

# **Aminas biógenas en vinos de la D.O.Ca. Rioja de la cosecha 2006**

Isabel López, Rosa López, Pilar Santamaría, Patrocinio Garijo, Carmen Tenorio

Servicio de Investigación y Desarrollo Tecnológico de La Rioja (CIDA). Ctra. De Mendavia-Logroño (NA 134, Km. 88) 26071 Logroño (La Rioja). Tfno.: 941291383

e-mail: [microbiologia.cida@larioja.org](mailto:microbiologia.cida@larioja.org)

## **INTRODUCCIÓN**

Las aminas biógenas son producidas por las bacterias lácticas (BL) durante el proceso de fermentación de alimentos y bebidas por descarboxilación de los aminoácidos precursores. Las más importantes en el vino son histamina, tiramina, putrescina, cadaverina y feniletilamina (Lonvaud-Funel, 2001).

El estudio de las aminas biógenas en los vinos tiene interés desde el punto de vista toxicológico. Hay numerosas referencias acerca de los efectos negativos que la histamina causa sobre personas sensibles, como dolor de cabeza, dificultades respiratorias, nauseas..., que se incrementan por la acción del alcohol. Por ello hay países que están reglamentando la concentración de estos compuestos en el vino o que recomiendan límites máximos que están dificultando cada vez más la comercialización en estos países.

Los objetivos de este trabajo han sido: realizar el seguimiento de la fermentación maloláctica (FML) espontánea de ocho vinos tintos de la cosecha de 2006 elaborados en distintas zonas de la D.O.Ca. Rioja (Rioja Alta, Rioja Baja y Rioja Alavesa); caracterizar por técnicas de la Biología Molecular la microbiota asociada a dicho proceso fermentativo y estudiar la composición en aminas biógenas de dichos vinos.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

Se llevó a cabo un muestreo de vinos tintos de la variedad Tempranillo en ocho bodegas de la D.O.Ca. Rioja. El método de elaboración fue distinto según la bodega: maceración carbónica (bodega 1), estrujado y despalillado con fermentación en depósito de acero inoxidable (bodegas 2, 4 a 8) y con fermentación en madera de roble (bodega 3). Los vinos de partida presentaron concentraciones de alcohol entre 13 y 14.7 % v/v; pHs entre 3.42 y 3.82; acidez volátil entre 0.15 y 0.56 g/l; ácido málico entre 1.66 y 2.67 g/l y sulfuroso total entre 22 y 57 mg/l.

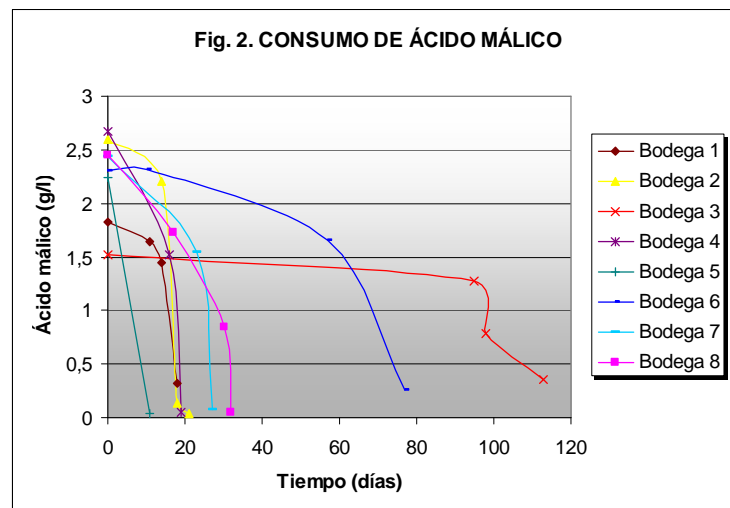
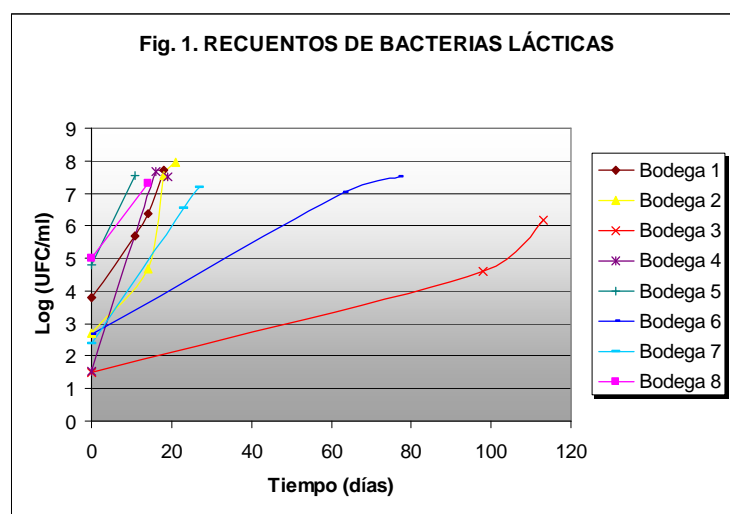
Se seleccionó un depósito por bodega y se tomaron muestras en tres momentos a lo largo de la FML espontánea: tras el fin de la fermentación alcohólica (FA), en FML tumultuosa (60% de degradación del ácido málico) y al final de la FML. El seguimiento de la FML se realizó mediante la medida del ácido málico y del ácido láctico por test enzimático. Las muestras se sembraron en medio de cultivo específico (MRS agar modificado) y se incubaron a 30°C en condiciones de anaerobiosis para el recuento y aislamiento de BL.

La identificación a nivel de especie se determinó mediante técnicas de microbiología clásica (Holt et al., 1994) y la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) específica de especie (Zapparoli et al., 1998; Quere et al., 1997). La caracterización a nivel de clon se realizó

mediante electroforesis de campos pulsantes (PFGE) utilizando el enzima de restricción *Sfi*I y el sistema CHEF-DR III de BioRad. La composición en aminas biógenas de los vinos se determinó por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (Ensayo de Intercomparación 2004) y la presencia de los genes implicados en la descarboxilación de la histidina mediante PCR (Coton et al., 1998 modificada).

## RESULTADOS

Las FMLs se completaron en un periodo de 11 a 113 días, alcanzándose un recuento medio de BL viables de  $1.73 \times 10^7$  UFC/ml en FML tumultuosa (Figuras 1 y 2). Los parámetros analíticos de los vinos obtenidos tras la FML mantuvieron valores dentro de la normalidad sin disminuciones de color ni aumentos de la acidez volátil importantes.



Se estudiaron 287 aislados, de los cuales el 97.21 % ( $n = 279$ ) fueron identificados como *Oenococcus oeni* y el resto pertenecieron al género *Lactobacillus* ( $n = 8$ ; dos aislados en la bodega 1, cuatro en la bodega 3, y dos en la bodega 6). Se establecieron 81 patrones de restricción distintos mediante PFGE de entre los 279 aislados de *O. oeni* (Tabla 1).

**Tabla 1.** Patrones de PFGE en cada bodega y en cada momento de la elaboración para la especie *O. oeni*.

Bodega	N° de aislados de cada patrón <u>Inicio de FML</u>							N° de aislados de cada patrón <u>FML tumultuosa</u>							N° de aislados de cada patrón <u>Fin de FML</u>							N° de patrones distintos	N° de aislados totales		
1	10			2				9			6				11		1	2	1	5	42				
2	3	1	1	10	1	3	4	1	2	1	1	1	1	1	2	1	1	1	4	1	1	1	1	20	43
3	*							2	3	1	1	3	3	2	2			12			1	9	30		
4	6							12				1			6		2	4	1	1	6	33			
5	4	2	1	3	3	2	--							1	1	1	1	4	2	3	1	1	12	30	
6	2	4	3	1	1	1	1	13			1	1	7		1	1	1	5	13	43					
7	10		1	4			2	1	3	6	2	1	8	3	1	1	13	43							
8	--							2	4		9			--							3	15			
<b>Total</b>	Patrones de PFGE: distintos en color blanco; indistinguibles en el mismo color.																				81	279			

\* no *O. oeni*; -- no muestreado.

Dependiendo de las bodegas, se encontraron de 3 a 20 patrones de PFGE distintos y en todos los casos, salvo en la bodega 7, hubo al menos un patrón que se mantuvo en todos los momentos estudiados a lo largo de la FML (Tabla 1). Se obtuvo un índice de diversidad de 0.98 (Bert et al., 1997) para el total de los aislados de *O. oeni* (n = 279) observando un aumento de la diversidad clonal a medida que la FML se fue desarrollando (Tabla 2). También se observó una mayor diversidad clonal en las bodegas de mayor volumen de elaboración, siendo las más pequeñas, las que presentaron IDs inferiores (Tabla 2).

**Tabla 2.** Índice de diversidad (ID) en cada bodega y en cada momento de la elaboración para la especie *O. oeni*.

Bodega	ID x 100 <u>Inicio de FML</u>	ID x 100 <u>FML tumultuosa</u>	ID x 100 <u>Fin de FML</u>	ID x 100
1	30	51	47	46
2	54	90	99	92
3	*	90	36	81
4	0	15	76	46
5	87	--	90	92
6	87	26	70	85
7	51	78	66	89
8	--	59	--	59
Total	94	95	96	98

\* no *O. oeni*; -- no muestreado.

Los niveles de aminos biógenas, en general, fueron bajos independientemente del método de elaboración, de la duración de la FML, de la presencia de otros géneros de BL y de la diversidad

clonal encontrada; solo en dos casos (bodegas 7 y 8) se detectaron valores superiores a 4 mg/l de histamina y a 37 mg/l de aminas biógenas totales (Tabla 3). En estos vinos, la FML comenzó sin problemas pero experimentó una ralentización sin motivo aparente antes de metabolizar el 60% del ácido málico inicial (datos no mostrados). En el resto de los vinos, la FML comenzó sin haber finalizado la fermentación alcohólica (FA) (vino de maceración carbónica), unos días o semanas después del fin de la FA (vinos de estrujado y despalillado con FML en depósito) o tras varios meses después del fin de la FA (vino con FML en bodega), la cual se desarrolló de forma progresiva sin producción de altos niveles de histamina.

**Tabla 3.** Contenido en Aminas Biógenas (AB) de los vinos después de la FML.

AB (mg/l)	Bodega 1	Bodega 2	Bodega 3	Bodega 4	Bodega 5	Bodega 6	Bodega 7	Bodega 8
<b>Histamina</b>	-	2,09	2,00	0,75	0,88	1,56	4,22	8,04
<b>Metilamina</b>	0,39	0,21	-	0,42	-	0,17	0,22	0,39
<b>Etilamina</b>	2,95	3,12	1,52	5,50	1,73	2,28	7,95	3,03
<b>Tiramina</b>	0,36	2,20	-	5,05	4,15	-	7,95	7,84
<b>Feniletilamina</b>	0,94	1,60	0,10	0,98	3,16	1,52	4,79	0,47
<b>Putrescina</b>	5,37	5,53	3,51	7,23	4,35	3,79	11,30	16,50
<b>Isoamilamina</b>	0,99	2,17	-	1,33	5,61	0,70	10,00	0,62
<b>Cadaverina</b>	0,32	0,47	0,66	0,61	0,42	0,53	0,55	0,54
<b>AB Totales</b>	11,32	17,39	7,93	21,87	20,30	10,55	46,98	37,43

- concentración < 0.10 mg/l

Los niveles de histamina también fueron independientes de la presencia del gen de la histidina descarboxilasa (*hdc*), que se detectó en el 90 % de los clones estudiados. Las cepas que resultaron *hdc* negativas se aislaron en las bodegas 2, 3, 6 y 7.

## CONCLUSIONES

El desarrollo de la FML espontánea varió en función de la bodega, tanto en duración como en población de BL en fase tumultuosa.

*O. oeni* fue la especie mayoritaria (97.21 %) durante la FML espontánea de ocho vinos tintos de la cosecha de 2006, encontrando una gran diversidad de patrones de PFGE entre los aislados de *O. oeni* estudiados (ID = 0.98). Además, esta diversidad aumentó a lo largo de dicha fermentación. En la mayoría de las bodegas estudiadas, al menos un clon permaneció en el vino durante todo el proceso fermentativo.

Los niveles de histamina en los vinos una vez finalizada la FML fueron bajos, excepto en dos bodegas en las que se superaron los 4 mg/l. La concentración total de aminas biógenas fue independiente del método de elaboración, de la duración de la FML, de la presencia de otros géneros de BL y de la diversidad clonal encontrada.

## **BIBLIOGRAFÍA**

Bert, F., Branger, C., Lambert-Zechovsky, N. (1997). Pulsed-field gel electrophoresis is more discriminating than multilocus enzyme electrophoresis and random amplified polymorphic DNA analysis for typing pyogenic streptococci. *Current Microbiology* 34: 226-229.

Coton, E., Rollan, G., Bertrand, A., Lonvaud-Funel, A. (1998). Histamine-producing lactic acid bacteria in wines: early detection, frequency and distribution. *American Journal of Enology and Viticulture* 49: 199-204.

Ensayo de Intercomparación. (2004). Código de ensayo: H-2/04. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Secretaría de Agricultura y Alimentación. Dirección General de Industria Agroalimentaria y Alimentación. Subdirección General de Control Agroalimentario.

Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T., Williams, S.T. (1994). *Bergey's manual of determinative bacteriology*. Hensyl, W.R. (Ed.), Williams and Wilkins, Baltimore.

Lonvaud-Funel, A. (2001). Biogenic amines in wines: role of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Letters* 199: 9-13.

Quere, F., Deschamps, A., Urdaci, M.C. (1997). DNA probe and PCR-specific reaction for *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Applied Microbiology* 82: 783-790.

Zapparoli, G., Torriani, S., Pesente, P., Dellaglio, F. (1998). Design and evaluation of malolactic enzyme gene targeted primers for rapid identification and detection of *Oenococcus oeni* in wine. *Letters in Applied Microbiology* 27: 243-246.

## **AGRADECIMIENTOS**

Este trabajo ha sido financiado por un proyecto regional de la Comunidad Autónoma de La Rioja (PR-0906), una beca postdoctoral de la Consejería de Educación, Cultura y Deporte del Gobierno de la Rioja (ICR/fbm 08/06/2006).