

# M37 - CARACTERIZACIÓN DE LA CAPACIDAD DE INCORPORACIÓN DE GLUTATIÓN Y DE SU EFECTO SOBRE EL CRECIMIENTO EN CEPAS DE *OENOCOCCUS OENI*

**Mar Margalef, María Isabel Araque, Albert Bordons, Cristina Reguant**

Universitat Rovira I Virgili, Dept. Bioquímica i Biotecnologia, C/ Marcel·lí Domingo, 1, 43007, Tarragona  
mariadelmar.margalef@urv.cat

## RESUMEN:

En este trabajo se evaluó la capacidad de incorporación de glutatión del medio en 30 cepas diferentes de *O. oeni*. Los resultados indican que todas las cepas tienen capacidad de incorporar GSH, aunque se observa una notable diversidad en la cantidad de GSH captado. Un 25% de las cepas estudiadas acumulan una cantidad de GSH intracelular unas cuatro veces superior que las cepas con menor capacidad de captación. También se evaluó el crecimiento con y sin GSH en condiciones de bajo pH y presencia de etanol. En todos los casos las cepas que podían captar el GSH presentaban un mayor crecimiento.

**Palabras clave:** *Oenococcus oeni*, GSH, captación, vino.

## 1. Introducción

El glutatión (GSH) es un tripéptido con carácter antioxidante, presente en todos los organismos vivos, asociado a la protección de la célula frente al estrés oxidativo. Tiene numerosas funciones metabólicas, como reducir los enlaces disulfuro de proteínas a cisteínas [1]. En procariontes se encuentra principalmente en Gram negativas. Las Gram positivas no pueden sintetizarlo, exceptuando *Streptococcus* y *Enterococcus* [2].

En *Oenococcus oeni*, la bacteria láctica principal responsable de la fermentación maloláctica (FML), se ha descrito que en condiciones de estrés asociadas al vino, la enzima glutatión reductasa (GshR), que reduce el GSH oxidado, aumenta su concentración [3]. También se vio un incremento de GshR en un estudio proteómico de células liofilizadas de *O. oeni* [4]. De estos resultados se deduce que el GSH participaría en el proceso de adaptación de *O. oeni* a las condiciones del vino. Como otras bacterias lácticas, *O. oeni* no posee la capacidad de sintetizar el GSH pero puede incorporarlo del medio [5]. El efecto antioxidante del GSH podría ayudar a las bacterias a mantener o mejorar su estado celular para desempeñar posteriormente la FML en el vino. Factores de estrés asociados al vino, como pH bajo y concentración elevada de etanol, dificultan la acción de *O. oeni* y ponen trabas a su supervivencia.

En este trabajo se evaluó la capacidad de incorporación de GSH del medio en 30 cepas de *O. oeni*. En base a los resultados obtenidos se seleccionaron dos cepas, 3P2 (con mayor capacidad de incorporación de GSH) y CECT 217<sup>T</sup> con menor capacidad. En estas cepas se estudió el efecto de la adición de GSH sobre su crecimiento en diversas condiciones del vino.

## 2. Material y métodos

Entre las 30 cepas analizadas en este estudio se encuentra la cepa PSU-1, la cepa tipo CECT 217<sup>T</sup>, cepas comerciales y algunas aisladas de vinos del Priorato y de Tarragona (Cataluña) de la colección propia. El medio de cultivo utilizado para los crecimientos fue MRS modificado con ácido D,L-málico y fructosa (4 y 5 g/l respectivamente), y se añadió 5mM de GSH al medio de cultivo. Los crecimientos celulares se realizaron en 50 ml y se siguieron hasta obtener la DO máxima a 600nm. Se centrifugaron dos muestras de 30 ml de cada cultivo y se lavaron con PBS1x en frío. Una de las muestras sirvió para la determinación del GSH total y la otra para la determinación del glutatión oxidado (GSSG), por lo cual se añadió un bloqueador del GSH reducido (2-vinil-piridina). Los pellets se guardaron a -80°C. Para la extracción se siguió el protocolo descrito para extraer el GSH por Glutathione Assay Kit (CatalogN.CS0260) con algunas modificaciones, rompiendo las células con perlas de vidrio. Los extractos se guardaron a -80°C. Para determinar la cantidad de GSH oxidado y reducido intracelular se usó el protocolo de fluorescencia de Collin et al. 2003. La intensidad fluorescente fue medida (485 excitación/520 emisión) en un lector de placas (Polarstar Omega de BMG Labtech). Las concentraciones de GSH medido fueron calculadas respecto al peso húmedo del pellet de la muestra, teniendo en cuenta el volumen final de extracto obtenido.

Algunas de las cepas posteriormente se utilizaron para ver el efecto del GSH a diferentes pH y en presencia de etanol. El medio de cultivo utilizado fue MRS modificado (con málico y fructosa) y con menos nitrógeno. La reducción de la concentración de compuestos proteicos se hizo para evitar precipitados indeseables durante el ensayo a diferentes pHs.

## 3. Resultados

En las 30 cepas de *O. oeni* analizadas se comprobó una gran variabilidad en la captación de GSH del medio. El GSSG no se detectó en todas las muestras, y en las muestras sin GSH añadido no se pudieron determinar los valores de GSH. El análisis reveló 4 cepas con una alta capacidad para captar el antioxidante (Fig. 1). Entre ellas el valor máximo se obtuvo en la cepa 3P2, aislada en vino del Priorat. También daban un valor alto una comercial (Alfa) y dos cepas de la colección propia (1P1 y UB51).

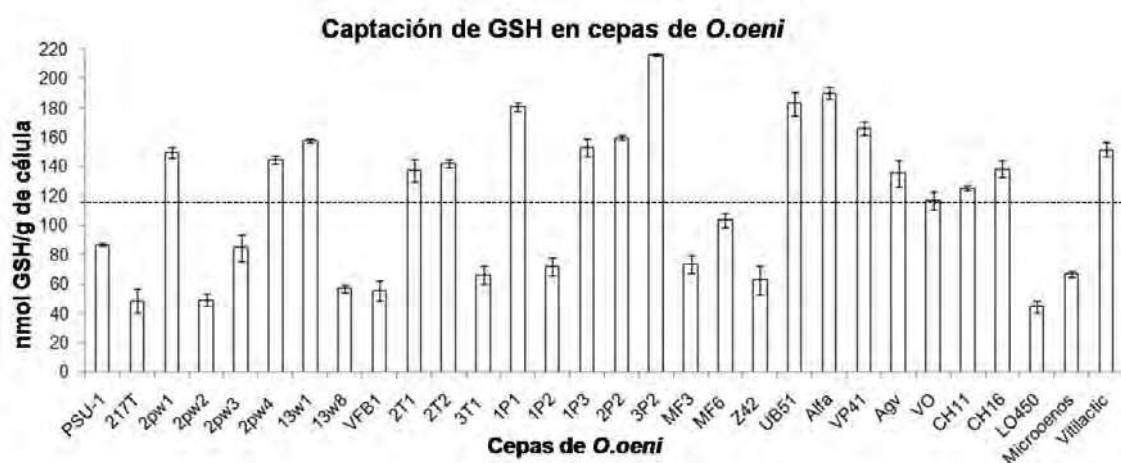


Fig.1 Captación de GSH intracelular en cepas de *O. oeni*. El gráfico muestra la cantidad en nmol de GSH reducido por g de célula detectado intracelularmente. La línea negra indica el valor medio de captación de las 30 cepas.

Como se observa, de las 9 cepas comerciales probadas, 6 dieron por encima de la media mientras que dos presentaron unos valores de hasta 4 veces inferiores a los valores

máximos. La cepa tipo CECT 217<sup>T</sup> es una de las que presenta una captación menor, hecho que puede ser causa de su crecimiento lento.

Para evaluar el efecto protector del glutatión (GSH) sobre *O. oeni* se eligieron tres cepas (PSU-1, 3P2 y 217<sup>T</sup>), con un comportamiento diferente en cuanto a la captación del GSH y se midió el crecimiento en diferentes condiciones de pH y concentración de etanol. En los cultivos sin etanol (control a pH 5) ya se apreciaron diferencias en el crecimiento de las tres cepas (DO<sub>max</sub>) que alcanzaron en presencia de GSH, especialmente 3P2. En 6% de etanol la DO<sub>max</sub> fue superior en las células con GSH. Con 12% de etanol el crecimiento fue prácticamente nulo con y sin GSH añadido.

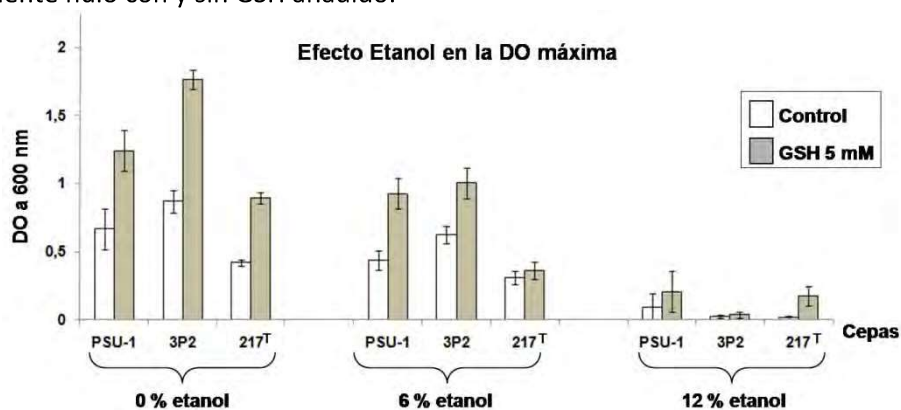


Fig.2 Efecto del etanol en el crecimiento de 3 cepas de *O. oeni*. Las barras blancas corresponden a los crecimientos de las 3 cepas sin GSH y las barras grises representan los crecimientos con 5mM de GSH en los diferentes medios con etanol. Los valores mostrados son las medias de los triplicados realizados.

Respecto al efecto del pH (Fig. 3), las diferencias observadas en la DO<sub>max</sub> en la condición control (pH 5) se mantuvieron a pH 4 e incluso incrementaron para las cepas PSU-1 y 217<sup>T</sup>. A pH 4, las diferencias de DO<sub>max</sub> en los cultivos con GSH respecto a los que no tienen son notablemente más elevadas en las cepas PSU-1 (67 % más) y la cepa 217<sup>T</sup> (54 % más), a pesar de que la cepa que presenta una DO<sub>max</sub> superior es 3P2. El crecimiento se inhibe notablemente a pH 3,4 aunque sigue la misma tendencia de aumento de crecimiento cuando hay mayor captación de GSH por parte de la cepa analizada.

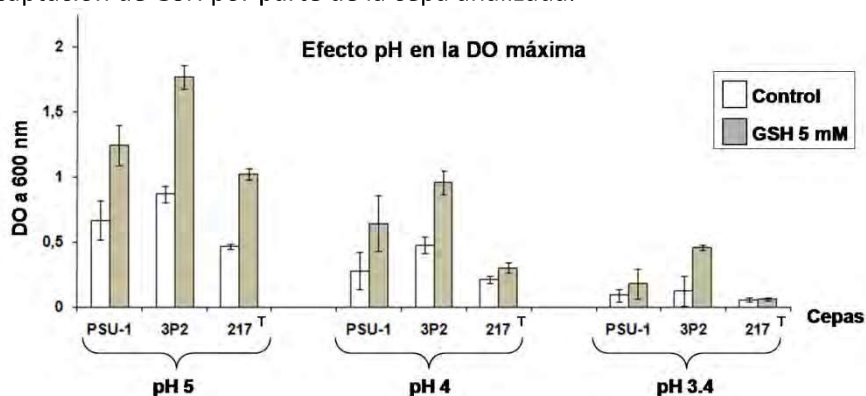


Fig.3 Efecto del pH en el crecimiento de 3 cepas de *O. oeni*. Las barras blancas corresponden a los crecimientos de las 3 cepas sin GSH y las barras grises representan los crecimientos con 5mM de GSH en los diferentes medios a diversos pHs. Los valores mostrados son las medias de los triplicados realizados.

## 4. Conclusiones

La captación de GSH por parte de las cepas de *O. oeni* analizadas fue muy diversa. Se pudieron identificar algunas cepas con una captación hasta 4 veces superior a las cepas con menor capacidad de incorporar GSH. En base a los resultados obtenidos, se han seleccionado tres cepas como modelo de estudio de la diferente capacidad de captación de GSH: 3P2 mayor, PSU-1 media y CECT 217<sup>T</sup> menor. Además, estas cepas presentan una actividad maloláctica diferente. En las mismas condiciones, la cepa 3P2 realiza la fermentación maloláctica (FML) más rápido, mientras que las cepas PSU-1 y especialmente 217<sup>T</sup> son más lentas. A pesar de ello, la relación entre una FML más rápida y una mayor capacidad de captación de GSH no se ha observado en todas las cepas estudiadas. Sin embargo sí se ha apreciado una relación positiva con la velocidad de crecimiento.

Los cultivos en los que se añadió GSH alcanzaron una mayor cantidad de biomasa que los cultivos sin GSH aunque hubiese algún factor de estrés. Por ello la adición de glutatión podría mejorar la preparación de preinóculos de *O. oeni* para vino.

## 5. Bibliografía

1. Masip L.; Veeravalli K. & Georgiou G. 2006. The many faces of glutathione in bacteria (Forum Review). *Antioxid. Redox Signal.* 8, 5, 753-762
2. Smimova G.V. & Oktyabrsky O.N. 2005. Glutathione in Bacteria. *Biochem-Moscow.* 70, 11, 1199-1211
3. Silveira M.G.; Baumgärtner M.; Rombouts F.M. & Abee T. 2004. Effect of adaptation to ethanol on cytoplasmic and membrane protein profiles of *Oenococcus oeni*. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 5, 2748-2755
4. Cecconi D., Milli A., Rinalducci S., Zolla L. & Zapparoli G. 2009. Proteomic analysis of *Oenococcus oeni* freeze-dried culture to assess the importance of cell acclimation to conduct malolactic fermentation in wine. *Electropho.* 30, 2988-2995
5. Rathberger M., Araque I., Olgúin N., Bordons A. & Reguant C. 2009. Estudio de la capacidad de captación de glutatión por *Oenococcus oeni* en diferentes fases de crecimiento y su efecto sobre la respuesta al estrés oxidativo. *XXII Congreso Nacional de Microbiología SEM, Almería.*
6. Collin C., Viernes H., Krejsa C., Botta D. & Kavanagh T. 2003. Fluorescence-based microtiter plate assay for glutamate-cysteine ligase activity. *Analytical Biochemistry.* 318 (2):175-80.

## 6. Agradecimientos

Los autores agradecen la financiación del proyecto AGL2012-34866 del MINECO. Maria del Mar Margalef disfruta de una beca predoctoral de la URV.