production and isolation of reuterin, a growth inhibitor produced by *Lactobacillus reuteri*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 33, 674–679.
- Talarico, T.L., Dobrogosz, W.J., 1989. Chemical characterization of an antimicrobial substance produced by *Lactobacillus reuteri*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 32, 1854–1858.
- Talarico, T.L., Dobrogosz, W.J., 1990. Purification and characterization of glycerol dehydratase from *Lactobacillus reuteri*. *Applied and Environmental Microbiology* 56, 1195–1197.
- Talarico, T.L., Axelsson, L.T., Novotny, J., Finzat, M., Dobrogosz, W.J., 1990. Utilization of glycerol as an hydrogen acceptor by *Lactobacillus reuteri*: purification of 1,3-propanediol NAD<sup>+</sup> oxidoreductase. *Applied and Environmental Microbiology* 56, 943–948.
- Toraya, T., Ushio, K., Fukui, S., Hogenkamps, H.P.C., 1977. Studies on the mechanism of adenosylcobalamin-dependent diol dehydratase reaction by the use of analogs of the coenzyme. *Journal of Biochemistry* 252, 963–970.
- Veiga da Cunha, M., Foster, M.A., 1992a. Sugar-glycerol cofermentation in lactobacilli: the fate of lactate. *Journal of Bacteriology* 174, 1013–1019.
- Veiga da Cunha, M., Foster, M.A., 1992b. 1,3-propanediol: NAD<sup>+</sup> oxidoreductases of *Lactobacillus brevis* and *Lactobacillus buchneri*. *Applied and Environmental Microbiology* 58, 2005–2010.
- Velonia, K., Smonou, I., 2000. Dismutation of aldehydes by alcohol dehydrogenases. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*, 2283–2287.
- Vollenweider, S., Lacroix, C., 2004. 3-hydroxypropionaldehyde: applications and perspectives of biotechnological production. *Applied Microbiology and Biotechnology* 64, 16–27.
- Werning, M.L., Ibarburu, I., Dueñas, M.T., Irastorza, A., Navas, J., López, P., 2006. *Pediococcus parvulus* *gtf* gene encoding the GTF glycosyltransferase and its application for specific PCR detection of β-D-glucan-producing bacteria in foods and beverages. *Journal of Food Protection* 69, 161–169.



## Biogenic Amines in Natural Ciders

G. GARAI,<sup>1</sup> M. T. DUEÑAS,<sup>1</sup> A. IRASTORZA,<sup>1</sup> P. J. MARTÍN-ÁLVAREZ,<sup>2</sup> AND M. V. MORENO-ARRIBAS<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Química Aplicada, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad del País Vasco, Box 1072, 20080 San Sebastián, Spain; and  
<sup>2</sup>Instituto de Fermentaciones Industriales, CSIC, Juan de la Cierva 3, 28006 Madrid, Spain

MS 06-204: Received 7 April 2006/Accepted 14 June 2006

### ABSTRACT

Biogenic amines play an important physiological role in mammals, and high amounts of some exogenous amines in human diet may contribute to a wide variety of toxic effects. These amines are commonly found in many foodstuffs, particularly in fermented products such as cheese, meat products, beer, wine, and ciders. Here, the level of biogenic amines in some natural ciders was examined. Twenty-four samples of cider purchased from commercial sources were analyzed by reverse-phase high-performance liquid chromatography and fluorescence detection after precolumn derivatization with *o*-phthaldialdehyde. Amine levels were variable, ranging from not detected to 23 mg/liter. The average level of total biogenic amines in ciders was 5.94 ± 8.42 mg/liter. Putrescine, histamine, and tyramine were the prevailing amines being present in 50.0, 37.5, and 33.3% of the ciders studied; very small amounts of ethylamine and phenylethylamine were observed in only one sample. Other cider parameters were analyzed to determine whether they affect the biogenic amine content in ciders, and the results were evaluated by applying cluster analysis and principal component analysis. Ciders that showed lower glycerol contents and higher amounts of 1,3-propanediol had much higher levels of histamine, tyramine, and putrescine, suggesting a high activity of lactic acid bacteria during cider making and thus the need for effective control of lactic acid bacteria.

Biogenic amines are low-molecular-weight nitrogenous bases that can cause food poisoning if large amounts are ingested, or when the natural mechanisms for their catabolism are inhibited or genetically deficient (29). Some biogenic amines, such as histamine and tyramine, have vasoactive and psychoactive properties. Tyramine has also been implicated in adverse reactions involving monoamine-oxidase inhibitor drugs. Other amines, such as putrescine, cadaverine, and phenylethylamine, are also important because they may intensify the undesirable effects of histamine (32). Their concentrations in food must therefore be controlled in order to prevent the health hazards that may arise from their consumption.

Biogenic amines are found in a variety of food and beverages. They are usually associated with products whose elaboration involves ripening or a fermentation process. The formation of biogenic amines is believed to result from microbial decarboxylation of their precursor amino acids (3, 12). In fermented beverages, such as wine and beer, biogenic amine formation not only requires precursors and the lactic acid bacteria (LAB) responsible for decarboxylation, but is also influenced by several factors such as pH and ethanol (14, 20, 23, 24), sulfur anhydride (SO<sub>2</sub>) level (35), raw material quality, and fermentation and technological conditions (13, 22).

In the Basque Country (North Spain), "natural" ciders are produced in small cider factories according to traditional methods, which imply, among other practices (such as the prohibition of addition of sugars and CO<sub>2</sub>), the exclusive use of juices obtained from fresh cider apples. The

cider-making process starts in November. Apple juices are obtained from the pressing of many varieties of cider apples from the Basque Country or imported from other Spanish regions (Asturias and Galicia) or other countries (France). Juices are fermented in small tanks (5,000 to 10,000 liters), and the usual oenological procedures (sulfur dioxide treatment, clarification or correction of acidity) are not applied. Alcoholic and malolactic fermentation occurs spontaneously with indigenous yeasts and LAB of the musts. Ciders are not microbiologically stabilized before bottling (after February), and undesirable alterations, produced mainly by endogenous LAB, such as acetification (8) and ropiness (7), often occur. Cider production doubled between 1987 and 2002, so cider has clearly become an increasingly important commercial product (6).

A wide range of literature has dealt with biogenic amine contents in different fermented foodstuffs, including several kinds of cheeses (9, 28), wines (17, 20, 21, 31), fish and meat products (16, 27), and beers and other alcoholic beverages (33, 37), but there is very little information about ciders. In fact, we are only aware of two works in which a few ciders are analyzed, among other alcoholic beverages, for the amines histamine and tyramine (36) and for putrescine (38).

The principal aim of this work was to provide data on the levels of biogenic amines in commonly consumed Basque Country ciders. Some important global parameters (pH, total acidity, ethanol, SO<sub>2</sub>, sugars, organic acids, glycerol, 1,3-propanediol, mannitol) were also determined, and special emphasis was placed on obtaining information about the possible relationships between the accumulation of biogenic amines and the composition parameters that determine cider characteristics and quality.

\* Author for correspondence. Tel: 34 91 562 2900; Fax: 34 91 564 4853; E-mail: mvmoreno@ifi.csic.es.

## MATERIALS AND METHODS

**Samples.** Twenty-four natural cider bottles, each from different cider makers that are representative of those currently manufactured in the Basque Country, were collected in February (2005) from commercial establishments. For chemical analysis, supernatants from centrifuged samples ( $16,000 \times g$ , 30 min) were filtered through a 0.22- $\mu$ m membrane filter.

**Biogenic amines: equipment.** The liquid chromatograph consisted of a Waters 600 Controller programmable solvent module (Waters, Milford, Mass.), a WISP 710B autosampler (Waters), and a Hewlett Packard 1046-A fluorescence detector. Chromatographic data were collected and analyzed with a Millennium<sup>32</sup> system (Waters). The separations were performed on a Waters Nova-Pak C<sub>18</sub> column (inside diameter, 150 by 3.9 mm; 60 Å; 4  $\mu$ m) with a matching guard cartridge of the same type.

**Biogenic amines: chemicals.** Acetonitrile of high-performance liquid chromatography (HPLC) grade was obtained from Scharlau (Barcelona, Spain). Ultrapure water generated by a Milli-Q System (Millipore, Bedford, Mass.) was used. Other reagent-grade chemicals were sodium phosphate dodecahydrate, boric acid, 2-mercaptoethanol (MEC), and methanol from Merck (Darmstadt, Germany), *o*-phthalaldehyde (OPA) from Fluka (Buchs, Switzerland), and 2-octanol from Sigma-Aldrich Vertriebs GmbH (Deisenhofen, Germany).

Histamine dihydrochloride, methylamine hydrochloride, tyramine, 2-phenylethylamine hydrochloride, 1,4-diaminobutane dihydrochloride or putrescine, and 1,5-diaminopentane dihydrochloride or cadaverine were purchased from Fluka and ethylamine hydrochloride was from Aldrich (Steinheim/Alburch, Germany). A stock solution (histamine, 1.2 g/liter; methylamine, 0.2 g/liter; ethylamine, 0.2 g/liter; tyramine, 0.8 g/liter; phenylethylamine, 1.0 g/liter; putrescine, 3 g/liter; cadaverine, 3 g/liter) was prepared in 40% ethanol and stored in a refrigerator protected from light. Standard solutions were prepared daily in 10% ethanol from the intermediate solution, and then these solutions were filtered through a 0.45- $\mu$ m Millipore filter before injection.

**Chromatographic conditions.** Mobile phase consisted of the eluent A as a solution of 10 mM sodium phosphate dodecahydrate adjusted to pH 8.3; eluent B was a mixture of 1% 2-octanol in acetonitrile and solvent eluent A (70:30, vol/vol). Mobile phases were filtered and degassed before use. The precolumn derivatizing reagent was prepared as follows: 350 mg of OPA and 2.5 ml of MEC were dissolved in 47.5 ml of methanol. The derivatizing reagent, filtered and degassed before use, was prepared at least 24 h before use and protected from light. For the derivatization reaction, 16  $\mu$ l of the samples was automatically mixed with 6  $\mu$ l of borate buffer (0.4 M, pH 10.5) and 12  $\mu$ l of the reaction solution. Samples, previously filtered through Millipore filters (0.45  $\mu$ m pore size), were then directly injected onto the HPLC system. The gradient elution program was as follows: 0 to 3 min (30% B, 0.1 ml/min), 3 to 20 min (30 to 50% B, 0.8 ml/min), 20 to 60 min (50 to 80% B, 0.8 ml/min). Derivatized amines were detected with a fluorescence detector (excitation wavelength of 340 nm and emission wavelength of 425 nm).

**Other analytical parameters.** The following parameters were measured in accordance with International Organization of Vine and Wine methodology (25): pH, total acidity, ethanol content, and SO<sub>2</sub>. The concentration of sugars, organic acids, and polyols was quantified by HPLC with an ion-exclusion cation exchange column (Aminex HPX-87H, Bio-Rad, Hercules, Calif.) and a UV-visible light and refractive index detector. The column

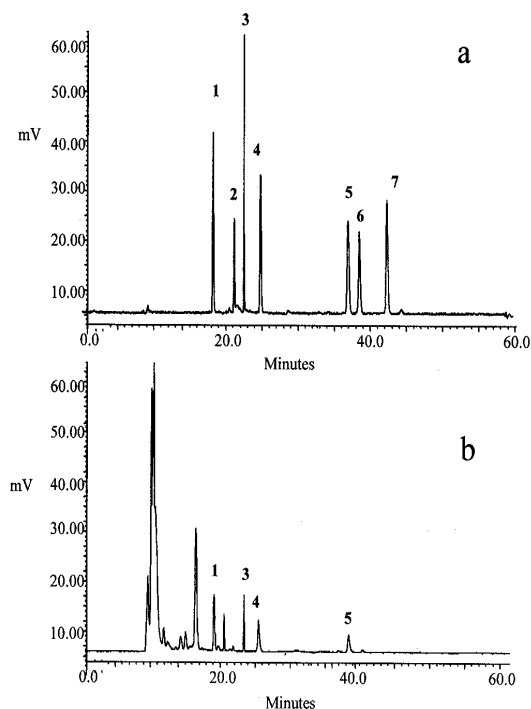


FIGURE 1. Liquid chromatographic profile of biogenic amines. (a) Standard solution. (b) Cider. Peak identities: (1) histamine, (2) methylamine, (3) ethylamine, (4) tyramine, (5) phenylethylamine, (6) putrescine, (7) cadaverine.

was eluted with dilute sulfuric acid (pH 2.2) at 65°C at a flow rate of 0.6 ml/min (10).

All the analyses were carried out in duplicate, and the time interval from purchase to analysis was short. Once the sample arrived at the laboratory, one fraction was immediately analyzed for biogenic amines, and the other was kept at -20°C until the other parameters were analyzed.

**Statistical analysis.** Statistical methods used for data analysis were cluster analysis (Ward's method from standardized variables) to discover natural groupings of the 24 cider samples of the study, and principal component analysis (from standardized variables) to examine the relationship among the analyzed variables. The STATISTICA program for Windows, version 7.1 (StatSoft Inc., Tulsa, Okla.), was used for data processing.

## RESULTS AND DISCUSSION

Biogenic amines (histamine, methylamine ethylamine, tyramine, phenylethylamine, putrescine, cadaverine) were determined by an HPLC procedure previously developed to determine these amines in wines (21). This method requires the use of a reverse-phase stationary column, a precolumn reaction system for OPA/MEC derivatization, and detection of the derived amines by fluorescence. The chromatograms of a standard solution and a cider sample are shown in Figure 1. As can be observed, the reverse-phase HPLC procedure provides a good separation of amines from possible interferences, mainly amino acids that elute in the first minutes of the chromatogram and then do not cause problems in the analysis of amines. Biogenic amine identification was made on the basis of retention time by comparison with

TABLE 1. Biogenic amine contents in the commercial ciders<sup>a</sup>

Cider sample	Histamine	Tyramine	Putrescine	Sum
1	3.03	4.81	9.39	17.23
2	ND	ND	7.31	7.31
3	ND	ND	ND	ND
4	3.29	5.03	10.82	19.25
5	ND	ND	ND	ND
6	ND	ND	ND	ND
7	ND	ND	ND	ND
8	ND	2.01	4.89	6.91
9	1.64	ND	3.32	4.92
10	1.08	ND	4.27	5.35
11	1.03	3.95	5.21	10.19
12	ND	ND	ND	ND
13	5.83	4.25	10.08	20.16
14	ND	ND	ND	ND
15	0.93	3.03	4.51	8.47
16	ND	ND	ND	ND
17	ND	ND	ND	ND
18	ND	4.03	7.31	11.34
19	2.21	ND	6.01	8.22
20	ND	ND	ND	ND
21	ND	ND	ND	ND
22	ND	ND	ND	ND
23	6.93	4.08	12.25	23.26
24	ND	ND	ND	ND
Mean	1.08	1.30	3.56	5.94
SD	1.92	1.95	4.15	7.49

<sup>a</sup> Values are reported in milligrams per liter. ND, not detected; SD, standard deviation.

standard solution. Because the analytical conditions were validated by wines (21), we performed a study of the recovery of the method with the present cider samples. Recovery of the amines investigated was measured by adding 0.25 to 30 mg/liter of amine mixture to cider. The baseline was determined from cider to which water was added instead of the amines. Five ciders were used in the recovery experiments. The results of recovery were high, ranging from 96 to 105%, depending on the biogenic amine.

Distributions of the contents of the amines histamine, tyramine, and putrescine detected in the 24 samples of commercial ciders, together with the mean and standard deviation values, are shown in Table 1. We did not find methylamine or cadaverine in any of the ciders analyzed, but we did detect low concentrations of both ethylamine and phenylethylamine in one cider sample each. The highest concentrations of the biogenic amines were recorded for putrescine, histamine, and tyramine (in descending order of magnitude; Table 1). These amines were also the most prevalent, detected in 50.0, 37.5, and 33.3% of the cider samples, respectively. It is worth noting that when there is a greater concentration of one of these amines, the content of the other two predominant amines is generally greater, as has already been observed in wines (21, 31, 34) and other Spanish ciders (36). Overall, total mean biogenic amine levels were lower than values reported by different authors in wines (21, 31) and beers (14, 15). Histamine has often been

related to histaminic intoxication of food (12). Nevertheless, the highest histamine content of the batches of Spanish ciders analyzed here was below the toxicity threshold suggested for other foods. Even taking into account the fact that cider contains alcohol, aromatic monoamine levels were lower than those considered capable of producing physiological effects, i.e., 20 mg/liter for histamine, 25 to 40 mg/liter for tyramine, and 3 mg/liter for phenylethylamine (1, 31).

Putrescine was the most prevalent amine and contributed the most to the total amine content in ciders, in a similar way as occurs in wines (11, 17, 20, 22) and beers (14, 15, 30), in which this amine is partially considered as a natural constituent because of its raw material origin. Putrescine was determined in 12 (50%) of the ciders analyzed, and the average content found was  $3.56 \pm 4.15$ , with a maximum value of 12.25 mg/liter. These values are much higher than those previously reported in Canadian ciders (38), in which concentrations of putrescine of 0.2 mg/liter were found, while histamine and tyramine were not detected. Histamine ( $1.08 \pm 1.92$ ; range, 0 to 6.93 mg/liter) and tyramine ( $1.30 \pm 1.95$ ; range, 0.00 to 5.03 mg/liter) concentrations were also much higher than those reported by Vidal-Carou et al. (36) when analyzing 10 Spanish ciders. These authors do not give information about the origin of ciders or technological procedures. According to Zee et al. (38), the low amounts of amines detected in the ciders that they analyzed could be explained by the fact that apple juice was pasteurized before fermentation, thus eliminating all microbiota responsible for decarboxylase activities. Indeed, Canadian ciders are rarely subjected to malolactic fermentation; thus, little or no decarboxylation of amino acids occurs through bacterial metabolism. This is not the case of the ciders studied here, which have undergone malolactic fermentation and are not microbiologically stabilized before bottling. Therefore, these ciders can contain different LAB species, mainly heterofermentative *Lactobacillus* species and *Oenococcus oeni*, able to produce biogenic amines, as already shown (5).

Table 2 summarizes the other analytical parameters analyzed. Basque Country ciders are bottled almost completely fermented, in contrast with French (18) and English (2) ciders, which usually contain higher reducing sugar contents. Of the sugars analyzed (glucose and fructose), only fructose was found, with mean values less than 0.21 g/liter. The alcoholic content in samples ranged between 5.6 and 7.6 (vol/vol). With respect to malolactic fermentation, L-malic acid content was very low in relation to L-lactic acid content, indicating that all ciders had undergone this transformation, as described for Asturian ciders (26). In relation to the influence on sensorial qualities, this secondary fermentation decreases the acidity and astringency of ciders (26).

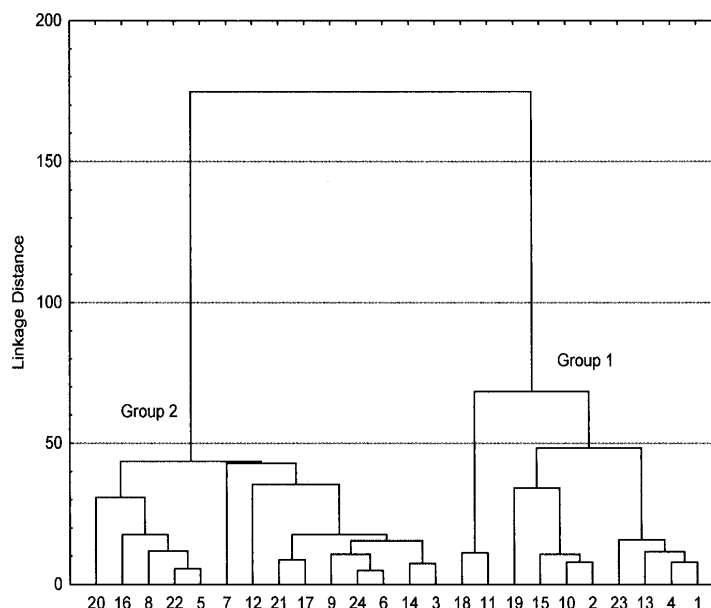
One characteristic of Basque Country natural cider is the relatively high value of volatile acidity (Table 2), similar to that found in Asturian ciders (26). High levels of acetic acid negatively affect the organoleptic quality of ciders as a result of the acetic taint; the Spanish Alimentary Code allows concentrations below 2.2 g/liter. Synthesis of

TABLE 2. Chemical analysis of commercial ciders<sup>a</sup>

Cider sample	Ethanol (% vol/vol)	pH	Total SO <sub>2</sub>	Total acidity (g of acetic acid/liter)	Fructose (g/liter)	Malic acid (g/liter)	Mannitol (g/liter)	Lactic acid (g/liter)	Glycerol (g/liter)	Acetic acid (g/liter)	1,3-Propanediol (g/liter)
1	6.20	3.89	19.01	99.98	ND	ND	3.96	3.96	ND	2.12	2.46
2	7.05	3.99	25.34	81.46	ND	ND	6.31	3.52	0.11	1.69	1.98
3	6.90	3.85	19.01	96.28	ND	0.06	6.17	3.75	2.58	2.2	0.92
4	6.60	3.98	19.01	83.94	ND	0.03	5.03	3.07	0.04	2.25	2.28
5	6.50	3.89	12.67	79.01	0.63	0.03	5.00	3.34	1.46	1.52	1.02
6	6.20	3.87	19.01	86.41	ND	0.01	4.72	3.27	0.86	1.53	1.57
7	6.50	3.93	19.01	76.53	0.01	0.24	3.46	3.08	1.08	1.35	1.11
8	6.03	3.83	12.67	82.95	0.75	0.01	2.98	3.75	1.58	1.33	1.15
9	5.90	3.84	19.01	94.31	ND	ND	2.52	3.51	2.09	2.55	1.53
10	6.50	4.02	12.67	77.52	0.29	0.01	4.86	2.93	0.18	1.66	2.37
11	5.60	3.86	12.67	111.59	ND	ND	2.36	3.96	ND	3.28	3.22
12	6.30	3.80	19.01	98.75	ND	0.13	8.67	5.27	1.39	1.81	0.66
13	6.20	3.93	12.67	100.17	ND	ND	3.95	2.95	0.01	1.42	1.56
14	6.30	3.82	25.34	95.79	0.61	0.01	4.66	3.93	2.46	1.88	0.58
15	7.20	3.94	12.67	95.30	ND	ND	4.23	3.05	0.14	1.52	2.13
16	7.05	3.98	19.01	72.58	0.42	ND	6.23	3.75	3.69	1.33	0.59
17	6.20	3.95	19.01	70.36	ND	0.01	4.79	4.21	2.09	1.43	0.94
18	5.70	3.91	19.01	92.33	ND	ND	2.46	3.01	0.01	2.56	2.42
19	6.70	4.08	50.69	81.47	ND	0.01	6.66	3.71	0.13	1.81	2.01
20	6.70	3.96	25.34	102.71	1.54	ND	6.31	4.42	1.14	2.11	1.87
21	5.60	3.83	12.67	87.40	ND	ND	5.37	4.56	2.43	1.77	1.28
22	6.60	4.04	19.01	77.03	0.96	0.01	4.27	3.58	1.44	1.59	1.09
23	6.90	4.03	25.34	79.50	ND	ND	4.65	3.94	0.21	1.65	1.96
24	6.20	3.90	25.34	95.29	ND	0.01	3.24	4.01	1.13	1.79	1.08
Mean	6.40	3.92	19.80	88.28	0.22	0.02	4.70	3.69	1.09	1.84	1.57
SD	0.45	0.08	8.00	10.77	0.40	0.05	1.52	0.57	1.05	0.47	0.70

<sup>a</sup> ND, not detected; SD, standard deviation.

FIGURE 2. Dendrogram of 24 samples of cider according to biogenic amines and chemical parameters compound data.



acetic acid may occur at all stages of fermentation as a metabolic product of different kinds of microorganisms, but the highest production is detected after malolactic fermentation (8) because no microbiological stabilization methods are used. As a consequence, very high levels of LAB are usually found after bottling, which increases the amounts of acetic acid.

Glycerol, which is produced by yeasts during alcoholic fermentation, contributes to smoothness and roundness on the palate, and its degradation has a negative influence on the sensory quality of ciders (26). The low levels found in ciders (Table 2) indicated a microbial activity by heterofermentative LAB, which can convert glycerol into 1,3-propanediol and/or lactic acid (19). This utilization is confirmed, taking into account the contents of 1,3-propanediol detected in the ciders studied (Table 2).

In order to establish whether any grouping of the ciders occurred on the basis of the data of the 14 variables analyzed (see Tables 1 and 2), cluster analysis was applied. Figure 2 shows the dendrogram obtained when these data are used. The square of the Euclidean distance was used to measure the similarity between samples on the basis of standardized variables and Ward's method for fusion of the groups. Two main groups can be observed: one of them (group 1) formed by 10 samples (1, 2, 4, 10, 11, 13, 15, 18, 19 and 23), and another (group 2) with the rest of the ciders. In general, the 10 samples from group 1 present higher values for 1,3-propanediol, putrescine, tyramine, and histamine than the samples from group 2, which have lower values of glycerol and lactic acid.

Principal component analysis was also applied to establish the relationships among concentrations of biogenic amines and the chemical parameters. Four principal components were obtained, and these explained 73% of the total variance of the data. The first principal component, which explains 32.6% of the total variance, was strongly correlated with putrescine ( $-0.89$ ), tyramine ( $-0.88$ ), 1,3-pro-

panediol ( $-0.86$ ), glycerol ( $0.82$ ), and histamine ( $-0.70$ ). The second principal component, which explains 20.5% of the total variance, was mainly correlated with the variables pH ( $-0.87$ ) and ethanol ( $-0.78$ ). In Figure 3, the 24 samples of ciders are plotted on the plane defined by these two first principal components. The samples are grouped according to the dendrogram in Figure 2. It can be observed that, in general, ciders 1, 2, 4, 10, 11, 13, 15, 18, 19, and 23 in group 1 are plotted on the left side of the plane, and the rest of the 14 ciders in group 2 are plotted on the right side of the plane. The 10 ciders from the first group present lower values of the first component and are characterized, taking into consideration the loading of the variables, by higher concentrations of putrescine, tyramine, and 1,3-propanediol and lower values of glycerol compared with the 14 samples of the other group. Therefore, the first principal component differentiates the cider samples from these two groups. The third principal component, which explains 11.4% of the total variance, was correlated with lactic acid ( $-0.66$ ), total  $\text{SO}_2$  ( $-0.62$ ), and mannitol ( $-0.57$ ). The fourth principal component only explains 8.9% of the total variance and is correlated with fructose ( $-0.71$ ) and malic acid ( $0.67$ ). The plot of the samples on the plane defined by these two last principal components (data not shown) did not show the previous grouping of the samples.

Table 3 shows the correlation coefficient values that are significantly different from zero ( $P < 0.05$ ) among the biogenic amines (histamine, tyramine, putrescine) and the other chemical parameters of the 24 ciders studied. A significant positive correlation can be observed ( $P < 0.05$ ) among these amines: tyramine and putrescine ( $0.83$ ), histamine and putrescine ( $0.81$ ), and histamine and tyramine ( $0.67$ ). It was also confirmed that the accumulation of these amines in ciders was highly correlated with glycerol and 1,3-propanediol ( $P < 0.05$ ). The three amines were negatively correlated with glycerol (correlation coefficient values of  $-0.49$ ,  $-0.62$ , and  $-0.72$  for histamine, tyramine,

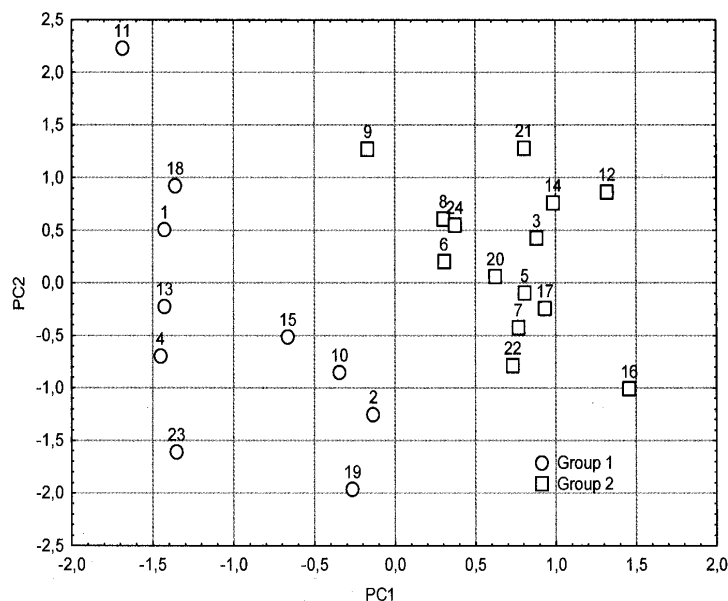


FIGURE 3. Plot of 24 samples of cider, grouped according to the dendrogram in Figure 2, on the plane defined by the first two principal components from biogenic amines and chemical parameters compound data.

and putrescine, respectively), while tyramine and putrescine were positively correlated with their metabolic product, 1,3-propanediol (correlation coefficient values of 0.64 and 0.67, respectively). Furthermore, a significant negative correlation was also found between glycerol and 1,3-propanediol ( $-0.81$ ), indicating that in the analyzed ciders, glycerol has been metabolized to 1,3-propanediol. In cider, as in other fermented beverages, glycerol can be degraded by heterofermentative LAB by glycerol dehydratase with 3-hydroxypropionaldehyde production. This compound is a precursor of acrolein in acidic conditions (4), an undesirable component for health and sensorial quality. The 3-hydroxypropionaldehyde can also be reduced to 1,3-propanediol, and in our experience, ciders in which glycerol has been metabolized to 1,3-propanediol have surprisingly high levels of histamine, tyramine, and putrescine.

The grouping results revealed by principal component analysis suggest that the ciders studied in this work showed a high activity of LAB, resulting in biogenic amine production, acetification, and glycerol degradation to 1,3-propanediol. Previous results have shown that high levels of

LAB are usually found throughout the elaboration period and in the final products as a consequence of the lack of microbiological control during cider making or before bottling (8). More work is necessary to confirm the implication of LAB in biogenic amine production throughout cider making. This could help to establish when biogenic amine concentration could increase and therefore when it could be recommended to control bacterial development.

#### ACKNOWLEDGMENTS

The work at the Instituto de Fermentaciones Industriales (CSIC) was partially supported by grants AGL2003-02436 and PTR1995-0736-OP, from the Spanish Ministerio de Educación y Ciencia. The work at the UPV was supported by the Universidad del País Vasco grant 00221.215-T-15889/2004 and by the Diputación de Gipuzkoa, Programa Red Gipuzkoana de Ciencia, Tecnología e Innovación (cofinanced by the European Union). Gaizka Garai acknowledges the Gobierno Vasco (Dpto. Agricultura, Pesca y Alimentación) for the predoctoral fellowship. We also thank Gracia García for her technical assistance.

#### REFERENCES

- Bauza, T., A. Blaise, J. P. Mestres, P. L. Teissedre, J. C. Cabanis, G. Kanny, and A. Moneret-Vautrin. 1995. Les amines biogènes du vin. Métabolisme et toxicité. *Bull' OIV*. 767-76:42-67.
- Beech, F. W., and J. G. Carr. 1977. Cider and perry, p. 139-313. In A. H. Rose (ed.), *Economic microbiology in alcoholic beverages*, vol. 1. Academic Press, London.
- Brink, T. B., C. Damink, H. M. L. J. Joosten, and J. H. J. Huis In't Veld. 1990. Occurrence and formation of biologically active amines in foods. *Int. J. Food Microbiol.* 11:73-84.
- Claisse, O., and A. Lonvaud-Funel. 2000. Assimilation of glycerol by a strain of *Lactobacillus collinoides* isolated from cider. *Food Microbiol.* 17:513-519.
- del Campo, G., I. Lavado, M. Duenas, and A. Irastorza. 2000. Histamine production by some lactic acid bacteria isolated from ciders. *Food Sci. Technol. Int.* 6:117-121.
- del Campo, G., J. J. Santos, I. Berregi, S. Velasco, I. Ibarburu, M. T. Dueñas, and A. Irastorza. 2003. Ciders produced by two types of presses and fermented in stainless steel and wooden vats. *J. Inst. Brew.* 109:342-348.
- Dueñas, M., A. Irastorza, C. Fernández, and A. Bilbao. 1995. Het-

TABLE 3. Correlation coefficients between biogenic amines and chemical parameters ( $n = 24$ )

Variable	Correlation coefficient values <sup>a</sup>
Histamine-tyramine	0.67
Histamine-putrescine	0.81
Tyramine-putrescine	0.83
Histamine-glycerol	-0.49
Tyramine-glycerol	-0.62
Putrescine-glycerol	-0.72
Tyramine-1,3-propanediol	0.64
Putrescine-1,3-propanediol	0.67
Glycerol-1,3-propanediol	-0.81

<sup>a</sup> All coefficients are significantly different from zero ( $P < 0.05$ ).



- erofermentative lactobacilli causing ropiness in Basque Country ciders. *J. Food Prot.* 58:76–80.
8. Dueñas, M., A. Irastorza, C. Fernández, A. Bilbao, and A. Huerta. 1994. Microbial populations and malolactic fermentation of apple cider using traditional and modified methods. *J. Food Sci.* 59:1060–1064.
  9. Fernández-García E., J. Tomillo, and M. Nuñez. 1999. Effect of added proteinases and level of starter culture on the formation of biogenic amines in raw milk Manchego cheese. *Int. J. Food Microbiol.* 52:189–96.
  10. Frayne, R. F. 1986. Direct analysis of the major organic components in grape must and wine using high performance liquid chromatography. *Am. J. Enol. Vitic.* 37:281–287.
  11. González-Marco, A., and C. Ancín-Azpilicueta. 2006. Amine concentrations in wine stored in bottles at different temperatures. *Food Chem.* 99:680–685.
  12. Hálasz, A., A. Barath, L. Simon-Sarkadi, and W. Holzapfel. 1994. Biogenic amines and their production by microorganism in food. *Trends Food Sci. Technol.* 5:42–49.
  13. Izquierdo-Pulido, M., J. Font-Farregas, J.-M. Carceller-Rosa, A. Mariné-Font, and M. C. Vidal-Carou. 1995. Biogenic amine changes related to lactic acid bacteria during brewing. *J. Food Prot.* 59:175–180.
  14. Izquierdo-Pulido, H., T. Hernández-Jover, A. Mariné-Font, and M. C. Vidal-Carou. 1996. Biogenic amines in European beers. *J. Agric. Food Chem.* 44:3159–3163.
  15. Kalac, P., J. Spicka, M. Krizek, and T. Pelikanova. 2002. The effects of lactic acid bacteria inoculants on biogenic amines formation in sauerkraut. *Food Chem.* 70:355–359.
  16. Kaniou, I., G. Samouris, T. Mouratidou, A. Eleftheriadou, and A. Zantopoulos. 2001. Determination of biogenic amines in fresh unpacked and vacuum-packed beef during storage at 4°C. *Food Chem.* 70:355–359.
  17. Landete, J. M., S. Ferrer, L. Polo, and I. Pardo. 2005. Biogenic amines in wines from three Spanish regions. *J. Agric. Food Chem.* 53:1119–1124.
  18. Leguerinel, I., J. J. Cleret, C. N. Bourgeois, and P. Mafart. 1987. Essai d'évaluation des caractéristiques organoleptiques des cidres par analyses instrumentales. *Sci. Aliment.* 7:223–230.
  19. Lonvaud-Funel, A. 2002. Lactic acid bacteria in winemaking: influence on sensorial and hygienic quality, p. 231–262. In V. P. Singh and R. D. Stapleton (ed.), *Biotransformations: bioremediation technology for health and environmental protection*. Progress in Industrial Microbiology 36. Elsevier, New York.
  20. Marcobal, A., P. J. Martín-Álvarez, M. C. Polo, R. Muñoz, and M. V. Moreno-Arribas. 2006. Formation of biogenic amines throughout the industrial manufacture of red wine. *J. Food Prot.* 69:397–404.
  21. Marcobal, A., M. C. Polo, P. J. Martín-Álvarez, and M. V. Moreno-Arribas. 2005. Biogenic amines content of red Spanish wines: comparison of a direct ELISA and an HPLC method for the determination of histamine in wines. *Food Res. Int.* 38:387–394.
  22. Martín-Álvarez, P. J., A. Marcobal, C. Polo, and M. V. Moreno-Arribas. 2006. Influence of technological practices on biogenic amine contents in red wines. *Eur. Food Res. Technol.* 222:420–424.
  23. Moreno-Arribas, M. V., and A. Lonvaud-Funel. 1999. Tyrosine decarboxylase activity of *Lactobacillus brevis* IOEB 9809 isolated from wine and *L. brevis* ATCC 367. *FEMS Microbiol. Lett.* 180:55–60.
  24. Moreno-Arribas, M. V., M. C. Polo, F. Jorganes, and R. Muñoz. 2003. Screening of biogenic amine production by lactic acid bacteria isolated from grape must and wine. *Int. J. Food Microbiol.* 84:117–123.
  25. Organization International de la Vigne et du Vin. 2004. Recueil de méthodes internationales d'analyse des vins et des moûts. Organization International de la Vigne et du Vin, Paris.
  26. Piccinelli, A., B. Suarez, J. Moreno, R. Rodriguez, L. M. Caso-García, and J. J. Mangas. 2000. Chemical characterization of Asturian cider. *J. Agric. Food Chem.* 48:3997–4002.
  27. Pons-Sanchez, C. S., M. C. Vidal-Carou, A. Marine-Font, and M. T. Veciana-Nogues. 2005. Influence of the freshness grade of raw fish on the formation of volatile and biogenic amines during the manufacture and storage of vinegar-marinated anchovies. *J. Agric. Food Chem.* 53:8586–8592.
  28. Roig-Sagues, A. X., A. P. Molina, and M. M. Hernandez-Herrero. 2002. Histamine and tyramine-forming microorganisms in Spanish traditional cheeses. *Eur. Food Res. Technol.* 215:96–100.
  29. Silla-Santos, M. H. 1996. Biogenic amines: their importance in foods. *Int. J. Food Microbiol.* 29:213–231.
  30. Slomkowska, A., and W. Ambroziak. 2002. Biogenic amine profile of the most popular Polish beers. *Eur. Food Res. Technol.* 215:380–383.
  31. Soufleros, E., M. L. Barrios, and A. Bertrand. 1998. Correlation between the content of biogenic amines and other wine compounds. *Am. J. Enol. Vitic.* 49:266–278.
  32. Straton, J. E., R. W. Hutkins, and S. Taylor. 1991. Biogenic amines in cheese and other fermented foods: a review. *J. Food Prot.* 54:460–470.
  33. Stute, R., K. Petridis, H. Steinhart, and G. Biernoth. 2002. Biogenic amines in fish and soy sauces. *Eur. Food Res. Technol.* 215:101–107.
  34. Vázquez-Lasa, M. B., M. Iñiguez-Crespo, M. González-Larraina, and A. González-Guerrero. 1998. Biogenic amines in Rioja wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 49:229.
  35. Vidal-Carou, M. C., A. Amballe-Espunyes, M. C. Ulla-Ulla, and A. Mariné-Font. 1990. Histamine and tyramine in Spanish wines: their formation during the winemaking process. *Am. J. Enol. Vitic.* 41:160–167.
  36. Vidal-Carou, M. C., M. J. Isla-Gavin, A. Mariné-Font, and R. Codony-Salcedo. 1989. Histamine and tyramine in natural sparkling wine, vermouth, cider, and vinegar. *J. Food Compos. Anal.* 2:210–218.
  37. Vidal-Carou, M. C., F. Lahoz-Portoles, S. Bover-Cid, and A. Mariné-Font. 2003. Ion-pair high-performance liquid chromatographic determination of biogenic amines and polyamines in wine and other alcoholic beverages. *J. Chromatogr. A* 998:235–241.
  38. Zee, J. A., R. E. Simard, L. L'Heureux, and J. Tremblay. 1983. Biogenic amines in wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 34:6–9.



## ORIGINAL ARTICLE

## Biogenic amine production by lactic acid bacteria isolated from cider

G. Garai<sup>1</sup>, M.T. Dueñas<sup>1</sup>, A. Irastorza<sup>1</sup> and M.V. Moreno-Arribas<sup>2</sup><sup>1</sup> Departamento de Química Aplicada, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad del País Vasco, San Sebastián, Spain<sup>2</sup> Instituto de Fermentaciones Industriales, CSIC, Juan de la Cierva 3, Madrid, Spain**Keywords**

Amino acid decarboxylase, biogenic amines, cider, lactic acid bacteria.

**Correspondence**M. Victoria Moreno-Arribas, Instituto de Fermentaciones Industriales (CSIC), Juan de la Cierva, 3 – 20006 Madrid, Spain.  
E-mail: mvmoreno@ifi.csic.es

2006/1006: received 13 July 2006, revised 22 December 2006 and accepted 11 June 2007

doi:10.1111/j.1472-765X.2007.02207.x

**Abstract****Aims:** To study the occurrence of histidine, tyrosine and ornithine decarboxylase activity in lactic acid bacteria (LAB) isolated from natural ciders and to examine their potential to produce detrimental levels of biogenic amines.**Methods and Results:** The presence of biogenic amines in a decarboxylase synthetic broth and in cider was determined by reversed-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC). Among the 54 LAB strains tested, six (five lactobacilli and one oenococci) were biogenic amine producers in both media. Histamine and tyramine were the amines formed by the LAB strains investigated. *Lactobacillus diolivorans* were the most intensive histamine producers. This species together with *Lactobacillus collinoides* and *Oenococcus oeni* also seemed to produce tyramine. No ability to form histamine, tyramine or putrescine by *Pediococcus parvulus* was observed, although it is a known biogenic amine producer in wines and beers.**Conclusions:** This study demonstrated that LAB microbiota growing in ciders had the ability to produce biogenic amines, particularly histamine and tyramine, and suggests that this capability might be strain-dependent rather than being related to a particular bacterial species.**Significance and Impact of the Study:** Production of biogenic amines by food micro-organisms has continued to be the focus of intensive study because of their potential toxicity. The main goal was to identify the microbial species capable of producing these compounds in order to control their presence and metabolic activity in foods.**Introduction**

Decarboxylation of amino acids, such as histidine, tyrosine and ornithine, results in formation of the corresponding biogenic amines, histamine, tyramine and diaminobutane (putrescine), which are the most frequently encountered in fermented foods, such as cheese, meat, fish products, wine, beer, etc. (Silla-Santos 1996). These food products are susceptible to spoilage by lactic acid bacteria (LAB), the main positive decarboxylase micro-organisms capable of producing biogenic amines (Lonvaud-Funel 2001). These compounds can cause toxicological effects if large amounts are ingested or when the natural detoxification process is inhibited either by drugs or genetically.

In the Basque country (north Spain), ciders are produced in small cider factories by using empirical and traditional techniques, and yeasts and LAB starters are not added. Evolution of LAB during the cider-making process has been monitored (Dueñas *et al.* 1994), and a fundamentally heterofermentative lactic flora was found, with *Lactobacillus* species and *Oenococcus oeni* being the most abundant. After alcoholic and malolactic fermentation, these ciders are bottled but not microbiologically stabilized and frequently suffer undesirable alterations, produced mainly by endogenous LAB, such as acidification (Dueñas *et al.* 1994), and ropiness (Dueñas *et al.* 1995).

The majority of research about the bacteria responsible for biogenic amines in foods has focused on cheese,

fermented meat products, wine and beer (Izquierdo-Pulido *et al.* 1996; Silla-Santos 1996; Moreno-Arribas *et al.* 2003; Novella-Rodríguez *et al.* 2004). The presence of biogenic amines in ciders was first reported by Zee *et al.* (1983) and Vidal-Carou *et al.* (1989). More recently, histamine, tyramine and putrescine have been found in various natural ciders (Garai *et al.* 2006), suggesting that decarboxylating LAB are probably responsible. Biogenic amine production by LAB has never been studied in species from natural ciders, except for one report dealing with histamine-forming activities (Del Campo *et al.* 2000). Thus, to determine the possible participation of LAB in the biogenic amine synthesis already detected in natural ciders, this study focused on examining the occurrence of amino acid decarboxylase activity of several strains of LAB isolated from Basque country (Spain) ciders.

## Materials and methods

### Bacteria strains and growth conditions

A total of 54 LAB including *Lactobacillus collinoides* (15 strains), *Lactobacillus diolivorans* (16 strains), *Lactobacillus plantarum* (two strains), *Lactobacillus suebicus* (three strains), *O. oeni* (10 strains) and *Pediococcus parvulus* (eight strains) were tested. They were isolated from Basque country ciders according to that described by Dueñas *et al.* (1994).

*Lactobacillus* and *Pediococcus* strains were routinely grown at 28°C in de Mann Rogosa Sharpe (MRS) medium at pH 4.8. *Oenococcus oeni* strains were grown in medium for *Leuconostoc oenos* (MLO medium) (ADSA, Barcelona, Spain) (Caspritz and Radler 1983) at 28°C. All bacteria were incubated in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. Two pure cultures of LAB control strains were also tested, including the tyramine-producing strain *Lactobacillus brevis* 216 (DSM 1268) provided by the Spanish Type Culture Collection (CECT), and *Lactobacillus* 30a, a histamine- and putrescine-producing strain, purchased from the American Type Culture Collection (ATCC). The strains were stored at -80°C in 20% glycerol.

### Identification of LAB isolates

The LAB strains isolated from cider were identified using biochemical tests as reported by Dueñas *et al.* (1995). The 16S rRNA sequence analysis of strains was performed according to the methods as described by Werning *et al.* (2006). To confirm identity of *O. oeni* strains, polymerase chain reaction (PCR) amplification with species-specific primers was performed by the method described by Zapparoli *et al.* (1998).

### Detection of biogenic amine-producing ability in LAB

The ability for biogenic amine production was examined in both cider and the semidefined Bover-Cid medium (Bover-Cid and Holzapfel 1999). For inoculum preparation in this last medium, LAB strains were subcultured twice in MRS broth supplemented with 0.1% fructose, 20% (v/v) of tomato juice and 0.005% of pyridoxal-5-phosphate. The pH was adjusted to 5.2 and the medium was autoclaved.

To detect biogenic amine formation, strains were grown in Bover-Cid medium containing 1% ornithine monohydrochloride and histidine monohydrochloride or 0.5% tyrosine di-sodium salt (all from Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany).

To avoid the loss of viability when cells are directly inoculated into cider, bacterial strains were twice subcultured in a modified cider medium containing in g l<sup>-1</sup>: glucose, 5; yeast extract, 5; pantothenic acid 0.01 and Tween 80 1. The pH was adjusted at 4.8 and sterilized by filtration (0.45 µm). Bacterial strains were grown at pH 4 or 5.2 in a final cider supplemented with 0.05% glucose, 0.4% tyrosine di-sodium salt and 1% ornithine monohydrochloride and histidine monohydrochloride.

After 7 days incubation at 28°C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere, the medium was centrifuged and the supernatant was kept at -20°C until analysis for biogenic amines. The trials were performed in duplicate.

Biogenic amines were analysed by reversed-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) according to the method described by Marcobal *et al.* (2005).

## Results

In this work, several strains, belonging to *L. collinoides* (15 strains), *L. diolivorans* (16 strains), *L. plantarum* (two strains), *L. suebicus* (three strains), *O. oeni* (10 strains) and *P. parvulus* (eight strains) were analysed for amino acid decarboxylase activity in Bover-Cid medium. Table 1 shows the number of positive strains of the total number of strains investigated. The quantitative production of biogenic amines by these LAB strains is shown in Table 2.

Most of the screening procedures used to determine production of biogenic amines by micro-organisms, generally involve the use of a differential medium containing a pH indicator. A positive result is indicated by a change to purple in response of the indicator to a pH shift. The pH change is dependent on the production of the more alkaline amine from the amino acids initially included in the medium. In our screening, we used modified decarboxylase broth supplemented with pyridoxal-5-phosphate that has a strong enhancing effect on the amino acid decarboxylase activity (Gale 1946). This modification was

**Table 1** Biogenic amine production by lactic acid bacteria isolated from ciders

Lactic acid bacteria*	N†	Histamine		Tyramine		Putrescine	
		MDA‡	HPLC§	MDA	HPLC	MDA	HPLC
<i>Lactobacillus brevis</i> CECT 216	0	–	–	1	1	1	–
<i>Lactobacillus</i> 30a	1	1	1	0	–	1	1
<i>Lactobacillus collinoides</i>	15	1	1	0	–	0	–
<i>Lactobacillus diolivorans</i>	16	3	3	1	1	0	–
<i>Lactobacillus plantarum</i>	2	0	–	0	–	0	–
<i>Lactobacillus suebicus</i>	3	0	–	0	–	0	–
<i>Oenococcus oeni</i>	10	0	–	1	1	0	–
<i>Pediococcus parvulus</i>	8	0	–	0	–	0	–

\*Taxon confirmed by sequencing and polymerase chain reaction (see Materials and methods).

†N, number of strains analysed.

‡MDA, number of positive strains in decarboxylase media (MDA).

§HPLC, number of positive strains by reversed-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC).

**Table 2** Concentration of the biogenic amines produced by positive lactic acid bacteria (LAB) strains in the decarboxylase synthetic broth and in cider (mean  $\pm$  standard deviation)

Bacterial strains	Amine production in MDA (mg l <sup>-1</sup> )		Histamine production in cider (mg l <sup>-1</sup> )		Tyramine production in cider (mg l <sup>-1</sup> )	
	Histamine	Tyramine	pH 4	pH 5.2	pH 4	pH 5.2
<i>Lactobacillus</i> 30a	1402.01 $\pm$ 3.22	ND	–	–	–	–
<i>Lactobacillus brevis</i> CECT 216	ND	854.01 $\pm$ 3.38	–	–	–	–
<i>Lactobacillus diolivorans</i> 18	1232.4 $\pm$ 3.17	–	152.09 $\pm$ 0.98	284.32 $\pm$ 0.84	ND	ND
<i>L. diolivorans</i> 20	793.2 $\pm$ 4.32	–	35.22 $\pm$ 0.87	77.33 $\pm$ 0.43	ND	ND
<i>L. diolivorans</i> 22	602.23 $\pm$ 7.09	–	15.31 $\pm$ 0.65	27.55 $\pm$ 0.21	ND	ND
<i>L. diolivorans</i> 54	–	746.92 $\pm$ 2.13	ND	ND	5.02 $\pm$ 0.11	8.54 $\pm$ 0.44
<i>Oenococcus oeni</i> 38	–	543.99 $\pm$ 3.11	ND	ND	21.33 $\pm$ 0.09	22.11 $\pm$ 0.99
<i>Lactobacillus collinoides</i> 13	1207.3 $\pm$ 9.34	–	12.34 $\pm$ 0.54	13.21 $\pm$ 0.32	ND	ND

ND, Not detected.

developed by Bover-Cid and Holzapfel (1999) and later successfully used to investigate a large number of fastidious LAB, including *O. oeni* strains, isolated from grape must and wines (Moreno-Arribas *et al.* 2003). The suitability of this medium was demonstrated by comparing the results of RP-HPLC quantification in the liquid medium. Previous reports (Roig-Sagues *et al.* 1996; Moreno-Arribas *et al.* 2003) have described the occurrence of false-positive reactions, because of the formation of other alkaline compounds, in the amino acid decarboxylase media. However, in our study, identical results were obtained by using the decarboxylase screening medium and by HPLC to identify biogenic amine-producing bacteria strains (Table 1).

In our screening, no histamine production was observed in cultures of *O. oeni* grown in decarboxylase media (Table 1). These results differ from those of Del Campo *et al.* (2000), in which a large number of *O. oeni* (also isolated from Spanish ciders) were shown to be his-

tamine producers. Although the ability of *O. oeni*, the most important species in wine, to produce histamine has been described in previous studies (Coton *et al.* 1998; Guerrini *et al.* 2002; Landete *et al.* 2005), the results are contradictory. The reasons for this lack of concordance between authors could be, first, because amine formation is associated with specific strains but not with a species. Furthermore, determination of the amino acid decarboxylase activity of LAB may result in numerous false-positive responses, because of the formation of different alkaline compounds (Rodríguez-Jerez *et al.* 1994; Roig-Sagues *et al.* 1996; Moreno-Arribas *et al.* 2003).

To date, there has not been any report on the role of *L. diolivorans* and *L. collinoides* in the formation of biogenic amines. Among the LAB species found in ciders, *L. diolivorans* strains appear to be the main producers of histamine, and to a lesser extent of tyramine, while one isolate of *L. collinoides* was found to be a histamine producer (Table 2). Previously, Del Campo *et al.* (2000)

described six isolates of *Lactobacillus* spp. of cider origin showing histidine decarboxylase activity. These results suggest that *Lactobacillus* may be responsible for histamine production in ciders, in addition to *O. oeni* strains previously described (Del Campo *et al.* 2000). *Lactobacillus collinoides* is a heterofermentative LAB commonly encountered in English apple juice (Carr and Davies 1972), in which it may be responsible for the metabolism of quinic acid, the second most abundant organic acid in juice (Carr 1983). It has also been related to the alteration called 'bitterness' in ciders (Claisse and Lonvaud-Funel 2001; Sauvageot *et al.* 2002). *Lactobacillus diolivorans*, a heterofermentative and recently described LAB (Krooneman *et al.* 2002) has been associated with ropiness in ciders (Werning *et al.* 2006) and bitterness in wines (Gorga *et al.* 2002).

*Pediococcus* spp. are usually recognized as amine producers in wines, cheese, beer and fermented sausages. However, it is difficult to compare results with different food products. In wines, *Pediococcus* has been proposed as the main genus responsible for histamine production (Delfini 1989) showing the highest production of histamine (Landete *et al.* 2005). In the present work, no biogenic amine formation was found in the strains of *P. parvulus* investigated.

Putrescine was the most prominent biogenic amine found in most fermented beverages, such as wine (Marcobal *et al.* 2006) and cider (Garai *et al.* 2006). Research by Straub *et al.* (1995) and Moreno-Arribas *et al.* (2003) demonstrated that some strains of *Lactobacillus buchneri* may contribute to the formation of putrescine from ornithine decarboxylation. More recently, some putrescine-producing *O. oeni* from wine have been described (Coton *et al.* 1999; Guerrini *et al.* 2002; Marcobal *et al.* 2004). However, in our experimental conditions, among the LAB tested, we did not find any producer of putrescine.

We are not aware of any previous research in which *O. oeni* was the LAB related to tyramine formation during cider fermentation. Tyramine is the biogenic amine more commonly produced by LAB (Silla-Santos 1996; Bover-Cid and Holzapfel 1999). The ability to produce tyramine is usually not described in this species (Delfini 1989; Lonvaud-Funel and Joyeux 1994; Moreno-Arribas *et al.* 2000; Guerrini *et al.* 2002). Nevertheless, *O. oeni* DSM 20252 was able to produce tyramine in fermented carrots and synthetic medium (Choudhury *et al.* 1990). Moreover, the production of tyramine was also found in a strain of this species isolated from wine (Gardini *et al.* 2005).

The ability of tyramine or histamine synthesis by the amine producers in the laboratory medium MDA (decarboxylase medium) was confirmed in cider, when these strains were cultured in the beverage at pH 4 and 5.2 (Table 2). The amine production was significantly lower

in cider than in the decarboxylase medium. The best histamine producer was *L. diolivorans* 18 and isolates belonging to this species showed high variability in the obtained levels of this amine. Regarding tyramine production in cider, *O. oeni* 38 produced the highest concentrations of this amine. In addition, histamine and tyramine synthesis in the amine producers seems to be enhanced at pH 5.2, as it is more favourable for growth and activity of the amino acid decarboxylase enzymes (Bover-Cid and Holzapfel 1999).

## Discussion

Extensive studies have been conducted to isolate and identify bacteria species that cause biogenic amine accumulation in fermented beverages, such as wine and beer (Izquierdo-Pulido *et al.* 1996; Moreno-Arribas *et al.* 2000; Constantini *et al.* 2006). Bacterial species commonly found in cider were not included in previous studies. In this work, a wide range of cider LAB species was examined for histamine, tyramine and putrescine production as these are the more prevalent amines in ciders, as described by Garai *et al.* (2006). These authors also described the main physical and chemical characteristics of the ciders analysed.

Among the LAB microbiota growing in ciders, *L. diolivorans* was the group bearing the highest proportion of decarboxylase-positive isolates. Therefore, this species must make a considerable contribution to biogenic amine accumulation during cider-making. These results agree with that reported by Dueñas *et al.* (1994) who indicated that in apple musts and ciders, a fundamentally heterofermentative lactic flora was found, with *Lactobacillus* species being the most abundant. *Oenococcus oeni*, which are producers of histamine in other fermented beverages such as wine, seem not to be relevant histamine producers in cider. However, the aminogenic potential is not homogeneously distributed within a bacterial species. The results obtained are in agreement with the hypothesis that decarboxylase activity is a strain-dependent property, and probably influenced by other factors (substrate availability, growth conditions and nutrients, pH, ethanol) that interact favouring biogenic amine production.

Bover-Cid and Holzapfel (1999) reported that the optimum pH should be in the range 5.0–5.2 in order to enhance the synthesis and activity of the amino acid decarboxylase enzymes. Our results showed that, despite the more acidic conditions in ciders (close to pH 4), the amine producers were also able to synthesize histamine or tyramine and contribute to the spoilage of ciders. Hence, microbiological stabilization must be performed after malolactic fermentation in order to eliminate these altering LAB and to avoid the synthesis of detrimental biogenic amines in ciders.

Regarding the method to detect biogenic amine-producing bacteria, we can conclude in agreement with Bover-Cid and Holzapfel (1999), that the amino acid decarboxylase procedure is a simple method to detect bacteria with decarboxylase activity. This method does not require sophisticated analytical equipment and can be incorporated into a conventional test system for bacterial selection in order to investigate the capacity of biogenic amine formation by LAB.

### Acknowledgements

The work at the UPV was supported by the Universidad del País Vasco grant 00221.215-T-15889/2004 and by the Diputación de Gipuzkoa, Programa Red Gipuzkoana de Ciencia, Tecnología e Innovación (co-financed by the European Union). The work at the Instituto de Fermentaciones Industriales (CSIC) was partially supported by grants AGL2003-02436 and PTR1995-0736-OP, from the Spanish Ministerio de Educación y Ciencia. Gaizka Garai acknowledges the Gobierno Vasco (Dpto. Agricultura, Pesca y Alimentación) for the predoctoral fellowship. The authors also thank Gracia Garcia for her technical assistance.

### References

- Bover-Cid, S. and Holzapfel, W.H. (1999) Improved screening procedure for biogenic amine production by lactic acid bacteria. *Int J Food Microbiol* **53**, 33–41.
- Carr, J.G. (1983) Microbes I have known: a study of those associated with fermented products. *J Appl Bacteriol* **55**, 383–401.
- Carr, J.G. and Davies, P.A. (1972) The ecology and classification of strains of *Lactobacillus collinoides* nov. spec. a bacterium commonly found in fermenting apple juice. *J Appl Bacteriol* **35**, 463–471.
- Caspritz, G. and Radler, F. (1983) Malolactic enzyme of *Lactobacillus plantarum*. *J Biol Chem* **258**, 4907–4910.
- Choudhury, N., Hansen, W., Engesser, D., Hammes, W.P. and Holzapfel, W.H. (1990) Formation of histamine and tyramine by lactic acid bacteria in decarboxylase assay medium. *Lett Appl Microbiol* **11**, 278–281.
- Claisse, O. and Lonvaud-Funel, A. (2001) Primers and a specific DNA probe for detecting lactic acid bacteria producing 3-hydroxypropionaldehyde from glycerol in spoiled ciders. *J Food Prot* **64**, 833–837.
- Constantini, A., Cersosimo, M., del Prete, V. and García-Moruno, E. (2006) Production of biogenic amines by lactic acid bacteria: screening by PCR, thin-layer chromatography, and high-performance liquid chromatography of strains isolated from wine and must. *J Food Prot* **69**, 391–396.
- 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 Vitic* **49**, 199–204.
- Coton, E., Torlois, S., Bertrand, A. and Lonvaud-Funel, A. (1999) Biogenic amines and wine lactic acid bacteria. *Bull OIV* **815–816**, 22–35.
- Del Campo, G., Lavado, I., Dueñas, M. and Irastoza, A. (2000) Histamine production by some lactic acid bacteria isolated from ciders. *Food Sci Technol Int* **6**, 117–121.
- Delfini, C. (1989) Ability of wine malolactic bacteria to produce histamine. *Sci Aliment* **9**, 413–416.
- Dueñas, M., Irastorza, A., Fernandez, C., Bilbao, A. and Huerta, A. (1994) Microbial populations and malolactic fermentation of apple cider using traditional and modified methods. *J Food Sci* **59**, 1060–1064.
- Dueñas, M., Irastorza, A., Fernandez, C. and Bilbao, A. (1995) Heterofermentative *Lactobacilli* causing ropiness in Basque Country Ciders. *J Food Prot* **58**, 76–80.
- Gale, E.F. (1946) The bacterial amino acid decarboxylases. In *Advances in Enzymology*, vol. 6 ed. Nord, F.F. New York: Interscience Publishers.
- Garai, G., Dueñas, M.T., Irastoza, A., Martín-Álvarez, P.J. and Moreno-Arribas, M.V. (2006) Biogenic amines in natural ciders. *J Food Prot* **69**, 3006–3012.
- Gardini, F., Zaccarelli, A., Belletti, N., Faustini, F., Cavazza, A., Martuscelli, M., Mastrocola, D. and Suzzi, G. (2005) Factors influencing biogenic amine production by a strain of *Oenococcus oeni* in a model system. *Food Control* **16**, 609–616.
- Gorga, A., Claisse, O. and Lonvaud-Funel, A. (2002) Organisation of the encoding glycerol dehydratase of *Lactobacillus collinoides*, *Lactobacillus hilgardii* and *Lactobacillus diolivorans*. *Sci Aliment* **22**, 151–160.
- Guerrini, S., Mangani, S., Granchi, L. and Vincenzini, M. (2002) Biogenic amine production by *Oenococcus oeni*. *Curr Microbiol* **44**, 374–378.
- Izquierdo-Pulido, M., Font-Fabregas, J., Carceller-Rosa, J.M., Marine-Font, A. and Vidal-Carou, C. (1996) Biogenic amine changes related to lactic acid bacteria during brewing. *J Food Prot* **59**, 175–180.
- Krooneman, J., Faber, F., Alderkamp, A.C., Oude Elferink, S.J.H.W., Driehuis, F., Cleenwerck, I., Swings, J. et al. (2002) *Lactobacillus diolivorans* sp. nov., a 1,2-propanediol-degrading bacterium isolated from aerobically stable maize silage. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**, 639–646.
- Landete, J.M., Ferrer, S., Polo, L. and Pardo, I. (2005) Which lactic acid bacteria are responsible for histamine production in wine? *J Appl Microbiol* **99**, 580–586.
- 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.
- Marcobal, A., de las Rivas, B., Moreno-Arribas, M.V. and Muñoz, R. (2004) Identification of the ornithine

- decarboxylase gene in the putrescine-producer *Oenococcus oeni* BIFI-83. *FEMS Microbiol Lett* **239**, 213–220.
- Marcobal, A., Polo, M.C., Martín-Alvarez, P.J. and Moreno-Arribas, M.V. (2005) Biogenic amines content of red Spanish wines. Comparison of a direct ELISA and an HPLC method for the determination of histamine in wines. *Food Res Int* **38**, 387–394.
- Marcobal, A., Martín-Alvarez, P.J., Polo, M.C., Muñoz, R. and Moreno-Arribas, M.V. (2006) Formation of biogenic amines during red wine manufacture. *J Food Prot* **69**, 391–396.
- Moreno-Arribas, V., Torlois, S., Joyeux, A., Bertrand, A. and 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. 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.
- Novella-Rodríguez, S., Veciana-Nogues, M.T., Roig-Sagues, A.X., Trujillo-Mesa, A.J. and Vidal-Carou, M.C. (2004) Evaluation of biogenic amines and microbial counts throughout the ripening of gota cheeses from pasteurized and raw milk. *J Dairy Res* **71**, 245–252.
- Rodríguez-Jerez, J.J., Mora-Ventura, M.T., Lopez-Sabater, E.I. and Hernandez-Herrero, M.M. (1994) Histidine, lysine and ornithine decarboxylase bacteria in Spanish salted semi-preserved anchovies. *J Food Prot* **57**, 784–787.
- Roig-Sagues, A.X., Hernandez-Herrero, M.M., Lopez-Sabater, E.I., Rodríguez-Jerez, J. J. and Mora-Ventura, M.T. (1996) Histidine-decarboxylase activity of bacteria isolated from raw and ripened “Salchichon”, a Spanish cured sausage. *J Food Prot* **59**, 516–520.
- Sauvageot, N., Pichereau, V., Louarme, V.L., Hartke, A., Auffray, Y. and Laplace, J.M. (2002) Purification, characterization and subunits identification of the diol dehydratase of *Lactobacillus collinoides*. *Eur J Biochem* **269**, 5731–5737.
- Silla-Santos, M.H. (1996) Biogenic amines: their importance in foods. *Int J Food Microbiol* **29**, 213–231.
- Straub, B.W., Kicherer, M., Schilcher, S.M. and Hammes, W.P. (1995) The formation of biogenic amines by fermentation organisms. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung* **201**, 79–82.
- Vidal-Carou, M.C., Isla-Gavin, M.J., Marine-Font, A. and Codony-Salcedo, R. (1989) Histamine and tyramine in natural sparkling wine, vermouth, cider, and vinegar. *J Food Compos Anal* **2**, 210–218.
- Werning, M.L., Ibarburu, I., Dueñas, M.T., Irastorza, A., Navas, J. and Lopez, P. (2006) The *Pediococcus parvulus* *gtf* gene encoding the GTF glycosyltransferase and its application for PCR detection of β-glucan producer bacteria in foods. *J Food Prot* **69**, 161–169.
- Zapparoli, G., Torriani, S., Presente, P. and Dellaglio, F. (1998) Design and evaluation of malolactic enzyme targeted primers for rapid identification and detection of *Oenococcus oeni* in wine. *Lett Appl Microbiol* **27**, 243–246.
- Zee, J.A., Simard, R.E., L'Heureux, L. and Tremblay, J. (1983) Biogenic amines in wines. *Am J Enol Vitic* **34**, 6–9.



1                   **Evolution of amino acids and biogenic amines throughout the industrial**  
2   **manufacture of natural ciders**

3  
4   G. Garai-Ibabe<sup>1\*</sup>, A. Irastorza<sup>1</sup>, M.T. Dueñas<sup>1</sup>, P.J. Martín-Álvarez<sup>2</sup>, M.V. Moreno-Arribas<sup>2</sup>

5  
6   <sup>1</sup>Departamento de Química Aplicada. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad del País  
7   Vasco (UPV/EHU). Paseo Manuel de Lardizabal 3, 20018. San Sebastián, Spain.

8   <sup>2</sup>Instituto de Fermentaciones Industriales, CSIC, Juan de la Cierva 3, 28006 Madrid, Spain

9

10

---

<sup>1</sup> \* **Author for correspondance**

Tel.:+34 943 01 5318 Fax: +34 943 01 5270 E-mail address: gaizka.garai@ehu.es

## 1 **Abstract**

2 **BACKGROUND:** Biogenic amines are compounds that can cause food poisoning incidents if large amounts are  
3 ingested. However, information about biogenic amines and amino acid contents in natural cider is scarce. The  
4 aim of this work was to study: a) the evolution of nitrogen compounds and biogenic amines during its  
5 elaboration period and b) the factors that could have influence on these components, such as harvest year, and  
6 type of press.

7 **RESULTS:** Asparagine and aspartic acid were the most abundant amino acids in fresh musts, followed by  
8 glutamic acid, glutamine,  $\gamma$ -aminobutyric acid and  $\alpha$ -alanine acid in fresh musts. Furthermore, significant  
9 differences have been observed in the concentration of most of the amino acids related to harvest year. Main  
10 biogenic amine precursors (histidine, tyrosine and ornithine) were found in low quantities in the initial musts and  
11 levels of biogenic amines in ciders were very low. Putrescine was the main and only amine present in all musts  
12 and ciders and histamine was the second biogenic amine of quantitative importance in final ciders. Tyramine was  
13 only detected in one of the cidermakeing cellars at the end of elaboration period.

14 **CONCLUSION:** Levels of biogenic amines in natural ciders were lower than that detected in other foods and  
15 wines, which could be du to the low levels of free amino acids present in natural ciders. Therefore, natural ciders  
16 could be considered as safe products from the point of view of biogenic amine contents.

17

18

19

20

21 **Keywords:** Natural cider; amino acids; biogenic amines; cider manufacture

22

23

1           Some biogenic amines are compounds with adverse effects on human health although  
2 they are frequently found in fermented foods and beverages.<sup>1</sup> The consumption of foods  
3 containing high concentrations of biogenic amines can cause undesirable physiological  
4 effects, such as headache, nausea, hypo- or hypertension, cardiac palpitation and even  
5 anaphylactic shock.<sup>1,2</sup> However, they could also cause problems in commercial transactions.<sup>2,</sup>  
6 <sup>3</sup> The synthesis of biogenic amines is believed to result from the microbial decarboxylation of  
7 their precursor amino acids.<sup>4,5</sup> In winemaking, several researchers have found that biogenic  
8 amines are formed by yeasts during alcoholic fermentation,<sup>6</sup> although quantitatively only very  
9 low concentrations are reached in this stage, less than 3 mg L<sup>-1</sup>.<sup>7</sup> However, lactic acid bacteria  
10 have been generally associated with biogenic amine formation during the process of  
11 malolactic fermentation (MLF) in wine.<sup>8,9</sup> At this stage, the increase of biogenic amines was  
12 accompanied by a significant decline in the amino acid precursors.<sup>9</sup> Garai *et al.*<sup>10</sup> showed that  
13 heterofermentative LAB microbiota growing in ciders had the ability to produce biogenic  
14 amines, particularly histamine and tyramine. However, to our knowledge, no studies have  
15 been reported considering the elaboration steps and technological factors involved in the  
16 accumulation of amines in natural ciders.

17           The presence of biogenic amines in ciders was first reported by Zee *et al.*<sup>11</sup> and Vidal-  
18 Carou *et al.*<sup>12</sup> More recently, histamine, tyramine and putrescine have been found to be the  
19 prevailing amines in various commercial natural ciders from the Basque Country; very small  
20 amounts of ethylamine and phenylethylamine were also detected in only one sample.<sup>13</sup>  
21 However, biogenic amine content of natural ciders is lower than that detected in other foods  
22 and wines.<sup>7,14,15</sup> Natural cider is produced in small cider factories by using traditional  
23 techniques.<sup>13</sup> Fermentation of apple juice into cider is a complex microbial reaction. Yeasts  
24 are primarily responsible for the alcoholic fermentation of musts and most of ciders undergo

1 malolactic fermentation mediated by lactic acid bacteria. These processes occur  
2 spontaneously with indigenous yeasts and lactic acid bacteria of the musts.

3 Amino acids play an important role in the nutrition of all microorganisms that are found  
4 in apple juices.<sup>16</sup> These compounds are also the sequential precursors of amines, as a  
5 consequence, the higher the content of free amino acids, the higher the probability of biogenic  
6 amine production.<sup>17</sup> Information concerning soluble nitrogen in apples is very scarce.  
7 Research shows that the concentration of all amino acids generally decreases as fruits ripen.<sup>18</sup>  
8 Hence, climatological and edaphological conditions could be important in determining the  
9 ripening degree of apples and, as consequence, affect amino acids levels. In addition, there  
10 may be some technological factors that might also contribute to the initial amino acid  
11 amounts. Among them, is the influence of the type of press on cider nitrogen compounds  
12 which has not been previously examined. In this respect this study could be helpful since  
13 there is a tendency in cidermaking to replace the traditional presses by the pneumatic ones.

14 This work aimed to study the evolution of nitrogen compounds and biogenic amines in  
15 the elaboration period of natural ciders from 14 different cellars. Furthermore, factors that  
16 could have influence on these components, such as harvest year, and type of press, were  
17 examined in order to seek relationships between these factors and the nitrogen compounds  
18 and biogenic amine contents.

19

## 20 **Material and Methods**

### 21 *Cidermaking and sample collection*

22 To study biogenic amine and amino acid evolution during cidermaking, 76 samples  
23 were taken on harvest 2005 (26 samples) and 2006 (50 samples) from 14 cidermaking cellars  
24 in Basque Country. These samples were manufactured as follows. All of the musts were made  
25 with cider apple varieties and juice extraction was carried out using vertical mechanical

1 presses with a wooden platform (slow extraction process, 30 samples) or pneumatic presses  
2 (fast extraction process, 46 samples) and cider production was performed according to  
3 traditional methods, that is, without sulphiting, enzymatic clarification, bentonite fining or  
4 yeast inoculation.

5 From each cellar four to six samples were taken, depending of the harvest year and  
6 according to the following steps: 1) apple must (17 samples); 2) during active alcoholic  
7 fermentation (16 samples); 3) at the end of alcoholic and malolactic fermentation (17  
8 samples); 4) before bottling (16 samples); 5) after three months of bottling (four samples) and  
9 6) after four or five months of bottling (six samples). At each sampling time, samples were  
10 collected and transported under refrigeration. Each assay was performed at least in duplicate.

#### 11 ***Total Nitrogen Analysis***

12 Total nitrogen was determined by the Kjeldahl method with a DK 20 Heating Digestor  
13 System and a UDK 142 Automatic Distillation Unit from VELP Scientifica (Italy) and a 702  
14 SM Tritino Unit from Metrohn (Switzerland).

#### 15 ***Free Amino Acid Analysis***

16 Free amino acids were analyzed in duplicate by reversed-phase HPLC using a liquid  
17 chromatograph consisting of a Waters 600 Controller programmable solvent module (Waters,  
18 Milford, MA, USA), a WISP 710B autosampler (Waters, Milford, MA, USA), and a HP  
19 1046-A fluorescence detector (Hewlett Packard). Prior to RP-HPLC analysis, all samples  
20 were diluted with 0.4 M borate buffer, pH 10. Samples were submitted to an automatic  
21 precolumn double derivatization with *o*-phthaldialdehyde (OPA) to determine primary amino  
22 acids and to 9-fluorenylmethyl chloroformate (FMOC) to detect secondary amino acids.  
23 Chromatographic conditions were as described by Moreno-Arribas *et al.*<sup>19</sup> Separations were  
24 performed on a Waters Nova-Pak C18 (150 x 3.9 mm i.d., 60 Å, 4 µm) column and the same  
25 type of precolumn. Detection was performed by fluorescence ( $\lambda$  excitation = 340,  $\lambda$  emission

1 = 425) and chromatographic data were collected and analyzed with a Millennium32 system  
2 (Waters, Milford, MA).

### 3 ***Biogenic amines analysis***

4 Biogenic amines were analyzed by reversed-phase HPLC according to the method  
5 described by Marcobal *et al.*<sup>7</sup> The chromatographic system was the same one used for the  
6 amino acid analysis. Samples were previously filtered through Millipore filters (0.45 μm) and  
7 then directly injected in duplicate onto the HPLC system. All reagents used were HPLC  
8 grade.

### 9 ***Conventional parameters***

10 Contents of sugars (glucose, fructose, mannitol), organic acids (malic, lactic, and acetic  
11 acid) and other metabolites (glycerol, 1,3-propanediol and ethanol) were measured by HPLC  
12 using an ion-exclusion, cation exchange column (Aminex HPX-87H, Biorad) and a UV-VIS  
13 and RI detector. The column was eluted with diluted sulphuric acid (pH 2.2) at 65 °C, at a  
14 flow rate of 0.6 ml min<sup>-1</sup>. For analysis, supernatants from centrifuged samples (16,000g, 30  
15 min) were filtered through a 0.22 μm membrane filter. The pH and density at 20 °C were  
16 determined in accordance with the OIV (Organisation Internationale de la Vigne et du Vin)  
17 methodology.<sup>20</sup>

### 18 ***Microbiological analysis***

19 Yeasts, acetic acid bacteria and lactic acid bacteria were enumerated by spread-plating  
20 0.1 ml aliquots of serial dilutions in Ringer solution on malt agar (Difco, Detroit, USA), apple  
21 juice-yeast extract agar and MRS agar (Difco, Detroit, USA) supplemented with 20% tomato  
22 juice (pH 4.8), respectively. For yeast growth, 100 mg L<sup>-1</sup> of streptomycin and 10<sup>5</sup> IU L<sup>-1</sup> of  
23 penicillin G were added to suppress the growth of acetic and lactic acid bacteria, respectively.  
24 For acetic acid bacteria growth, the culture medium was supplemented with a solution of 1%  
25 (v/v) of 0.5% pimarcin solution, and 1% (v/v) of penicillin G (2.5 x 10<sup>5</sup> IU). To enumerate

1 lactic acid bacteria, a solution of 1% (v/v) of 0.5% pimaricin solution and 0.3% (v/v) 2-  
2 phenylethanol was added and incubation took place in a CO<sub>2</sub> incubator in air supplemented  
3 with 5% CO<sub>2</sub>.

#### 4 ***Statistical methods***

5 The statistical methods used for the data analysis were: multifactor analysis of variance  
6 to examine the main effects together of the three factors studied (harvest year, press type and  
7 cidermaking process), and cluster analysis (from standardized variables) to examine the main  
8 effect of the above mentioned factors. The STATISTICA program for Windows, version 7.1  
9 was used for data processing (StatSoft, Inc., 2005, www.statsoft.com). This program was run  
10 on a personal computer.

11

#### 12 **Results and discussion**

13 To study the evolution of the nitrogen compounds content during cidermaking, the  
14 cellars provided a total of 76 samples. The samples were manufactured in different cider-  
15 producing cellars from the 2005 and 2006 harvest, with two press types, and collected at  
16 different stages of the cidermaking process. Mean values, standard deviations and the range  
17 for each chemical variable analyzed (amino acids, biogenic amines contents and other  
18 compounds) are listed in Table 1.

19 A multifactor analysis of variance was applied in order to examine the main effects of  
20 harvest year (2005 and 2006) and of the two technological factors, namely, press type (slow  
21 and fast extraction levels) and manufacture steps (initial, during alcoholic fermentation, at the  
22 end of alcoholic, and before bottling), on each of the analysed variables. The results are also  
23 shown in Table 1. The cidermaking step has a statistically significant effect on the majority of  
24 analyzed variables ( $p < 0.05$ ); the harvest year also has a statistically significant effect on many  
25 of the variables ( $p < 0.05$ ), whereas the press type factor has a statistically significant effect in

1 few of the variables analyzed ( $p < 0.05$ ). In order to obtain a preliminary view of the main  
2 causes for the variation, a cluster analysis was carried out on the data of the free amino acids,  
3 biogenic amines, and the other compounds quantified in the 76 samples studied (variables in  
4 Table 1). Figure 1 shows the obtained dendrogram. The squared Euclidean distance was taken  
5 as a measure of the proximity between two samples and Ward's method was used as a linkage  
6 rule. The variables were previously standardized. As may be seen in the figure mentioned  
7 above, two main groups of samples were obtained according to the cidermaking process, the  
8 samples in the two first stages appear in the group on the right hand and the remaining  
9 samples appear in the other group. The dendrogram in Figure 1 suggests that the major  
10 differences are due to the varying stages of the elaboration process and also to the year of  
11 harvest.

12       There is little information available concerning nitrogen compounds and free amino acid  
13 concentrations as precursors of biogenic amines in cidermaking. In the present study,  
14 significant differences have been observed in the values of most of the amino acids, except  
15 asparagine, threonine,  $\alpha$ -alanine, GABA, valine, phenylalanine and leucine, that are related to  
16 harvest year, the mean concentrations of most of the amino acids being higher in the 2005  
17 samples than in 2006 ones (Table 1). Differences were significant for all the amino acids due  
18 to the manufacture step (Table 1) however, in relation to the type of press, no significant  
19 effect was observed for most amino acids.

20       With respect to the initial amino acid content in fresh musts, asparagine and aspartic  
21 acid were the most abundant compounds, which were followed by glutamic acid, glutamine,  
22  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) and  $\alpha$ -alanine. The mean concentrations for these compounds in  
23 fresh musts from two year sampling period were 12.34, 8.22, 4.87, 5.28, 6.23 and 6.42 mg L<sup>-1</sup>,  
24 respectively. Similar results have been previously reported indicating that aspartic acid,  
25 asparagine and glutamic acid were among the main amino acids in apples<sup>16,21,22</sup>, and apple



1 juice concentrates.<sup>23</sup> Asparagine and aspartic acid were also the predominant amino acids in  
2 base cider during the manufacture of sparkling cider.<sup>24</sup> However, minor amounts of serine  
3 (2.51 mg L<sup>-1</sup>) were found at the initial stages of fermentation, in comparison to what was  
4 reported by Blanco Gomis *et al.*<sup>22</sup> The concentrations of the rest of amino acids were lower.

5 To have a global vision of the change of the amino acids content in cidermaking, Figure  
6 2A shows the mean values and 95% confidence intervals of the sum of free amino acids in the  
7 samples of the two years together with their evolution during the cidermaking process. The  
8 main observation from the figure is that sharp decreases of the sum of all amino acids were  
9 found and, thus, the stage of elaboration resulted significant for all amino acids (Table 1). As  
10 previously reported, amino acids play an important part in the nutrition of all microorganisms  
11 that are found in apple juices.<sup>16</sup> Moreover, amino acids may be involved in decarboxylation  
12 reactions linked to the formation of esters, as reported in winemaking.<sup>25</sup> After bottling (stages  
13 five and six), slight increases for the majority of amino acids were measured in the samples  
14 from the 2005 season (Figure 2A).

15 Total nitrogen was the only variable influenced by the type of press. Significantly lower  
16 values of this variable were observed in samples obtained with the pneumatic press (Table 1).  
17 These results could be due to the fact that in traditional pressing the same apples were pressed  
18 successively several times (seven or eight times), thereby contributing to a better extraction of  
19 nitrogen compounds. According to our results, it seems that total nitrogen is also significantly  
20 influenced by the manufacture stage (Figure 2B). The increase in the sum of amino acids of  
21 ciders after bottling did not correspond to the increase in total nitrogen content, which was  
22 higher. These results could be due to the lack of fining before bottling and, as a consequence,  
23 cider is maintained in contact with yeasts and bacterial lees. In these conditions, the  
24 simultaneous release of proteins and/or peptides, together with amino acids, from yeast during

1 autolysis may take place, in a similar way to that which occurs in aged wines with yeast  
2 lees.<sup>19,25</sup>

3 The amino acids threonine and serine form part of the O-glycosidic bonds of yeast  
4 mannoproteins. The data shows a rise in threonine and serine during the last steps of  
5 cidermaking (Figure 3). This has also been observed during the ageing of sparkling ciders<sup>24</sup>  
6 and it is a usual trend during the ageing of sparkling wines.<sup>19</sup> The yeast excretion and  
7 autolysis at the end of the fermentation explains this process.<sup>16</sup>

8 With regard to biogenic amine content evolution during the six steps of the cidermaking  
9 process, there are no mayor changes, if it is compared with the changes observed in the amino  
10 acids concentration (Table 2). Putrescine was the only amine present in all musts from the two  
11 years, the maximum values being 6.65 mg L<sup>-1</sup> in 2005 and 3.17 mg L<sup>-1</sup> in 2006. The statistical  
12 analysis showed significant differences for this amine content with regard to the year and the  
13 factor stage of cidermaking (Table 1). In the musts of the 2005 season, the initial quantities,  
14 close to 6 mg L<sup>-1</sup>, were maintained during the first stages of cidermaking, but later it decline  
15 by nearly half (Figure 4). This could be due to the incorporation of this polyamine in yeast  
16 metabolism as spermine and spermidine precursor. On the other hand, the content of this  
17 amine could also diminish by oxidative degradation or by reactions with other substances  
18 present in cider. Slighter decreases were detected in the amounts of putrescine in musts from  
19 the 2006 season. Concentrations ranging from 2.19 to 2.91 mg L<sup>-1</sup> were found in all final  
20 ciders. These results are in agreement with a previous report on biogenic amine content in  
21 commercial ciders<sup>13</sup> in which the highest concentrations of the biogenic amines were recorded  
22 for putrescine, histamine and tyramine (in descending order of magnitude). In addition, our  
23 results suggest that putrescine can be related with apple or the must, in a similar way to what  
24 is found in grapes.<sup>9,26</sup> In agreement with the previous report<sup>13</sup>, histamine was the second  
25 biogenic amine of quantitative importance in final ciders of the two seasons (1.03 mg L<sup>-1</sup> and

1 1.53 mg L<sup>-1</sup>, respectively). However, tyramine was only detected in one of the cidemaker  
2 cellars at the end of elaboration period (1.36 mg L<sup>-1</sup>). With respect to the factors studied in  
3 relation to histamine formation, the stage of cidemaking and season were statistically  
4 significant (Table 1). Histamine was not found in the fresh musts of the 2005 season, it was  
5 only found at the end of the process (Figure 4). However, in 2006 it appeared in fresh must in  
6 low amounts, ranging from 1.40-1.55 mg L<sup>-1</sup> and later changes were not detected.

7 Phenylethylamine and cadaverine were only detected in very few samples from the 2005  
8 season; in amounts around 4 and 6 mg L<sup>-1</sup>, respectively, and disappeared before bottling. The  
9 methylamine and ethylamine amines were only detected in very low amounts (below 1 mg L<sup>-1</sup>  
10 <sup>1</sup>) and no important changes occurred in these amines either during cidemaking or as a  
11 consequence of the season.

12 Lactic acid bacteria have been generally associated with biogenic amine formation  
13 during malolactic fermentation (MLF) in wine. Taking into account the evolution of lactic and  
14 L-malic acids, malolactic fermentation occurred concomitantly with alcoholic fermentation in  
15 all the studied musts (Figure 5). This fact can be explained by the initial high levels of lactic  
16 acid bacteria (from 10<sup>5</sup>-10<sup>7</sup> cfu mL<sup>-1</sup>) which were not controlled by sulphur dioxide addition.  
17 This practice is rarely used in the elaboration of natural ciders as the addition of chemicals is  
18 preferably kept to a minimum in order to maintain the organoleptic qualities of the final  
19 product.<sup>27</sup> As a consequence, lactic acid bacteria were the predominant population in final  
20 products. This population can also use the glycerol produced by yeasts during glycerol-  
21 pyruvic fermentation, as observed in six of the analyzed musts.<sup>28</sup> In two of them, it was  
22 completely metabolized with a parallel increase in acetic acid content (data not shown).

23 With respect to amino acid precursors (histidine, tyrosine and ornithine), of the main  
24 biogenic amines in ciders (histamine, tyramine and putrescine, respectively), all of them were  
25 found in low quantities in initial musts. Levels of histidine, ranging from 0.36 to 3.21 mg L<sup>-1</sup>

1 were found in nine of the 13 musts in the 2006 season and around 2.4-2.7 mg L<sup>-1</sup> in 2005.  
2 After complete disappearance associated to growth of yeasts and lactic acid bacteria, slight  
3 increases of this amino acid were detected at later stages (after bottling, stages five and six);  
4 to be more specific, it was found in two of the musts of the 2005 season in which a low  
5 formation of histamine was detected. In relation to tyrosine evolution, there was a similar  
6 behaviour to histidine. However, although in all 2005 musts, an increase of this amino acid  
7 was detected at later stages of sampling; tyramine was formed in only one of the ciders (1.3  
8 mg L<sup>-1</sup>). At these stages, predominant microbiota was constituted by lactic acid bacteria with  
9 populations between 10<sup>6</sup>-10<sup>7</sup> cfu ml<sup>-1</sup>, probably with histidine decarboxylase activity, which  
10 could utilise the nitrogenous compounds excreted by the yeasts at the end of the  
11 fermentation.<sup>29</sup>

12 Another relevant finding was the reduction or disappearance of arginine during the  
13 manufacture of the ciders studied (Figure 3C). Heterofermentative lactic acid bacteria, which  
14 are the main population in cidermaking<sup>30</sup>, could degrade this aminoacid producing ornithine  
15 via the arginine deiminase pathway.<sup>31</sup> However, in our study, ornithine concentrations also  
16 decrease to a similar extent as arginine during cidermaking (Figure 3D). One possible  
17 explanation of this reduction may be the simultaneous transformation of ornithine to  
18 putrescine by lactic acid bacteria strains with ornithine decarboxylase activity. However, no  
19 increases in putrescine contents were detected in the studied samples, probably due to its  
20 gradual transformation to other polyamines. On the other hand, the presence of putrescine-  
21 forming bacteria seems to be rare in natural ciders.<sup>10</sup> During industrial manufacture, natural  
22 ciders underwent alcoholic and malolactic fermentation spontaneously given that it is  
23 common that yeast and bacterial metabolic activity occurs simultaneously. These complex  
24 microbiological interactions may, at least partially, explain the above results.

1 In summary, from the results obtained in this study, it can be concluded that there is a  
2 significant reduction in amino acids during the manufacture of natural ciders. This is probably  
3 due to the consumption of amino acids by yeasts and bacteria during fermentation. After  
4 bottling, there was a slight increase for most amino acids observed, thus suggesting that  
5 amino acids are released by yeast and bacterial autolysis. Amino acids are essential for the  
6 biosynthesis of biogenic amines. The low levels of free amino acids found in natural ciders  
7 may be decisive in the formation of biogenic amines. Therefore, as previously mentioned<sup>13</sup>,  
8 natural ciders can be considered to have very little amine content.

### 9 **Acknowledgements**

10 This study was supported by the Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación (Projects,  
11 PET2007-0134 and AGL2006-04514). The work at the UPV was partially supported by the  
12 Diputación de Gipuzkoa, Programa Red Gipuzkoana de Ciencia, Tecnología e Innovación  
13 (co-financed by the European Union) and UPV/EHU (EHU06/93). Gaizka Garai-Ibabe  
14 acknowledges the Gobierno Vasco (Dpto. Agricultura, Pesca y Alimentación) for the pre-  
15 doctoral fellowship and the Asociación de productores de sidra de Gipuzkoa.

16

### 17 **References**

- 18 1- Silla-Santos MH, Biogenic amines: their importance in foods. *Int J Food Microbiol*  
19 **29**: 213–231 (1996).
- 20 2- Bauza T, Blaise A, Teissedre PL, Cabanis JC, Kanny G, Moneret-Vautrin, DA and  
21 Daumas F, Biogenic amines in wine. Metabolism and toxicity. *Bull OIV* **68** : 42-67  
22 (1995).
- 23 3- Lehtonen P, Determination of amines and amino acids in wine - a review. *Am J Enol*  
24 *Vitic* **47**: 127-133 (1996).

- 1 4- Brink TB, Damink C, Joosten HMLJ and Huis in't Veld J H J, Occurrence and  
2 formation of biologically active amines in foods. *Int J Food Microbiol* **11**: 73–84  
3 (1990).
- 4 5- Hálasz A, Barath A, Simon-Sarkadi L and Holzappel W, Biogenic amines and their  
5 production by microorganism in food. *Trends Food Sci Technol* **5**: 42-49 (1994).
- 6 6- Caruso M, Fiore M, Contursi M, Salzano G, Paparella A and Romano P, Formation of  
7 biogenic amines as criteria for the selection of wine yeast. *World J Microbiol*  
8 *Biotechnol* **18**: 159-163 (2002).
- 9 7- Marcobal A, Polo MC, Martín-Álvarez PJ and Moreno-Arribas MV, Biogenic amines  
10 content of red Spanish wines. Comparison of a direct ELISA and an HPLC method for  
11 the determination of histamine in wines. *Food Res Int* **38**: 387-394 (2005).
- 12 8- Landete JM, Polo L, Ferrer S and Pardo I, Biogenic amines in wines from three  
13 Spanish Regions. *J Agric Food Chem* **53**:1119-1124 (2005).
- 14 9- Marcobal A, Martín-Alvarez PJ, Polo MC and Moreno-Arribas MV, Formation of  
15 biogenic amines throughout the industrial manufacture of red wine. *J Food Prot* **69**:  
16 397-404 (2006).
- 17 10- Garai G, Dueñas MT, Irastorza A and Moreno-Arribas MV, Biogenic amine  
18 production by lactic acid bacteria isolated from ciders. *Lett Appl Microbiol* **45**: 473-  
19 478 (2007).
- 20 11- Zee JA, Simard RE, Heureux LL and Tremblay J, Biogenic amines in wines. *Am J*  
21 *Enol Vitic* **34**: 6–9 (1983).
- 22 12- Vidal-Carou MC, Isla-Gavin MJ, Marine-Font A and Codony-Salcedo R, Histamine  
23 and tyramine in natural sparkling wine, vermouth, cider, and vinegar. *J Food Compos*  
24 *Anal* **2**: 210–218 (1989).

- 1 13-Garai G, Dueñas MT, Martín-Alvarez PJ, Irastorza A and Moreno-Arribas MV,  
2 Biogenic amines in natural ciders. *J Food Prot* **69**: 3006-3012 (2006).
- 3 14-Ferreira, IMPLVO and Pinho O, Biogenic amines in Portuguese traditional foods and  
4 wines. *J Food Protect* **69**: 2293-2303 (2006).
- 5 15- Moreno-Arribas MV and Polo MC, Occurrence of lactic acid bacteria and biogenic  
6 amines in biologically aged wines. *Food Microbiol* **25** : 875-881 (2008).
- 7 16-Beech FW and Carr J, *Economic Microbiology in Alcoholic beverages*, vol 1. London  
8 (UK). A.H. Rose. Cider and Perry; p.139-313 (1977).
- 9 17-Herbert P, Cabrita MJ, Ratola N, Laureano O and Alves A, Relationship between  
10 biogenic amines and free amino acid contents of wines and musts from Alentejo  
11 (Portugal). *J Environ Sci Heal B* **41** : 1171-1186 (2006).
- 12 18- Mangas JJ, Moreno J, Picinelli A and Blanco D, Characterization of cider apple fruits  
13 according to their degree of ripening. A chemometric approach. *J Agric Food Chem*  
14 **46**: 4174-4178 (1998).
- 15 19- Moreno-Arribas MV, Pueyo E, Polo MC and Martín-Álvarez PJ, Changes in the amino  
16 acid composition of the different nitrogenous fractions during the aging of wine with  
17 yeast. *J Agric Food Chem* **46**: 4042-4051 (1998).
- 18 20-OIV (Organisation Internationale de la Vigne et du Vin), Compendium of  
19 International methods of wine and must analysis. Vol 1. [Internet]. France. Available  
20 from: <http://www.oiv.int/uk/accueil/index.php> (2009).
- 21 21-Baron A, Goas JM and Drilleau JM, Evolution au cours de la maturation des fractions  
22 azotées et des acides aminés dans la pomme et dans le moût correspondant. *Sci*  
23 *Aliments* **2**: 15-23 (1982).

- 1 22- Blanco-Gomis D, Picinelli-Lobo AM, Gutiérrez-Alvarez MD and Mangas-Alonso JJ,  
2 Determination of amino acids in apple extracts by high performance chromatography.  
3 *Chromatographia* **29**: 155-160 (1990).
- 4 23- Elkins RE, Matthys A, Lyon R and Huang CJ, Characterization of commercially  
5 produced apple juice concentrate. *J Food Comp Anal* **9**: 43-56 (1996).
- 6 24- Suárez Valles B, Palacios García N, Rodríguez Madrera R and Picinelli Lobo A,  
7 Influence of yeast strain and aging time on free amino acid changes in sparkling  
8 ciders. *J Agric Food Chem* **53**: 6408-6413 (2005).
- 9 25- Alcaide-Hidalgo J, Moreno-Arribas MV, Martín-Álvarez PJ and Polo MC, Influence of  
10 malolactic fermentation, postfermentative treatments and ageing with lees on nitrogen  
11 compounds of red wines. *Food Chem* **103**: 572-581 (2007).
- 12 26- del Prete V, Costantini A, Cecchini F, Morassut M and García-Moruno E, Occurrence  
13 of biogenic amines in wine: The role of grapes. *Food Chem* **112**: 474-481 (2009).
- 14 27- del Campo G, Berregi I, Santos JI, Dueñas M and Irastorza A, Development of  
15 alcoholic and malolactic fermentations in highly acidic and phenolic apple musts.  
16 *Biores Techn* **99**: 2857–2863 (2008).
- 17 28- Garai-Ibabe G, Ibarburu I, Berregi I, Claisse O, Lonvaud-Funel A, Irastorza A and  
18 Dueñas MT, Glycerol metabolism and bitternes producing lactic acid bacteria in  
19 cidermaking. *Int J Food Microbiol* **121**: 253-261 (2008).
- 20 29- Beech FW, Cider making and cider research. A review. *J Inst Brew* **78**: 477-491  
21 (1972).
- 22 30- Dueñas M, Irastorza A, Fernandez C, Bilbao A and Huerta A, Microbial populations  
23 and malolactic fermentation of apple cider using traditional and modified methods. *J*  
24 *Food Sci* **59**: 1060–1064 (1994).



---

1        31- Liu SQ, Pritchard GG, Hardman MJ and Pilone GJ, Occurrence of arginine deiminase  
2            pathway enzymes in arginine catabolism by wine lactic acid bacteria. *Appl Environ*  
3            *Microbiol* **61**: 310-316 (1995).

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

1 **Figure 1.**

2

3 Dendrogram of the samples according to the data of the variables showed in Table 1. Samples  
4 are labeled according to the year harvest (2005 and 2006), the levels of the press type (1: slow  
5 extraction and 2: fast extraction) and cidermaking steps (1-6) factors.

6

7 **Figure 2.**

8

9 Mean values and 95% confidence intervals of A) the sum of free amino acids (In solid lines  
10 (—), results for harvest year 2005 and dashed lines (- - -), for harvest year 2006) and B) total  
11 nitrogen content in the samples during the cidermaking steps (in solid lines (—), results for  
12 slow extraction and in dashed lines (- - -) for fast extraction)

13

14 **Figure 3.**

15 Mean values and 95% confidence intervals of the content of the amino acids A) threonine, B)  
16 serine, C) arginine and D) ornithine in the samples during the cidermaking steps. In solid lines  
17 (—), results for harvest year 2005 and in dashed lines (- - -), for harvest year 2006.

18

19 **Figure 4.**

20 Mean values and 95% confidence intervals of the content of A) putrescine and B) histamine  
21 in the samples during the cidermaking steps. In solid lines (—), results for harvest year 2005  
22 and in dashed lines (- - -), for harvest year 2006.

23

24

25

26

27

1 **Figure 5.**

2 Mean values and 95% confidence intervals of the A) yeasts population, B) density, C) malic  
3 acid and D) lactic acid bacterial population in the samples during the cidermaking steps. In  
4 solid lines (—), results for harvest year 2005 and in dashed lines (- - -), for harvest year 2006.

5

6



Submitted to Journal of Agricultural and Food Chemistry

**Screening and selection of 2 substituted (1,3)- $\beta$ -D-glucan producing lactic acid bacteria and exopolysaccharide characterization**

Journal:	<i>Journal of Agricultural and Food Chemistry</i>
Manuscript ID:	Draft
Manuscript Type:	Article
Date Submitted by the Author:	
Complete List of Authors:	Garai-Ibabe, Gaizka; Universidad del País Vasco (UPV) Areizaga, Javier; Universidad del País Vasco (Facultad de Químicas), Química Aplicada Aznar, Rosa; University of Valencia, Microbiology Elizaquibel, Patricia; University of Valencia, Microbiology Prieto, Alicia; CIB - Centro de Investigaciones Biológicas Irastorza, Ana; Universidad del País Vasco (Facultad de Químicas), Química Aplicada Dueñas, Maria; Universidad del País Vasco (Facultad de Químicas), Química Aplicada



1 **Screening and selection of 2 substituted (1,3)- $\beta$ -D-glucan producing lactic**  
2 **acid bacteria and exopolysaccharide characterization**

3

4 Gaizka Garai-Ibabe<sup>1</sup>, Javier Areizaga<sup>1</sup>, Rosa Aznar<sup>2</sup>, Patricia Elizaquibel<sup>2</sup>, Alicia Prieto<sup>3</sup>, Ana  
5 Irastorza<sup>1</sup>, María Teresa Dueñas<sup>1</sup>.

6

7 <sup>1</sup> Facultad de Ciencias Químicas, Universidad del País Vasco (UPV/EHU). Paseo Manuel de  
8 Lardizabal, 3. 20018. Donostia, Spain.

9

10 <sup>2</sup> Departamento de Microbiología, Universitat de Valencia, Burjassot, Valencia; Instituto de  
11 Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA), Consejo Superior de Investigaciones  
12 Científicas (CSIC), Burjassot, Spain.

13

14 <sup>3</sup> Centro de Investigaciones Biológicas, C.S.I.C, Ramiro de Maeztu 9. 28040 Madrid, Spain.

1 **ABSTRACT**

2           The ability to produce a 2 substituted (1,3)- $\beta$ -D-glucan was screened in 147 LAB  
3 strains recovered from cider. Of them, 32 identified as *Pediococcus parvulus*, exhibited a ropy  
4 character in MRS broth and were PCR positive for the presence of the *gtf* gene, related to the  
5 synthesis of the  $\beta$ -glucan. Half of the strains produced more than 100 mg L<sup>-1</sup> of EPS. <sup>1</sup>H  
6 NMR spectra of the crude EPSs were identical to that previously described for *P. parvulus*  
7 2.6, indicating that all are 2 substituted (1,3)- $\beta$ -D-glucans. The EPSs from two of the isolates  
8 were subjected to acid hydrolysis and methylation analysis, confirming the NMR results. Size  
9 exclusion chromatography (SEC) showed in all crude EPSs the presence of two different  
10 molecular mass fractions of about 10<sup>7</sup> Da and 10<sup>4</sup> Da, whose relative proportions varied  
11 among strains. EPS amounts and concentrations of high molecular fraction are linearly  
12 correlated. Intraspecific diversity of isolates was determined by RAPD profiles. Based on  
13 genotypic and phenotypic characteristics, two strains were selected to be further studied as  
14 probiotics.

15  
16 **KEYWORDS:** (1,3)(1,2)- $\beta$ -D-glucans; *Pediococcus parvulus*, screening, exopolysaccharide  
17 characterization

## 1 INTRODUCTION

2 Exopolysaccharide (EPS) producing lactic acid bacteria are becoming industrially  
3 important microorganisms for elaboration of functional food products. Most of them are  
4 heteropolysaccharide (HePS) producers and are being used as natural biothickeners to  
5 improve the texture and stability of some dairy products, such as fermented milks and cheese.  
6 In addition, health benefits have been claimed for EPS synthesized by LAB (1). In contrast,  
7 homopolysaccharide (HoPS) producing LAB strains have been rarely evaluated and used  
8 only for fermentation of non-dairy products (2).

9 (1,3)- $\beta$ -D-glucans from several bacteria and fungi constitute a group of natural  
10 polysaccharides with a main chain of (1,3)-linked  $\beta$ -glucopyranosyl units. It can be linear or  
11 branched with either (1,6) or (1,2)-linked side chains of varying length and distribution. In  
12 plants, (1,3)- $\beta$ -D-glucans exhibit a linear structure with mixed  $\beta$ -(1,3) and  $\beta$ -(1,4) glycosidic  
13 bonds (3). These polysaccharides have been extensively studied in the last decade, and most  
14 of these polymers, such as curdlan and scleroglucan, exhibit interesting physicochemical  
15 properties, especially gelling capability. Moreover, (1,3)- $\beta$ -D-glucans are considered as  
16 biological response modifiers and numerous publications describe their biological activities  
17 and therapeutic uses (4). Its biological effects are influenced by their degree of branching,  
18 chain length, and tertiary structure (5).

19 In this research line, synthesis of (1,3)- $\beta$ -glucans by LAB represents a promising  
20 alternative to diversify and extent the number and applications of EPS producing LAB in the  
21 development of new functional foods. Thus, *P. parvulus* 2.6 isolated from a ropy cider  
22 synthesizes a 2-substituted (1,3)- $\beta$ -D-glucan and the analysis of its rheological properties  
23 showed that it has potential utility as a biothickener (6). In addition, human ingestion of an  
24 oat-based food elaborated with *P. parvulus* 2.6 resulted in a decrease of serum cholesterol  
25 levels, boosting the effect previously demonstrated for (1,3)(1,4)- $\beta$ -D-glucans in oats (7). The



1 potential of *P. parvulus* 2.6 as probiotic strain has been examined and it resists  
2 gastrointestinal stress, adheres to Caco-2 cells and induces the production of inflammation-  
3 related cytokines by polarized macrophages (8).

4 Synthesis of the 2-substitute (1,3)- $\beta$ -D-glucan by *P. parvulus* 2.6 is controlled by a  
5 single transmembrane glucosyltransferase (GTF), which polymerizes glucosyl residues from  
6 UDP glucose (9). A PCR assay, based on the glicosyltransferase gene (*gtf*) from *P. parvulus*  
7 2.6, has been developed for the detection of (1,3)- $\beta$ -D-glucan producing LAB (10). This *gtf*  
8 gene has also been detected on other EPS producing LAB, such as *Lactobacillus diolivorans*  
9 and *Oenococcus oeni* (10, 11) but, besides the  $\beta$ -glucan, these strains produce a  $\alpha$ -glucan and  
10 a heteropolysaccharide, respectively.

11 The aim of this work was to screen the ability to produce (1,3)- $\beta$ -D-glucans in a large  
12 number of LAB, isolated from ropy and non altered cider. We found that 29 *P. parvulus*  
13 isolates synthesize a single type of exopolysaccharide, a 2-substituted (1,3)- $\beta$ -D-glucan.  
14 Intraspecific diversity of these strains was also examined by randomly amplified polymorphic  
15 DNA with three separate random primers. Based on their EPS yields, high molecular masses  
16 of  $\beta$ -glucans, and RADP profiles, two of them were selected to be further studied as  
17 probiotics.

18

## 19 MATERIAL AND METHODS

20 **Bacterial strains and growth conditions.** A total of 147 LAB strains belonging to  
21 the culture collection of the UPV/EHU (Donostia-San Sebastián, Spain) were used in this  
22 study for screening of EPS production. They were previously isolated from both ropy and  
23 non-altered natural ciders between 1993 and 2005. Strains were stored at -80 °C in Man  
24 Rogosa Sharpe (MRS) broth (Pronadisa, Madrid, Spain), containing 20% (v/v) glycerol.  
25 Before experimental use, bacteria were propagated in MRS broth supplemented with 0.05%

1 (wt/v) L-cysteine hydrochloride (Merck, Darmstad, Germany) and 0.1% (wt/v) Tween 80  
2 (Pronadisa, Barcelona, Spain) at 28 °C in an atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub>.

3 For EPS isolation and quantification, strains were grown in MST broth (12). Batch  
4 fermentations without pH control were carried out in fully filled 250 mL screw-cap flasks for  
5 96 h at 28 °C in an atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub>. Growth was monitored  
6 spectrophotometrically at 600 nm (OD<sub>600</sub>).

7 **Rapid screening of EPS-producing LAB strains.** Screening for EPS-producing  
8 LAB was performed in MRS broth (pH 4.8) supplemented with 20% (v/v) tomato juice and 5  
9 g L<sup>-1</sup> fructose (MRS-T-F) at 28 °C in an atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub> for 48 h. The EPS-  
10 producing ability was evaluated by visual observation of the culture viscosity. EPS positive  
11 strains showed a ropy liquid culture and upon agitation, the cell deposit formed a long string.

12 **Carbohydrate fermentation.** Bacteria were grown in MRS broth (without glucose)  
13 containing chlorophenol red (0.04 g L<sup>-1</sup>), as pH indicator and supplemented with 2% (wt/v) of  
14 the following carbohydrates: glucose, fructose, galactose, lactose, sucrose, maltose, sorbitol,  
15 raffinose, mannitol, rhamnose, trehalose, or xylose. Incubation was performed for 7 days, at  
16 28 °C in an atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub>,

17  **$\beta$ -D-glucan agglutination test.** Agglutination tests were performed using  
18 *Streptococcus pneumoniae* type 37-specific antisera as previously reported by Werning et al  
19 (10). Each culture (10  $\mu$ L) was mixed with 10  $\mu$ L of the antisera (Statens Seruminstitut,  
20 Copenhagen, Denmark) and incubated for 2 h at 4 °C. The preparations were analyzed by  
21 phase-contrast microscopy. The 2-substituted (1,3)- $\beta$ -D-glucan producer *P. parvulus* 2.6 was  
22 used as positive control, and *L. reuteri* CECT 925<sup>T</sup> as negative control.

23 **DNA extraction, identification of EPS-producers, and PCR detection of the gtf**  
24 **region.** One-millilitre aliquots of MRS cultures were used for DNA extraction. Following  
25 centrifugation at 13000  $\times$  g for 3 minutes, pellets were washed in 0.5 mL of TE (10 mM Tris

1 HCl; 1 mM EDTA, pH 8) and centrifuged at  $13000 \times g$  for 3 minutes. For DNA extraction,  
2 the resulting cell pellet was resuspended in 180  $\mu\text{L}$  of an enzymatic lysis buffer, containing 20  
3 mM Tris-HCl (pH 8), 2 mM sodium EDTA, 1,2 % Triton®X-100 and 20 mg  $\text{mL}^{-1}$  lysozyme,  
4 and incubated for 30 min at 37°C. DNA was purified by DNeasy Blood and Tissue Kit  
5 (Qiagen GmbH, Hilden, Germany), according to the manufacturer's instructions. DNA  
6 samples were stored at -20 °C until use. Strains were identified by 16S rRNA sequence  
7 analysis. A fragment of 530 bp of the 16S rRNA was amplified with primers PA (5'-  
8 AGAGTTTGATCCTGG CTCAG-3') and UPIR (5'-TCACGCGGCTGCTGGCAC-3')  
9 corresponding to positions 9 to 539 in the *Escherichia coli* numbering system. Each 50  $\mu\text{L}$   
10 PCR reaction was carried out with 1.25U of BIOTAQ DNA polymerase (Bioline,  
11 Luckenwalde, Germany) and contained 1  $\mu\text{M}$  of each primer, 0.75 mM  $\text{MgCl}_2$ , 20 mM Tris-  
12 HCl pH 8.4, 50 mM KCl, 200  $\mu\text{M}$  of each dNTP and 5  $\mu\text{L}$  of DNA template. Cycling  
13 conditions were 1x (94 °C, 5 min); 25x (94 °C, 1 min; 55 °C, 1 min; 72 °C, 2 min), and 1x (72  
14 °C, 10 min). The PCR products were separated on a 0.8% (wt/v) agarose gel, and the  
15 amplicons were purified with the QIAquick Gel extraction kit (Qiagen, Hilden, Germany)  
16 according to the manufacturer's instructions. 16S rRNA sequences were identified with  
17 nucleotide identity at the species level higher than 98% by using the BLAST tool of the  
18 GenBank DNA database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

19 For detection of the *gtf* gene, specific primers (GTFF and GTFR) were used for PCR  
20 amplification (10). These primers were located in the coding sequence of the putative  
21 carboxyl glycosyltransferase domain and amplified a 417 bp fragment of the gene. Each 50  
22  $\mu\text{L}$  PCR reaction was carried out with 1.25U of BIOTAQ DNA polymerase (Bioline,  
23 Luckenwalde, Germany) and contained 0.2  $\mu\text{M}$  of each primer, 3.5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 20 mM Tris-  
24 HCl pH 8.4, 50 mM KCl, 25  $\mu\text{M}$  of each dNTP and 5  $\mu\text{L}$  of DNA template. Cycling

1 conditions were 1x (94 °C, 5 min); 25x (94 °C, 1 min; 55 °C, 1 min; 72 °C, 2 min), and 1x (72  
2 °C, 10 min).

3 **RAPD-PCR.** Total genomic DNA was isolated as described above and the genomic  
4 diversity of the strains was analyzed by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD)  
5 method using universal primers M13 (5'-GAG GGT GGC GGT TCT-3') (13), P1 (5'-ACG  
6 CGC CCT-3') and P2 (5'-ATG TAA CGC C-3') (14) (synthesized by Eurofins MWG  
7 Operon, Germany). PCR amplifications were conducted in a solution containing: 1x PCR  
8 buffer (Bioline), 5 μM of primer, 1 U of BIOTAQ DNA polymerase (Bioline), 5 mM MgCl<sub>2</sub>  
9 (Bioline) for P1 and P2 or 2.5 mM for M13, 100 μM of each dNTP (Bioline) and 200 ng of  
10 DNA template in a total volume of 50 μL. Amplification conditions were: one cycle of 94 °C  
11 for 5 min, 40 °C for 5 min and 72 °C for 5 min. This was followed by 33 cycles of 94 °C for  
12 30 s (M13) or 1 min (P1 and P2), 40 °C for 1 min and 72 °C for 1 min. 20 μL of the  
13 amplification product were electrophoresed on 1.8% agarose gel in TAE buffer at 80 V for 90  
14 min. Gels were stained with ethidium bromide and photographed under UV light. Gel images  
15 were recorded using a Gel-Doc (Bio-Rad) and stored as TIFF files.

16 **Banding pattern analysis.** Digitized images were converted, normalized, analysed  
17 and combined with the Software package BioNumerics 2.5 (Applied Maths, St-Martens-  
18 Latem, Belgium). In order to normalize the banding patterns, molecular markers were  
19 included every seven tracks. The levels of similarity between pairs of traces were computed  
20 using the Pearson product-moment correlation coefficient that provides similarity based upon  
21 densitometric curves. Data obtained from RAPD profiles (M13, P1 and P2, on separate and  
22 combined) were clustered using the Unweighted Pair Group Method with Arithmetic  
23 averaging (UPGMA) algorithm (15) using the corresponding tools in BioNumerics. The  
24 consistence of the clusters obtained was estimated by calculating the cophenetic correlation

1 values corresponding to the dendrograms. This method calculates the correlation between the  
2 dendrogram-derived similarities and the matrix similarities.

3 **Clustering of multiple data sets.** Clustering of multiple data sets, combining banding  
4 patterns (M13, P1, P2) and adding specific PCR result (gtf-PCR) and phenotypic traits (sugar  
5 fermentations, EPS quantification values and agglutination results), was calculated taking  
6 averaged similarity values from the individual experiments with the aid of the “Composite  
7 data set” tool in BioNumerics. The similarity between the strains based on specific PCR or  
8 phenotypic profiles was calculated by the binary coefficient of Jaccard (15). The consistency  
9 of the clusters obtained was estimated by calculating the cophenetic correlation values  
10 corresponding to the dendrograms.

11 **EPS isolation and quantification.** Bacterial cells were removed from fermented  
12 media by centrifugation ( $16,000 \times g$ ,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 30 min). The clear supernatant was collected and  
13 the EPS precipitated by adding two volumes of cold acetone (100% v/v) and maintained  
14 overnight at  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . The precipitate was recovered by centrifugation at  $14,000 \times g$  for 10 min at  
15  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , washed 3 times with 70% (v/v) acetone and centrifuged. Finally, precipitated  
16 polysaccharide was dissolved in distilled water and the total sugar content was determined by  
17 the phenol–sulphuric acid method using glucose as standard (16). All determinations were  
18 made by triplicate. For EPS characterization, the final precipitate was dissolved in and  
19 dialyzed against deionized water, using a dialysis membrane (Medicell International, Ltd.,  
20 London, U.K.) having a cut-off of 3.5 kDa, for 2–3 days (changed twice each day). After  
21 dialysis, the precipitate was lyophilized.

22 **EPS characterization.** NMR analyses of the EPSs were performed using a  
23 spectrometer Avance 500 (Bruker Instruments Inc.). 0.6 mg of each EPS was resuspended in  
24 0.6 mL of deuterated water (Deuterium oxide, 99 atom % D, Aldrich) and the solutions were  
25 stirred until complete homogenization.  $^1\text{H}$  monodimensional and 2D-COSY analysis were

1 carried out at 30 °C, according to the conditions described by Dueñas et al. (17). The  
2 molecular masses of the polysaccharides were determined by high-performance size exclusion  
3 chromatography (HP-SEC, GPCV 2000, Waters), which included a differential RI detector as  
4 described by Velasco et al. (6).

5 Monosaccharide composition was determined and quantified by gas chromatography  
6 after hydrolysis of the polysaccharides with 3M trifluoroacetic acid (TFA) as previously  
7 described (18). For linkage type analysis, the samples were methylated according to Ciucanu  
8 and Kerek (19). The permethylated samples were hydrolyzed with 3 M TFA (1 h, 120°C) and  
9 then reduced, acetylated and analyzed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)  
10 as reported by Leal et al. (18).

11

## 12 RESULTS

13 **Screening of EPS-producing LAB strains and identification.** A total of 147 strains  
14 of lactic acid bacteria, previously isolated from both ropy and non-altered natural cider were  
15 screened for their EPS-producing ability in MRS-T-F broth. After incubation, the ropy  
16 character of culture broth was visually detected in 32 strains (Table 1). These strains were  
17 identified at species level by PCR amplification of a 530 bp fragment of the 16S rRNA gene.  
18 After sequencing, all strains were assigned with nucleotide identity higher than 98% to  
19 *Pediococcus parvulus* species.

20 To assess the ability of EPS-positive strains to ferment different raw materials for  
21 alimentary use, sugar fermentation patterns were studied. All strains were able to grow on, and  
22 ferment glucose, fructose and trehalose. Maltose was also fermented by the majority of strains  
23 (75%), as shown for the  $\beta$ -glucan producer *P. parvulus* 2.6, whereas galactose was used in a  
24 minor proportion (56%).

1        **EPS production.** The EPS producing ability of the 32 EPS-producing LAB strains  
2 was analyzed in a MST semidefined medium to avoid the problem of interference associated  
3 with complex medium ingredients, such as mannans in yeast extract. Most of the strains are  
4 able to synthesize EPS with yields ranging from 18 to 243 mg L<sup>-1</sup> (Table 1). Thirteen strains  
5 yielded relatively large amounts of EPS, between 104 and 243 mg L<sup>-1</sup>, 7 between 50 and 100  
6 mg L<sup>-1</sup> and 5 produced < 50 mg L<sup>-1</sup>. Strains 1, 22 and 23 produced the highest EPS  
7 concentration (about 250 mg L<sup>-1</sup>). In contrast, four strains (14, 19, 20, and 21) were very poor  
8 producers or non producers. For this reason, they were excluded from further EPS  
9 characterization.

10        **PCR and immunological detection of 2-substituted (1,3)-β-D-glucan producing**  
11 **strains.** PCR was used to detect in EPS-positive strains the presence of the *gtf* gene, encoding  
12 for the GTF glycosyltransferase involved in the synthesis of the 2-substituted (1,3)-β-D-  
13 glucan by *P. parvulus* 2.6. The expected amplicon of 417 bp was detected in all strains  
14 (Figure 1), suggesting that they were (1,3)(1,2)-β-D-glucan producers. In addition, we used an  
15 agglutination test with antibodies against the capsular polysaccharide of *S. pneumoniae*  
16 serotype 37. Immunoprecipitation assays showed that most (25) of the *gtf*-positive strains  
17 agglutinated in the presence of type 37-specific antiserum (Figure 1) and two kinds of  
18 agglutination were observed (Figure 2). When EPS production in MST medium was higher  
19 than 100 mg/L, huge cell aggregates were detected, and cell agglutination led to smaller  
20 aggregates when EPS yields ranged from 30 to 100 mg L<sup>-1</sup>. However, no agglutination was  
21 found in seven *gtf*<sup>+</sup> strains (15, 16, 17, 18, 19, 20, and 21), which were very poor or non-  
22 producers.

23        **Structural and molecular mass determination of EPSs.** Structural characterization  
24 of the 28 crude EPSs was performed by <sup>1</sup>H NMR analysis. The chemical shifts for the <sup>1</sup>H  
25 resonances of all polysaccharides were identical to those found for the β-glucan produced by

1 *P. parvulus* 2.6 (17) and figure 3 corresponds to a representative <sup>1</sup>H and 2D-COSY NMR  
2 spectrum. From these results, we concluded that all ropy *P. parvulus* strains synthesize a β-  
3 glucan with the same primary structure: a trisaccharide repeating unit, with two (1,3)-β linked  
4 residues in the main chain, one of which is substituted in position 2 by a terminal glucose  
5 residue.

6 The EPSs from strains CUPV1 and CUPV22, which were the maximum EPS  
7 producers, were additionally analyzed by chemical means in order to confirm the NMR  
8 results. Acid hydrolysis of these polysaccharides yielded glucose as their unique component.  
9 Methylation analysis gave partially methylated alditol acetates corresponding to terminal, 3-  
10 *O*-substituted and 2,3-di-*O*-substituted glucopyranose in relative proportions 1:1:1. These data  
11 are in agreement with those expected for the trisaccharide repeating unit (Table 2).

12 Molecular weight determination of the β-D-glucans was carried out by size exclusion  
13 chromatography (SEC), using different dextrans as molecular weight standards. The analysis  
14 revealed in all cases the presence of two different molecular mass fractions. The high- and  
15 low-molecular-mass polymers ranged between  $1.1 \times 10^7$  and  $7.1 \times 10^6$  Da, and  $5.3 \times 10^4$  and  
16  $2.7 \times 10^4$  Da, respectively, and most of them (22 out of the 28) produced mainly the high-  
17 molecular mass polymer. It is worth noting that amounts of EPS and concentrations of the  
18 high molecular fraction are linearly correlated ( $R^2$  0.799,  $p < 0.001$ ). Thus, strains yielding  
19 more than  $100 \text{ mg L}^{-1}$  of crude EPS, produced almost exclusively the high-molecular-mass  
20 fraction (between 96% and 82%), while those that synthesized between  $100 \text{ mg L}^{-1}$  and  $40 \text{ mg}$   
21  $\text{L}^{-1}$ , produced mainly high-molecular-mass EPS (79%-60%). In contrast, poor EPS producers  
22 ( $<25 \text{ mg L}^{-1}$ ) synthesized both fractions in similar amounts (between 55% and 42%).

23 **RAPD profiles analysis.** The clustering analysis including reference strains and cider  
24 isolates was calculated individually and in combination for the RAPD-M13, RAPD-P1 and  
25 RAPD-P2 profiles. In all cases, *P. damnosus* strains were separated from *P. parvulus*. At least



1 four patterns were observed with a single primer. Of them, P1 showed the lowest intraspecies  
2 differentiation i.e. one pattern was shared by 21 out of the 34 strains. Cophenetic correlation  
3 values were 90, 96 and 77 % for the clustering with RAPD-M13, RAPD-P1 and RAPD-P2  
4 profiles, respectively, and 90 % for the global analysis combining the three RAPD profiles.  
5 The highest intraspecies differentiation was obtained with the combined RAPD M13-P1-P2  
6 profile showing up to 17 patterns within the strains.

7 **Combination of phenotypic and genotypic data.** Figure 1 shows the dendrogram  
8 derived from UPGMA clustering based on the combined similarity matrix obtained from the  
9 M13, P1 and P2 RAPD fingerprinting, *gtf*-PCR amplification, sugar fermentation,  
10 agglutination test and EPS quantification. The total analyzed strains (34 *P. parvulus* and 2 *P.*  
11 *damnosus*) clustered at 10.5 % similarity, with a cophenetic correlation value of 97 %. At 58  
12 % similarity, two clusters were formed grouping all *P. parvulus* except the type strain CECT  
13 7350<sup>T</sup> that joined them at 52.5 %. Cluster I, grouped strain *P. parvulus* 2.6 together with 25  
14 cider isolates. All isolates included in this cluster were positive for the agglutination test and  
15 exhibited the 417 bp amplicon (*gtf*-PCR positive). They also showed the highest EPS  
16 production values. Within this cluster, at 85% similarity joined isolates CUPV28 to CUPV32.  
17 All of them were recovered the same year, from the same cellar and sample, which indicates  
18 their clonality. In other instances, at same similarity joined isolates collected with 10 years of  
19 difference i.e. CUPV7 to CUPV10 recovered on 1993 from cellar A, together with CUPV12  
20 and CUPV13, recovered on 2003 from cellars C and D, respectively. This finding might  
21 indicate a clonality of EPS producing strains linked to cider production. Strain *P. parvulus* 2.6  
22 is clearly separated from other strains within the cluster. Cluster II grouped 7 cider isolates  
23 which were *gtf*-PCR positive but negative for the agglutination test, and they showed the  
24 lowest EPS production levels. All isolates were recovered on 2005 from the same cellar, and  
25 6 of them joined at 85% similarity while CUPV15 was clearly different.

## 1 DISCUSSION

2 EPS-producing lactic acid bacteria are being used as starter cultures or coadjutants for  
3 elaboration of fermented foods such as yogurt, cheese and cereal based products (2, 20, 21)  
4 because of their biothickening properties. In addition, the possible benefits for human health  
5 of exopolysaccharides produced by LAB are currently being studied (1). In this context, the 2-  
6 substituted (1,3)- $\beta$ -D-glucan producers may represent interesting strains for food industry  
7 because of the widely described positive effects of the (1,3)- $\beta$ -D-glucans as biological  
8 response modifiers (4). We have previously found that, besides the biothickener properties of  
9 the 2-substituted (1,3)- $\beta$ -D-glucan of *P. parvulus* 2.6 (6), this strain displayed  
10 immunomodulating activities and probiotics properties (7, 22, 8). In the present work, in order  
11 to identify new (1,3)- $\beta$ -glucan producing strains, a screening among 147 LAB strains,  
12 previously isolated from ropy and non-altered natural ciders was performed.

13 Thirty two isolates showed a ropy phenotype when they were grown in MRS broth  
14 and all of them were identified as belonging to *P. parvulus*. As previously reported (23) for  
15 other homo- or heteropolysaccharide producing LAB strains, EPS production by these ropy *P.*  
16 *parvulus* varied widely among isolates. Interestingly, almost half of them synthesized large  
17 amounts of EPS (between 100 and 250 mg L<sup>-1</sup>). These levels are relatively higher than those  
18 reported for other EPS<sup>+</sup> LAB strains isolated from natural food environments (23, 24), with  
19 exception of the huge amounts of dextrans or fructans produced by some *Leuconostoc* strains  
20 (25).

21 When molecular tools were used for  $\beta$ -D-glucan producing bacteria detection, it is  
22 worth noting that the 32 *P. parvulus* EPS<sup>+</sup> strains amplified in the PCR reaction with specific  
23 primers for the *gtf* gene, suggesting its  $\beta$ -D-glucan producing ability (10). In addition, the  
24 agglutination test with the specific antiserum against the capsular  $\beta$ -glucan of *S. pneumoniae*  
25 type 37 was assayed as supplementary method for rapid screening of the 2-substituted (1,3)- $\beta$ -

1 D-glucan producers. Its capsular envelope is constituted by a branched polysaccharide  
2 composed of a backbone of  $\rightarrow 3$ - $\beta$ -D-Glcp-(1 $\rightarrow$ ) units with monosaccharide side chains of  $\beta$ -  
3 D-Glc-(1 $\rightarrow$ ) linked to C2 of each Glc residue (sophorosyl subunits). The anti-type 37 serum  
4 preferentially recognizes the branched part of this capsular polysaccharide (26) and, as a  
5 consequence, it reacts with *P. parvulus* 2.6 (27) and other 2-substituted (1,3)- $\beta$ -D-glucan  
6 producers (28; 11). From our results, we can conclude that this agglutination assay could be  
7 successfully used as a rapid screening method when  $\beta$ -glucan levels are not very low ( $> 20$ -30  
8 mg L<sup>-1</sup>), in agreement with that reported by Dols-Lafargue et al. (11).

9 The synthesis of the 2-substituted (1,3)- $\beta$ -D-glucan by *gtf* and agglutination positive  
10 strains (25) was confirmed by <sup>1</sup>H-NMR analysis of the purified exopolysaccharides. In  
11 addition, methylation analysis data for the EPSs from strains 1 and 22 (which were selected  
12 for producing high amounts of high-molecular mass EPSs) clearly showed that the crude EPS  
13 was only constituted by this kind of polysaccharide, in contrast to that previously described  
14 for *Lactobacillus* sp. G-77 (29) and *Oenococcus oeni* (16, 11), which synthesize, besides the  
15  $\beta$ -glucan, an  $\alpha$ -glucan and heteropolysaccharides, respectively. This fact represents an  
16 interesting characteristic in order to assess the biological activities or the prebiotic potential of  
17 these  $\beta$ -glucans.

18 In addition to primary structure and solution conformation, molecular weight may play  
19 a role on biological activity of the (1,3)- $\beta$ -D-glucans, determining whether and with what  
20 affinity these polysaccharides bind to receptor(s) and modulate immune function (4). In this  
21 context, as found by Velasco et al. (6), culture medium composition decisively influences the  
22 molecular weight of the 2-substituted (1,3)- $\beta$ -D-glucan synthesized by *P. parvulus* 2.6, being  
23 glucose the sugar source in which molecular weight and EPS yield were highest.

24 For this reason, all strains in this study were grown on glucose and, similarly to that  
25 reported for other *P. parvulus* strains (2.6 and IOE 8801) (6, 11), all  $\beta$ -glucans were

1 constituted by two fractions, a high-molecular-mass polymer (close to  $1 \times 10^7$  Da) and a low-  
2 molecular one (about  $10^4$  Da). The relative proportions of the two fractions varied widely  
3 between strains and were significantly correlated with EPS yield. As described by de Vuyst et  
4 al. (30), the molecular mass of an EPS is of primary importance for the intrinsic viscosity of  
5 the polymer, and, hence, some of our β-glucan producers could be considered as promising  
6 biothickening agents, such as strains 1 and 22, because of the high molecular masses of their  
7 EPSs. For both strains, the molecular masses of their high molecular fractions (Table 1) are  
8 higher than those reported for other (1,3)-β-D-glucans of commercial use, such as  
9 scleroglucan and curdlan, which ranged from  $1.3 \times 10^5$  to  $6 \times 10^6$  Da (31) and from  $5.3 \times 10^4$   
10 to  $2.0 \times 10^6$  Da (32), respectively. However, other factors such as EPS conformation or  
11 interactions between EPS and growth media microstructure could also contribute to the  
12 rheological features of the fermented media (24), further research is needed to assess its  
13 viscosifying properties in particular food matrices.

14       Regarding genotypic characterization, the EPS-producing *P. parvulus* cider isolates,  
15 exhibited highly similar single RAPD profiles even though they had been recovered over a  
16 thirteen years period. However, the combined analysis of the three RAPD profiles and  
17 phenotypic traits grouped cider isolates together and apart from the type strain of the species,  
18 *P. parvulus* CECT 7350<sup>T</sup>, isolated from silage. In addition, RAPD profiles distinguish clone  
19 isolates from singular strains such as *P. parvulus* 2.6, a previously characterized cider isolate  
20 (10), and they have been applied for strain selection. Besides, RAPD profiles obtained in the  
21 present study, clearly allowed differentiation between *P. parvulus* and *P. damnosus*, two  
22 closely related species. It is worthwhile to mention that *P. parvulus* 2.6 was first described as  
23 belonging to the species *P. damnosus* (16, 33) and later on assigned to *P. parvulus* following  
24 16S rRNA sequencing analysis (10).

1 To conclude, in this study a screening of 2 substituted (1,3)- $\beta$ -D-glucan producers has  
2 been performed. All  $\beta$ -glucan positive strains belonged to *P. parvulus*, and 2 of them (CUPV  
3 1 and 22) have been selected on basis of their high EPS yields, molecular masses, and high  
4 proportion of the  $10^7$  Da fraction. They exhibit the ability to ferment several sugar sources,  
5 including glucose, galactose, and maltose, making them suitable for its use as starter or  
6 coadjuvants cultures in dairy and non-dairy product fermentations. In addition, they are not of  
7 clonal origin as assessed by RAPD profiles and both strains can be easily differentiated by  
8 RAPD PCR with P1 or P2 primers. Currently, research on the probiotic and biothickening  
9 potential of these two strains is in progress.

1 **LITERATURE CITED**

- 2 (1) Ruas-Madiedo, P.; Abraham, A.; Mozzi, F.; de los Reyes-Gavilán, C. G. Functionality of  
3 exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. Research Signpost: Kerala, India,  
4 2008.
- 5 (2) Tiekink, M.; Korakli, M.; Ehrmann, M. A.; Ganzle, M. G.; Vogel, R. F. In situ production  
6 of exopolysaccharides during sourdough fermentation by cereal and intestinal isolates of  
7 lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **2003**, *69*, 945-952.
- 8 (3) Laroche, C.; Michaud, P. New developments and prospective applications for  $\beta$ -(1,3)  
9 glucans. *Recent Pat. Biotechnol.* **2007**, *1*, 59-73.
- 10 (4) Sletmoen, M.; Stokke, B.T. Higher order structure of (1,3)- $\beta$ -D-glucans and its influence  
11 on their biological activities and complexation abilities. *Biopolymers.* **2008**, *89*, 310-21.
- 12 (5) Zhang, L.; Li, X.; Xu, X.; Zeng, F. Correlation between antitumor activity, molecular  
13 weight, and conformation of lentinan. *Carbohydr. Res.* **2005**, *340*, 1515-1521.
- 14 (6) Velasco S. E.; Areizaga, J.; Irastorza, A.; Dueñas, M. T.; Santamaria, A.; Muñoz, M. E.  
15 Chemical and rheological properties of the  $\beta$ -Glucan produced by *Pediococcus parvulus*  
16 2.6. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 1827-1834.
- 17 (7) Mårtensson, O.; Björklund, M.; Lambo, M. A.; Dueñas-Chasco, M. T.; Irastorza, A.;  
18 Holst, O.; Norin, E.; Walling, G.; Öste, R.; Önning, G. Fermented rOPY, oat-based  
19 products reduce cholesterol levels and stimulate the bifidobacteria flora in humans. *Nutr.*  
20 *Res.* **2005**, *25*, 429-442.
- 21 (8) Fernández de Palencia, P.; Werning, M. L.; Sierra-Filardi, E.; Dueñas, M. T.; Irastorza,  
22 A.; Corbí, A. L.; López, P. Probiotic properties of the 2-substituted (1,3)- $\beta$ -D-glucan  
23 producing bacterium *Pediococcus parvulus* 2.6. *Appl. Environ. Microbiol.* **2009**, *75*, 4887-  
24 4891.

- 1 (9) Werning, M. L.; Corrales, M. A.; Prieto, A.; Fernández de Palencia, P.; Navas, J.; López,  
2 P. Heterologous expression of a 2-substituted-(1→3)-β-D-glucan in *Lactococcus lactis*.  
3 *Appl. Environ. Microbiol.* **2008**, *74*, 5259-5262.
- 4 (10) Werning, M. L.; Ibarburu, I.; Dueñas, M. T.; Irastorza, A.; Navas, J.; López, P.  
5 *Pediococcus parvulus* *gtf* gene encoding the GTF glycosyltransferase and its application  
6 for specific PCR detection of β-D-glucan-producing bacteria in foods and beverages. *J.*  
7 *Food Prot.* **2006**, *69*, 161–169.
- 8 (11) Dols-Lafargue, M.; Lee, H. Y.; Le Marrec, C.; Heyraud, A.; Chambat G.; Lonvaud-  
9 Funel. A. Characterization of *gtf*, a glucosyltransferase gene in the genomes of  
10 *Pediococcus parvulus* and *Oenococcus oeni*, two bacterial species commonly found in  
11 wine. *Appl. Environ. Microbiol.* **2008**, *74*, 4079-4090.
- 12 (12) Velasco S.; Årskold, E.; Paese, M.; Grage, A.; Irastorza, A.; Rådström, P.; van Niel, E.  
13 W. J. Environmental factors influencing growth of and exopolysaccharide formation by  
14 *Pediococcus parvulus* 2.6. *Int. J. Food Microbiol.* **2006**, *111*, 252–258.
- 15 (13) Pinto, B.; Chenoll, E.; Aznar, R. Identification and typing of food-borne *Staphylococcus*  
16 *aureus* by PCR-based techniques. *Syst. Appl. Microbiol.* **2005**, *28*, 340-352.
- 17 (14) Simpson, P. J.; Stanton, C.; Fitzgerald, G. F.; Ross, R. P. Genomic diversity within the  
18 genus *Pediococcus* as revealed by randomly amplified polymorphic DNA PCR and  
19 pulsed-field gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* **2002**, *68*, 765-771.
- 20 (15) Sneath, P. H. A.; Sokal, R. R. Numerical taxonomy. Freeman, San Francisco, CA. 1973.
- 21 (16) Ibarburu, I.; Soria-Díaz, M. E.; Rodríguez-Carvajal, M. A.; Velasco, S. E.; Tejero-Mateo,  
22 P.; Gil-Serrano, A. M.; Irastorza, A.; Duenas, M. T. Growth and exopolysaccharide (EPS)  
23 production by *Oenococcus oeni* I4 and structural characterization of their EPSs. *J. Appl.*  
24 *Microbiol.* **2007**, *103*, 477-486.

- 1 (17) Dueñas-Chasco, M. T.; Rodríguez-Carvajal, M. A.; Tejero, P.; Franco-Rodríguez, G.;  
2 Espartero, J. L.; Irastorza-Iribas, A. Gil-Serrano, A. M. Structural analysis of the  
3 exopolysaccharide produced by *Pediococcus damnosus* 2.6. *Carbohydr. Res.* **1997**, *303*,  
4 453-458.
- 5 (18) Leal, J. A.; Jiménez-Barbero, J.; Bernabé, M.; Prieto, A. Structural elucidation of a cell  
6 wall fungal polysaccharide isolated from *Ustilaginoidea virens*, a pathogenic fungus of  
7 *Oriza sativa* and *Zea mays*. *Carbohydr. Res.* **2008**, *343*, 2980-2984.
- 8 (19) Ciucanu, I.; Kerek, F. A simple method for the permethylation of carbohydrates.  
9 *Carbohydr. Res.* **1984**, *131*, 209-217.
- 10 (20) Jolly, L.; Vincent, S. J. F.; Duboc, P.; Neeser J. R. Exploiting exopolysaccharides from  
11 lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek.* **2002**, *82*, 367-374.
- 12 (21) Ruas-Madiedo, P.; Hugenholtz, J.; Zoon, P. An overview of the functionality of  
13 exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *Int. Dairy J.* **2002**, *12*, 163-171.
- 14 (22) Lambo-Fodje, A.; Öste, R.; Nyman, E. G.-L. Short-chain fatty acid formation in the  
15 hindgut of rats fed native and fermented oat fiber concentrates. *British J. Nutrition.* **2006**,  
16 *96*, 47-55.
- 17 (23) Mozzi, F.; Vanningelgem, F.; Hebert, E. M.; Van der Meulen, R.; Moreno, M. R. F.; Font  
18 de Valdez, G.; De Vuyst L. Diversity of heteropolysaccharide-producing lactic acid  
19 bacterium strains and their biopolymers. *Appl. Environ. Microbiol.* **2006**, *72*, 4431-4435.
- 20 (24) Vanningelgem, F.; Zamfir, M.; Mozzi, F.; Adriany, T.; Vancanneyt, M.; Swings, J.; De  
21 Vuyst, L. Biodiversity of exopolysaccharides produced by *Streptococcus thermophilus*  
22 strains is reflected in their production and their molecular and functional characteristics.  
23 *Appl. Environ. Microbiol.* **2004**, *70*, 900-912.
- 24 (25) Van der Meulen, R.; Grosu-Tudor, S.; Mozzi, F.; Vanningelgem, F.; Zamfir, M.; de  
25 Valdez, G. F.; De Vuyst, L. Screening of lactic acid bacteria isolates from dairy and cereal



- 1 products for exopolysaccharide production and genes involved. *Int. J. Food Microbiol.*  
2 **2007**, *118*, 250-8.
- 3 (26) Llull, D.; García, E; López, R. Tts, a processive  $\beta$ -glucosyltransferase of *Streptococcus*  
4 *pneumoniae*, directs the synthesis of the branched type 37 capsular polysaccharide in  
5 *Pneumococcus* and other Gram-positive species. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 21053-21061.
- 6 (27) Fernández de Palencia, P.; López, P.; Corbí, A. L.; Peláez C.; Requena T. Probiotic  
7 strains: survival under simulated gastrointestinal conditions, *in vitro* adhesion to Caco-2  
8 cells and effect on cytokine secretion. *Eur. Food Res. Technol.* **2008**, *227*, 1475–1484.
- 9 (28) Walling, E.; Gindreau, E.; Lonvaud-Funel, A. A putative glucan synthase gene *dps*  
10 detected in exopolysaccharide-producing *Pediococcus damnosus* and *Oenococcus oeni*  
11 strains isolated from wine and cider. *Int. J. Food Microbiol.* **2005**, *98*, 53-62.
- 12 (29) Dueñas, M. T.; Rodríguez, M. A.; Tejero, P.; Espartero, J. L.; Irastorza, A; Gil, A.  
13 Structural analysis of the exopolysaccharides produced by *Lactobacillus* spp. G-77.  
14 *Carbohydr. Res.* **1998**, *307*, 125–133.
- 15 (30). de Vuyst, L.; Vin, F.; Vaningelmen, F.; Degeest, B. Recent developments in the  
16 biosynthesis and applications of heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *Int.*  
17 *Dairy J.* **2001**, *11*, 687–707.
- 18 (31) Survase, S. A.; Saudagar, P. S.; Bajaj, I. B.; Singhal, R. S. Scleroglucan: Fermentative  
19 production, downstream processing and applications. *Food Technol. Biotechnol.* **2007**, *45*,  
20 107-118.
- 21 (32) Nakata, M.; Kawaguchi, T.; Kodama, Y.; Konno, A. Characterization of curdlan in  
22 aqueous sodium hydroxide. *Polymer* **1998**, *39*, 1475-1481.
- 23 (33) Dueñas, M.; Munduate, A.; Perea, A.; Irastorza, A. Exopolysaccharide production by  
24 *Pediococcus damnosus* 2.6 in a semidefined medium under different growth conditions.  
25 *Int. J. Food Microbiol.* **2003**, *87*,113-120.

**1 ACKNOWLEDGEMENTS**

2 This work was supported by the Ministerio de Ciencia e Innovación (projects AGL2006-  
3 11932, AGL2009-12998 and CSD2007-00063), the Universidad del País Vasco (UPV/EHU)  
4 (EHU08/37), the Diputación Foral de Gipuzkoa, Programa Red Gipuzkoana de Ciencia,  
5 Tecnología e Innovación (co-financed by the European Union), and the Generalitat  
6 Valenciana (GVACOMP2009-257). Gaizka Garai acknowledges the Gobierno Vasco (Dpto.  
7 Agricultura, Pesca y Alimentación) for the predoctoral fellowship.

1 **Table 1.** Growth and EPS production by *P. parvulus* strains in MST medium and  
 2 characterization of their polymers  
 3

Strain	OD <sub>600</sub>	EPS (mg L <sup>-1</sup> )	Average molecular weight (Mw)			
			Mw F1 (10 <sup>6</sup> Da)	Relative proportion of F1 (%)	Mw F2 (10 <sup>4</sup> Da)	(%) Relative proportion of F2 (%)
1	2.04	233	10.2	95.8	3.0	4.2
2	2.06	124	8.2	87.5	3.0	12.5
3	1.60	149	9.3	95.3	2.7	4.7
4	0.87	44	8.6	38.6	4.9	61.4
5	0.96	42	10.3	31.4	5.3	68.6
6	1.84	127	9.4	81.8	3.1	18.2
7	1.61	106	8.8	88.9	3.4	11.1
8	2.02	125	9.7	89.4	3.8	10.6
9	1.91	119	9.4	86.4	3.9	13.9
10	1.81	121	9.3	91.0	3.4	9.0
11	1.87	102	7.4	85.9	3.4	14.1
12	1.95	44	8.6	70.9	3.3	29.1
13	1.07	49	7.1	74.6	3.0	25.4
14	1.49	11	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
15	1.50	22	9.5	49.5	2.8	50.5
16	1.63	25	9.1	42.3	2.8	57.7
17	1.48	18	9.6	54.6	2.8	45.4
18	1.51	21	9.3	51.7	3.5	48.3
19	1.40	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
20	1.65	6	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
21	1.47	2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
22	2.37	228	10.5	91.2	3.1	8.8
23	2.29	243	9.9	94.2	2.9	5.8
24	2.37	140	10.1	94.9	3.1	5.1
25	1.59	93	8.4	66.4	2.9	33.6
26	2.38	135	10.2	90.5	3.1	9.5
27	1.64	58	11.1	60.1	3.2	39.9
28	2.20	62	10.0	68.3	3.4	31.7
29	2.19	63	9.9	79.0	3.5	21.0
30	2.21	79	8.6	62.7	3.4	37.3
31	2.30	75	10.0	62.6	3.4	37.4
32	2.21	75	10.3	70.1	3.4	29.9
<i>P. parvulus</i> 2.6	1.92	193	9.3	90.6	4.1	9.4

4 n.d., no determined; OD<sub>600</sub>, optical density at 600 nm; F1, high molecular mass fraction; F2,  
 5 low molecular mass fraction  
 6  
 7

1 **Table 2.** Percentages of the linkage types deduced from methylation analysis of the EPS  
2 produced by strains 1 and 22 of *P. parvulus*.

3

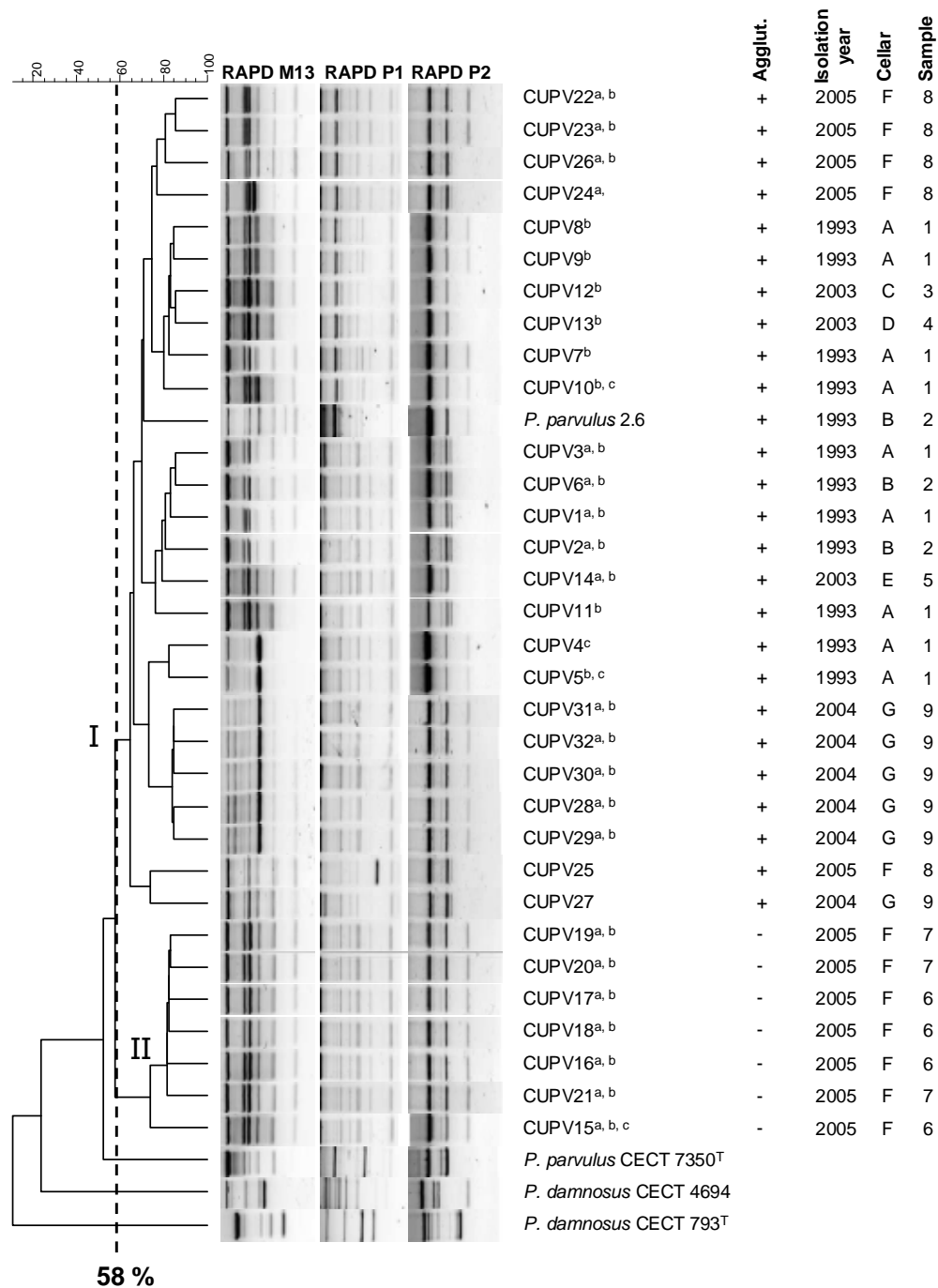
RT (min)	Deduced linkage type	Characteristic fragments (m/z)	Relative proportion	
			CUPV1	CUPV22
6.701	Glc $p$ -(1 $\rightarrow$ )	87, 102, 118, 129, 145, 161, 162, 205	1	1
8.716	$\rightarrow$ 3)-Glc $p$ -(1 $\rightarrow$ )	101, 118, 129, 161, 173, 233	1	1
10.958	$\rightarrow$ 2,3)-Glc $p$ -(1 $\rightarrow$ )	87, 101, 129, 161, 202, 262	1	1

4

5 RT, retention time

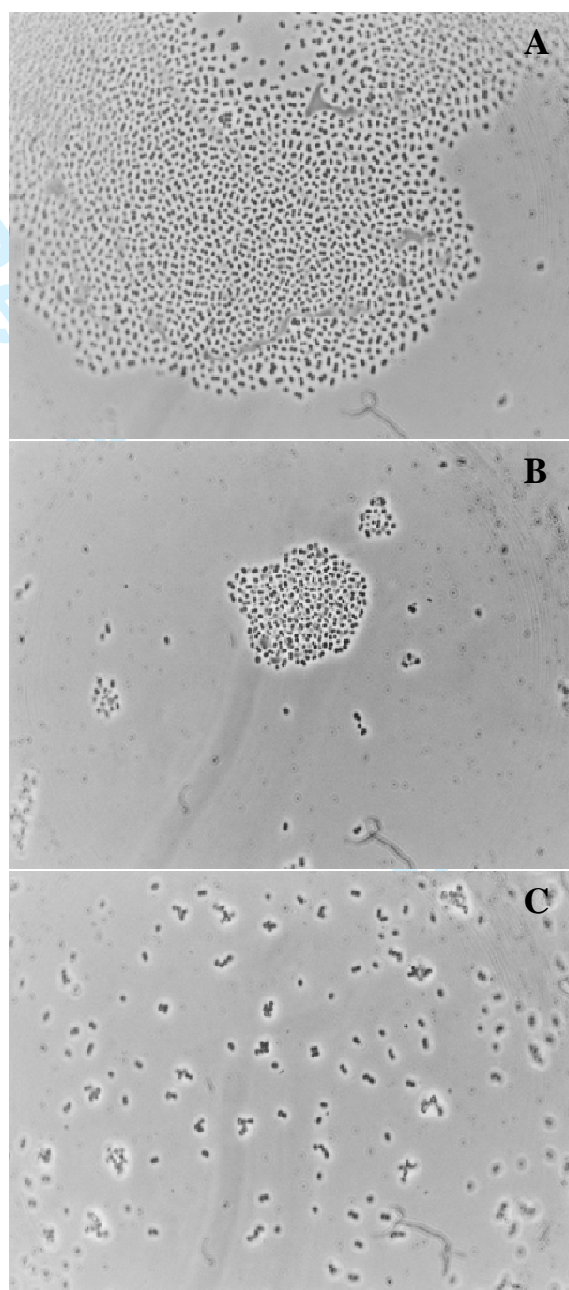
6

1 Figure1.

2  
3

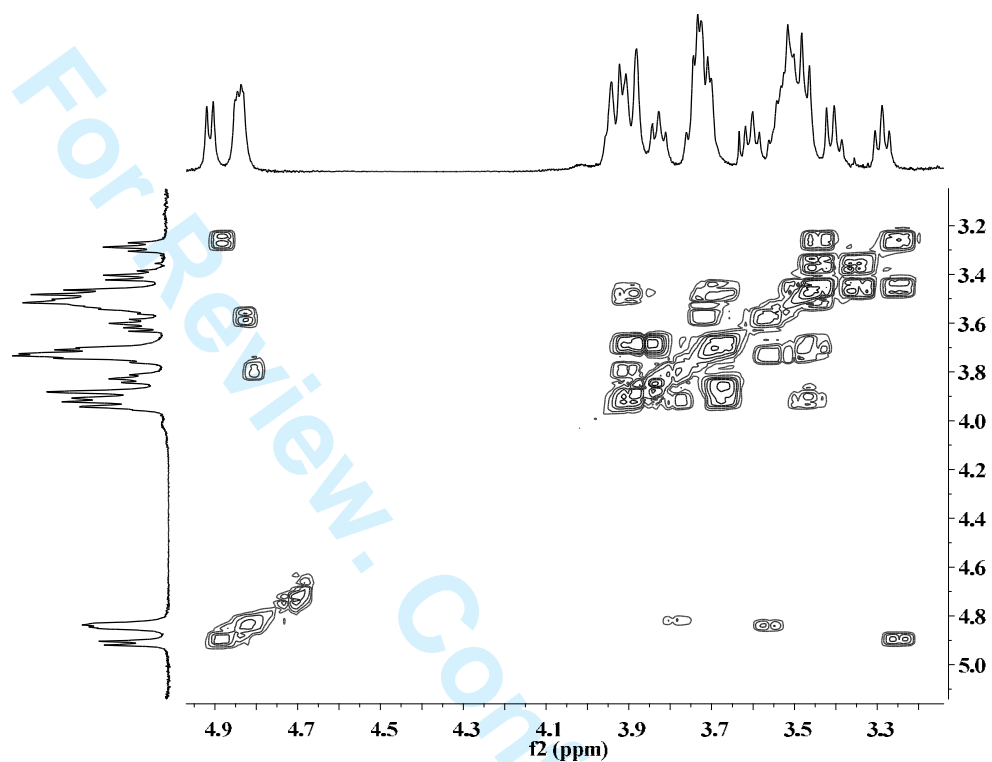
4 **Figure 1.** Dendrogram derived from UPGMA cluster analysis based on the combined  
5 similarity matrix obtained from the M13, P1 and P2 RAPD fingerprinting, gtf-PCR, sugar

1 fermentation, agglutination test and EPS quantification of the 34 *P. parvulus* (1 reference  
2 strain and 33 cider isolates) and 2 *P. damnosus* reference strains. The scale measures the  
3 percentage of similarity. Clusters are numbered. The tracks show the processed band patterns  
4 corresponding to RAPD M13, P1, and P2 after conversion, normalization, and subtraction of  
5 the background. Column on the right show data corresponding to isolation year, cider making  
6 cellar, sample number and agglutination test. Differences in sugar fermentation patterns are  
7 indicated as follows: <sup>a</sup>galactose; <sup>b</sup>maltose; <sup>c</sup>xylose. *P. parvulus* 2.6 is an EPS producing cider  
8 isolate previously described (10). CECT, Spanish Type Culture Collection, type strain.

1 Figure 2.  
2  
3

46 **Figure 2.** Immunoagglutination in presence of anti-type 37 antibody on (1,3)(1,2)- $\beta$ -D-glucan  
47 producing *P. parvulus* strains CUPV22 (A) and CUPV25 (B). No agglutination with CUPV17  
48 strain (C).

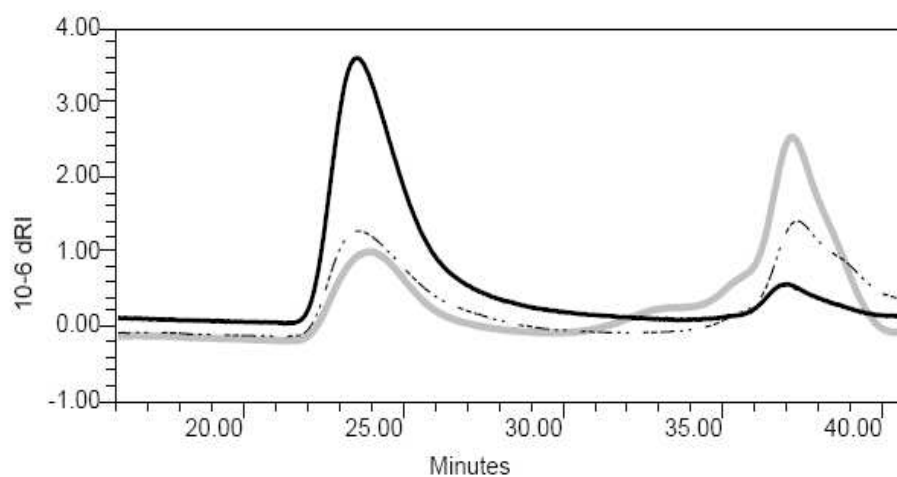
1 Figure 3.



2  
3 **Figure 3.** 500 MHz  $^1\text{H}$  NMR spectrum of a representative  $\beta$ -glucan was recorded in  $\text{D}_2\text{O}$  at 30  
4  $^\circ\text{C}$  and the 500 MHz 2D homonuclear proton double-band filtered correlation spectrum (DBF-  
5 COSY) was obtained by double band selective excitation of the 3-5 ppm region.



1 Figure 4.



2

3 **Figure 4.** Size exclusion chromatograms of the  $\beta$ -glucans synthesized by *P. parvulus*

4 CUPV22 (continuous line), *P. parvulus* CUPV15 (dashed lines) and *P. parvulus*

5 CUPV5 (grey line) are depicted.



**Physiological properties of 2-substituted (1,3)- $\beta$ -D-glucan producing *Lactobacillus suebicus* and *Pediococcus parvulus* strains isolated from cider**

Garai-Ibabe, Gaizka <sup>1</sup>, Dueñas, María Teresa<sup>1</sup>, Irastorza, Ana<sup>1</sup>, Sierra-Filardi, Elena <sup>2</sup>, Werning, María Laura.<sup>2</sup>, López, Paloma<sup>2\*</sup>, Corbí, Angel Luis<sup>2</sup> and Fernández de Palencia, Pilar<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Facultad de Ciencias Químicas. Dpto de Química Aplicada. Universidad del País Vasco (UPV/EHU). Paseo Manuel de Lardizabal, 3. 20018. Donostia, Spain.

<sup>2</sup>Centro de Investigaciones Biológicas, C.S.I.C, Ramiro de Maeztu 9. 28040 Madrid, Spain.

\*Corresponding author. Mailing address: Centro de Investigaciones Biológicas, Ramiro de Maeztu 9. 28040 Madrid, Spain. Tel: 34-918373112. Fax: 34-915360432. e-mail: [plg@cib.csic.es](mailto:plg@cib.csic.es).

Running title: (1,3)- $\beta$ -D-glucan role in lactic acid bacteria isolated from cider

Keywords: exopolysaccharide, lactic acid bacteria, (1,3)- $\beta$ -D-glucan, probiotic, prebiotic.

## 1 ABSTRACT

2       The (1,3)-β-D-glucans are considered to be biological response modifiers with health  
3 promoting properties. In this work we have identified three lactic acid bacteria (*Lactobacillus*  
4 *suebicus* CUPV221, *Pediococcus parvulus* CUPV1 and *Pediococcus parvulus* CUPV22) and  
5 have characterised the 2-substituted (1,3)-β-D-glucans that they produce. In addition, the  
6 probiotic potential of the strains has been assessed. The three strains excreted significant levels  
7 (137 to 180 mg L<sup>-1</sup>) of exopolysaccharide (EPS), which increased the viscosity of the growth  
8 media. The two *Pediococcus* strains produced the β-D-glucan mainly during the late exponential  
9 growth phase whereas *L. suebicus* CUPV221 synthesized most of the EPS in the stationary  
10 phase. Size exclusion chromatography of EPS preparations from each strain showed the presence  
11 of two main species, one with a molecular mass of approximately 10<sup>7</sup> Da, the other of  
12 approximately 10<sup>4</sup> Da; whose proportions varied among the strains. Analysis for tolerance to  
13 simulated digestive tract conditions revealed that the three strains had a high survival (around  
14 30%) after exposure to saliva and gastric conditions at pH 5. Moreover, for *P. parvulus* CUPV22  
15 and *L. suebicus* CUPV221, the survival was not further affected under moderate acidic  
16 conditions (down to 3.1), although only CUPV221 showed a significant survival (11%) at pH  
17 1.8. All three LAB strains were resistant to pancreatin and bile salts. The adherence to Caco-2  
18 cells was strain-dependent, with *P. parvulus* CUPV22 exhibiting the highest adhesion level  
19 (10.5%), which decreased to 1.2% after removal of the EPS by washing. Finally, *P. parvulus*  
20 CUPV22 and *L. suebicus* CUPV221 differentially induced the production of inflammation-  
21 related cytokines by polarized macrophages.

## 1 INTRODUCTION

2 Lactic acid bacteria (LAB) and bifidobacteria are exploited industrially for their health  
3 promoting properties in food production, particularly in fermented milk products. Some of these  
4 bacteria are inhabitants of the gastrointestinal tract and they are the most commonly used  
5 probiotic microorganisms in functional food elaboration (19). A probiotic bacterium is defined as  
6 “a live microorganism that, when administered in adequate amounts, confers a health benefit on  
7 the host” (11). The reported beneficial effects for probiotic bacteria include minimizing  
8 symptoms of lactose intolerance, modulating the immune system, reducing cholesterol levels and  
9 hypertension, and preventing infectious, inflammatory, allergic and tumor-related diseases (4).  
10 Commercialized probiotics are limited to a few strains of bifidobacteria, lactobacilli and  
11 streptococci, most of which produce exopolysaccharides (EPS) (28, 35). These biopolymers are  
12 biothickening agents that play an important role in the rheology, texture and ‘mouthfeel’ of  
13 fermented milks (viili, långfil) and other fermented products (16). In addition, health benefits  
14 have been claimed for EPS synthesized by LAB (27).

15 The role of surface polysaccharides in probiotic-host interactions has not yet been studied  
16 in great detail. Polysaccharides display a high diversity among lactobacilli and they are thought  
17 to be involved in determining strain-specific properties important for probiotic action, such as  
18 adhesion, stress resistance and interactions with specific receptors and effectors of the host  
19 defense system (5, 38). However, knowledge of the involvement of these biopolymers in the  
20 adhesion of bacteria to the intestinal epithelium is scarce. In the case of the probiotic organism  
21 *Lactobacillus rhamnosus* GG, Lebeer *et al.* (18) showed that its long galactose-rich EPS  
22 molecules act negatively on its adherence and biofilm formation capacity. However, we have  
23 detected that the 2-substituted (1,3)- $\beta$ -D-glucan produced by *P. parvulus* 2.6 isolated from cider  
24 contributes to bacterial adhesion to human intestinal epithelial cells (13). Moreover, the results of

1 Dols-Lafargue *et al.* (6) revealed the contribution of this latter  $\beta$ -glucan to biofilm formation by  
2 *P. parvulus* IOEB 8801 isolated from wine.

3 Most of the EPS-producing LAB and bifidobacteria strains used in functional dairy food  
4 elaboration synthesize heteropolysaccharides. By contrast, homopolysaccharide producers have  
5 been rarely evaluated and are used only for fermentation of non-dairy products. However,  
6 several glucan or fructan producing *Lactobacillus* strains have been assayed for sourdough  
7 fermentation (30) and the  $\beta$ -D-glucan producing *P. parvulus* 2.6 has been tested for elaboration  
8 of a fermented oat product (21).

9 The (1,3)- $\beta$ -D-glucans from several bacteria, fungi and plants are considered to be  
10 biological response modifiers and numerous publications describe their biological activities and  
11 therapeutic uses (29). In this context, (1,3)- $\beta$ -D-glucan producing lactic acid bacteria isolated  
12 from non dairy habitats could represent an alternative to diversify and extent the number and  
13 applications of EPS producing probiotic strains.

14 In this work, three 2-substituted (1,3)- $\beta$ -D-glucan-producing LAB strains (*Pediococcus*  
15 *parvulus* CUPV1 and CUPV22 and *Lactobacillus suebicus* CUPV221) isolated from a non-dairy  
16 source (Basque Country natural cider) and their exopolysaccharides were characterized with the  
17 aim to analyze their potential probiotic and viscosifying properties and thereby assess their  
18 suitability as candidates for the elaboration of functional foods.

## 1 MATERIALS AND METHODS

### 2 *Bacterial strains and media*

3           The three EPS producing LAB strains employed in this study were previously isolated  
4 from Basque natural ciders, as described by Dueñas *et al.* (7) and identified as *Pediococcus*  
5 *parvulus* (strains CUPV1 and CUPV22) and *Lactobacillus suebicus* (strain CUPV221) by  
6 16SrRNA sequencing (Accession numbers in GenBank: GQ923890, GQ923889 and  
7 GQ923888). *Lactobacillus acidophilus* LA-5 and *Bifidobacterium animalis* sups. *lactis* BB-12  
8 (Chr. Hansen A/S., Hørsholm, Denmark) were used in this study as control for adhesion  
9 experiments to epithelial Caco-2 cells. Strains were maintained at -80°C in Man Rogosa Sharpe  
10 (MRS) broth (Pronadisa, Madrid, Spain) supplemented with 20% (vol/vol) glycerol.

11           For production and further characterization of the EPS, strains were grown in two  
12 previously described semi-defined media buffered at pH 6.0: MST (33) for *P. parvulus* strains  
13 and SMD (34) for *L. suebicus* CUPV221. Both media contained glucose as carbohydrate source  
14 at concentration of 20 g L<sup>-1</sup>. Batch fermentations without pH control were carried out in fully  
15 filled 250 mL screw-cap flasks for 240 h at 28°C in an atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub>.

16           For analysis of probiotic properties, the EPS-producing and probiotic bacteria were  
17 grown respectively at 30°C or 37°C in MRS broth supplemented with 0.05% (wt/vol) L-cysteine  
18 hydrochloride (Merck, Darmstad, Germany) and 0.1% (wt/vol) Tween 80 (Pronadisa, Barcelona,  
19 Spain) and incubated at 30°C under anaerobic conditions (in anaerobic jars with AnaeroGen™,  
20 Oxoid Unipath Ltd. Basingstoke, Hampshire, UK).

21

### 22 *Characterization of LAB strains*

23           The three EPS producing LAB strains were characterized as described below.

1 For DNA extraction, and PCR detection of the gene (*gtf*) encoding the glycosyltransferase (GTF)  
2 responsible for the synthesis of the 2-substituted (1,3)-β-D-glucan, pellets from 1 mL of MRS  
3 cultures were used for DNA extraction by DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen GmbH, Hilden,  
4 Germany), according to the manufacturer's instructions. DNA samples were stored at -20°C until  
5 used. For detection of the *gtf* gene of the EPS producing strains, specific primers GTFF and  
6 GTFR were used for-PCR amplification as previously described by Werning *et al.* (39). For  
7 characterization of the *gtf*, the entire genes were amplified with the primers  
8 5'-ATGTAAATGATAATGATTCAGAACTAAAAAATTTC-3' and  
9 5'-TTAATCATTCCAATCAACTGTTTCCGTGTT-3' and these as well as internal primers were  
10 used to determine the 1704 nt DNA sequence of the *gtf* genes of the three EPS-producing strains  
11 as previously described (39). The DNA sequences have been deposited in the GenBank (*P.*  
12 *parvulus* CUPV1, GU174475; *P. parvulus* CUPV22, GU174476 and *L. suebicus* CUPV221,  
13 GU174474).

#### 15 ***Purification and characterization of EPS***

16 For purification and quantification of EPS, bacterial cells were removed from fermented  
17 media by centrifugation (16,000 × *g*, 4°C, 30 min). The EPS present in the supernatant was  
18 precipitated by addition of two volumes of cold acetone and incubation overnight at 4°C. After  
19 centrifugation at 14,000 × *g* for 10 min at 4°C, the precipitate was washed 3 times with 70%  
20 acetone and sedimented by centrifugation. Finally, the EPS was suspended in distilled water and  
21 the total sugar content was determined by the phenol-sulphuric acid method using glucose as  
22 standard (14). Each reported value was the average of three independent determinations.

23 For EPS characterization, the exopolysaccharides were removed from the fermented  
24 growth media after 96 h of culture. After EPS purification, the precipitated EPS was dissolved  
25 and dialyzed against deionized water, using a membrane (Medicell International, Ltd., London,



1 U.K.) having a cut-off of 3.5 KDa, for 2–3 days (water changed twice each day). After dialysis,  
2 the precipitate was lyophilized.

3 For NMR analysis, 0.6 mg of each purified EPS sample was resuspended in 0.6 mL of  
4 deuterated water (99 atom % D, Aldrich) and the solutions were stirred to complete  
5 homogenization. The NMR analyses of the EPS were performed using an Avance 500  
6 spectrometer (Bruker Instruments Inc.).  $^1\text{H}$  monodimensional and 2D-COSY analyses were  
7 carried out at 30°C according to the conditions described by Dueñas *et al.* (8).

8 The molecular masses of the exopolysaccharides were determined by high-performance  
9 size exclusion chromatography (HP-SEC, GPCV 2000, Waters) as described by Velasco *et al.*  
10 (34).

11 The viscosities of the cell-free fermented growth media were determined with a  
12 capillary Cannon-Fenske viscometer (0.3 mm Ø) at 26°C as described by Dueñas *et al.* (10).  
13 Viscosity was expressed in centistocks ( $\text{cSt} = \text{mm}^2 \text{seg}^{-1}$ ) and all measurements were performed  
14 in triplicate.

15

### 16 ***Gastrointestinal transit tolerance assay***

17 Tolerance assays were performed with late exponential-phase cells, resuspended in 15  
18 mL of 10% skim-milk acidified with 1 M HCl to pH 4.6 (giving approximately  $10^9$  CFU  $\text{mL}^{-1}$ ).  
19 Human gastrointestinal tract conditions were simulated as previously described (12) with the  
20 following modifications. For gastric stress (G) analysis, bacteria after exposure to lysozyme were  
21 treated with pepsin at pHs 5.0, 4.0, 3.1, 2.1 or 1.8 for 20 min. Gastrointestinal stress (GI) was  
22 mimicked by exposure of the G pH 5 samples to bile salts and pancreatin at pH 6.5 for 120 min.  
23 Cell suspensions were prepared as described above and samples of 2.5 mL were withdrawn to  
24 determine cell viability by the LIVE/DEAD<sup>®</sup> BacLight<sup>™</sup> fluorescent stain (1). Prior to the  
25 analysis, it was established that a correlation exists for all strains between green (live

1 bacteria)/red (dead bacteria) fluorescent (G/R) ratio and viable cell numbers were determined by  
2 plate count. All experiments were performed in triplicate with three independent cultures of each  
3 strain.

#### 5 ***Caco-2 cell culture and adhesion assay***

6 The Caco-2 cell line from human colon adenocarcinoma was obtained from the cell bank of the  
7 Centro de Investigaciones Biológicas (Madrid, Spain). Cells were grown in Men-Alpha Medium  
8 (Invitrogen, Barcelona, Spain), supplemented with 10% (vol/vol) heat-inactivated fetal bovine  
9 serum. The incubation was carried out at 37°C in an atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub>. Caco-2  
10 cells were seeded in 96-well tissue culture plates (Falcon Microtest™, Becton Dickinson,  
11 Franklin Lakes, NJ, USA) at a concentration of 1.25×10<sup>4</sup> cells per well (1.25×10<sup>5</sup> cells mL<sup>-1</sup>) and  
12 grown for 15 days to obtain a monolayer of differentiated and polarized cells. The culture  
13 medium was changed every 2 days. Cell concentrations were determined before and after  
14 adhesion experiments in a counting chamber (Type Neubauer 0.100 mm Tiefe. 2. Depth  
15 Profondeur 0.0025 mm<sup>2</sup>) using a NIKON ECLIPSE TS 100 microscope.

16 For adhesion experiments, late exponential phase cells of the three strains were  
17 sedimented by centrifugation for 10 min at 12.000 x g, resuspended in the appropriate volume of  
18 Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM, Invitrogen) to give 1.25×10<sup>6</sup> CFU mL<sup>-1</sup>, and were  
19 added to Caco-2 cells in a final volume of 0.1 mL per well. In addition, for analysis of the  
20 influence of the EPS on the adhesion capability of the *P. parvulus* CUPV22, two sub-populations  
21 were used: (i) prepared as indicated above (CUPV22) and (ii) composed of bacterial cells  
22 washed with PBS prior to resuspension as above (CUPV22\*), with the aim of removing the EPS  
23 attached to bacterial before analyzing their adhesion.

24 Adhesion experiments consisted of exposing Caco-2 cells to bacteria (ratio 1:10) for 1  
25 h, at 37°C. Then, unattached bacteria were removed by three-fold washing with 0.2 mL PBS pH

1 7.1, and Caco-2 cells were detached from the plastic surface by incubating for 10 min at 37°C  
2 with 0.2 mL of 0,05% trypsin–EDTA per well. The detachment reaction was stopped by adding  
3 0.1 mL of cold phosphate-buffered saline PBS pH 7.1 (10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 140  
4 mM NaCl, 3 mM KCl, all purchased from Merck). To determine the number of cell-associated  
5 bacteria, appropriate dilutions were plated onto MRS agar plates. All adhesion assays were  
6 conducted in triplicate.

7

### 8 ***Detection of EPS by electron microscopy***

9 The presence or absence of the EPS attached to the bacteria was determined using a  
10 JEOL 1230 transmission electron microscope operated at 100 KV. Samples were prepared as  
11 follows. Glow-discharged carbon-coated formvar grids were placed face-down over a droplet of  
12 each culture concentrated five-fold in 0.1 M AcNH<sub>4</sub> pH 7. After 1 min, each grid was removed,  
13 blotted briefly with filter paper and, without drying, negatively stained with 2 % uranyl acetate  
14 for 40 s, then blotted quickly and air-dried.

15

### 16 ***Macrophage differentiation, culture and immune stimulatory assay***

17 Human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated from buffy coats  
18 from normal donors over a Lymphoprep (Nycomed Pharma, Oslo, Norway) gradient according  
19 to standard procedures. Monocytes were purified from PBMC by magnetic cell sorting using  
20 CD14 microbeads (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Germany). CD14+ cells (>95%  
21 monocytes) were cultured at 37°C in an atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub> for 7 days in RPMI  
22 (GIBCO, Invitrogen, NY, USA) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) (completed  
23 medium), containing 1,000U mL<sup>-1</sup> granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-  
24 CSF) or 10 ng mL<sup>-1</sup> macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) (ImmunoTools GmbH,  
25 Friesoythe, Germany) to generate M1 and M2 monocyte-derived macrophages, respectively,

1 with cytokine addition every second days. M1 and M2 macrophages ( $5 \times 10^5$  cells  $\text{mL}^{-1}$  as  
2 determined by Neubauer-counting) were stimulated with LPS from *Escherichia coli* 055:B5  
3 (Sigma, Barcelona, Spain) at  $10 \text{ ng mL}^{-1}$ , or exposed to  $1.25 \times 10^7$  CFU  $\text{mL}^{-1}$  (ratio 25:1,  
4 bacteria:Caco-2 cells) of *P. parvulus* CUPV22 or *L. suebicus* CUPV221 in an atmosphere  
5 containing 5%  $\text{CO}_2$  during 18 h.

6 Supernatants from untreated (Basal) and treated M1 and M2 macrophages were tested  
7 for the presence of cytokines using commercially available ELISA for IL-6, IL-8, IL-10, TNF- $\alpha$   
8 (all purchased from ImmunoTools, Friesoythe, Germany), following the protocols supplied by  
9 the manufacturers. Each determination was performed in triplicate, and the mean and standard  
10 deviations are shown.

11

## 12 ***Statistical Analysis***

13 Statistical analysis was performed using the SPSS-PC 17.0 Software (SPSS Inc.,  
14 Chicago, Illinois, USA). Data were subjected to a one-way ANOVA, and where appropriate, the  
15 least significant difference test (LSD) was used for comparison of the means.

## 1 RESULTS

### 2 *LAB strains characterization and EPS production*

3 Three LAB strains isolated from cider were investigated in this study with the aim to identify  
4 potential probiotic bacteria which synthesize (1,3)- $\beta$ -D-glucans. They exhibited a ropy  
5 phenotype when cultured in MRS broth, suggesting that they were exopolysaccharide producers.  
6 Identification by 16S RNA sequencing showed that they belong to the species *P. parvulus*  
7 (strains CUPV1, CUPV22) and *L. suebicus* (CUPV221). The GTF glycosyltransferase  
8 implicated in the synthesis of a 2-substituted (1,3)- $\beta$ -D-glucan by *P. parvulus* 2.6 is encoded by  
9 the *gft* gene (40) and we had previously developed a PCR method for detection of this gene (39).  
10 Using this method *gft* was detected in the genomes of the three EPS producing strains by PCR  
11 amplification of a 417 bp DNA with specific primers (result not shown). Sequencing the 1704 nt  
12 of the amplified genes revealed that the genes from CUPV1 and CUPV22 differed in only three  
13 nucleotides from the gene of CUPV221. Comparison of the deduced amino acid sequences of  
14 their encoded GTF glycosyltransferases by use of the Blast program (NCBI, USA) showed that  
15 the enzyme of CUPV221 only deviated by two amino acids (A91V and L126I) from that of *P.*  
16 *parvulus*\_2.6 (39). Moreover, the enzyme of *P. parvulus* 2.6 deviated in one amino acid (A489T)  
17 from those of the *P. parvulus* CUPV1 and CUPV22 strains. This close homology, and the ropy  
18 phenotype, suggested that these strains were 2-substituted (1,3)- $\beta$ -D-glucan producers. In  
19 addition, the GTF glycosyltransferase encoded by the *gft* gene is a membrane-bound protein  
20 (40), which belongs to the glycosyltransferase superfamily A (cl11394 in CDD data base of  
21 NCBI). This superfamily includes diverse families of glycosyl transferases with a common GT-  
22 A type structural fold. Therefore, alignment of the GTF glycosyltransferase amino acid sequence  
23 of the EPS-producing strains with the members of the superfamily revealed that the homology  
24 expanded from 109 to 354 amino acids, thus positioning mutations L126I within the homology  
25 region and revealing that it is located in the active site of the enzyme proximal to the DXD motif

1 (amino acids 198-200 in GTF), which is the putative metal ion binding site that is used to  
2 coordinate the phosphates of the NDP-sugar in the active center. Moreover, analysis of the GTFs  
3 with the TMpred program ([http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED\\_form.html](http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html)) revealed  
4 that mutation A489T is positioned in the loop located between the fifth and the six  
5 transmembrane helices of the GTF glycosyltransferase and that none of the other two mutations  
6 are included in transmembrane regions. These results indicate that A91V and A489T could be  
7 neutral mutations for the enzyme activity, whereas L126I could indeed alter it and could be  
8 responsible for the low molecular mass detected for the EPS synthesized by *L. suebicus*  
9 CUPV221 strain.

10         Since we have detected that *P. parvulus* 2.6 is able to synthesize β-D-glucan using  
11 glucose as carbon source (34), the EPS producing ability of the three LAB strains was analyzed  
12 during growth in semi-defined media supplemented with this sugar (Fig. 1). The three strains  
13 were able to produce and release EPS into the growth media, at final levels between 137 to 180  
14 mg L<sup>-1</sup>. All the strains synthesized EPS during the exponential phase of growth, though the  
15 pattern of production and secretion differed between the *Pediococcus* and *Lactobacillus* strains in  
16 the stationary phase. In *Pediococcus* CUPV1, EPS increased up to 123 mg L<sup>-1</sup> in the early  
17 stationary phase (60 hours) with only a moderate increase up to 167 mg L<sup>-1</sup> after 181 hours of  
18 growth (Fig. 1 A). Similarly, *Pediococcus* CUPV22 had produced 159 mg L<sup>-1</sup> at the entrance  
19 into stationary phase (60 hours) with only a slow increase to 179 mg L<sup>-1</sup> after 181 hours of  
20 growth (Fig. 1 B). By contrast, in the *Lactobacillus* strain, there was a markedly slower rate of  
21 EPS production during the exponential growth phase, reaching a peak of 48 mg L<sup>-1</sup> in early  
22 stationary phase which remained constant until a late, sharp increase to 137 mg L<sup>-1</sup> at 181 hours  
23 (Fig. 1C). In addition, production of EPS and viscosity increases of the growth media were  
24 statistically correlated (P< 0.001) for each strain (Fig. 1), with R<sup>2</sup> of 0.792, 0.933 and 0.952 for  
25 CUPV 1, CUPV22 and CUPV221, respectively. Production of EPS by the three strains

1 correlated with an increase of the viscosity of the growth media (Fig. 1). Moreover, after 181  
2 hours of incubation CUPV22 and CUPV221 had produced similar levels of EPS (about 150 mg  
3 L<sup>-1</sup>), which resulted, in both cases, in an increase of viscosity of approximately 4 mm seg<sup>-1</sup>.  
4 However, under the same growth conditions as used for *P. parvulus* CUPV22, *P. parvulus*  
5 CUPV1 produced 167 mg L<sup>-1</sup> of EPS though surprisingly the viscosity increase of 1.5 mm<sup>2</sup> seg<sup>-1</sup>  
6 was significantly lower ( $P < 0.001$ ). This difference in viscosity could have been due to  
7 differences in the structure or the molecular mass of the polymers synthesized by the different  
8 strains, and therefore this hypothesis was further investigated.

9

### 10 ***EPS characterization***

11 Structural characterization of the three exopolysaccharides was performed by <sup>1</sup>H and 2D-  
12 COSY NMR analysis. The chemical shifts for the <sup>1</sup>H resonances of the two exopolysaccharides  
13 from *P. parvulus* CUPV1 and CUPV22 strains were identical to those of the *P. parvulus* 2.6 EPS  
14 (Fig. 2). However, the identity of the EPS from *L. suebicus* CUPV221 could not be established,  
15 due to the low resolution of the anomeric proton region. Therefore, the three polysaccharides  
16 were subjected to 2D-COSY NMR analysis (Fig. 2) which revealed that they possessed a  
17 primary structure constituted by a trisaccharide repeating unit, with two (1,3)-β linked glucose  
18 residues in the main chain, one of which is substituted in position 2 by a terminal glucose  
19 residue, and therefore were indeed identical to that obtained from *P. parvulus* 2.6 (8 and Fig. 2).  
20 Molecular weight determination of the 2-substituted (1,3)-β-D-glucans was carried out by size  
21 exclusion chromatography, using dextrans of known molecular weight as standards. Beside a  
22 minor fraction with a molecular mass below the smallest 10 kDa dextran standard (data not  
23 shown), two main fractions were detected for the polymers of the three strains (Fig. 3). The  
24 higher molecular mass fraction of the β-D-glucan was the more abundant for *P. parvulus* CUPV1  
25 (10.24 x 10<sup>6</sup> Da) and *P. parvulus* CUPV22 (10.47 x 10<sup>6</sup> Da), constituting respectively the 96%

1 and 92% of the total polymer population. By contrast, the lower molecular mass polymer  
2 fraction (ranging from 25 to 40 x 10<sup>3</sup> Da) was a minority for these strains, but constituted 88% of  
3 the EPS produced by *L. suebicus* CUPV221. Interestingly, these and the above results (Fig. 1C)  
4 indicate that the lower molecular mass polymer can confer a substantial viscosity to the growth  
5 media. Moreover, they also indicated that the different viscosities of the two *Pediococcus*  
6 cultures were not attributable to differences in the primary structure or molecular mass of the  
7 EPS.

8

### 9 ***Characterization of probiotic properties***

10 The tolerance to the digestive tract stress of the three β-glucan producing strains was  
11 investigated in a simulated gastrointestinal tract model. Bacterial suspensions in acidified  
12 skimmed-milk (pH 4.6) were incubated in conditions that simulated the major factors influencing  
13 the survival of the ingested microorganisms during their passage through the gastrointestinal  
14 tract. Several relevant factors were considered: the effect of lysozyme as well as pepsin at the pH  
15 values of stomach (pHs 5.0, 4.0, 3.1, 2.0 and 1.8) under digestion conditions (gastric stress), and  
16 the further action of bile salts and pancreatin (gastrointestinal stress). Assays were performed in  
17 skimmed-milk for two reasons, as i) fermented milks and yoghurt are widely used vehicles for  
18 delivering probiotic bacteria, and ii) it has been previously described that skimmed-milk  
19 enhanced the gastric stress tolerance of LAB strains (2). The survival of the three strains was  
20 mainly affected during exposure to saliva and gastric conditions (Fig. 4). After exposure to pH  
21 5.0 (G pH 5.0 in Fig. 4), the three strains showed a reduction of the viability, though with still a  
22 23% to 30% of cell survival. Treatments at lower pHs caused a progressive reduction of *P.*  
23 *parvulus* CUPV1 cell viability which dropped below the detection limits (1x10<sup>5</sup> cfu mL<sup>-1</sup>) at pH  
24 2.1 (Fig. 4A, G pH 2.1), although the strain still exhibited a 1.6% cell survival after exposure to  
25 pH 3.1 (Fig. 4A, G pH 3.1). This tolerance to acidic stress was more pronounced for the two



1 other strains. Survival of *P. parvulus* CUPV22 remained at around 30% of cell viability after  
2 exposure to pHs from 5.0 to 3.1 (Fig. 4B), but dropped below the detection limit at more acidic  
3 pHs. *L. suebicus* CUPV221 was significantly more resistant to the gastric acidic stress ( $P < 0.05$ )  
4 and 11% cell survival was still detected at pH 1.8 (Fig. 4C), this viability being similar to that  
5 previously detected for the *Bifidobacterium animalis* subspecies *lactis* BB-12 probiotic strain (12). To  
6 evaluate the tolerance of the strains to intestinal conditions, G pH 5 samples were incubated in  
7 the presence of bile salts and pancreatin at pH 6.5 (GI pH 5.0 in Fig. 4). Under these conditions,  
8 cell viability of the three strains was not further affected.

9 In addition, the ability of the strains to attach to epithelial intestinal cells was  
10 investigated using the Caco-2 cell line as an *in vitro* model of the colonic epithelium. It was  
11 found that the presence of the three test bacterial strains had no deleterious effect on the Caco-2  
12 cells, as assessed by Neubauer-counting at the end of the adhesion assay. The number of  
13 epithelial cells present in the untreated control sample  $1.72 \times 10^5 \pm 2.12 \times 10^4$  cells mL<sup>-1</sup> was similar  
14 to that detected in presence of *P. parvulus* CUPV1 ( $1.76 \times 10^5 \pm 1.59 \times 10^4$ ), *P. parvulus* CUPV22  
15 ( $1.99 \times 10^5 \pm 4.7 \times 10^4$ ) and *L. suebicus* CUPV221 ( $1.43 \times 10^5 \pm 1.06 \times 10^4$ ). As shown in Figure 5, the  
16 adherence to Caco-2 cells varied with *P. parvulus* CUPV22 presenting the highest level of  
17 adhesion. In order to test the contribution of the  $\beta$ -glucan to the adhesion capability, an  
18 additional assay was performed with *P. parvulus* CUPV22, after washing the bacterial cells with  
19 PBS with the aim to remove the  $\beta$ -glucan attached to the cell surface (*P. parvulus* CUPV22\*  
20 sub-population). Analysis of the washed bacteria by electron microscopy (insets in Fig. 5)  
21 revealed that indeed this treatment had removed the EPS. Moreover, it provoked a sharp  
22 decrease in the adhesion capability of the strain to Caco-2 cells from 10.5 % to the 1.2% level for  
23 the CUPV22\* sub-population, Thus, these results support a contribution of the EPS in bacterial  
24 adhesion to epithelial cells.

1           The adhesion level of *P. parvulus* CUPV22 was significant higher ( $P < 0.05$ ) than the  
2 *Lactobacillus acidophilus* LA-5 (5.5%) and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12  
3 (1.2%) probiotic strains (Fig. 5), while *L. suebicus* showed a higher level than that found for  
4 *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 ( $P < 0.05$ ) and similar to that of *L. acidophilus*.

5           Therefore, the immunomodulatory capacity of these two strains was evaluated by  
6 determining their ability to modulate cytokine production by GM-CSF-driven pro-inflammatory  
7 M1 macrophages and M-CSF-driven anti-inflammatory macrophages (36) Both bacterial strains  
8 triggered production of IL-6, IL-8 and TNF $\alpha$  pro-inflammatory cytokines from M1 macrophages  
9 (Fig. 6). By contrast, IL-10 production was only induced by strain CUPV22 in both types of  
10 macrophages ( $P < 0.05$ ; Fig. 6). Thus, *P. parvulus* CUPV22 and *L. suebicus* CUPV221 induce a  
11 distinct cytokine profile upon contact with macrophages and, consequently, differentially  
12 promote human macrophage activation.

## 1 DISCUSSION

2           Currently, the development of new probiotic strains aims at more active beneficial  
3 organisms (28). In this research line the (1,3)- $\beta$ -D-glucans are attracting an increasing attention  
4 of the pharmaceutical and functional food industries, because of their positive effects on human  
5 and animal health, such as immune stimulation, anti-inflammatory or cholesterol-lowering  
6 activity (15, 41). Human trials of an oat-based food elaborated with the (1,3)- $\beta$ -D-glucan  
7 producer *P. parvulus* 2.6 resulted in a decrease of the serum cholesterol levels and increased  
8 counts of faecal *Bifidobacterium* ssp. (22). It has also been reported that a *P. parvulus* 2.6  
9 fermented oat fiber concentrate provoked changes in SCFA formation in the caecum, distal colon  
10 and faeces of rats, which may be positive towards maintaining colonic health (17). Thus, the  
11 (1,3)- $\beta$ -D-glucan producing *Pediococcus* and *Lactobacillus* strains reported here could be  
12 potential probiotic strains, useful for elaboration of functional foods.

13           With this aim we have here identified three lactic acid bacteria: *P. parvulus* CUPV1, *P.*  
14 *parvulus* CUPV22 and *L. suebicus* CUPV221, which produce high levels (Fig. 1) of the same 2-  
15 substituted (1,3)- $\beta$ -D-glucan as *P. parvulus* 2.6 (Fig. 2 and 8), *Pediococcus* sp. (20), *L.*  
16 *diolivorans* (9) and *O. oeni* (6,14) isolated from ropy cider and wine. The analysis of these  
17 strains for gastrointestinal stress tolerance (Fig. 4) and capacity for adhesion to epithelial cell  
18 (Fig. 5) revealed a differential behavior among them, but a similar high resistance to intestinal  
19 stress. *P. parvulus* CUPV1 showed the highest sensitivity to gastric stress (reduction of viability  
20 of 98.4% at pH 3.1) and the lowest adherence to Caco-2 cells (0.5%). By contrast, *P. parvulus*  
21 CUPV22 displayed a survival of 29% after exposure to gastric stress at pH 3.1, higher than that  
22 previously detected for *P. parvulus* 2.6 (10%) (13). Moreover, 11% of the *L. suebicus* CUPV221  
23 population survived to the more extreme condition (pH 1.8) of the gastric pH gradient. In  
24 addition, *P. parvulus* CUPV22 showed a high level of adherence to Caco-2 cells (10.5%). This  
25 level was similar to that reported for the probiotic *L. rhamnosus* GG (9.7%) (31), but higher than

1 that detected for *P. parvulus* 2.6 (6.1%) (13) and for the probiotic *L. acidophilus* LA-5 (5.5%)  
2 detected in this work (Fig. 5). The EPS which is attached and surrounding the strain of *P.*  
3 *parvulus* CUPV22, as was seen in electronic microscopy pictures (inset in Fig. 5), could improve  
4 its adhesion to the epithelial cells by attaching to the adhesion receptors of these cells, as  
5 postulated by Ruas-Madiedo *et al.* (26). Corroborating this hypothesis, the high adherence of *P.*  
6 *parvulus* CUPV22 to colon epithelial cells decreased to 1.2%, when the (1,3)-β-D-glucan  
7 attached to its surface was removed by washing. This correlates with the fact that removal of the  
8 *P. parvulus* 2.6 EPS reduced its adherence to Caco-2 cells to levels closer to that of its isogenic  
9 strain, which does not produce the (1,3)-β-D-glucan (13), This and the results of Dols-Lafargue  
10 *et al.* (6) showing the contribution of 2-substituted (1,3)-β-D-glucan on biofilm formation by  
11 LAB, support that this biopolymer could play an important role in cellular recognition and  
12 intestinal colonization by LAB strains.

13 In addition, *L. suebicus* CUPV221 showed levels of adherence to Caco-2 cells (3.2%)  
14 superior to that of the probiotic *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 (1.8%) (Fig. 5).  
15 Moreover, the strain displayed a resistance to the gastrointestinal stress comparable to that of *P.*  
16 *parvulus* CUPV22. The above results indicated that a significant fraction of *P. parvulus*  
17 CUPV22 and *L. suebicus* CUPV221 should survive the passage through the digestive tract and to  
18 adhere to the intestinal mucosa. It has been demonstrated that adherent LAB strains are able to  
19 protect intestinal cells from infection by pathogenic bacteria (25) and they could act as  
20 immunomodulatory agents in the human colon. Considering the potential immunomodulatory  
21 effect of strains *P. parvulus* CUPV22 and *L. suebicus* CUPV221, it is worth noting that, although  
22 their ability to trigger pro-inflammatory cytokine production in human macrophages was roughly  
23 similar, only strain *L. suebicus* CUPV221 promoted the release of IL-10. This effect was  
24 observed using both pro-inflammatory M1 and anti-inflammatory M2 macrophages (36). It is  
25 well recognized that the anti-inflammatory cytokine IL-10 has a critical role in the regulation of

1 the immunity against infections and the resolution of inflammatory responses, by virtue of its  
2 capacity to down-modulate the activity of the immune cells that cause tissue damage during  
3 pathogen clearance and inflammation (3). IL-10 action is primarily due to a direct effect on  
4 monocytes and macrophages, where it limits the production of pro-inflammatory cytokines  
5 (including IL-1, IL-6, IL-12 and TNF $\alpha$ ) (23). Therefore, the ability of strains CUPV22 and  
6 CUPV221 to induce the expression of IL-10 by macrophages may be indicative of an ability to  
7 limit tissue damage. In this regard, given its higher IL-10-inducing capacity, strain *L. suebicus*  
8 CUPV221 would be better suited for favoring resolution of inflammation and maintenance of  
9 tissue homeostasis, two effects that would be compatible with a probiotic action. To our  
10 knowledge this is the first instance of a *L. suebicus* strain with potentially beneficial  
11 immunomodulatory properties. The above results suggest that both strains are potential  
12 probiotics that could be used for elaboration of functional foods.

13         Apart from interest in their therapeutic properties, (1,3)- $\beta$ -D-glucans have been  
14 extensively studied due to their physicochemical properties, especially gelling capability, which  
15 has led to their extensive use in food applications. In this context, the use of the (1,3)- $\beta$ -D-glucan  
16 of *P. parvulus* 2.6 as a biothickener has been proved (34). For this reason, the increase in  
17 viscosity of the culture supernatants provoked by the three selected strains has been determined  
18 in this work. All three strains were able to produce significant levels (137-180 mg L<sup>-1</sup>) of the  
19 EPS during growth in semi-defined medium (Fig. 1).  $\beta$ -glucan production by the *Pediococcus*  
20 strains starts during exponential growth phase, as has been demonstrated for other 2-substituted  
21 (1,3)- $\beta$ -D-glucan producers, such as *P. parvulus* 2.6 (33) and *P. damnosus* IOEB8801 (37). By  
22 contrast, *L. suebicus* CUPV221 produced the EPS during the stationary phase, which could be  
23 advantageous for its use as a co-adjuvant during fermentations.

24         The  $\beta$ -glucan of *P. parvulus* CUPV22 and *L. suebicus* CUPV221 conferred high  
25 viscosity to the broth (4 mm<sup>2</sup> seg<sup>-1</sup>), whereas *P. parvulus* CUPV1 only provoked a moderate

1 increase of viscosity of 1.5 mm seg<sup>-1</sup> (Fig. 1). The molecular mass analysis of the β-glucans (Fig.  
2 3) showed that for *P. parvulus* CUPV22, the crude EPS was mainly composed of a high  
3 molecular mass polymer. This result could reveal a relationship between the presence of an  
4 elevated proportion of the high molecular mass fraction in the EPS and a significant thickening  
5 ability. However, the major fraction of the β-glucan from *L. suebicus* CUPV221 had low  
6 molecular weight, which may be related to the genetic changes in the inferred catalytic site (see  
7 Results). Thus, both high and low molecular mass fractions provoked a similar viscosity  
8 enhancement. These results are in agreement with that reported by Petry *et al.* (24), who found  
9 no direct correlation between the amounts of EPS produced, the molecular mass ratio of EPS  
10 fractions and the rheological properties of fermented milk. These observations suggest that other  
11 factors such as EPS conformation or interactions between EPS and growth media microstructure,  
12 could also affect the rheological features of the fermented media (32). Nevertheless, the overall  
13 results indicate that *P. parvulus* CUPV22 and *L. suebicus* CUPV221 have potential as probiotic  
14 strains, and that their polymers may have utility as viscosifiers of fermented foods, which would  
15 be an added value for functional products.

16 In order to detect the potential raw materials to be fermented by each strain, the  
17 carbohydrate consumption profile has been analyzed in this work (results not shown). The two  
18 strains as well as *P. parvulus* CUPV1 were able to grow on, and ferment, glucose, fructose,  
19 galactose and trehalose, making them suitable for use in dairy products. Interestingly, the two *P.*  
20 *parvulus* strains were also able to ferment maltose, a disaccharide present in oat and other  
21 cereals, which indicates a potential to be used as starter or coadjuvants cultures in non-dairy  
22 product fermentations.

---

## 1 **ACKNOWLEDGEMENTS**

2           We thank Dr Stephen Elson for critical reading of the manuscript. We also thank Javier  
3 Areizaga for molecular weight determination of the exopolysaccharides. This work was  
4 supported by the *Ministerio de Ciencia e Innovación* (projects AGL2006-11932 and AGL2009-  
5 12998, subprojects 01 and 02), the *Universidad del País Vasco* (UPV/EHU) (EHU08/37) and the  
6 *Diputación Foral de Gipuzkoa, Programa Red Gipuzkoana de Ciencia, Tecnología e Innovación*  
7 (co-financed by the European Union). Gaizka Garai-Ibabe acknowledges the *Gobierno Vasco*  
8 (*Dpto. Agricultura, Pesca y Alimentación*) for the pre-doctoral fellowship.

**1 REFERENCES**

- 2 1. **Alakomi H-L, J. Mättö, I. Virkajärvi, and M. Saarela.** 2005. Application of a  
3 microplate scale fluorochrome staining assay for the assessment of viability of probiotic  
4 preparations. *J. Microbiol. Meth.* **62**:25–35.
- 5 2. **Charteris W. P., P. M. Kelly, L. Morelli, and J. K. Collins.** 1998. Development and  
6 application of an in vitro methodology to determine the transit tolerance of potentially  
7 probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in the upper human gastrointestinal  
8 tract. *J. Appl. Microbiol.* **84**:759-768.
- 9 3. **Couper K. N., D. G. Blount D. G., and E. M. Riley.** 2008. IL-10: the master regulator  
10 of immunity to infection. *J. Immunol.* **180**:5771–5777.
- 11 4. **De Vrese, M., and J. Schrezenmeir.** 2008. Probiotics, prebiotics, and synbiotics. *Adv.*  
12 *Biochem. Engin. Biotechnol.* **111**: 1–66.
- 13 5. **Delcour, J., T. Ferain, M. Deghorain, E. Palumbo, and P. Hols.** 1999. The  
14 biosynthesis and functionality of the cell-wall of lactic acid bacteria. *Antonie Van*  
15 *Leeuwenhoek* **76**:159-184. 37.
- 16 6. **Dols-Lafargue., M., H. Y. Lee, C. Le Marrec, A. Heyraud, G. Chambat, and A.**  
17 **Lonvaud-Funel.** 2008. Characterization of *gtf*, a glucosyltransferase gene in the genomes  
18 of *Pediococcus parvulus* and *Oenococcus oeni*. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**:4079-4090.
- 19 7. **Dueñas, M., A. Irastorza, K. Fernández, and A. Bilbao.** 1995. Heterofermentative  
20 lactobacilli causing ropiness isolated from Basque Country ciders, *J. Food Prot.* **58**:76–  
21 80.
- 22 8. **Dueñas-Chasco M.T., M. A. Rodriguez-Carvajal, P. Tejero, G. Franco-Rodriguez, J.**  
23 **L. Espartero, A. Irastorza-Iribas, and A. M.Gil-Serrano.** 1997. Structural analysis of  
24 the exopolysaccharide produced by *Pediococcus damnosus* 2.6. *Carbohyd. Res.* **303**: 453-  
25 458.



- 1        9. **Dueñas-Chasco M.T., M. A. Rodríguez-Carvajal, P. Tejero-Mateo, J. L. Espartero,**  
2            **A. Irastorza-Iribas, and A. M. Gil-Serrano.** 1998. Structural analysis of the  
3            exopolysaccharides produced by *Lactobacillus* spp. G-77. Carbohydr. Res. **307**: 125-133.
- 4        10. **Dueñas, M., A. Munduate, A. Perea, and A. Irastorza.** 2003. Exopolysaccharide  
5            production by *Pediococcus damnosus* 2.6 in a semidefined medium under different  
6            growth conditions. Int. J. Food Microbiol. **87**:113-120.
- 7        11. **FAO/WHO.** 2001. Report on joint FAO/WHO expert consultation on evaluation of  
8            health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live  
9            lactic acid bacteria. WHO, Geneva, Switzerland.
- 10       12. **Fernández de Palencia, P., P. López, A. L. Corbí, C. Peláez, and T. Requena.** 2008.  
11           Probiotic strains: survival under simulated gastrointestinal conditions, *in vitro* adhesion to  
12           Caco-2 cells and effect on cytokine secretion. Eur Food Res Technol. **227**:1475–1484.
- 13       13. **Fernández de Palencia P., M. L. Werning, E. Sierra-Filardi, M. T. Dueñas, A.**  
14            **Irastorza, A. L. Corbí, and P. López.** 2009. Probiotic properties of the 2-substituted  
15            (1,3)- $\beta$ -D-glucan producing bacterium *Pediococcus parvulus* 2.6. Appl. Environ. Microbiol.  
16            **75**: 4887-4891.
- 17       14. **Ibarburu I., M. E.Soria-Diaz, M. A. Rodriguez-Carvajal, S. E. Velasco, P. Tejero-**  
18            **Mateo, A. M. Gil-Serrano, A. Irastorza, and M. T. Dueñas.** 2007. Growth and  
19            exopolysaccharide (EPS) production by *Oenococcus oeni* 14 and structural  
20            characterization of their EPSs. J. Appl. Microbiol. **103**: 477-486.
- 21       15. **Jiezhong C. and R. Seviour.** 2007. Medicinal importance of fungal  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)(1 $\rightarrow$ 6)  
22            glucans. Mycological Res. **111**:635-652
- 23       16. **Jolly L., S.J.F. Vincent, P. Duboc, and J.R. Neeser.** 2002. Exploiting  
24            exopolysaccharides from lactic acid bacteria. Antonie van Leeuwenhoek. **82**:367-374.

- 1       17. **Lambo-Fodje, A., R. Öste, and E. G.-L Nyman.** 2006. Short-chain fatty acid formation  
2       in the hindgut of rats fed native and fermented oat fiber concentrates. *British J. Nutrition.*  
3       **96:47-55.**
- 4       18. **Lebeer, S., T.L.A. Verhoeven, G. Francius, G. Schoofs, I. Lambrichts, Y. Dufrière, J.**  
5       **Vanderleyden, and S. C.J. De Keersmaecker.** 2009. Identification of a gene cluster for  
6       the biosynthesis of a long galactose-rich exopolysaccharide in *Lactobacillus rhamnosus*  
7       GG and functional analysis of the priming glycosyltransferase. *Appl. Environ. Microbiol.*  
8       **75:3554-63.**
- 9       19. **Ljungh, A., and T Wadström.** 2006. Lactic acid bacteria as probiotic. *Curr. Issues*  
10       *Intest. Microbiol.* **7:** 73-89.
- 11       20. **Llaubères R. M., B. Richard, A. Lonvaud, D. Dubourdieu, and B. Fournet.** 1990.  
12       Structure of an exocellular  $\beta$ -D-glucan from *Pediococcus* sp., a wine lactic bacteria.  
13       *Carbohydr. Res.* **203:**103-107.
- 14       21. **Mårtensson, O, J. Staaf, M. T. Dueñas-Chasco, A. Irastorza , R. Oste, and O. Holst.**  
15       2002. A fermented ropy non-dairy oat product based on the exopolysaccharide-producing  
16       strain *Pediococcus damnosus* 2.6. *Adv Food Sci.* **24:** 4–11.
- 17       22. **Mårtensson, O., M. Biörklund, M. A. Lambo, M. T. Dueñas-Chasco, A. Irastorza, O.**  
18       **Holst, E. Norin, G. Walling, R. Öste, and G. Önning.** 2005. Fermented ropy, oat-based  
19       products reduce cholesterol levels and stimulate the bifidobacteria flora in humans. *Nutr.*  
20       *Res.* **25:**429-442.
- 21       23. **Moore K. W., R. de Waal Malefyt, R. L. Coffman, and A. O’Garra.** 2001.  
22       Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu. Rev. Immunol.* **19:**683–765.
- 23       24. **Petry S., S. Furlan, E. Waghorne, L Saulnier, J. Cerning, and E. Maguin.** 2003.  
24       Comparison of the thickening properties of four *Lactobacillus delbrueckii* subsp.

- 1           *bulgaricus* strains and physicochemical characterization of their exopolysaccharides.  
2           FEMS Microbiol. Lett. **221**: 285-291.
- 3           25. **Ramiah, K., C.A. van Reenen, and L.M.T. Dicks.** 2008. Surface-bound proteins of  
4           *Lactobacillus plantarum* 423 that contribute to adhesion of Caco-2 cells and their role in  
5           competitive exclusion and displacement of *Clostridium sporogenes* and *Enterococcus*  
6           *faecalis*. Res. Microbiol. **159**: 470-475
- 7           26. **Ruas-Madiedo, P., M. Gueimonde, A. Margolles, C.G De Los Reyes-Gavilan, and S.**  
8           **Salminen.** 2006. Exopolysaccharides produced by probiotic strains modify the adhesion  
9           of probiotics and enteropathogens to human intestinal mucus. J. Food Protect. **69**: 2011-  
10           2015.
- 11           27. **Ruas-Madiedo, P., A. Abraham, F. Mozzi, and C. G. de los Reyes-Gavilán.** 2008.  
12           Functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria, p. 137-166. In B.  
13           Mayo, P. López, and G. Pérez-Martín (ed.), Molecular aspects of lactic acid bacteria for  
14           traditional and new applications. Research Signpost, Kerala, India.
- 15           28. **Salminen S., A. von Wright, L. Morelli, P. Marteau, D. Brassart, W.M. de Vos, R.**  
16           **Fonden, M. Saxelin, K. Collins, G. Mogensen, S.E. Birkeland, and T. Mattila-**  
17           **Sandholm.** 1998. Demonstration of safety of probiotics a review. Int. J. Food Microbiol.  
18           **44**: 93-106.
- 19           29. **Sletmoen, M., and B.T Stokke.** 2008. Higher order structure of (1,3)- $\beta$ -D-glucans and  
20           its influence on their biological activities and complexation abilities. *Biopolymers*  
21           **89**:310-21.
- 22           30. **Tieking, M., M. Korakli, M.A. Ehrmann, M.G. Gänzle, and R.F. Vogel.** 2003. In situ  
23           production of exopolysaccharides during sourdough fermentation by cereal and intestinal  
24           isolates of lactic acid bacteria. Appl. Environ. Microbiol. **69**: 945-952.

- 1        31. **Tuomola E. M., and S. J. Salminen.** 1998. Adhesion of some probiotic and dairy  
2            *Lactobacillus* strains to Caco-2 cell cultures. *Int. J. Food Microbiol.* **41**: 45-51
- 3        32. **Vaningelgem F., M. Zamfir, F. Mozzi, T. Adriany, M. Vancanneyt, J. Swings and L.**  
4            **De Vuyst.** 2004. Biodiversity of exopolysaccharides produced by *Streptococcus*  
5            *thermophilus* strains is reflected in their production and their molecular and functional  
6            characteristics. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 900-912
- 7        33. **Velasco S., E. Årskold, M. Paese, A. Grage, A. Irastorza, P. Rådstrom, and E.W. J.**  
8            **van Niel.** 2006. Environmental factors influencing growth of and exopolysaccharide  
9            formation by *Pediococcus parvulus* 2.6. *Int. J. Food Microbiol.* **111**: 252–258.
- 10       34. **Velasco S. E., J. Areizaga, A. Irastorza, M. T. Dueñas, A. Santamaria, and M. E.**  
11            **Muñoz.** 2009. Chemical and rheological properties of the  $\beta$ -glucan produced by  
12            *Pediococcus parvulus* 2.6. *J. Agric. Food Chem.* **57**:1827-1834.
- 13       35. **Ventura, M., C. Canchaya, G.F. Fitzgerald, R.S. Gupta, and D. van Sinderen,** 2007.  
14            Genomics as a mean to understand bacterial phylogeny and ecological adaptation: the  
15            case of bifidobacteria. *Antonie van Leeuwenhoek.* **91**: 351-372.
- 16       36. **Verreck F., A. de Boer, T. Langenberg, D. M. Hoeve, M. A. Kramer, M. Vaisberg,**  
17            **E. Kastelein, R. Kolk, A. R. de Waal-Malefyt, and T. H. Ottenhoff.** 2004. *Proc. Natl.*  
18            *Acad. Sci. USA* **101**:4560-4565.
- 19       37. **Walling E., M. Dols-Lafargue, and A. Lonvaud-Funel.** 2005. Glucose fermentation  
20            kinetics and exopolysaccharide production by ropy *Pediococcus damnosus* IOEB8801.  
21            *Food Microbiol.* **22**: 71–78 .
- 22       38. **Welman, A. D. and I. S. Maddox.** 2003. Exopolysaccharides from lactic acid bacteria:  
23            perspectives and challenges. *Trends Biotechnol.* **21**:269-274. 22.
- 24       39. **Werning M. L., I. Ibarburu, M. T. Dueñas, A. Irastorza, J. Navas, and P. López.**  
25            2006. *Pediococcus parvulus* *gtf* gene encoding the GTF glycosyltransferase and its

- 
- 1 application for specific PCR detection of  $\beta$ -D-glucan-producing bacteria in foods and  
2 beverages. *J. Food Prot.* **69**: 161–169.
- 3 40. **Werning, M.L., M.A. Corrales, A. Prieto, P. Fernández de Palencia, J. Navas, J. P.**  
4 **López.** 2008. Heterologous expression of a 2-substituted-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glucan in  
5 *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**:5259-5262.
- 6 41. **Zekovic D. B., S. Kwiatkowski, M.M. Vrvic, D. Jakovijevic, and C. A. Moran.** 2005.  
7 Natural and modified (1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-Glucans in health promotion and disease alleviation.  
8 *Crit. Rev. Biotech.* **25**:205-230.

## 1 LEGENDS TO THE FIGURES

2 **Figure 1. Analysis of EPS production by LAB.** Growth of the indicated EPS-producing LAB  
3 in semi-defined medium was followed by OD measurements (left panels). Their EPS production  
4 (white rectangles) and the viscosity increases of culture medium (grey rectangles) are depicted in  
5 the right panels. The determinations were performed in duplicate and experiments were  
6 conducted in triplicate and the mean and standard deviations are shown. \*The ratio viscosity/EPS  
7 at 181 hours for strain CUPV1 showed a significant difference ( $P<0.001$ ) with the ratios detected  
8 with strains CUPV22 and CUPV 221.

9

10 **Figure 2. Analysis of the structure of EPS.** 500 MHz  $^1\text{H}$  NMR spectra of the polymers  
11 synthesized by the indicated strains were recorded in  $\text{D}_2\text{O}$  at  $30^\circ\text{C}$  and the 500 MHz 2D  
12 homonuclear proton double-band filtered correlation spectrum (DBF-COSY) was obtained by  
13 double band selective excitation of the 3-5 ppm region. Couplings between anomeric protons and  
14 C2 protons (H1C/H2C, H1B/H2B y H1A/H2A) of the 2-substituted (1,3)-β-D-glucan from *P.*  
15 *parvulus* 2.6 are boxed.

16

17 **Figure 3. Determination of the molecular mass of EPS.** Size exclusion HPLC chromatograms  
18 of the β-glucans synthesized by *P. parvulus* CUPV1 (grey line), *P. parvulus* CUPV22 (dashed  
19 line) or *L. suebicus* CUPV221 (solid line) are depicted.

20

21 **Figure 4. Analysis of cell survival after gastric (G) and gastrointestinal (GI) stresses.** The  
22 indicated bacterial strains were untreated (C) or subjected to various G or GI stresses as  
23 described in the text. Cell viability was analyzed by measurement of green and red fluorescence  
24 after appropriate staining. The determinations were performed in duplicate and the values are the  
25 mean of three independent experiments performed with three different cultures of each bacterium

1 and are expressed as a percentage of control. 100% control values of the green/red fluorescence  
2 ratio for untreated *P. parvulus* CUPV1, *P. parvulus* CUPV22 and *L. suebicus* CUPV221 were  
3 respectively 7.3, 10.8 and 9.5 which corresponded to  $2.2 \times 10^8$ ,  $2.3 \times 10^8$  and  $8 \times 10^7$  cfu mL<sup>-1</sup>.  
4 \*  $P < 0.01$  compared with *P. parvulus* CUPV 22 and *L. suebicus* CUPV221. \*\* $P < 0.05$  compared  
5 with the *P. parvulus* CUPV1 and CUPV22 strains.

6

7 **Figure 5. Adhesion of bacterial strains to Caco-2 cells after infection with ten bacteria per**  
8 **epithelial cell.** Adhesion levels are expressed as the percentage of the total number of bacteria  
9 (adhered plus unadhered) detected after exposure for 1 hour to Caco-2 cells. Each adhesion assay  
10 was conducted in triplicate. The values are the mean of three independent experiments  
11 performed with three different cultures of each bacterium and each experiment with a different  
12 Caco-2 culture, and for each of them, three independent determinations were performed.

13 \*\*  $P < 0.05$  compared with *L. acidophilus* La-5 and *B. animalis* BB-12; \*  $P < 0.05$  compared with  
14 *B. animalis* BB-12. The two insets show electron micrographs of *P. parvulus* CUPV22 cultures  
15 unwashed (CUPV22) or washed with PBS (CUPV22\*) prior to the adhesion experiments.

16

17 **Figure 6. Cytokine response of macrophages to *P. parvulus* CUPV22 and *L. suebicus***  
18 **CUPV221 strains** M1 and M2 macrophages were either untreated (Basal 18h) or stimulated  
19 with LPS from *Escherichia coli* 055:B5 at  $10 \text{ ng mL}^{-1}$  or the indicated LAB strains. The levels of  
20 IL-6 (A), IL-8 (B), TNF $\alpha$  (C) and IL-10 (D) released were determined. Each determination was  
21 performed in triplicate and the mean and standard deviations are shown. \*  $P < 0.05$  comparison  
22 with *P. parvulus* CUPV22.

23

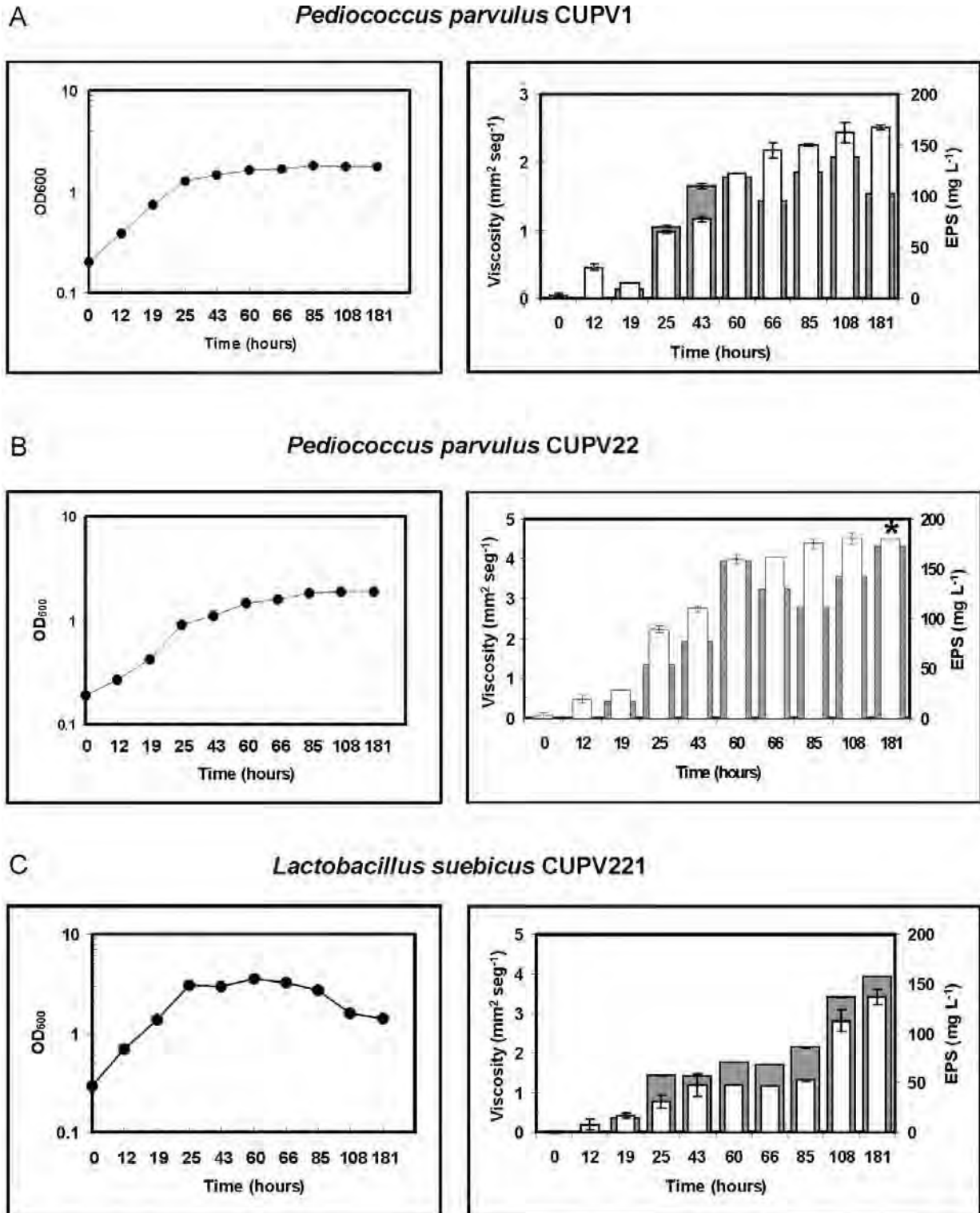


Figure 1



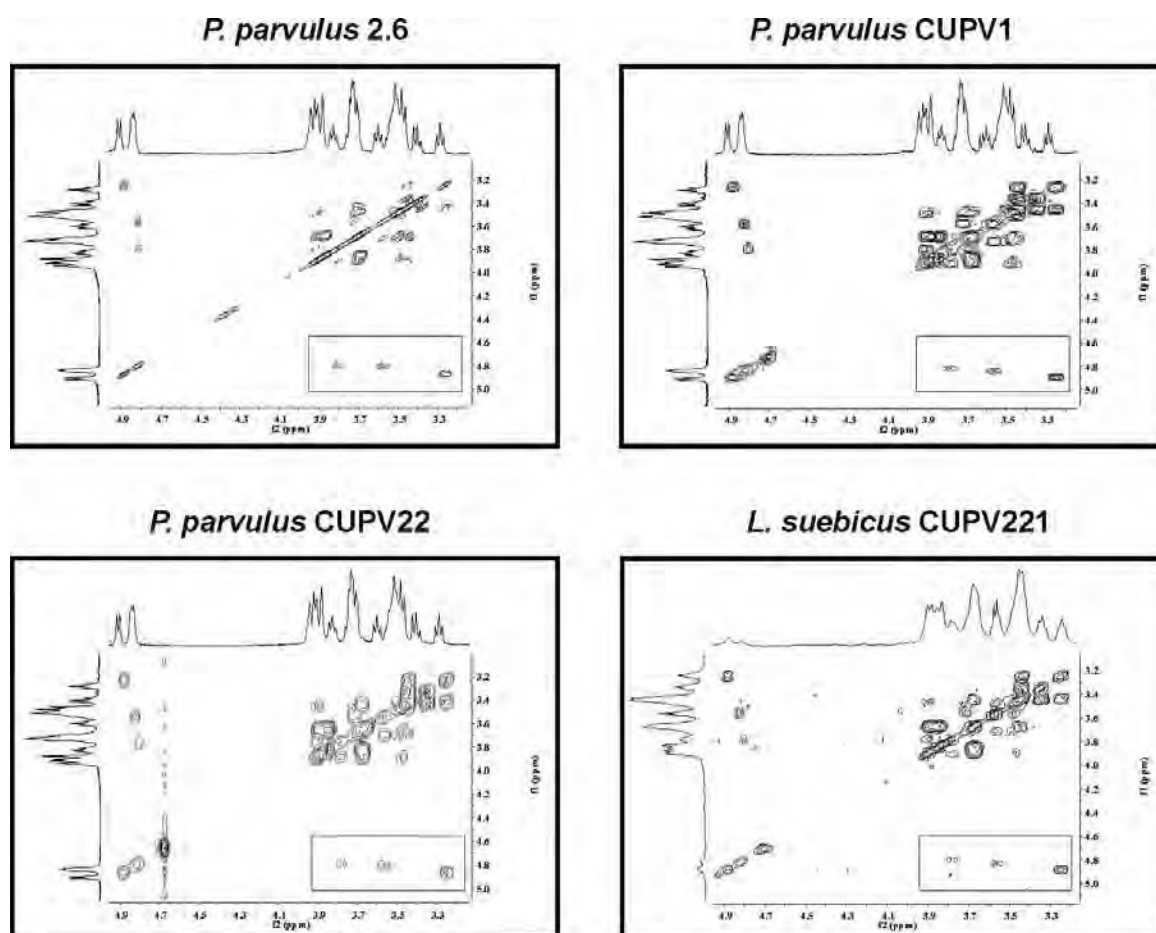


Figure 2

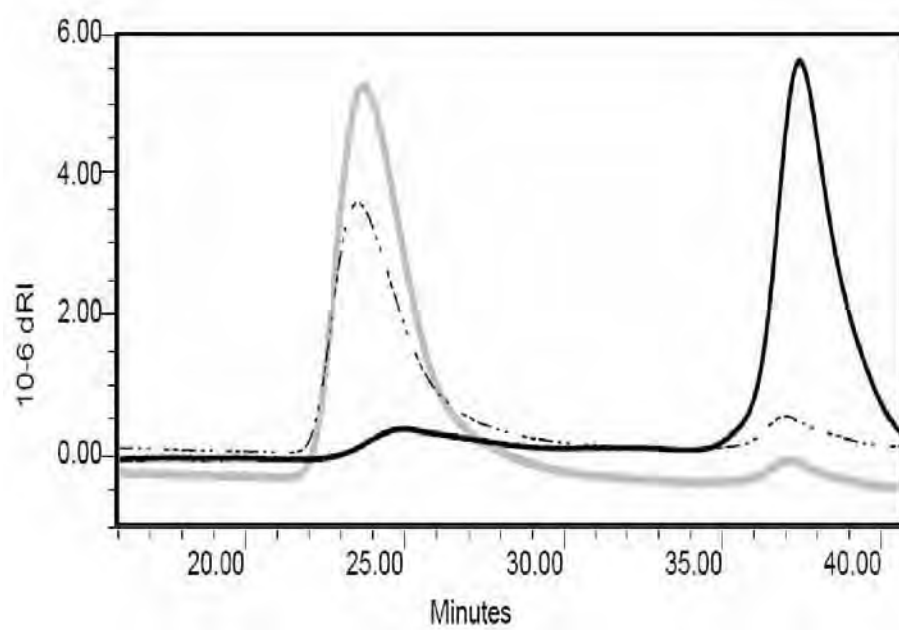
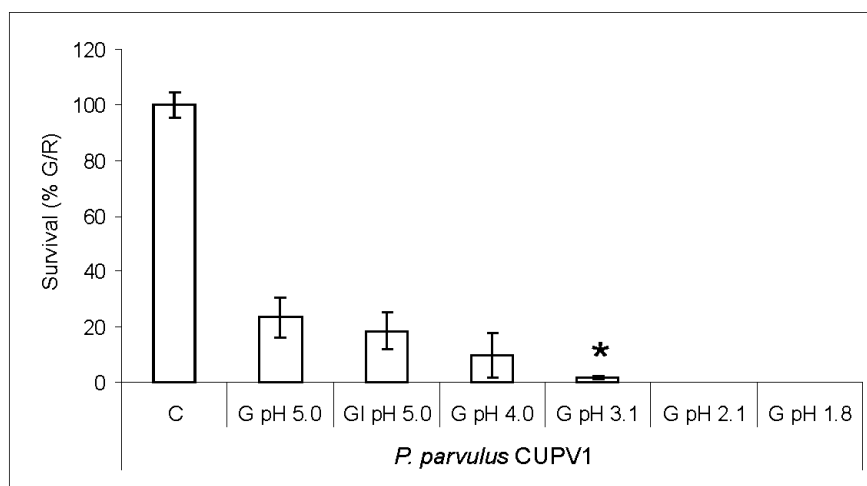
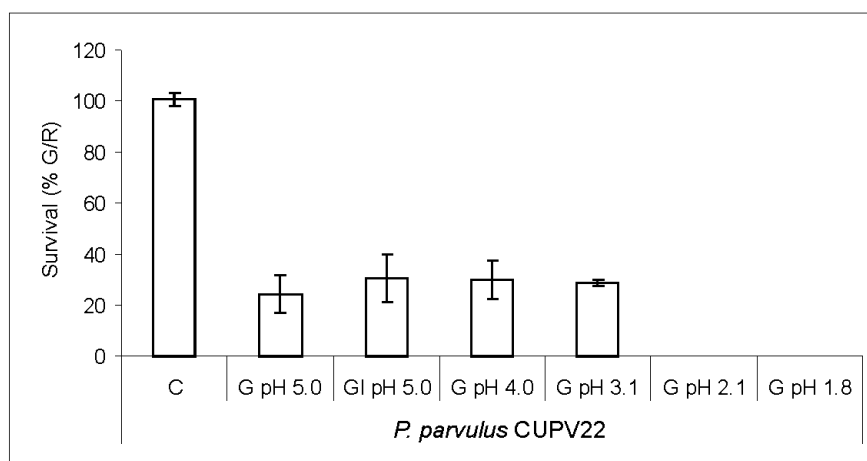


Figure 3

A



B



C

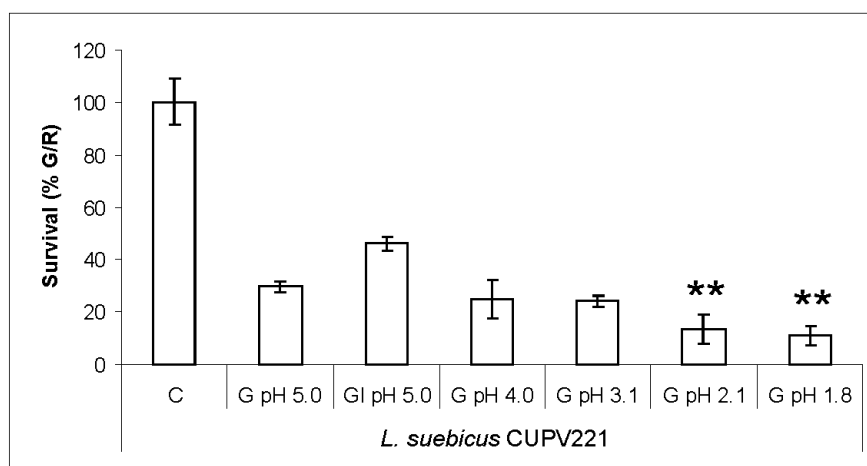


Figure 4

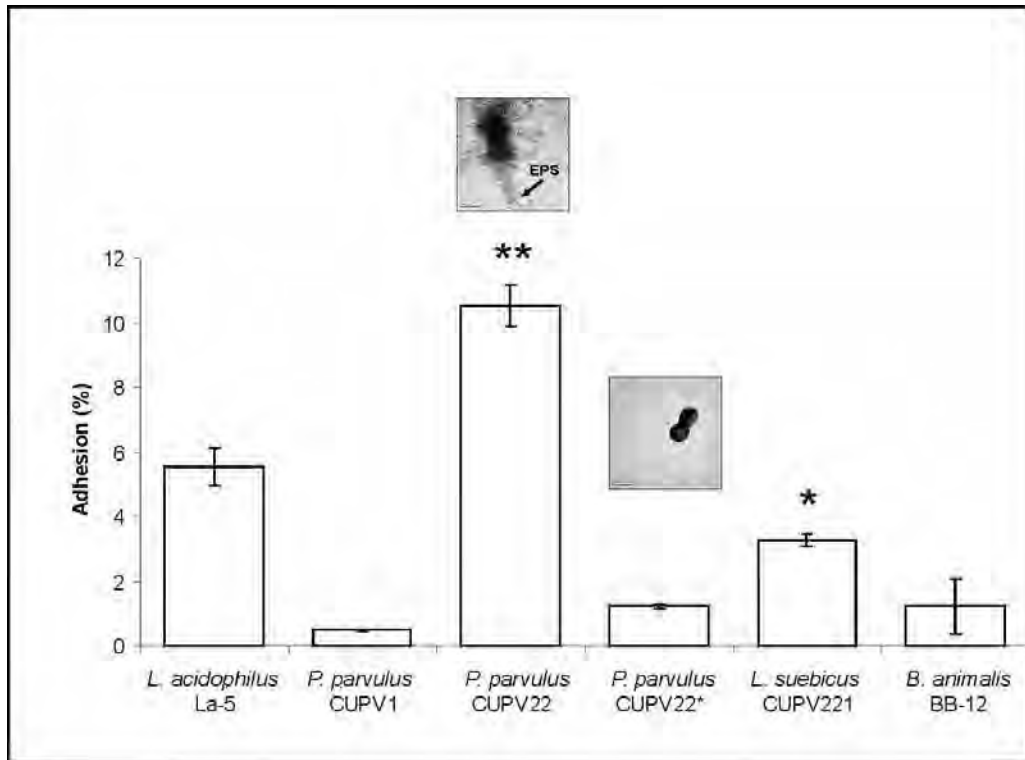


Figure 5

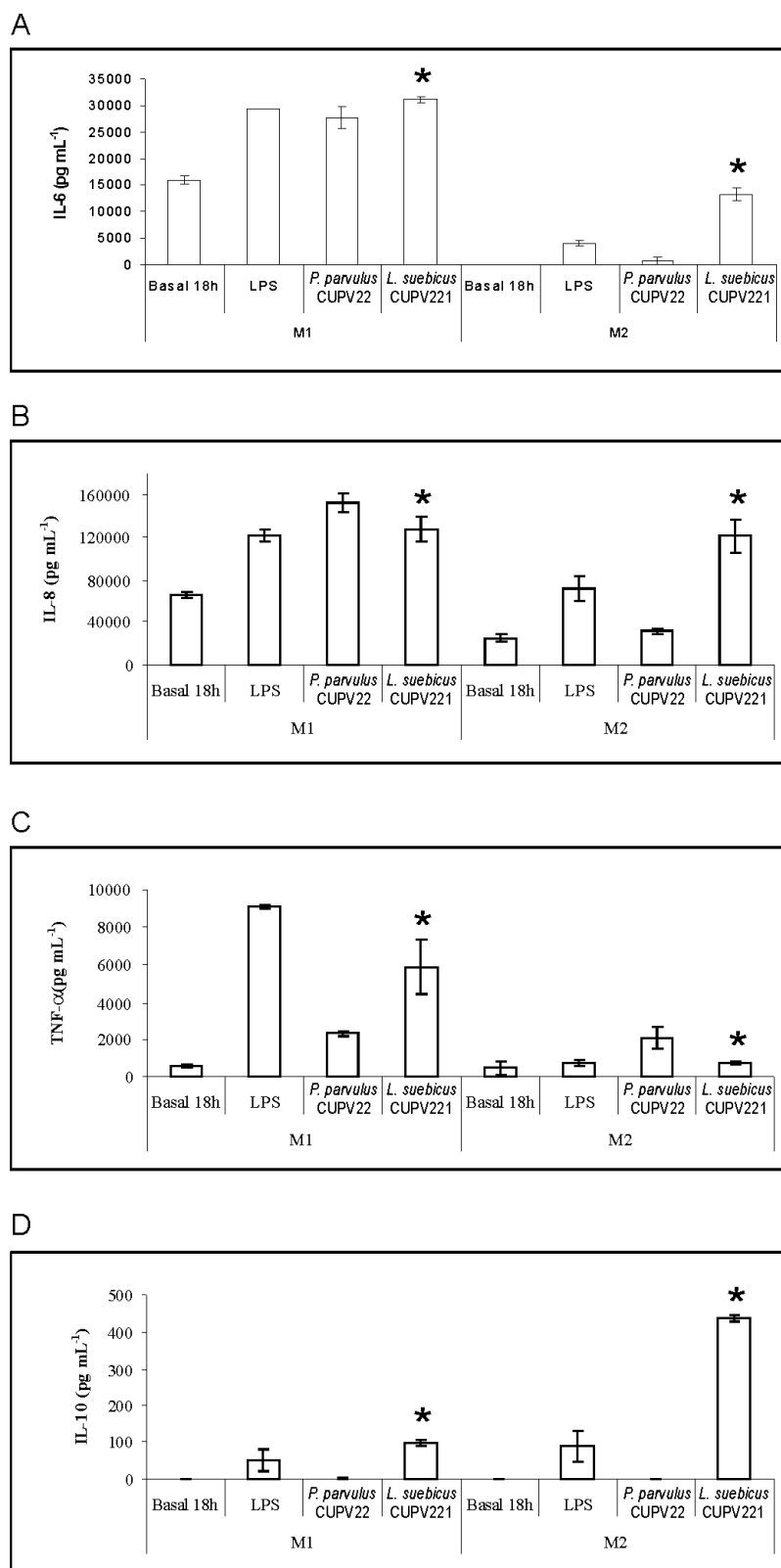


Figure 6



## TESIS DOCTORALES PUBLICADAS

- Nº 1. La raza Latxa: Sistemas de producción y características reproductivas. EDUARDO URIARTE EGURCEGUI
- Nº 2. Estudio y puesta a punto de un método simplificado de control lechero cualitativo en la raza ovina Latxa y su inclusión en el plan de selección. GUSTAVO ADOLFO MARIA LEVRINO
- Nº 3. Implicaciones tecnológicas de la composición química del pescado con especial referencia a los lípidos. ROGELIO POZO CARRO
- Nº 4. Estudio de suelos de Vizkaia. MARGARITA DOMINGO URARTE
- Nº 5. El Maedi o neumonía progresiva en el conjunto de las enfermedades respiratorias crónicas del ganado ovino en la Comunidad Autónoma Vasca. LORENZO GONZÁLEZ ANGULO
- Nº 6. Estudio experimental de las fases iniciales de la paratuberculosis ovina. RAMÓN A. JUSTE JORDAN
- Nº 7. Identificación, origen y factores fisicoquímicos que condicionan la contaminación por elementos metálicos de sedimentos de ríos. ESTILITA RUIZ ROMERA
- Nº 8. Análisis financiero de proyectos de inversión en repoblaciones forestales. ÁLAVARO AUNOS GÓMEZ
- Nº 9. Desarrollo y evaluación del sistema integrado de diagnóstico y recomendación (DRIS) para la fertilización de las praderas permanentes. Marta Rodríguez Julia
- Nº 10. Estudio de las mieles producidas en la Comunidad Autónoma del País Vasco. MARÍA TERESA SANCHO ORTIZ
- Nº 11. La biomasa microbiana como agente de las transformaciones de nitrógeno en el suelo tras el enterrado de la paja de cereal. JESÚS ÁNGEL OCIO ARMENTIA
- Nº 12. Análisis jurídico y económico de la implementación de la política agraria comunitaria en la Comunidad Autónoma del País Vasco. BEATRIZ PÉREZ DE LAS HERAS
- Nº 13. Nemátodos formadores de quistes (*Globodera spp.*) en patata (*Solanum tuberosum L.*): caracterización taxonómica, reproducción y actividad de las formas juveniles. AZUCENA SALAZAR BAYONA
- Nº 14. Ensayo comparativo de tres métodos de tratamiento antihelmítico estratégico en rebaños de ovejas latxas. ANA LUISA GRACIA PÉREZ
- Nº 15. Estudio sobre una encefalitis vírica similar al Louping-ill en el ganado ovino de la Comunidad Autónoma Vasca. DANIEL FERNÁNDEZ DE LUCO MARTINÉZ
- Nº 16. Análisis de caracteres involucrados en la selección y mejora de *Lupinus hispanicus* Boiss. et Reuter. VERÓNICA ARRIETA PICO
- Nº 17. Contribución al estudio de fermentaciones artesanales e industriales de Rioja Alavesa. MILAGROS VIÑEIRA GARCÍA
- Nº 18. Estudio del manejo de la alimentación en los rebaños ovinos de raza Latxa y su influencia sobre los resultados reproductivos y de producción de leche. LUIS M<sup>a</sup>. OREGUI LIZARRALDE
- Nº 19. El sector pesquero vizcaíno, 1800-1960. Análisis de la interacción de los elementos ambiental, extractivo y comercial en la pesquería. JOSÉ AGUSTÍN MAIZ ALCORTA
- Nº 20. Epidemiología, diagnóstico y control de la paratuberculosis ovina en la Comunidad Autónoma del País Vasco. J. J. ADURIZ RECALDE
- Nº 21. Agrupación de poblaciones locales de maíz (*Zea mays L.*) mediante caracteres morfológicos y parámetros ambientales. JOSÉ IGNACIO RUIZ DE GALARRETA GÓMEZ
- Nº 22. Estudio del potencial melífero de Bizkaia. AMELIA CERVELLO MARTÍNEZ

- Nº 23. Influencia de los procesos de salado y ahumado sobre las características fisicoquímicas del queso Idiazabal (compuestos nitrogenados). FRANCISCO C. IBAÑEZ MOYA
- Nº 24. El Euskal Artzain Txakurra (el perro pastor vasco) descripción y tipificación racial. MARIANO GÓMEZ FERNÁNDEZ
- Nº 25. Evaluación de diferentes ciclos de selección recurrente en dos poblaciones sintéticas de maíz. GOTZONE GARAY SOLACHI
- Nº 26. Valoración agronómica de la gallinaza: Compostaje. ADOLFO MENOYO PUELLES
- Nº 27. Relación clima-vegetación en la Comunidad Autónoma del País Vasco. AMELIA ORTUBAY FUENTES
- Nº 28. Influencia de los procesos de salado y ahumado tradicional sobre las características microbiológicas y organolépticas del queso Idiazabal. FRANCISCO J. PÉREZ ELORTONDO
- Nº 29. Mastitis en la oveja Latxa: epidemiología, diagnóstico y control. JUAN C. MARCO MELERO
- Nº 30. Contribución al conocimiento anatomopatológico y diagnóstico de la tuberculosis caprina y ovina por *Mycobacterium bovis*. M.<sup>a</sup> MONTSERRAT GUTIÉRREZ CANCELA
- Nº 31. Estudio de factores que pueden influir en la calidad de la pluma de gallos Eusko-oiloa (Variedad *Marradune*) para la fabricación de moscas artificiales utilizadas en la pesca de la trucha. ROSA M.<sup>a</sup> ECHARRI TOMÉ
- Nº 32. Estudio de la fracción lipídica durante la maduración del queso Idiazabal. Influencia de los procesos tecnológicos del tiempo de permanencia en salmuera y ahumado. ANA ISABEL NÁJERA ORTIGOSA
- Nº 33.- Influencia del tipo de cuajo y adición de cultivo iniciador sobre los compuestos nitrogenados durante la maduración del queso Idiazabal. M.<sup>a</sup> SOLEDAD VICENTE MARTÍN
- Nº 34. Estudio de la infección por *Borrelia burgdorferi*, grupo *Ehrlichia phagocytophila* y virus de la encefalitis ovina en las poblaciones de ixódidos de la Comunidad Autónoma Vasca. MARTA BARRAL LAHIDALGA
- Nº 35. Lipólisis en el queso Idiazabal: efecto de la época de elaboración, del cultivo iniciador, de la pasteurización y del tipo de cuajo. FELISA CHAVARRI DÍAZ DE CERIO
- Nº 36. Aspectos inmunológicos de la paratuberculosis de los pequeños rumiantes. Respuesta inmune asociada a la vacunación. JUAN MANUEL CORPA ARENAS
- Nº 37. Desarrollo y evaluación de nuevas técnicas de diagnóstico del Maedi-Visna. ANA BELÉN EXTRAMIANA ALONSO
- Nº 38. Estudios sobre Patogenia y Diagnóstico de la Adenomatosis Pulmonar Ovina. MARÍA MERCEDES GARCÍA GOTI
- Nº 39. Análisis de los factores de explotación que afectan a la producción lechera en los rebaños de raza Latxa de la CAPV. ROBERTO J. RUIZ SANTOS
- Nº 40. Crecimiento y producción de repoblaciones de *Pinus radiata* D. Don en el Territorio Histórico de Gipuzkoa (País Vasco). LUIS MARIO CHAUCHARD BADANO
- Nº 41. Puesta a punto de técnicas PCR en heces y de Elisa para el diagnóstico de la Paratuberculosis. Estudio de prevalencia en ganado bovino. JOSEBA M. GARRIDO URKULLU
- Nº 42. Epidemiología y diagnóstico de la leptospirosis y la neosporosis en explotaciones de bovino lechero de la CAPV. RAQUEL ACHAERANDIO GALDOS
- Nº 43. Relaciones aire-agua en sustratos de cultivo como base para el control del riego. Metodología de laboratorio y modelización. VALENTÍN TERÉS TERÉS
- Nº 44. Zonas endémicas de enfermedad de Lyme en la CAPV: estudio del papel de los micromamíferos en el mantenimiento de *Borrelia burgdorferi* sensu lato en el medio natural. HORACIO GIL GIL



- Nº 45. Optimización del esquema de mejora de la raza Latxa: análisis del modelo de valoración e introducción de nuevos caracteres en el objetivo de selección. ANDRÉS LEGARZA ALBIZU
- Nº 46. Influencia de las condiciones de almacenamiento, reimplantación y lluvia ácida en la viabilidad de *Pinus radiata* D. Don. MIREN AMAIA MENA PETITE
- Nº 47. Estudio sobre encefalopatías en peces: patogenicidad del nodavirus causante de la enfermedad y retinopatía vírica (ERV) y transmisión experimental del prión *scrapie* a peces. RAQUEL ARANGUREN RUIZ
- Nº 48. Enfermedades transmitidas por semilla en judía-grano (*Phaseolus vulgaris* L.): detección, control sanitario y mejora genética. ANA MARÍA DÍEZ NAVAJAS
- Nº 49. Pastoreo del ganado vacuno en zonas de montaña y su integración en los sistemas de producción de la CAPV. NEREA MANDALUNIZ ASTIGARRAGA
- Nº 50. Aspectos básicos de la mejora genética de patata (*Solanum tuberosum* L.) a nivel diploide. LEIRE BARANDALLA URTIAGA
- Nº 51. El cuajo de cordero en pasta: preparación y efecto en los procesos proteolíticos y lipolíticos de la maduración del queso de Idiazabal. M<sup>a</sup>. ÁNGELES BUSTAMANTE GALLEGO
- Nº 52. Dinámica de la población de atún blanco (*Thunnus alalunga* Bonnaterre 1788) del Atlántico Norte. JOSU SANTIAGO BURRUTXAGA
- Nº 53. El pino radiata (*Pinus radiata* D. Don) en la historia forestal de la Comunidad Autónoma de euskadi. Análisis de un proceso de forestalismo intensivo. MARIO MICHEL RODRÍGUEZ
- Nº 54. Balance hídrico y mineral del pimiento de Gernika (*Capsicum annuum* L., cv Derio) en cultivo hidropónico. Relaciones con la producción. HUGO MACÍA OLIVER
- Nº 55. Desarrollo de métodos moleculares y su aplicación al estudio de la resistencia genética y patogé- nia molecular del Scrapie. DAVID GARCÍA CRESPO
- Nº 56. Estudio epidemiológico y experimental de la transmisión y control del virus Maedi-Visna en ovino lechero de raza Latxa del País Vasco. VEGA ÁLVAREZ MAIZTEGUI
- Nº 57. Desarrollo y aplicación de técnicas de diagnóstico serológico para el estudio de la transmisión calostrual y horizontal del virus Maedi-Visna (VMV) en ovino. MARA ELISA DALTABUIT TEST
- Nº 58. Integral Study of Calving Ease in Spanish Holstein Population. EVANGELINA LÓPEZ DE MATURANA LÓPEZ DE LACALLE
- Nº 59. Caracterización Molecular, Detección y Resistencia de *Mycobacterium avium subespecie paratuberculosis*. IKER SEVILLA AGIRREGOMOSKORTA
- Nº 60. Desarrollo de un sistema de fertilización nitrogenada racional en trigo blando de invierno bajo condiciones de clima mediterráneo húmedo. M.<sup>a</sup> ARRITOKIETA ORTUZAR IRAGORRI
- Nº 61. Estructura y dinámica de la materia orgánica del suelo en ecosistemas forestales templados: de lo particular a lo general. NAHIA GARTZIA BENGOTXEA
- Nº 62. Análisis sensorial del vino tinto joven de Rioja Alavesa: descripción y evaluación de la calidad. IÑAKI ETAIO ALONSO
- Nº 63. Biología del gusano de alambre (*Agriotes* spp.) en la Llanada Alavesa y desarrollo de estrategias de control integrado en el cultivo de la patata. ANA ISABEL RUIZ DE AZÚA ESTÍVARIZ
- Nº 64. La sucesión en la ganadería familiar: el ovino de leche en el País Vasco. GUADALUPE RAMOS TRUCHERO
- Nº 65. Identificación molecular de las especies de piroplasmas en las poblaciones de Inóxidos de la Comunidad Autónoma del País Vasco. Distribución y prevalencia de babesia y theileria en los ungulados domésticos y silvestre. MIREN JOSUNE GARCÍA
- Nº 66. Estudio de variables inmunológicas y bacteriológicas en relación con la inmunización frente a paratuberculosis en los rumiantes. MARÍA V. GEIJO VÁZQUEZ



ISBN: 978-84-457-3061-4



9 788445 730614