

LAS BACTERIAS Y SU REPERCUSIÓN SOBRE LAS AMINAS BIÓGENAS

S. Ferrer¹; J.M. Landete²; L. Polo¹; I. Pardo¹

¹ENOLAB - LABORATORI DE MICROBIOLOGIA ENOLÒGICA, DEPARTAMENT DE MICROBIOLOGIA I ECOLOGIA, EDIFICI D'INVESTIGACIÓ 3.71, UNIVERSITAT DE VALÈNCIA, E46100 BURJASSOT-VALÈNCIA, SPAIN

²DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA, INSTITUTO DE FERMENTACIONES INDUSTRIALES, CSIC, C/ JUAN DE LA CIERVA, 3, 28006 MADRID, SPAIN

Sergi.Ferrer@uv.es; jm.landete@ifi.csic.es; Lucia.Polo@uv.es; Isabel.Pardo@uv.es

INTRODUCCIÓN

Las aminas biógenas (AB) son compuestos orgánicos (bases nitrogenadas) de bajo peso molecular, encontradas frecuentemente en alimentos fermentados como vino, queso, salchichas, etc. Las características químicas y efectos biológicos de las AB son muy diversas, pudiendo tener efectos beneficiosos o perjudiciales en los seres humanos. Así, algunas aminas como la putrescina, parecen ser esenciales para el crecimiento y la proliferación celular en organismos vivos. Sin embargo, otras AB como la histamina y tiramina tienen efectos perjudiciales sobre la salud, o sobre las características organolépticas de los alimentos como la putrescina. Por ello, su concentración en alimentos debería ser muy bajo, o al menos no superar determinados niveles (9). En el caso del vino, aunque se han descrito más de 20 AB distintas (20), las más abundantes y peligrosas son histamina, tiramina, feniletilamina y putrescina, y en menor medida cadaverina y triptamina (9).

La síntesis de AB supone la coincidencia de tres factores diferentes: existencia de precursores (aminoácidos), presencia de microorganismos con actividades descarboxilásicas correspondientes, y concurrencia de las condiciones ambientales adecuadas (7). La existencia de aminoácidos se encuentra cualitativa y cuantitativamente ligada a las materias primas y a la tecnología de vinificación: variedad de uva, momento de la vendimia, adición de nutrientes aminoacídicos, maceración, adición de enzimas, lisis microbiana, etc. (7). La existencia de condiciones favorables para el metabolismo microbiano, como por ejemplo valores de pH elevados, bajo contenido en SO₂, etc. favorecerán lógicamente la síntesis de AB (15).

En el presente trabajo, vamos a centrar la atención en el segundo de los tres factores que acabamos de mencionar, la presencia de microorganismos con actividades descarboxilásicas, concretamente las bacterias, y más especialmente las bacterias lácticas (BL).

BACTERIAS ACÉTICAS

Las bacterias acéticas (BA) parecen ser poco productoras de AB, y no son normalmente descritas como causantes de su síntesis en vinos. En un amplio estudio realizado por nuestra parte con numerosas especies de *Acetobacter* (*A. aceti*, *A. malorum*, *A. pasteurianus*, *A. pomorum*, *A. tropicalis* y *Acetobacter* sp.), *Gluconacetobacter* (*G. diazotrophicus*, *G. europaeus*, *G. hansenii*, *G. liquefaciens*, *G. oboediens*, *G. sacchari* y *G. xylinus*), y *Gluconobacter* (*G. asaii*, *G. cerinus*, *G. frateurii* y *G. oxydans*), no pudimos encontrar que

ninguna de ellas produjera histamina, tiramina, feniletilamina, putrescina, cadaverina o triptamina, ni en medio sintético ni en vino (9).

En el caso de las BA en vinificación, suele buscarse siempre evitar su crecimiento o eliminarlas de la forma más inmediata y eficaz posible. De ahí que quizás no abunden los estudios detallados de síntesis de AB por parte de las BA. En cualquier caso, nuestros resultados coinciden con datos de otros autores, lo que indicaría que las BA no representan un peligro para el vino en cuanto a la síntesis de AB.

BACTERIAS LÁCTICAS: ESPECIES PRODUCTORAS

Las BL son las principales responsables de la síntesis de AB en vino (9). En la Tabla 1 puede observarse la correlación entre la especie de BL y el tipo de AB sintetizada en vino.

Tabla 1. Especies de BL que son capaces de sintetizar AB en vino.

Especie	Amina Biógena			
	Histamina	Tiramina	Feniletilamina	Putrescina
<i>L. brevis</i>	-	+ (100%)	+ (100%)	?
<i>L. buchneri</i>	+ (30%)	-	-	+ (<1%)
<i>L. casei</i>	-	-	-	-
<i>L. collinoides</i>	-	-	-	-
<i>L. hilgardii</i>	+ (27%)	+ (25%)	+ (25%)	+ (<1%)
<i>L. mali</i>	+ (67%)	-	-	-
<i>L. paracasei</i>	-	-	-	-
<i>L. plantarum</i>	-	+ (<1%)	-	-
<i>L. mesenteroides</i>	+ (6%)	-	-	-
<i>O. oeni</i>	+ (78%)	-	-	+ (20%)
<i>P. parvulus</i>	+ (16%)	-	-	-
<i>P. pentosaceus</i>	-	-	-	-

En el caso de la histamina, la producción de este compuesto es un carácter dependiente de cepa, variando desde un 6% aproximadamente de las cepas positivas para la especie *L. mesenteroides*, a un 80% de positivas en la especie *O. oeni* (4-6, 8, 11, 13, 16, 21, 22, 26, 30, 31). Hay que señalar que estos porcentajes varían en función del método empleado, ya que los sistemas menos sensibles como la detección en placa solamente revelarán las cepas que produzcan concentraciones más elevadas de AB, mientras que métodos enzimáticos o que emplean HPLC serán capaces de mostrar cepas que produzcan concentraciones más bajas de AB (12, 13).

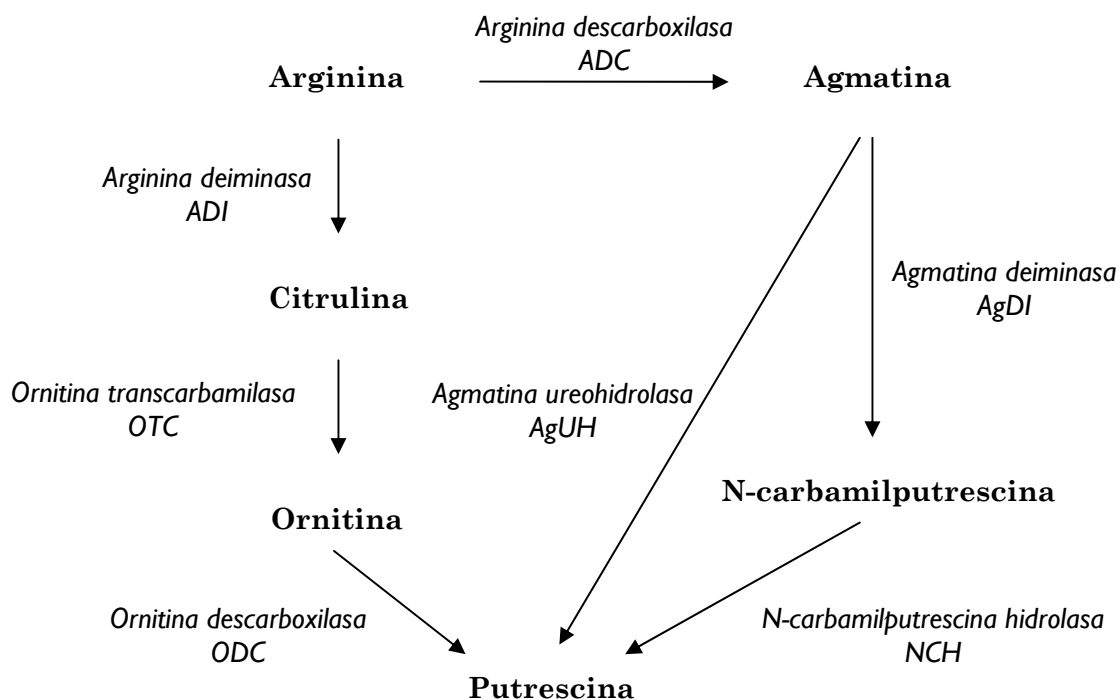
En cuanto a la tiramina, en algunas especies como *L. brevis*, todas las cepas analizadas aisladas de vino son productoras, mientras que por ejemplo sólo una parte de las cepas pertenecientes a *L. hilgardii* sintetizan esa AB (1, 18). Es de destacar que todas las cepas productoras de tiramina son capaces de sintetizar feniletilamina, quizás debido a una actividad secundaria del mismo enzima descarboxilásico (18).

Las especies de BL aisladas de vinos que son capaces de sintetizar putrescina son *L. buchneri* (31), *L. hilgardii*, *O. oeni* (8) y quizás *L. brevis* (25) (Tabla 1). Este carácter parece ser más escaso en BL que la capacidad para sintetizar otras AB; de todas formas, el número de cepas capaces de sintetizar putrescina parece que es cada vez más frecuente: hace algunos años no se aislaban BL del vino productoras de putrescina, y cada vez parece que la frecuencia de su aislamiento es mayor, lo cual podría significar a su vez que únicamente se han mejorado los métodos de detección y cuantificación de esas AB.

RUTAS BIOSINTÉTICAS DE AMINAS BIÓGENAS

Las AB son producidas a partir de los aminoácidos precursores gracias a la acción de las descarboxilasas correspondientes. Así, la histidina descarboxilasa (HDC) sintetiza histamina a partir de histidina, la tiramina descarboxilasa (TDC) sintetiza tiramina desde tirosina y feniletilamina a partir de fenilalanina. El caso de la putrescina es más complejo (Figura 1).

Figura 1. Posibles rutas de síntesis de la putrescina a partir de la arginina en BL.

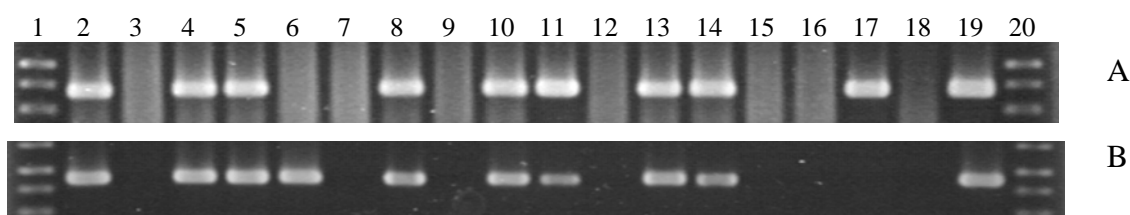


En algunas BL, como *O. oeni*, la arginina se convierte sucesivamente en citrulina, ornitina y putrescina gracias a la arginina deiminasa (ADI), ornitina transcarbamilasa (OTC) y ornitina descarboxilasa (ODC) (8, 27-29). En otras BL, como *L. hilgardii*, la arginina se descarboxila a agmatina por la arginina descarboxilasa (ADC), y ésta se transforma sucesivamente en N-carbamilputrescina y putrescina debido a la acción sucesiva de la agmatina deiminasa (AgDI) y la N-carbamilputrescina hidrolasa (NCH) (2, 3).

DETECCIÓN DE GENES DE CEPAS PRODUCTORA DE AMINAS BIÓGENAS

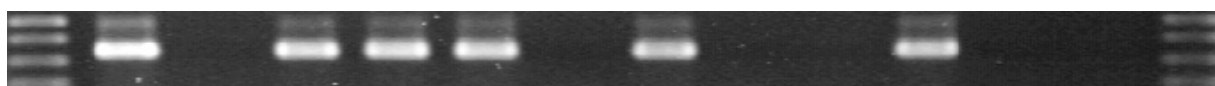
Hoy en día existen cebadores específicos para detectar los genes correspondientes a los enzimas descarboxilasicos arriba mencionados. En el caso del gen *hdc*, observamos un ejemplo en la Figura 2 (13). Puede observarse que hay cepas de *O. oeni* que darían falsos negativos con la pareja de cebadores JV16HC/JV17HC (19), mientras que la cepa de *L. hilgardii* 5w proporciona una ausencia de reacción para los cebadores CL1mod/JV17HC (13). Esta última pareja ha sido optimizada para la detección del gen *hdc* en cepas de *O. oeni* (13). Debido a que la eficacia en la detección de los genes varía en función de las especies de BL a las que se aplican, aconsejamos emplear los cebadores CL1mod/JV17HC para *O. oeni*, y JV16HC/JV17HC para el resto de BL. Cuando no sepamos la identidad de las BL, sería deseable realizar la doble reacción para evitar resultados incorrectos.

Figura 2. Detección del gen *hdc* con los cebadores JV16HC/JV17HC (A) y CL1mod/JV17HC (B). Carreras 1 y 20 patrón de bandas. Carrera 2 control positivo *Lactobacillus buchneri* ST2A, (carrera 3) control negativo *Pediococcus pentosaceus* 136, (carrera 4) *Oenococcus oeni* 4042, (carrera 5) *O. oeni* 4023, (carrera 6) *O. oeni* 4021, (carrera 7) *O. oeni* 4047, (carrera 8) *O. oeni* 4010, (carrera 9) *O. oeni* 3996, (carrera 10) *O. oeni* 4045, (carrera 11) *P. parvulus* 339, (carrera 12) *P. pentosaceus* 56, (carrera 13) *P. parvulus* 276, (carrera 14) *L. hilgardii* 464, (carrera 15) *L. plantarum* 98, (carrera 16) *L. paracasei* 364, (carrera 17) *L. hilgardii* 5w, (carrera 18) *Leuconostoc mesenteroides* 27, (carrera 19) *L. mesenteroides* 86.



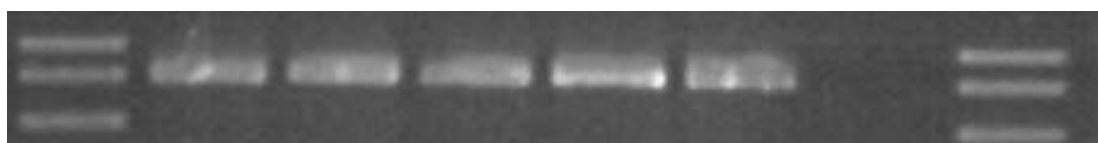
Para el gen *tdc*, responsable de la síntesis de la tiramina descarboxilasa, postulamos el empleo de la pareja de cebadores p0303 (23) y P1-rev (18, 24) (Figura 3).

Figura 3. Detección del gen *tdc* en distintas BL aisladas de vinos



En cuanto a la síntesis de putrescina, como hemos visto existen un par de caminos posibles para su síntesis: a través de la ornitina como en el caso de *O. oeni*, o a través de la agmatina como en *L. hilgardii*. En el primero de los casos, se suele utilizar los cebadores 3 y 16 para el gen *odc* (6, 28, 30). Para detectar los genes de la ruta de la agmatina, proponemos el empleo de los cebadores AfuAF y AguAR para el gen *aguA* (AgDI), y aguBF y AguBR para *aguB* (NCH) (10), tal como se observa en la Figura 4.

Figura 4. Detección del gen *aguA* en distintas BL

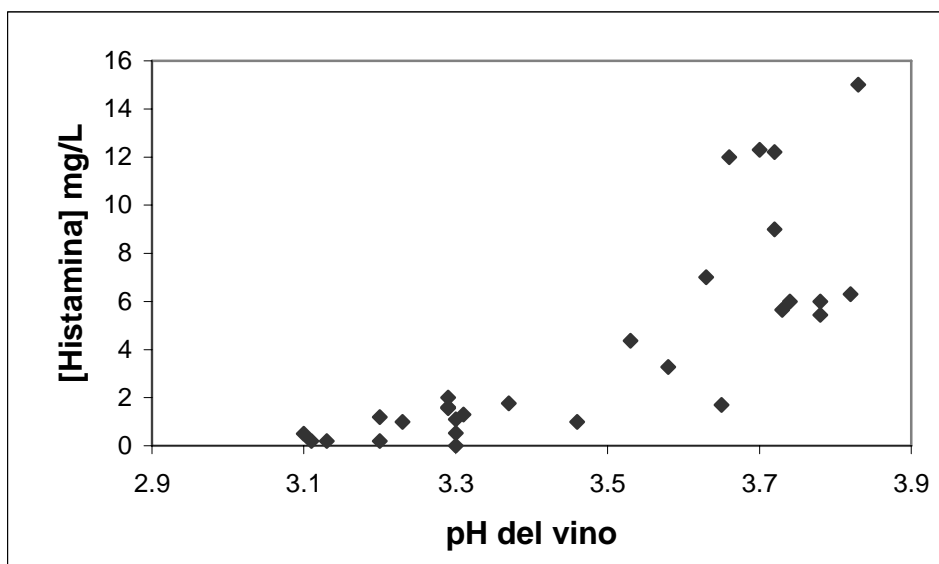


REGULACIÓN DE GENES Y ENZIMAS RESPONSABLES DE LA SÍNTESIS DE AMINAS BIÓGENAS

Desde el punto de vista aplicado, es de gran interés conocer no solamente qué BL poseen determinados genes, sino cuándo, cuánto, cómo y porqué se expresan esos genes, lo cual determinará la cantidad final de las respectivas AB en vinos. Así, sabemos que la mayoría de cepas de *O. oeni* pueden producir histamina en vinos, pero que la cantidad final no será normalmente elevada, y que cuando detectamos producción de histamina en vinos en cantidades importantes, éstas se deben al crecimiento y metabolismo de otras BL, especialmente *L. hilgardii* y *P. parvulus* (13, 14).

Un factor determinante es el pH del vino (14). Tal como se observa en la Figura 5, a valores de pH inferiores a 3.5 no existen generalmente unos niveles elevados de histamina, cosa que no ocurre con vinos de pH alto como por ejemplo 3.8 o 3.9. Ello se debe a que las actividades metabólicas de las BL responsables de la síntesis de AB se encuentran limitadas en vinos más ácidos, los cuales se encuentran pues más protegidos. La regulación se ejerce a nivel de la actividad enzimática, no en la expresión de los genes (15, 17).

Figura 5. Valores de pH y concentración de histamina encontrados en distintos vinos tras finalización de la fermentación maloláctica.



La actividad de los enzimas implicados en la síntesis de AB es máxima a temperaturas cercanas a los 30°C, mientras que a los 4°C esta actividad disminuye a un 20% del máximo (no existe influencia sobre la expresión de los genes, sino sobre la actividad de los enzimas) (15, 17).

El etanol no tiene ningún efecto relevante sobre la expresión de los genes codificantes de las descarboxilasas, pero sí directamente sobre los enzimas, de forma que una concentración de unos 10° alcohólicos dobla la actividad enzimática respecto al control, tal como se puede observar en la Figura 6 (15, 17).

La glucosa, fructosa, ácido málico y ácido cítrico disminuyen la expresión de los genes codificantes, pero no la actividad del enzima descarboxilásico correspondiente (Figura 7). Por

su parte, los ácidos láctico y tartárico no poseen efecto ni sobre la síntesis ni sobre la actividad de los enzimas implicados en la síntesis de AB (15, 17).

Figura 6. Efecto de la concentración de etanol en la actividad enzimática de la HDC.

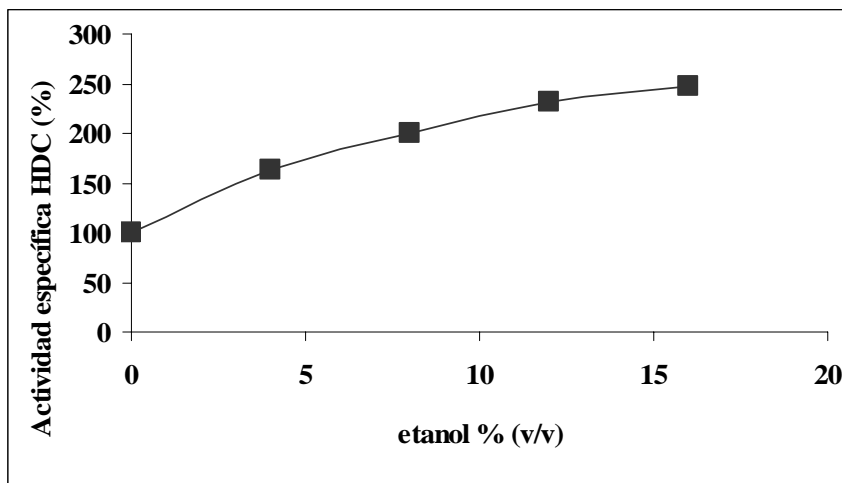
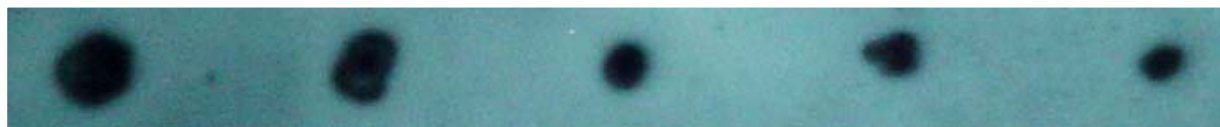


Figura 7. Efecto de la concentración del ácido málico (de izquierda a derecha 0, 0.5, 1, 2 y 4 g/L) en la expresión del gen *hdc*.



En cuanto al SO_2 , éste no afecta tampoco la síntesis ni la actividad de los enzimas, pero sí que posee lógicamente una influencia indirecta al disminuir la población microbiana (15, 17).

Otros factores, como la histidina, histamina, la fase de crecimiento celular, o la presencia de piridoxal fosfato (un cofactor necesario para las descarboxilasas), han sido estudiados y caracterizado su efecto sobre la síntesis de AB (16).

IMPLICACIONES TECNOLÓGICAS DE LA REGULACIÓN DE GENES Y ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS

A modo de resumen de lo que acabamos de ver arriba, podemos establecer que la glucosa, fructosa, málico, cítrico y la presencia de la propia AB disminuyen la expresión de los genes responsables. Los aminoácidos precursores aumentan la expresión de los genes. El etanol incrementa la actividad de los enzimas. La temperatura y el pH influyen en los enzimas pero no en los genes. El estado de crecimiento influye en la expresión génica. El tartárico, láctico y SO_2 no influyen en síntesis ni actividad enzimática.

Traducido a posibles repercusiones tecnológicas, todo ello significa que las AB no van a sintetizarse tanto en mosto (donde hay más glucosa, fructosa, málico, etc.) como en vino (más etanol y menos recursos energéticos). Ello es lógico si pensamos en un sistema donde escasean los recursos como es el vino, y las BL pueden así regular la utilización de metabolitos (energía): en primer lugar, se emplearán preferentemente los azúcares, especialmente glucosa y fructosa. Seguidamente los ácidos orgánicos como cítrico y málico

(tartárico y láctico no se suelen emplear y por ello no tienen efecto sobre la síntesis de enzimas descarboxilásicos de aminoácidos). Y finalmente se emplearían los aminoácidos para obtener energía y mantener el pH intracelular relativamente elevado. Es una estrategia de mantenerse a largo plazo, e ir dosificando esos recursos de forma racional al secuenciar su utilización.

En otras palabras, las AB no se sintetizan mayoritariamente en mosto sino en vino debido a la regulación de los factores que hemos caracterizado, y ello es de hecho lo que se observa a nivel de producción: los incrementos normalmente importantes en AB en los vinos se hallan más en las fases de crianza que en los momentos iniciales.

Respecto al SO₂, hay que considerar otra cuestión tecnológicamente importante. Como hemos dicho este compuesto posee una actividad antiséptica evidente, pero no afecta a la síntesis ni a la actividad de los enzimas descarboxilásicos: hemos observado que las descarboxilasas pueden continuar activas en el vino incluso cuando la bacteria está muerta. Ello significa que aunque matemos a las BL, los enzimas pueden seguir sintetizando AB: hemos estudiado vinos de crianza en los que las bacterias habían muerto, pero en los que seguía aumentando el contenido de AB transcurrido bastante tiempo debido a esta actividad enzimática residual (7).

ACTUACIONES TECNOLÓGICAS DERIVABLES

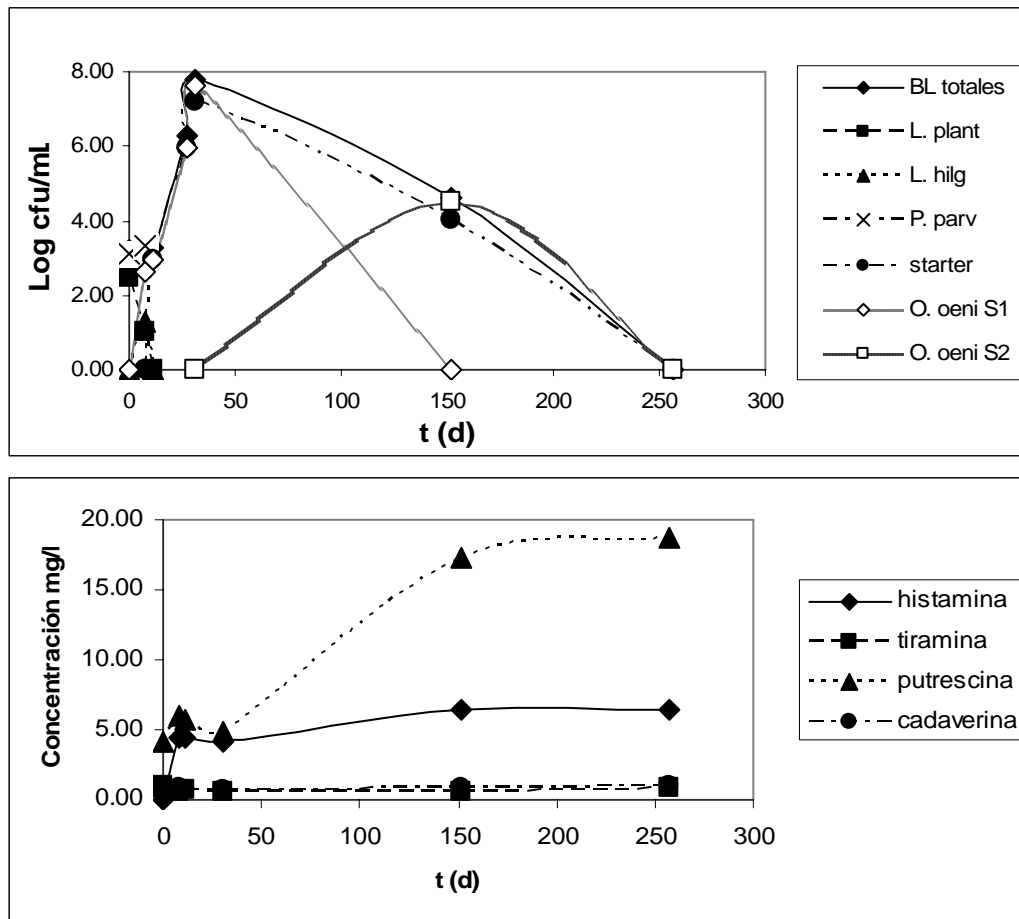
De lo que acabamos de ver, se desprende que podemos procurar evitar la aparición de AB en vinos mediante distintas estrategias. Evidentemente el empleo de SO₂ (u otros inhibidores que pudieran emplearse como bacteriocinas o lizozima entre otros) puede ser de gran ayuda empleado a tiempo y en las debidas condiciones, aunque no destruya los enzimas. El empleo de cultivos iniciadores seleccionados y seguros es otra posible estrategia que ha demostrado ser útil. Sin embargo, no siempre ocurre así por desgracia. En la parte superior de la Figura 8 se muestra una cinética de crecimiento de BL a lo largo de una vinificación en bodega. Este vino fue sulfitado e inoculado con un cultivo iniciador comercial. Se observa en el panel superior que las poblaciones de lactobacilos (*L. plantarum* y *L. hilgardii*) son detectadas al principio, pero no tras el sulfitado y la inoculación. El cultivo iniciador consigue crecer e implantarse en el vino, llevando a cabo la fermentación maloláctica (datos no mostrados). Junto con esta cepa, coexiste otra (*O. oeni* S1) durante un tiempo, pero que es desplazada al cabo de un tiempo: se detecta a los 30 días de inicio de la fermentación, pero ya no a los 150 días. En cambio, otra cepa (*O. oeni* S2) que no es detectada al principio y es superada primeramente por el cultivo iniciador, es capaz de crecer en momentos posteriores, estando a la par con la cepa inoculada desde los 150 días del inicio de la fermentación hasta el final.

Cuando observamos lo ocurrido con la evolución de las AB (panel inferior de la Figura 8), no se perciben aumentos significativos de la tiramina ni de cadaverina. La histamina sufre un aumento inicial coincidente con la fermentación alcohólica y la existencia de los lactobacilos, y posteriormente no presenta un aumento muy significativo. En cambio, la putrescina aumenta espectacularmente hacia los 150 días, coincidiendo con el crecimiento mayor de la cepa *O. oeni* S2. Analizadas estas cepas en laboratorio, *O. oeni* S2 demostró poseer los genes y la capacidad de sintetizar putrescina en vino, mientras que *O. oeni* S1 y la cepa del cultivo iniciador eran negativos para este carácter. Por ello, la cepa *O. oeni* S2 fue la responsable de la síntesis de putrescina en esas fases avanzadas del proceso de vinificación, y fue capaz de crecer durante la crianza en un vino que había desarrollado la fermentación maloláctica de forma exitosa por un cultivo comercial.

De lo anterior se deduce la necesidad de estabilizar el vino una vez acabada la fermentación maloláctica, ayudándonos de la adición de SO₂ (si es posible, o de algún otro antiséptico), reducir la población microbiana por centrifugación o filtración, etc. La inoculación con

cultivos iniciadores es una ayuda importante, pero no debemos descuidar otras actuaciones que nos permitan controlar las poblaciones de BL y evitar así la aparición de las AB justo en los momentos en los que el vino esté más desprotegido y las condiciones metabólicas del mismo las idóneas para la actuación de las descarboxilasas de aminoácidos. El control de los microorganismos en el vino es ahora una cuestión más importante que nunca.

Figura 8. Evolución de las poblaciones de BL (panel superior) y AB (panel inferior) a lo largo de una vinificación en bodega de un vino de la variedad Tempranillo



BIBLIOGRAFÍA

1. Arena, M., D. Fiocco, M. Manca de Nadra, I. Pardo, and G. Spano. 2007. Characterization of a *Lactobacillus plantarum* Strain Able to Produce Tyramine and Partial Cloning of a Putative Tyrosine Decarboxylase Gene. *Current Microbiology* 55: 205-210.
2. Arena, M. E., J. M. Landete, M. C. Manca de Nadra, I. Pardo, and S. Ferrer. 2007. Factors affecting the production of putrescine by *Lactobacillus hilgardii* X1B isolated from wine. *Journal of Applied Microbiology* Accepted.
3. Arena, M. E., and M. C. Manca de Nadra. 2001. Biogenic amine production by *Lactobacillus*. *Journal of Applied Microbiology* 90: 158-162.
4. Coton, E., and M. Coton. 2005. Multiplex PCR for colony direct detection of Gram-positive histamine- and tyramine-producing bacteria. *J. Microbiol. Meth.* 63: 296-304.

5. Coton, E., G. C. Rollan, and A. Lonvaud-Funel. 1998. Histidine carboxylase of *Leuconostoc oenos* 9204: purification, kinetic properties, cloning and nucleotide sequence of the *hdc* gene. *J Appl Microbiol* 84: 143-151.
6. de las Rivas, B., Á. Marcobal, and R. Muñoz. 2005. Improved multiplex-PCR method for the simultaneous detection of food bacteria producing biogenic amines. *FEMS Microbiology Letters* 244: 367-372.
7. Ferrer, S., and I. Pardo. 2005. Prevención de la aparición de aminas biógenas en vinos. *ACE Revista de Enología* 70: 6-8.
8. Guerrini, S., S. Mangani, L. Granchi, and M. Vincenzini. 2002. Biogenic amine production by *Oenococcus oeni*. *Current Microbiology* 44: 374-378.
9. Landete, J. M. 2005. Estudio y caracterización molecular de la producción de aminas biógenas por parte de bacterias lácticas de origen enológico. *Tesis Doctoral. Universitat de València*.
10. Landete, J. M., M. E. Arena, I. Pardo, M. d. N. M.C., and S. Ferrer. 2007. Implicated bacterial genes in putrescine production from agmatine: detection and correlation with the activity. *FEMS Microbiology Letters* Submitted.
11. Landete, J. M., S. Ferrer, and I. Pardo. 2007. Biogenic amine production by lactic acid bacteria, acetic bacteria and yeast isolated from wine. *Food Control* 18: 1569-1574.
12. Landete, J. M., S. Ferrer, and I. Pardo. 2004. Improved enzymatic method for the rapid determination of histamine in wine. *Food Additives and Contaminants* 21: 1149-1154.
13. Landete, J. M., S. Ferrer, and I. Pardo. 2005. Which lactic acid bacteria are responsible of histamine production in wine? *Journal of Applied Microbiology* 99: 580-586.
14. Landete, J. M., S. Ferrer, L. Polo, and I. Pardo. 2005. Biogenic amines in wines from three Spanish regions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 1119-1124.
15. Landete, J. M., S. Ferrer, L. Polo, and I. Pardo. 2004. Influencia de factores físico-químicos del vino sobre la producción de histamina. *Tecnología del vino* 19: 67-70.
16. Landete, J. M., I. Pardo, and S. Ferrer. 2006. Histamine, histidine, and growth-phase mediated regulation of the histidine decarboxylase gene in lactic acid bacteria isolated from wine. *FEMS Microbiology Letters* 260: 84-90.
17. Landete, J. M., I. Pardo, and S. Ferrer. 2007. Regulation of *hdc* expression and HDC activity by enological factors in lactic acid bacteria. *Journal of Applied Microbiology* Accepted.
18. Landete, J. M., I. Pardo, and S. Ferrer. 2007. Tyramine and phenylethylamine production among lactic acid bacteria isolated from wine. *International Journal of Food Microbiology* 115: 364-368.
19. Le Jeune, C., A. Lonvaud-Funel, B. ten Brink, H. Hofstra, and J. M. B. M. van der Vossen. 1995. Development of a detection system for histidine decarboxylating lactic acid bacteria based on DNA probes, PCR and activity test. *Journal of Applied Bacteriology* 78: 316-326.
20. Lehtonen, P. 1996. Determination of amines and amino acids in wine: a review. *American Journal of Enology and Viticulture* 47: 127-133.
21. Lonvaud-Funel, A. 2001. Biogenic amines in wines: role of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Letters* 199: 9-13.
22. Lonvaud-Funel, A., and A. Joyeux. 1994. Histamine production by wine lactic acid bacteria: isolation of a histamine-producing strain of *Leuconostoc oenos*. *Journal of Applied Bacteriology* 77: 401-407.

23. Lucas, P., J. Landete, M. Coton, E. Coton, and A. Lonvaud-Funel. 2003. The tyrosine decarboxylase operon of *Lactobacillus brevis* IOEB 9809: characterization and conservation in tyramine-producing bacteria. *FEMS Microbiology Letters* 229: 65-71.
24. Lucas, P., and A. Lonvaud-Funel. 2002. Purification and partial gene sequence of the tyrosine decarboxylase of *Lactobacillus brevis* IOEB 9809. *FEMS Microbiology Letters* 211: 85-89.
25. Lucas, P. M., V. S. Blancato, O. Claisse, C. Magni, J. S. Lolkema, and A. Lonvaud-Funel. 2007. Agmatine deiminase pathway genes in *Lactobacillus brevis* are linked to the tyrosine decarboxylation operon in a putative acid resistance locus. *Microbiology* 153: 2221-2230.
26. Lucas, P. M., W. A. M. Wolken, O. Claisse, J. S. Lolkema, and A. Lonvaud-Funel. 2005. Histamine-Producing Pathway Encoded on an Unstable Plasmid in *Lactobacillus hilgardii* 0006. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 1417-1424.
27. Mangani, S., S. Guerrini, L. Granchi, and M. Vincenzini. 2005. Putrescine accumulation in wine: role of *Oenococcus oeni*. *Current Microbiology* 51: 6-10.
28. Marcobal, A., B. de las Rivas, M. V. Moreno-Arribas, and R. Muñoz. 2004. Identification of the ornithine decarboxylase gene in the putrescine-producer *Oenococcus oeni* BIFI-83. *FEMS Microbiology Letters* 239: 213-220.
29. Marcobal, A., B. las Rivas, M. V. Moreno-Arribas, and R. Munoz. 2004. Identification of the ornithine decarboxylase gene in the putrescine-producer *Oenococcus oeni* BIFI-83. *FEMS Microbiology Letters* 239: 213-220.
30. Marcobal, Á., B. d. l. Rivas, M. V. Moreno-Arribas, and R. Muñoz. 2005. Multiplex PCR Method for the Simultaneous Detection of Histamine-, Tyramine-, and Putrescine-Producing Lactic Acid Bacteria in Foods. *Journal of Food Protection* 68: 874-878.
31. 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. *International Journal of Food Microbiology* 84: 117-123.