



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
ESCUELA DE POSTGRADO

**EVALUAR EL EFECTO DEL pH, DE LA CONCENTRACIÓN DE ÁCIDO
MÁLICO Y AMINOÁCIDOS SOBRE EL CONTENIDO DE AMINAS BIOGENAS.**

TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERO AGRÓNOMO Y AL GRADO DE
MAGISTER EN ENOLOGÍA Y VITIVINICULTURA.

CÉSAR RODRIGO CATALÁN HERNÁNDEZ

DIRECTORES DE TESIS

ÁLVARO PEÑA NEIRA
CARMEN PRIETO DURÁN

PROFESORES CONSEJEROS

ÍTALO CHIFFELLE GÓMEZ
JAIME ROMERO ORMAZABAL

SANTIAGO DE CHILE

NOVIEMBRE 2013

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
ESCUELA DE POSTGRADO

**EVALUAR EL EFECTO DEL pH, DE LA CONCENTRACIÓN DE ÁCIDO
MÁLICO Y AMINOÁCIDOS SOBRE EL CONTENIDO DE AMINAS BIOGENAS.**

TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERO AGRÓNOMO Y AL GRADO DE
MAGISTER EN ENOLOGÍA Y VITIVINICULTURA.

CÉSAR RODRIGO CATALÁN HERNÁNDEZ

Directores de Tesis	Calificaciones (Memoria de Título)	Calificaciones (Tesis de Grado)
Carmen Prieto Duran Ingeniero Agrónomo, Mg. Sc.	6,5	Aprobada
Álvaro Peña Neira Ingeniero Agrónomo, Enólogo, Dr.	6,5	Aprobada
Profesores Consejeros		
Ítalo Chiffelle Gómez Bioquímico, Dr.	6,6	Aprobada
Jaime Romero Ormazábal Bioquímico, Dr.	6,0	Aprobada

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a todas las personas que hicieron posible la realización de esta tesis, y en forma muy especial:

- A mis padres, José y Norma, por su amor, apoyo incondicional y compañía en todos los momentos de mi vida.
- A mi polola, Francisca Paulina Lopez Muñoz, por su amor, comprensión, apoyo, ánimo y compañía, para la realización de este documento.
- A mi familia; hermanos, sobrinos, primos, tíos, por ser parte importante de mi vida y estar siempre en mi corazón.
- A los profesores guías Carmen Prieto y Álvaro Peña, por toda la paciencia, ayuda y buena disposición todos estos años. A los profesores consejeros, Ítalo Chiffelle y Jaime Romero por la ayuda proporcionada durante la realización de este trabajo.
- A Carla Jara por su importante ayuda en esta investigación.
- A todos las personas que participan del departamento de Agroindustria y Enología, y muy especial a la “Rosy”, quien ha sido parte importante en mi pasar por la Universidad, desarrollo profesional y en la realización de esta investigación, entregando ayuda, comprensión, paciencia y apoyo.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	5
CAPITULO I	6
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	7
1. Las Aminas Biógenas: Definición y efectos fisiológicos	7
1.1. Histamina	9
1.2. Tiramina.....	9
1.3. Putrescina.....	10
1.4. Agmatina.....	10
2. Aminas biógenas en vinos.....	11
2.1. Enzimas que intervienen en la formación de Aminas Biógenas	12
3. El Origen de las aminas biógenas en el vino.....	13
3.1. Síntesis de Aminas Biógenas en el vino	13
3.2. Efectos sensoriales	15
3.3. Resultados encontrados en Chile	16
4. Bacterias lácticas en el vino	17
4.1. Producción de aminas biógenas en los vinos por parte de las bacterias lácticas.....	18
4.2. Métodos de análisis de detección y cuantificación de aminas biógenas por microorganismos.....	19
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	20
CAPITULO II	26
EFFECTO DEL pH, DE LA CONCENTRACIÓN DE ÁCIDO MÁLICO Y AMINOÁCIDOS SOBRE EL CONTENIDO DE AMINAS BIOGENAS	26
RESUMEN	27
ABSTRACT	28
INTRODUCCIÓN	29
HIPÓTESIS Y OBJETIVO	34
MATERIALES Y MÉTODOS	35

1.	Lugar de estudio.....	35
2.	Materiales.....	35
3.	Metodología	36
3.1.	Preparación del medio.....	36
3.2.	Cepa y condiciones de cultivo	38
3.3.	Fermentación Maloláctica (FML).....	39
3.4.	Toma de muestras	39
4.	Determinaciones analíticas	40
4.1.	Aminas Biógenas	40
4.1.1.	Cuantificación.....	40
4.1.2.	Identificación	41
4.2.	Ácidos Orgánicos.....	42
4.2.1.	Cuantificación.....	42
4.2.2.	Identificación	43
5.	Diseño experimental y análisis estadístico.....	44
	RESULTADOS Y DISCUSION	45
	CONCLUSIONES.....	58
	BIBLIOGRAFÍA.....	59
	ANEXOS.....	67
	Anexo 1. Medio V 50 (vino sintético).	67
	Anexo 2. Método de Determinación de Aminas Biógenas	68
	Anexo 3. Método de Determinación de Ácidos Orgánicos.....	73

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Contenido de aminoácidos en los medios con mayor y menor concentración ..	37
Cuadro 2. Aminas biógenas, precursores y enzimas responsables de la producción de aminas en vinos.	40
Cuadro 3. Gradiente de la fase móvil, utilizada para el análisis de aminas en vinos.	41
Cuadro 4. Orden de elusión de los ácidos orgánicos detectados por HPLC.....	42
Cuadro 5. Aminas biógenas encontradas en la primera etapa de la fermentación maloláctica.	46
Cuadro 6. Aminas biógenas encontrados en la segunda etapa de la fermentación maloláctica	46

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Reacción de descarboxilación de aminoácidos en la producción de aminas biógenas (Galvez, 2008).....	8
Figura 2. Histamina (Landete, 2005).	9
Figura 3. Tiramina (König <i>et al.</i> , 2009).....	10
Figura 4. Putrescina (Mafra <i>et al.</i> , 1999).	10
Figura 5. Agmatina (Perez de Arce, 2010)	11
Figura 6. Esquema de representación de cada tratamiento de estudio.....	38
Figura 7. Comparación de promedios entre etapa 1 y etapa 2 de Agmatina.	48
Figura 8. Comparación de promedios entre etapa 1 y etapa 2 de Histamina.	51
Figura 9. Comparación de promedios entre etapa 1 y etapa 2 de Putrescina.....	53
Figura 10. Comparación de promedios entre etapa 1 y etapa 2 de Tiramina.....	56

ABREVIATURAS

HPLC	High Performance Liquid Chromatography / Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia
AQC	6-amino-quinolil-N-hidroxynimidil Carbamato
cv.	cultivar
FML	Fermentación Maloláctica
BL	Bacteria Láctica
AB	Aminas Biógenas
MAO	Monoaminooxidasa
DAO	Diaminooxidasa
SO₂L	Anhídrido Sulfuroso Libre
CECT	Colección Española de Cepas Tipo

CAPITULO I

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Las enfermedades relacionadas con la dieta, tales como el sobrepeso, la obesidad, la diabetes, la hipertensión y los problemas cardiovasculares, no están limitadas a los países ricos, encontrándose en alza en todo el mundo como resultado de los nuevos estilos de vida y los hábitos alimentarios (Organización de las naciones unidas para la agricultura y la alimentación, 2007). Por otra parte Díaz *et al.*, (2006) señalan que las recientes tendencias en seguridad de los alimentos, sumado a las demandas del consumidor por productos más saludables, han estimulado la investigación de compuestos que causan daño y que pueden estar presentes en éstos.

1. Las Aminas Biógenas: Definición y efectos fisiológicos

Las Aminas Biógenas (AB) son compuestos nitrogenados, de bajo peso molecular. Se encuentran principalmente en alimentos fermentados, como queso, vino, embutidos entre otros y tienen importancia biológica en los vegetales, en las células microbianas y animales. (Innocente *et al.*, 2007).

Según Pérez (2006), las AB se pueden originar:

- Durante procesos metabólicos de las plantas y animales, sin participación de microorganismos (espermita, espermidina, putrescina).
- A partir de los aminoácidos, que actuarían de precursores, por acción de las enzimas descarboxilasas de los microorganismos con esta actividad (histamina, tiramina, triptamina, feniletilamonio, putrescina, cadaverina, agmatina). Ver Figura 1.
- En procesos de putrefacción, por lo que se podría considerar como indicadores de alteración.

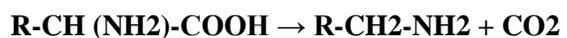


Figura 1. Reacción de descarboxilación de aminoácidos en la producción de aminas biógenas (Galvez, 2008).

Las AB pueden tener una estructura alifática (putrescina, cadaverina, espermina, espermidina), aromática (tiramina, feniletilamina) o heterocíclica (histamina y triptamina). Las aminas alifáticas se relacionan con condiciones de deficiencia sanitaria, mientras que las de estructura aromática y heterocíclica se relacionan con efectos toxicológicos (Mafra *et al.*, 1999).

Las características químicas y funciones biológicas de las AB pueden tener efectos beneficiosos y perjudiciales en los seres humanos. En concentraciones excesivas pueden inducir a problemas respiratorios y cardiacos, hipertensión, dolores de cabeza y problemas alérgicos. Las personas pueden tener sensibilidades diferentes a las acciones tóxicas de estas sustancias, por tanto, los efectos tóxicos normalmente se relacionan con: la cantidad de comida o bebida ingerida, la concentración total de AB y al consumo de etanol. También se ha visto, que el consumo simultaneo de comidas fermentadas y bebidas alcohólicas causan desordenes, incluso cuando cada producto no pudiera considerarse arriesgado (González y Ancín, 2006).

La mayoría de las intoxicaciones alimentarias se relacionan fundamentalmente con la histamina, pero también con otras aminas como las aminas aromáticas feniletilamina y tiramina. El resto de las AB pueden contribuir a reforzar la acción de las anteriores (Landete, 2005).

El contenido de AB es superior en la mayoría de los alimentos que en los vinos, pero, como el vino posee alcohol (etanol), y en conjunto con la histamina, inhiben la metabolización intestinal, potenciando la acción de esta amina, inhibiendo la acción de las aminooxidasas, que a su vez catalizan la desaminación oxidativa de las AB, produciendo aldehídos, agua

oxigenada y amoniaco (Pérez, 2006). La explicación a lo anterior es que, la actividad de las enzimas implicadas en el metabolismo de las AB, como la monoaminooxidasa (MAO) y diaminooxidasa (DAO), pueden ser inhibidas por diversos medicamentos (algunos antidepresivos, por ejemplo), por el etanol e incluso por otras aminas que se encuentren presentes en los propios alimentos, disminuyendo así la eficacia de la detoxificación (Sandler y Reynolds, 1976; Rivas-Gonzalo y Mariné, 1983; Bauza y Teissedre, 1995, Gloria *et al.*, 1998).

No obstante, existe un gran número de AB, este trabajo se centrará en el estudio de la histamina, tiramina, putrescina y agmatina.

1.1. Histamina

La histamina o β -aminoetilimidazol, es una molécula hidrófila compuesta de un anillo imidazol y un grupo amino unido por 2 grupos metilo tal como se muestra en la figura 2. Es una monoamina heterocíclica producida por descarboxilación del aminoácido histidina. La sintomatología que más produce en el hombre es una ligera hipotensión arterial, enrojecimiento facial, dolor de cabeza, e incluso diarrea (Landete, 2005).

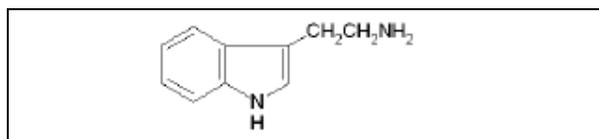


Figura 2. Histamina (Landete, 2005).

1.2. Tiramina

Es una monoamina aromática, y se trata de una molécula con un grupo benceno que posee un radical nitrogenado ($-NH_2$) y un grupo ($-OH$) en posición 4 como muestra la figura 3. Se encuentra fuertemente en los alimentos fermentados como vino, cerveza, embutidos y quesos. Tiene efectos vasoconstrictivos sobre los vasos cerebrales y sistémicos. Es producida por descarboxilación del aminoácido tirosina y comúnmente no es producida por

las Bacterias lácticas (BL), sin embargo algunas cepas de *Lactobacillus hilgardii* se encuentran dentro de las que expresan el gen para la descarboxilación de este aminoácido (König *et al.*, 2009; Landete, 2005).

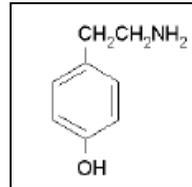


Figura 3. Tiramina (König *et al.*, 2009).

1.3. Putrescina

Es una poliamina alifática, ya que posee un grupo (-NH₂) en cada extremo de la cadena de acuerdo a la figura 4. Se relaciona con el crecimiento y diferenciación celular. Dentro de los efectos que tiene putrescina está la reducción de la presión arterial, y puede potenciar los efectos negativos sobre la salud humana causada por otras AB que estén presentes (Woller, 2005; Landete, 2005). Esta amina es relacionada con la falta de higiene dentro de una planta de producción, por lo cual, es importante controlar su concentración para tomar medidas de mitigación en el caso de ser necesario (Gálvez, 2008; Mafra *et al.*, 1999).



Figura 4. Putrescina (Mafra *et al.*, 1999).

1.4. Agmatina

Es una poliamina alifática, tal como muestra la figura 5, sintetizada a través de la descarboxilación del aminoácido ornitina. Sirve de intermediario para la formación de putrescina. Se encuentra esporádicamente en los vinos (Gálvez, 2008). Algunos autores mencionan que esta amina es producida solo por cepas de *Lactobacillus hilgardii*, en la que ésta seguiría una vía anómala para el catabolismo de la arginina, descarboxilando a

agmatina, ya que habitualmente es metabolizada directamente a putrescina o metabolizada primero a ornitina, y luego a putrescina (König *et al.*, 2009 ; Moreno-Arribas y Polo, 2008). La agmatina puede ser transformada a putrescina mediante dos vías, una directa mediante la agmatina deiminasa y una segunda vía mediante la formación de N-carbamoilputrescina por la agmatinasa para luego ser transformada a putrescina por acción de la N-carbamoilputrescina hidrolasa (Perez de Arce, 2010; Landete *et al.*, 2008).



Figura 5. Agmatina (Perez de Arce, 2010)

2. Aminas biógenas en vinos

Para Zoecklein *et al.*, (2001), el contenido de AB depende de la zona de cultivo, la variedad y las técnicas de elaboración. Zee *et al.*, (1983), demuestran que existe una clara diferencia entre las distintas zonas de producción vitivinícola y la cantidad de AB encontradas. Los diferentes cultivares tiene influencia sobre la composición cualitativa y cuantitativa de los aminoácidos presentes en el mosto (Landete, 2005). Gálvez (2008), para los vinos del cv. Chardonnay y del cv. Cabernet sauvignon clasificó de forma exitosa el origen de los vinos, según el contenido de AB, dado el índice climático utilizado.

El vino contiene hasta 25 AB distintas, siendo las mayoritarias la histamina, la tiramina y la putrescina, producidas por la descarboxilación de los aminoácidos histidina, tirosina y ornitina respectivamente (Carrascosa *et al.*, 2005).

Ya en los años 1975 y 1987 hubo estudios que negaron la posibilidad de que fueran las BL los microorganismos que generaban las AB en el vino, al no observar un aumento en las concentraciones de AB, tras la fermentación maloláctica (FML). Pero, otros autores

demonstraron que sí, por lo que dedujeron que eran las BL los microorganismos responsables de la formación de AB en el vino durante la FML. Luego de esto, algunos autores dedujeron que altos niveles de AB, estaban relacionados a vinos que poseían grandes poblaciones de BL, pero que no había solo un género, si no que participaban varios géneros de BL en la síntesis de AB (Landete, 2005).

Actualmente, los límites de concentración de AB en el vino no están establecidos oficialmente por la OIV (Organisation Internationale de la Vigne et du Vin), pero algunos países establecen sus propias recomendaciones (Carrascosa *et al.*, 2005). Moreno-Arribas (2007), señala que aunque todavía no se han definido los límites legales para ninguna de las AB, algunos países imponen sus propias recomendaciones, especialmente en el caso de la histamina, por lo tanto, las exportaciones de vino a estos países pueden ser paralizadas en el futuro, convirtiendo a las AB en una restricción al intercambio comercial. Hernández-Orte *et al.*, (2006), destacan para el caso de la histamina, que en algunos países se han recomendado límites máximos, como por ejemplo: 2 mg*L⁻¹ en Alemania, 5-6 mg*L⁻¹ en Bélgica, 10 mg*L⁻¹ en Suiza y Austria, 8 mg*L⁻¹ en Francia y 3 mg*L⁻¹ en los países bajos, y que con respecto al resto de las aminas, no existe ninguna recomendación al límite de tolerancia.

2.1. Enzimas que intervienen en la formación de Aminas Biógenas

La histamina se produce por la descarboxilación del aminoácido histidina por acción de la enzima histidina descarboxilasa. La tiramina se forma por la descarboxilación de la tirosina por la tirosina descarboxilasa. La biosíntesis de las poliaminas comienza por la conversión de ornitina en putrescina por acción de la ornitina descarboxilasa, aunque existe una vía alternativa para la síntesis de putrescina, la cual implica la acción de la enzima arginina descarboxilasa, cuyo sustrato es el aminoácido arginina. La descarboxilación de la arginina produce agmatina que puede ser transformada directamente a putrescina por acción de la enzima agmatina deiminasa o indirectamente mediante la formación del intermediario N-carbamilputrescina y la acción secuencial de la agmatinasa y de la N-carbamilputrescina

hidrolasa. (Landete, 2005). Según resultados de Jiménez y Ancín (2007), se ha encontrado que una parte de histamina y tiramina se degradaría al final del envejecimiento, ya que algunos autores afirman que la acción residual de enzimas oxidasas degradarían estas aminas (Enes-Dapkevicius *et al.*, 2000; Voigt y Eitenmiller, 1978).

La actividad descarboxilasa específica de *Lactobacillus hilgardii* 464 fue estudiada por Landete (2005), durante diferentes fases de crecimiento, apreciando ya, a las 3 horas de actividad histidina descarboxilasa específica, incluso superior a las 6 y 12 horas, ya que a las 3 horas aún mostraba actividad residual del medio de donde procedía, pues las BL procedían de medio MRS y estaban en fase de crecimiento exponencial cuando se inocularon. A las 60 horas, se demostraba una disminución considerable de esta actividad, mucho más evidente a las 72 horas.

3. El Origen de las aminas biógenas en el vino

Las AB pueden estar presentes en la materia prima (uva) o se pueden producir durante los procesos de vinificación, aunque, es posible que la propia vid pueda producir enzimas con capacidad de descarboxilante, lo cual explicaría la presencia de AB en el mosto, pero el principal proceso que provoca la síntesis de las AB en el vino, es la FML (Landete, 2005). Ésta, es realizada en el vino por intermedio de las BL, y que junto con provocar una disminución en la acidez total en el vino, pérdida de color, aumento de la acidez volátil, también induce un cambio en la calidad organoléptica, siendo este aspecto, el de impacto más reconocido en este proceso, puesto que disminuye la acidez provocada por el ácido málico, por otro ácido más suave, el ácido láctico (Carrascosa *et al.*, 2005).

3.1. Síntesis de Aminas Biógenas en el vino

En general, los vinos tintos presentan mayores concentraciones de AB que los vinos blancos. Estos mayores valores se atribuyen a la presencia de BL, de la FML en los

primeros y que además, la mayoría de los mostos blancos contienen menores concentraciones de aminoácidos y poseen menor pH, siendo ambos factores limitantes para el desarrollo bacteriano en el vino (Moreno-Arribas, 2007). Landete *et al.*, (2005b), encontró que en los vinos a los cuales se les permitía la realización de la FML, tienen un incremento significativo de concentraciones de AB. Mafra *et al.*, (1999), cuantificaron las AB en vinos resultantes de varios procesos de vinificación usados en Portugal: vinos blancos y tintos, encontrando que los diferentes procesos de vinificación influían en la concentración de AB. Las diferencias encontradas en la concentración de AB entre vinos tintos, rosados y blancos, parecen demostrar que el tipo de vinificación influye en el contenido de estos compuestos en el vino (Landete, 2005). Los vinos tintos son los que presentaban la mayor concentración de AB, mientras que los vinos fortificados presentan una concentración relativamente baja. Moreno-Arribas (2007), explica que el hecho de que los vinos tintos tengan mayores niveles de AB se puede explicar por qué éstos se fermentan con pieles y semillas, de donde se extraen los polifenoles, las proteínas, los polisacáridos y los aminoácidos, por lo que se deduce que maceraciones intensas y prolongadas en el tiempo, darán lugar a vinos con mayores contenidos de histamina, tiramina, putrescina y cadaverina.

Prácticas enológicas, como la maceración post-fermentativa, la adición de enzimas, el contacto con lías y el envejecimiento, tienden a aumentar el contenido en aminoácidos. Por el contrario, los trasiegos tempranos, el desborre o la filtración del vino, tienden a disminuirlos, ya que limitan la liberación al vino de aminoácidos procedentes de la lisis de levaduras. Además los trasiegos eliminan microorganismos potencialmente capaces de descarboxilar aminoácidos precursores de AB (Landete, 2005). Sin embargo, para Peynaud (1998), la filtración no elimina las AB ya presentes, ni las enzimas libres que catalizan la formación o destrucción de aminos y que proceden de la lisis de los microorganismos existentes antes de la filtración. La clarificación con bentonita (agente clarificante que ayuda a eliminar complejos que se forman entre polifenoles y el ácido tartárico en vinos tintos, y entre las proteínas y el ácido tartárico en vinos blancos) también ayuda a disminuir la concentración de AB, ya que la bentonita produce una precipitación de las proteínas y

aminoácidos e incluso de las aminas si éstas ya están cuando se aplica el tratamiento (Landete, 2005).

Según resultados de Jiménez y Ancín (2007), el grado de turbidez de los vinos en el momento de crianza, no influiría en la acumulación de AB. Mientras que putrescina y cadaverina no se formarían durante esta etapa, Marques *et al.*, (2008) estudiando las variaciones de las AB en la crianza con lías, encontraron que los niveles de tiramina y cadaverina fueron mayores en estos vinos. Por otra parte Jiménez *et al.*, (2003) no encontraron diferencias en la concentración de AB durante el envejecimiento, ya sea en barricas de origen francés o americano. Pérez (2006), agrega que el tiempo de crianza de los vinos, puede aumentar la concentración de AB, en especial de histamina. Estudios de Jiménez *et al.*, (2003), en vinos del cv. Chardonnay y vinos del cv. Pinot noir, observaron un aumento de histamina, tiramina y putrescina durante la crianza en madera de roble, pero para la formación de histamina en esta etapa, se ha comprobado que la enzima histidina descarboxilasa mantiene su actividad en un nivel elevado durante muchos meses, en células viables pero no cultivables, y estas poblaciones residuales, mantienen actividades de supervivencia durante la crianza del vino, entre las que se encuentra la descarboxilación de los aminoácidos (Rolland *et al.*, 1995). Si el vino no es sulfitado, a lo largo de su conservación, se produce un incremento muy significativo del contenido de AB, que es mayor en los casos donde los pH son más elevados, por ejemplo cercanos a 4 (Lonvaud-Funel *et al.*, 1998).

3.2. Efectos sensoriales

Sensorialmente las AB y especialmente las que son volátiles, como la tiramina y feniletilmina, pueden resultar negativas cuando se encuentran en concentraciones elevadas, sobre $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, principalmente porque modifican el equilibrio aromático y gustativo del vino, incluyendo la fase retronasal del mismo (Pérez, 2006).

Además de su toxicidad, las AB, en concentraciones elevadas pueden conferir alteraciones desagradables y detectables en el vino. Putrescina y Cadaverina, además de reaccionar con

nitritos, dando lugar a la formación de nitrosaminas de conocido efecto cancerígeno, pueden causar una depreciación del aroma del vino al conferirle sabores desagradables (Meruvia, 2011). Lonvaud-Funel (2001), indican que la presencia de Cadaverina y Feniletilamina en elevadas concentraciones pueden ser un indicativo del uso de materias primas de baja calidad y condiciones inapropiadas durante la guarda y almacenamiento del vino.

3.3. Resultados encontrados en Chile

En Chile, el estudio de AB es escaso, y en un ensayo realizado el año 2004 se muestra que en el cv. Cabernet sauvignon el contenido de AB es muy variado, constatándose claramente que putrescina es la que se encuentra en mayor concentración ($4,34 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), seguida por histamina, cadaverina y feniletilamina ($1,82 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, $0,34 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, $0,09 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, respectivamente) (Ganga *et al.*, 2005). Gálvez (2008), en estudios de vinos comerciales de los cvs. Cabernet sauvignon y Chardonnay, encontró diferentes rangos de concentración de AB, donde se destacan: histamina desde no detectado a $1,33 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ con un promedio de $1,04 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, agmatina desde no detectado a $24,28 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ con un promedio de $1,79 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, tiramina desde no detectado a $5,04 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ con un promedio de $1,10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ y putrescina desde no detectado a $14,14 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ con un promedio de $5,34 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. Salinas (2009), en estudios de vinos comerciales de los cvs. Merlot y Carmenere, encontró los siguientes rangos de concentración de AB: histamina desde no detectado a $5,93 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ con un promedio de $2,05 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, agmatina no se detectó a ninguna de las muestras en ambos cvs., Tiramina desde no detectado a $5,31 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ con un promedio de $1,86 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ y putrescina desde $1,47 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ a $15,57 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ con un promedio de $5,64 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. Perez de Arce (2010), encontró evaluando el efecto del etanol y el fosfato de amonio sobre la síntesis de AB, valores promedio de histamina entre $9,58 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ a $14,74 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, de agmatina entre $16,70 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ a $44,16 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, de tiramina entre $1,79 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ a $4,28 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ y de putrescina desde no detectado a $0,87 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$.

4. Bacterias lácticas en el vino

Se ha demostrado que un número limitado de especies de BL se desarrollan en el mosto y en el vino, debido principalmente a: el bajo pH, al escaso contenido de elementos nutritivos en el mosto y, al contenido de etanol en el vino. Su importancia es doble, dado que por un lado ejercen un efecto beneficioso, ya que son responsables de la FML, y por otro lado, pueden tener consecuencias negativas, debido a su capacidad para producir alteraciones que disminuyen la calidad del vino (Carrascosa *et al.*, 2005).

Las BL relacionadas con el proceso de vinificación se encuentran ya presentes en la uva, en una concentración inferior al de las bacterias acéticas y levaduras. A lo largo de la fermentación alcohólica la concentración de las BL disminuyen como consecuencia de la competencia con levaduras y la sensibilidad al Sulfuroso libre (SO_2L) y etanol. Generalmente tras la fermentación alcohólica el número de BL puede aumentar hasta 10^7 - 10^8 ufc*mL⁻¹ y, como consecuencia, el ácido málico es transformado en ácido láctico durante la FML (Landete, 2005). Según Flanzy (2000), generalmente al final de la fermentación alcohólica se pueden contar 10^2 - 10^3 cel*mL⁻¹ para llegar a 10^8 cel*mL⁻¹ en el momento de mayor población de bacterias lácticas durante la FML y el umbral se alcanza cuando existe una población de 10^6 cel*mL⁻¹ y una temperatura óptima próxima a 18-20°C. En este proceso, sólo algunos géneros de BL se pueden desarrollar, entre los cuales están: *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* y *Oenococcus*. Aunque en estudios de vinos comerciales chilenos, y después de un análisis presuntivo, se puede decir que las BL que se desarrollan durante la fase exponencial de la FML son exclusivamente de la especie *Oenococcus oeni* (Gálvez, 2008).

Las AB también pueden evolucionar durante la crianza del vino, al contener niveles importantes de aminoácidos libres que pueden ser descarboxilados por poblaciones microbianas residuales formándose las correspondientes AB (Landete, 2005).

Hay estudios durante la guarda en botella del vino, que no observaron cambios drásticos en la concentración de AB. González y Ancín (2006) estudiaron el efecto de diferentes temperaturas de guarda, señalando que sólo existieron diferencias en la evolución durante los primeros 45 días. Posteriormente la concentración de AB se mantiene hasta no tener diferencias entre los tratamientos de temperatura aplicadas a los vinos, asumiendo que la actividad oxidasa de las bacterias aún existe en botella.

4.1. Producción de aminas biógenas en los vinos por parte de las bacterias lácticas

La formación de AB en el vino va a depender de la presencia de cepas de BL con la actividad enzimática descarboxilante, correspondiente. Para Carrascosa *et al.*, (2005) las BL son capaces de metabolizar los aminoácidos del mosto y del vino, para dar lugar a la formación de precursores del carbamato de etilo o de AB. En ambos casos, se trata de alteraciones de la calidad sanitaria de los vinos y la formación en éste, va a depender de la presencia de BL con actividad enzimática descarboxilante, siendo los géneros *Lactobacilos* y *Pediococos* los principales productores de AB.

Ferrer *et al.*, (2007) señalan que las BL son los principales responsables de la síntesis de AB en el vino. Pérez (2006), agrega que algunas cepas de los géneros *Pediococcus* y *Lactobacillus* pueden llegar a producir entre 40 y 50 mg*L⁻¹ de AB y cepas del género *Oenococcus* no suelen sobrepasar los 5 mg*L⁻¹. Además Hidalgo (2003), señala que las BL responsables de la descarboxilación de los aminoácidos son de los géneros *Pediococcus* y *Oenococcus*. A su vez, Leitão *et al.*, (2005), sugieren que todas las BL relacionadas con la FML están involucradas en la formación de estas AB, al igual que las condiciones sanitarias deficientes, durante el proceso de elaboración del vino. Landete *et al.*, (2005a), probaron que casi el 80% de las cepas del género *Oenococcus oeni* son capaces de producir histamina, aunque normalmente la producen en bajos niveles. Por el contrario, solo el 27% de la cepas del género *Lactobacillus hilgardii* y el 16% de las cepas del género *Pediococcus parvulus*, exhiben esta capacidad, produciendo elevados niveles de histamina en vino y en medio sintético. Así estas dos especies son las responsables de las

concentraciones de histamina en vino superiores a $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. Sin embargo, Moreno-Arribas (2007) destaca que las levaduras también pueden liberar aminoácidos al mosto o vino, durante la autólisis, y que éstos pueden servir como precursores para la síntesis de AB durante la FML y en el periodo de crianza del vino.

4.2. Métodos de análisis de detección y cuantificación de aminas biógenas por microorganismos.

Hasta el momento se han descrito varias metodologías para detectar y cuantificar la capacidad de producir AB por parte de las BL aisladas de alimentos fermentados, entre los cuales se encuentran los de detección en placa y los de detección molecular, aunque el método de cuantificación que se ha empleado para el estudio de la capacidad aminobiogénica de las BL, es el de la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). También existe un método enzimático, que sirve para evaluar la capacidad de producción de histamina por bacterias aisladas de pescado (Landete, 2005).

Los métodos microbiológicos tradicionalmente utilizados, para la detección de bacterias productoras de aminas, implican la utilización de un medio de cultivo que contiene el aminoácido precursor y un indicador de pH. Como consecuencia de la formación de la AB, el medio se alcaliniza y se produce un viraje en el indicador de pH, aunque las BL presentan una excesiva producción de ácido, a veces se obtienen resultados falsos negativos. Existen otros métodos basados en técnicas de biología molecular, para la detección de BL productoras de AB, debido a que en ocasiones se han descrito la pérdida de capacidad para formarlas después de un periodo de almacenamiento en medios sintéticos (Carrascosa *et al.*, 2005).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAUZA, T. y TEISSEDRE, P. 1995. Les amines biogènes du vin. Métabolisme et toxicité. Bulletin l' OIV 68 : 42-67

CARRASCOSA, A.; MUÑOZ, R. y GONZÁLEZ, R. 2005. Microbiología del vino. Ediciones A. Madrid Vicente, España. 398p.

DIAZ, E.; SANTAMARÍA, C.; GOZZI, M. and FERRARI, A. 2006. Biogenic amines in Argentine wines. Toxicology Letters 164S: S1-S324.

ENES-DAPKEVICIUS, M.L.N.; NOUT, M.J.R. and WYMENGA, W. 2000. Biogenic amine formation and degradation by potencial fish silage starter microorganisms. International Journal of Food Microbiology 57: 107-114

FERRER, S.; LANDETE, J.; POLO, L.; PARDO, I. 2007. Las bacterias y su repercusión sobre las aminos biógenas. In: Sesión 3 Las bacterias y los factores de calidad y Seguridad Alimentaria, 10p. Eduard Mata y Joan Aguado. Simposio internacional de Microbiología y calidad integral del vino. Vilafranca del Penedès, Barcelona, España 20-21 de Noviembre, 2007. Agencia Catalana de Seguridad Alimentaria y el Instituto Catalán de la Vid y el Vino. Barcelona, España. Disponible en: <http://www.gencat.net/salut/acsa/Du12/html/ca/dir1311/dd16608/15-p-ferrer.pdf> Leído el 10 de agosto de 2008.

FLANZY, C. 2000. Enología: Fundamentos Científicos y Tecnológicos. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, España. 783p.

GALVEZ, C. 2008. Aminas biógenas en vinos chilenos: Incidencia según el origen y microorganismos involucrados. Tesis de Magíster en Enología y Vitivinicultura. Facultad de ciencias Agronómicas, Universidad de Chile. 105p.

GANGA, M.; YAÑEZ, L.; ROMO, C.; MARTÍNEZ, C.; LAVÍN, A. y OYARCE. M. 2005. Aminas biogénicas en vinos chilenos. Revista Vendimia 45(7): 18-20.

GLORIA, M.; WATSON, B.; SIMON-SARKADI, L. and DAESCHEL, M. 1998. A survey of biogenic amines in Oregon Pinot noir and Cabernet Sauvignon wines. American Journal of Enology and Viticulture. 49: 279-281.

GONZÁLEZ, A. and ANCÍN, C. 2006. Amine concentrations in wine stored in bottles at different temperatures. Food Chemistry 99: 680-685.

HERNÁNDEZ-ORTE, P.; PEÑA-GALLEGO, A.; IBARZ, M.; CACHO, J. and FERREIRA, V. 2006. Determination of the biogenic amines in musts and wines before and after malolactic fermentation using 6-aminoquinolyl-*N*-hydroxysuccinimidyl carbamate as the derivatizing agent. Journal of Chromatography A, 1129: 160–164.

HIDALGO, J. 2003. Tratado de Enología. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, España. 1423p.

INNOCENTE, N. ; BIASUTTI, M. ; PADOVESE, M. and MORET, S. 2007. Determination of biogenic amines in cheese using HPLC technique and direct derivatization of acid extract. Food Chemistry 101: 1285-1289.

JIMENEZ, N. and ANCIN, C. 2007. Acumulación de aminas biógenas durante envejecimiento de vinos con diferente turbidez. Revista Enólogos 47: 54-59.

JIMÉNEZ, N. ; TORREA, D. and ANCÍN, C. 2003. Changes in Amine Concentrations during Aging of Red Wine in Oak Barrels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 5732-5737.

KÖNIG, H.; UNDEN, G.; and FRÖHLICH, J. 2009. Biology of Microorganisms on Grapes, in *Must and Wine*. 522p.

LANDETE, J. 2005. Estudio y caracterización molecular de la producción de aminas biógenas por parte de bacterias lácticas de origen enológico. Tesis Doctoral. Universidad de Valencia, Facultad de Ciencias Biológicas. Valencia, España. 178p.

LANDETE, J. ; FERRER, S. and PARDO, I. 2005a. Which lactic acid bacteria are responsible for histamine production in wine?. *Journal of Applied Microbiology* 2005: 39-44.

LANDETE, J. ; FERRER, S. ; POLO, L. and PARDO, I. 2005b. Biogenic amines in wines from tree Spanish regions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 1119-1124.

LANDETE, J.; ARENA, M.E.; PARDO, I.; MANCA DE NADRA, M.C.; and FERRER, S. 2008. Comparative survey of putrescine production from agmatine deamination in different bacteria. *Food Microbiology* 25. 882-887.

LEITÃO, M.; MARQUES, A. and ROMÃO, M. 2005. A survey of biogenic amines in commercial Portuguese wines. *Food Control* 16: 199-204.

LONVAUD-FUNEL, A; COTON, C.; TORTOIS, S. and BRETRAND, A. 1998. Histamine-producing lactic acid bacteria in wines : early detection, frequency, and distribution. *American Journal of Enology and Viticulture* 49 : 199-204.

LONVAUD-FUNEL, A. 2001. Biogenic amines in wines: role of lactic acid bacteria. FEMS Microbiology Letters 199: 9-13.

MAFRA, I. ; HERBERT, P. ; SANTOS, L.; BARROS, P.; and ALVES, A. 1999. Evaluation of biogenic amines in some Portuguese quality wines by HPLC fluorescence detection of OPA derivatives. American Journal of Enology and Viticulture 50: 128–132.

MARQUES, A.; LEITÃO, M. and SAN ROMÃO, M. 2008. Biogenic amines in wines: Influence of oenological factors. Food Chemistry 107: 853-860.

MERUVIA, D. 2011 Determinación y Cuantificación de los niveles de Aminas Biógenas en vinos tintos Bolivianos. Tesis de Magíster en Enología y Vitivinicultura. Facultad de ciencias Agronómicas, Universidad de Chile. 54p.

MORENO-ARRIBAS, M. 2007. Control de la formación de aminas biógenas durante la elaboración y crianza del vino. In: Sesión 2 Las levaduras y las repercusiones de su comportamiento metabólico, 13p. Eduard Mata y Joan Aguado. Simposio internacional de Microbiología y calidad integral del vino. Vilafranca del Penedès, Barcelona, España 20-21 de Noviembre, 2007. Agencia Catalana de seguridad alimentaria y el Instituto Catalán de la Vid y el vino. Barcelona, España. Disponible en: <http://www.gencat.net/salut/acsa/Du12/html/ca/dir1311/dd16608/11-p-moreno.pdf>. Leído el 11 de Agosto de 2008.

MORENO-ARRIBAS, M. and POLO, C. 2008. Wine Chemistry and Biochemistry. 736p.

ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA AGRICULTURA Y LA ALIMENTACION (FAO). 2007. Buenos hábitos alimentarios contra la mal nutrición y las enfermedades relacionadas con la dieta. Disponible en: <http://www.fao.org/newsroom/es/news/2007/1000673/index.html>. Leído el 10 de noviembre de 2007.

PÉREZ, J. 2006. Resultados de aminos biógenos en vinos de variedades canarias. In: Antonia Bellido, Ruth Lozano. Gobierno de Canarias. III Jornadas Enológicas de Canarias. Lanzarote, Canarias, España. 29-30 Junio, 1 de Julio. Disponible en: <http://www.gobiernodecanarias.org/agricultura/icca/jornadas/enologicas/ponencias/juanpedroperez.pdf>. Leído el 10 de noviembre de 2007.

PEREZ DE ARCE, F. 2010. Efecto de la concentración de fosfato diamónico y etanol sobre el contenido de aminos biógenos en vino. Memoria de Título para optar al grado de Ingeniero Agrónomo. Facultad de ciencias Agronómicas, Universidad de Chile. 29p.

PEYNAUD, E. 1998. Enología práctica: Conocimiento y Elaboración del vino. Ediciones Mundi-Prensa, Castelló, 37. 28001. Madrid, España.

RIVAS-GONZALO, J. y MARINÉ, A. 1983. Migrañas de orden alimentario: Aspectos relacionados con la Tiramina. Circular Farmacéutica 278: 1-6

ROLLAN, G. ; COTON, C. and LONVAUD-FUNEL, A. 1995. Histidine decarboxylase activity of *Leuconostoc oenos* 9204. Food Microbiology 12: 455-461.

SALINAS, P. 2009. Perfil de aminos biógenos en vinos de los cvs. Merlot y Carmenere provenientes de cinco regiones vitivinícolas. Tesis de Magíster en Enología y Vitivinicultura. Facultad de ciencias Agronómicas, Universidad de Chile. 49p.

SANDLER, M. and REYNOLDS, G. 1976. Does phenylethylamine cause schizophrenia. The Lancet 1: 70-71.

VOIGT, M.N. and EITENMILLER, R.R. 1978. Role of histidine and tyrosine decarboxylases and mono- and diamine oxidases in amine build-up in cheese. Journal of Food Protection 41: 182-186.

WOLLER, R. 2005. Aminas biogénas: presencia en el vino y efectos en el organismo. ACE Revista de Enología. Disponible en: http://www.acenologia.com/ciencia70_2.htm leído el 30 de agosto de 2008.

ZEE, I. ; SIMARD, R. ; L'HEUREUX, L. and TREMBLAY, J. 1983. Biogenic amines in wines. American Journal of Enology and Viticulture 34: 6-9

ZOECKLEIN, B., FUGELSANG, K., GUMP, B. y NURY, F. 2001. Análisis y producción de vino. Editorial Acribia, Zaragoza, España. 613 p.

CAPITULO II

EFFECTO DEL pH, DE LA CONCENTRACIÓN DE ÁCIDO MÁLICO Y AMINOÁCIDOS SOBRE EL CONTENIDO DE AMINAS BIOGENAS.

RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto del pH, de la concentración de aminoácidos y ácido málico, en el contenido final de aminas biógenas. Para esto se utilizó una bacteria láctica, perteneciente a la CECT (Colección Española de Cepas Tipo), *Lactobacillus hilgardii* cepa 464, productora de aminas biógenas, la cual fue inoculada en el medio sintético V50, con el fin de inducir la Fermentación Maloláctica. Las condiciones adaptadas en este “medio V50” fueron; el grado alcohólico, el pH, la concentración de aminoácidos y de ácido málico, esto con el fin de simular las posibles condiciones que tiene un vino chileno, una vez finalizada la fermentación alcohólica.

Para la determinación del contenido de aminas biógenas en este medio sintético V50, las muestras fueron analizadas mediante la técnica de HPLC con derivatización en precolumna con 6-amino-quinolil-N-hidroxynimidil carbamato (AQC). Se eligió cuantificar 4 aminas biógena, agmatina, histamina, putrescina y tiramina, de acuerdo a los resultados encontrados en estudios previos de vinos comerciales chilenos, que arrojaron que este grupo eran las que se encontraban en mayor cantidad.

El contenido final de aminas biógenas en los medios sintéticos evaluados, evidenció los peligros que existe si se favorecen las condiciones donde se desarrollan las bacterias lácticas, dado que para agmatina y putrescina, los contenidos fueron altos al final de la Fermentación Maloláctica (FML), no así para histamina y tirarina, ya que sus contenidos fueron menores y además fueron disminuyendo a medida que avanzaba la Fermentación Maloláctica, aunque para el caso de Histamina, están por sobre los límites legales que han impuesto algunos países en sus reglamentaciones locales y representarían peligro potencial a la salud humana o a barreras para la exportación.

Palabras Claves: *Lactobacillus hilgardii*, HPLC, AQC, Histamina.

ABSTRACT

The aim of this investigation was to assess the effect of pH, concentration of amino acids and malic acid, in the final content of biogenic amines. For this we used a lactic acid bacterium belonging to the CECT (Spanish Collection of Type Strains), *Lactobacillus hilgardii* 464 strain, producer of biogenic amines, which was inoculated into the synthetic medium V50, with the aim of inducing Malolactic Fermentation.

For determining the content of biogenic amines in this synthetic medium V50, the samples were analyzed by HPLC technique with pre-column derivatization with 6-amino quinolyl-N-hydroxynimidil carbamate (AQC). Was chosen to quantify biogenic amines, agmatine, histamine, putrescine and tyramine, according to the results found in previous studies of commercial Chilean wines, which showed that this group was those who were in greater quantity.

The final content of biogenic amines in synthetic media tested, showed the dangers that exist if conditions are favored where lactic acid bacteria grow, since for agmatine and putrescine, the contents were high at the end of malolactic fermentation, histamine and not for tirarima, since their contents were lower and were also declining as malolactic fermentation progressed, although in the case of histamine, are above the legal limits imposed on some countries your local regulations and represent danger potential human health or for export barriers.

Keywords: *Lactobacillus hilgardii*, HPLC, AQC, Histamine.

INTRODUCCIÓN

Las aminas biógenas (AB) son compuestos orgánicos nitrogenados de bajo peso molecular que desempeñan un importante papel como reguladores endógenos de diversos procesos fisiológicos en el organismo humano (Silla Santos, 1996). En concentraciones altas pueden causar efectos fisiológicos indeseables en los seres humanos, sobre todo cuando el alcohol está presente (Landete *et al.*, 2007). Según Flanzky (2000), estos compuestos son considerados como nefastos para la salud. A su vez Carrascosa *et al.*, (2005) señalan que las AB se encuentran fundamentalmente en los alimentos y bebidas fermentadas. Concentraciones de 2-10 mg*L⁻¹ de histamina en las bebidas alcohólicas, 10-80 mg*L⁻¹ de tiramina y 3 mg*L⁻¹ de feniletilamina se han sugerido como niveles tóxicos (Soufleros *et al.*, 2007). A su vez Carrascosa *et al.*, (2005) señalan que un hombre sano puede ingerir dosis relativamente elevadas de histamina (hasta 2,75 mg*kg⁻¹ de peso) sin riesgo, a pesar de que están descritos accidentes alimentarios histamínicos.

Las AB, como histamina y tiramina, se forman por la descarboxilación de los aminoácidos correspondientes (Zoecklein *et al.*, 2001). Algunas AB pueden tener su origen por la aminación de compuestos no nitrogenados tales como aldehídos y cetonas (Ough *et al.*, 1981). Por otra parte, la contribución de las levaduras en la concentración final de AB del vino, es menos significativa que la de las Bacterias Lácticas (BL) (Moreno-Arribas, 2007).

Ferrer *et al.*, (2007), indican que las AB más abundantes y peligrosas en el vino son la histamina, tiramina, feniletilamina y putrescina, y en menor medida cadaverina y triptamina. Landete (2005), destaca que histamina, es quizás la amina más importante en el vino y a la única que se le han puesto límites de concentración en el vino destinado a la exportación. La histamina es una amina ampliamente estudiada debido a su habilidad de producir dolores de cabeza, hipertensión y problemas digestivos, mientras que la tiramina es a menudo asociada con la migraña e hipertensión. Putrescina y cadaverina pueden

aumentar la toxicidad potencial de otros compuestos (por ejemplo la histamina) aunque ellos no son tóxicos, aumentan los efectos negativos de la histamina y tiramina, interfiriendo con las enzimas que los metabolizan (Hernández-Orte *et al.*, 2006).

La síntesis de AB en el vino supone la coincidencia de tres factores diferentes: la existencia de precursores (aminoácidos), la presencia de microorganismos con actividades descarboxilasas correspondientes, y la concurrencia de condiciones ambientales adecuadas para su producción (Ferrer *et al.*, 2007).

En la uva los tipos y niveles de AB van a depender de una serie de factores, como la variedad y grado de maduración de la uva, tipo de suelo (Gloria *et al.*, 1998; Zoecklein *et al.*, 2001) y el contenido de compuestos nitrogenados en el mosto (Coton *et al.*, 1998; Sass-Kiss *et al.*, 2000; citados por Soufleros *et al.*, 2007). Por ejemplo, putrescina se asocia a problemas de deficiencia de potasio en el suelo (Brodequis *et al.*, 1989; Leitão *et al.*, 2003). Según Goñi y Azpilicueta (2001), las concentraciones de AB en los vinos pueden venir determinadas por la composición de aminoácidos y por la cepa de levadura que realiza la fermentación alcohólica. Bell y Henschke (2005) mencionan que la concentración de histamina aumentaría entre un 1,6 a 3,8 veces en el mosto y vino proveniente de vides a las que se les realizan aplicaciones de nitrógeno en exceso en campo. Bertrand *et al.*, (1991), citados por Bell y Henschke (2005), encontraron que en bayas del cv. Merlot, las concentraciones de histamina se duplicaban en vides tratadas con nitrógeno en comparación a las que no se les realizaban ninguna aplicación. También mencionan que lo mismo ocurriría con otras AB, pero en menor grado. Soufleros *et al.*, (2007) comentan que los tipos y niveles de AB en los vinos son afectados por el grado de maduración de la uva, el tipo de suelo y el contenido de compuestos nitrogenados en el mosto. Además agregan que *Botrytis cinerea* (hongo que prolifera en la uva en condiciones favorables temperatura entre 15 a 20 °C y humedad relativa cercana a 90%), aumenta la concentración de AB en uvas y vinos, dado que la condición de higiene de las uvas afecta los niveles de algunas aminos, es decir, material de uva podrido da niveles superiores de AB, sobre todo de isopentilamina, y 2-feniletilamina.

Según Pérez (2006), la aplicación de nutrientes en forma de aminoácidos o nitrógeno inorgánico, influiría en la aparición de las AB al incorporar fuentes de aminoácidos. Además, hay investigaciones que mencionan algunos otros factores que pueden estar afectando la cantidad de AB, como son: la duración de la maceración de pieles, la crianza en barricas, y el crecimiento de bacterias y levaduras indígenas (Bauza y Teissedre, 1995; Cilliers y Van Wyk, 1985; Gloria *et al.*, 1998). Según Gardini *et al.*, (2005) un alto pH aumentaría el contenido de AB mientras que una alta concentración de etanol y una baja concentración de piridoxal-5-fosfato (cofactor durante la descarboxilación) reducirían su acumulación.

Carrascosa *et al.*, (2005), agregan que los factores detallados anteriormente pueden influir en la abundancia de AB, pero que a su vez, ésta estará influenciada por la composición del mosto y el tipo de vinificación, además de otros factores como el pH y la concentración de Sulfuroso libre (SO₂L), van a determinar la microbiota bacteriana y su actividad biológica. Navascués (2005), observó que la producción de histamina aumenta cuando el medio es deficiente o faltan otros substratos fermentables tales como azúcares o ácido málico, por lo mismo, la descarboxilación de aminoácidos se utiliza como medio de obtención de energía en células que no tienen otros recursos y explica el por qué la concentración de las AB aumenta después de la fermentación maloláctica (FML), cuando el resto de las fuentes de energía ya fueron consumidas. Lonvaud-Funel (2001), cree que la reacción de descarboxilación, se produce como mecanismo de defensa de las BL, provocando un incremento del pH, hecho que favorece el crecimiento y la supervivencia de este grupo de microorganismos.

Para Navascués (2005), el pH del vino es el factor más importante en la generación de AB, ya que determina no solo la actividad biológica de la BL, sino también su actividad. Así a pH elevado se produce mayor cantidad de AB, debido a un crecimiento más fácil de las BL y una mayor diversidad posible de géneros, especies y cepas, a lo que Ferrer *et al.*, (2007) agregan que a pH inferiores a 3,5 no existen, generalmente, niveles elevados de histamina,

cosa que no ocurre con vinos de pH más elevados, como por ejemplo 3,8-3,9, dado que las actividades metabólicas de las BL responsables de la síntesis de AB se encuentran limitadas en vinos más ácidos, los cuales se encuentran más protegidos. Para Pérez de Arce (2010), el pH es el único que presenta relación con el contenido final de AB, principalmente con agmatina, aumentando la concentración de esta amina a medida que el pH aumenta, al igual que Landete (2005), quien observó la existencia de una relación entre el pH del vino y la concentración de histamina en el mismo, de manera que las concentraciones más elevadas de histamina se observaban en los vinos de pH más alto.

Las BL son importantes en enología ya que son responsables de la FML, proceso que mejora la calidad de los vinos tintos o de blancos excesivamente ácidos (Divies *et al.*, 2000). En este proceso solo algunos géneros se pueden desarrollar; *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* y *Oenococcus* (Lonvaud-Funel, 1999). Sin embargo, también durante la FML pueden dar lugar a alteraciones que deprecian la calidad y aceptación del producto terminado. Algunas BL poseen actividad enzimática amino-descarboxilasa que les permite producir AB a partir de aminoácidos precursores (Leitão *et al.*, 2000). Así por ejemplo, la histamina, tiramina y putrescina se producen a partir de los aminoácidos histidina, tirosina, y ornitina respectivamente (Polo y Moreno-Arribas, 2005).

Respecto a la relación que puede existir entre el ácido málico o el ácido láctico, con la producción de AB, existen varias posiciones. Para Landete (2005), la FML y el almacenamiento durante 12 meses en botella sobre la influencia en los contenidos de AB, suponen un incremento significativo de las concentraciones de histamina, tiramina y feniletilamina, sin embargo, no tienen ninguna consecuencia sobre los niveles de putrescina.

Para Pérez de Arce (2010), el contenido de ácidos orgánicos no se relaciona de forma importante con el contenido de AB, ya que en cuanto al ácido málico, no se encontró relación con alguna de las AB en específico, ni con el total de AB que pueden haber en un vino, pero, con el ácido láctico, se encontró una relación con triptamina, de forma inversa,

lo que significa que a una menor concentración de ácido láctico, mayor fue el contenido de triptamina. Sin embargo, cabe destacar que la descarboxilación de aminoácidos por bacterias lácticas tiene como objetivo la obtención de energía y la regulación del pH interno (Molenaar *et al.*, 1993). Esto se explica porque cuando las BL no disponen de medios de obtener energía, es cuando descarboxilan los aminoácidos. Así Soufleros *et al.*, (1998) encontraron que el incremento de histamina estaba relacionado con una disminución de ácido málico y ácido cítrico, asociándolo a medios pobres nutricionalmente (sin glucosa, ni ácido málico). Pero también están aquellos autores que encontraron que el contenido de ácido láctico no estaría influenciando la producción de histamina, Landete, (2005) junto con otros autores, encontraron que tendría una influencia negativa sobre su producción (Rollan *et al.*, 1995). Con respecto a las enzimas descarboxilasas, Farías *et al.*, (1993), observaron que el ácido málico y el ácido cítrico aumentarían la actividad de éstas, mientras que Landete (2005) no encontró ningún efecto.

HIPÓTESIS Y OBJETIVO

HIPÓTESIS:

La hipótesis planteada en el estudio postula que una menor concentración de ácido málico en el vino a inicios de la fermentación maloláctica, induce a una mayor producción de aminos biógenas por parte de las bacterias lácticas.

OBJETIVO

- Determinar el efecto del pH, del ácido málico y de la concentración de aminoácidos, sobre la producción de aminos biógenas por parte de una bacteria láctica.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Lugar de estudio

El estudio se realizó en los laboratorios de Química enológica, Cromatografía y Microbiología del Departamento de Agroindustria y Enología de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Chile.

2. Materiales

Se utilizaron 250 mL de vino sintético medio V50 (anexo1) como unidad muestral. Este medio V50 es utilizado por Jara (2009) y Quintero (2010), en sus tesis doctorales. Para la preparación del medio sintético se utilizaron frascos de vidrio de borosilicato transparentes de 250 mL graduados.

Para cada tratamiento se utilizó una bacteria láctica productora de aminas biógenas; *Lactobacillus hilgardii* cepa 464, aportada por el laboratorio de Microbiología Enológica de la Universidad de Valencia (ENOLAB), perteneciente a la Colección Española de Cepas Tipo (CECT), con una población de 10^{-6} cel*mL⁻¹, previamente cultivada en medio MRS.

Para las dos concentraciones de aminoácidos (Cuadro 1), fueron utilizados estándares comerciales, de acuerdo a las aminas biógenas a obtener en el estudio. Es por esto, que los aminoácidos utilizados fueron: L-Arginina, L-Histidina, L-Ornitina y L-Tirosina. Todos estos aminoácidos fueron proporcionados por el laboratorio de Microbiología Enológica del Departamento de Agroindustria y Enología, de la Universidad de Chile, adquiridos en laboratorios SIGMA-ALDRICH (EE.UU).

Se utilizó ácido L (-) málico >95%, adquirido en laboratorios SIGAL, para definir las concentraciones en cada tratamiento, ya sea con 2 o 5 g*L⁻¹ de ácido málico respectivamente (Figura 6).

Se utilizaron estándares comerciales de cada amina biógena en estudio: agmatina, histamina, putrescina y tiramina adquiridos en laboratorios SIGMA-ALDRICH (EE.UU), para ser usados en la cuantificación de aminas biógenas y en las rectas de calibración.

Para el ajuste de pH, de acuerdo a los tratamientos (Figura 6), se utilizó ácido Tartárico, proporcionado por el Laboratorio de Química Enológica del Departamento de Agroindustria y Enología, de la Universidad de Chile, fabricado por la empresa Derivados Vinicos, Argentina e importado por Industrias Vínicas.

3. Metodología

3.1. Preparación del medio

Se preparó el vino sintético “medio V50”, para la inoculación de la cepa 464 en estudio. Para esto, se prepararon 6 litros totales del medio sintético “medio V50”, los cuales se distribuyeron en 2 frascos de vidrio de borosilicato de 3 litros cada uno. A cada uno de estos frascos se les agregó las concentraciones de aminoácidos (Cuadro 1), para ir subdividiendo de acuerdo a la distribución final que tendrán los tratamientos. Al primer frasco se le adicionó la mayor concentración de aminoácidos y al segundo frasco, la concentración menor. Los aminoácidos utilizados en el medio sintético “medio V50”, fueron elegidos de acuerdo a los resultados obtenidos por Gálvez (2008), Salinas (2009) y Pérez de Arce (2010), en estudios sobre el perfil de aminas biógenas y su relación con zonas vitivinícolas chilenas y en estudios sobre el efecto del etanol y el fosfato de amonio en la concentración

final de aminos biógenas en vinos. Las concentraciones de aminoácidos utilizadas se basaron a las encontradas por Landete (2005) en diferentes cultivares (cuadro 1), de acuerdo a los tratamientos que tendrán mayor o menor concentración de aminoácidos.

Cuadro 1. Contenido de aminoácidos en los medios con mayor y menor concentración

Aminoácido (g*L ⁻¹)	Mayor contenido	Menor contenido
Arginina	15*10 ⁻³	45*10 ⁻³
Histidina	2*10 ⁻³	5*10 ⁻³
Ornitina	1*10 ⁻³	15*10 ⁻³
Tirosina	2*10 ⁻³	9*10 ⁻³

Fuente: Landete (2005).

A continuación se sub-dividieron los 2 frascos con 3 litros cada uno de medio sintético en otros 2 frascos, con una capacidad de 1,5 litros cada uno, y luego se adicionó el ácido L(-) Málico *sigmaultra* $\geq 95\%$, de acuerdo a las dos concentraciones establecidas: la primera es de 2 g*L⁻¹ y la segunda en 5 g*L⁻¹ de ácido málico, lo que da un total de 4 frascos, con un volumen de 1,5 Litros cada uno. Con esto, se logró establecer 2 contenidos de ácido málico en el medio sintético V50, siendo el primero un contenido de 2g*L⁻¹ y el segundo con un contenido de 5 g*L⁻¹ de ácido málico, sobre las 2 concentraciones de aminoácidos que fueron fraccionadas anteriormente. En este momento se midió el pH, en cada uno de los frascos obtenidos, por potenciometría según la técnica de Bordeu y Scarpa (1998), para luego a estos 4 frascos de 1,5 L de medio sintético, con sus dos concentraciones de aminoácidos y de ácido málico, se volvieron a dividir en 2 frascos con 0,75 litros cada uno, obteniendo 8 frascos en total, a los cuales se les procedió a ajustar el pH usando ácido L (-) tartárico, dada la regla de que 1g*L⁻¹ de ácido tartárico modifica en 0,1 punto de pH (Flanzy, 2000). Después, de acuerdo al pH inicial medido anteriormente, se dejaron 4 botellas con un pH de 3,4 y 4 botellas con pH de 3,9, los cuales muestran los 8 tratamientos, como se demuestra a continuación en la Figura 6.

Cada tratamiento fue dividido en 3 frascos de 250 mL, que representan la unidad experimental de este estudio, generando las 3 repeticiones que tendrá cada uno de estos tratamientos.

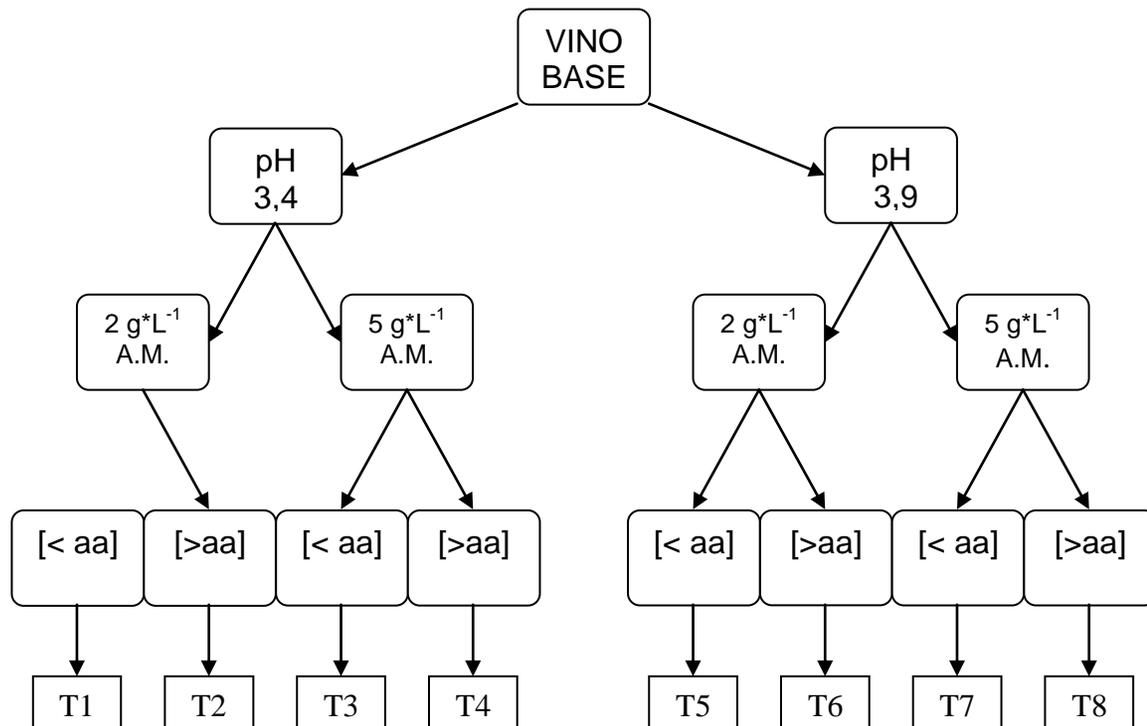


Figura 6. Esquema de representación de cada tratamiento de estudio. A.M.: ácido málico. aa: Aminoácidos.

3.2. Cepa y condiciones de cultivo

En cada tratamiento, se inoculó la cepa de BL *Lactobacillus hilgardii* cepa 464, productora de AB previamente cultivada y desarrollada en medio MRS líquido. La incubación se realizó a 22 °C por 5 días.

La BL *Lactobacillus hilgardii* cepa 464, fue inoculada con una población de 10^6 cel*ml⁻¹, en cada uno de los tratamientos mencionados, con el fin de que esta cepa realice la FML. Se realizó la estimación de densidad poblacional al Medio V50 durante tres días, mediante

la técnica de recuento directo por microscopía, con la utilización de cámara de anaerobiosis, usando tinción con azul de metileno.

3.3. Fermentación Maloláctica (FML)

La FML se realizó en las 24 botellas de 0,25 litros, que corresponden a los 8 tratamientos con sus tres repeticiones cada uno. Estas botellas se incubaron a 20°C por 5 meses. La FML se controló mediante cromatografía en papel, usando la técnica descrita por Bordeu y Scarpa (1998). Al mismo tiempo se fue observando la evolución de la FML usando Cromatografía Líquida de alta eficacia (HPLC).

3.4. Toma de muestras

La Fermentación maloláctica tuvo una duración de 5 meses, durante este periodo se cuantificaron las aminas biógenas en 2 etapas, siendo la primera a la cuarta semana desde la inoculación del medio sintético y la segunda al completar los 5 meses.

Las muestras fueron tomadas directamente desde el medio sintético de cada tratamiento y sus repeticiones, para hacer los análisis respectivos de acuerdo a las dos etapas evaluadas:

En la primera etapa, cada tratamiento y sus respectivas repeticiones, se cuantificaron cada 2 días las AB y cada 3 días los ácidos orgánicos, usando la Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC). Además, en cada semana, fue seguida la FML por cromatografía en papel, junto con recuento directo en microscopio de microorganismos, e identificación mediante morfología.

En la segunda etapa, a cada tratamiento con sus repeticiones, fueron cuantificadas las AB junto con la medición de ácidos orgánicos, por HPLC una vez al mes. Además se siguió la evolución de la FML por cromatografía en papel.

4. Determinaciones analíticas

4.1. Aminas Biógenas

4.1.1. Cuantificación

Durante la FML, fueron cuantificadas las AB presentes en el medio sintético “medio V50”, mediante la técnica de Cromatografía Líquida de alta eficacia acoplada a un detector de fluorescencia (HPLC-FL), Agilent Technologies 1200 Series, siguiendo la metodología propuesta por Hernández-Orte et al., (2006).

Se analizaron los siguientes compuestos: Agmatina, Histamina, Putrescina, Tiramina, tal como se muestran en cuadro 2.

Cuadro 2. Aminas biógenas, precursores y enzimas responsables de la producción de aminas en vinos.

Precursor	Enzima	Aminas biógenas
Arginina	Arginina descarboxilasa	Agmatina
Histidina	Histidina descarboxilasa	Histamina
Ornitina	Ornitina descarboxilasa	Putrescina
Tirosina	Tirosina descarboxilasa	Tiramina

Fuente: Landete (2005).

Para ello, a las muestras del medio sintético “medio V50” se les realizó una derivatización en precolumna con 6-amino-quinolil-N-hidroxynimidil carbamato (AQC) restituido a partir del kit enzimático AccQ Fluor (Waters, USA). La derivatización consistió en extraer 20 μL de medio sintético “medio V50” a un tubo eppendorf previa centrifugación a 3500 rpm por 15 minutos, el cual se filtra en una membrana de 0,22 μm para luego diluir 1:5. Luego se aplican 60 μL de buffer borato y 20 μL del agente derivatizante, y se incuban las muestras por 15 minutos a 55°C. Posteriormente, las muestras se inyectan en el cromatógrafo a un

volumen de 5 μL por muestra. Se utilizaron las longitudes de onda 250 y 395 nm para identificación de los compuestos de interés. La columna cromatográfica utilizada fue Luna 5u C18 100A y tiene como fase estacionaria dimetiloctadecilsilil de 300 mm de largo y 3,9 mm de diámetro interno. La columna se acondiciona a 65°C en el horno del cromatógrafo y la composición de la fase móvil está dada de la siguiente manera:

La fase A estaba compuesta por una solución de acetato de sodio trihidrato (140 mM) (Aldrich, pág. 2110, 17924-1EA) y trietilamina (17 mM) (Aldrich, pág. 2303, 236500-25G) con el pH ajustado a 5,05 con ácido fosfórico (85%).

La fase B estaba compuesta por 100% metanol (Cuadro 3).

El volumen de muestra a inyectar fue de 5 μL , con un flujo de 1 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$. El programa cromatográfico ocupado, consiste en 80% fase A y 20% de fase B por 5 minutos, seguido por un gradiente de elusión lineal de 20% a 80% de fase B hasta los 25 minutos (anexo 2).

Cuadro 3. Gradiente de la fase móvil, utilizada para el análisis de aminas en vinos.

Tiempo (min.)	A (%)	B (%)
0	80	20
5	80	20
17	60	40
42	35	65
50	15	85
55	0	100
60	0	100
62	80	20
70	80	20

Fuente: Laboratorio de Cromatografía, Depto. de Agroindustria y Enología.

4.1.2. Identificación

La identificación de las AB se realizó por comparación de estas aminas, con el tiempo de retención de los estándares comerciales inyectados en las mismas condiciones cromatográficas, las cuales se asemejan a las condiciones que se emplearon para elaborar

las rectas de calibrado, que se utilizaron para la cuantificación de los compuestos de interés en las muestras analizadas.

4.2. Ácidos Orgánicos

4.2.1. Cuantificación

Se cuantificaron los ácidos orgánicos (ácido tartárico, ácido málico y ácido láctico), usando cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC-FL), siguiendo el protocolo de medición de ácidos orgánicos del laboratorio de Cromatografía del Departamento de Agroindustria y Enología (anexo 3).

Se analizaron e identificaron los siguientes compuestos: Ácido Tartárico, Ácido Málico, Ácido Láctico en orden de elusión tal como se muestra en el cuadro 4.

Cuadro 4. Orden de elusión de los ácidos orgánicos detectados por HPLC.

Ácido Orgánico	Tiempo de retención relativo
Ácido tartárico	3,2 min
Ácido Málico	3,7 min
Ácido Láctico	4,1 min

Fuente: Laboratorio de Cromatografía, Dpto. de Agroindustria y Enología.

Antes de la inyección de cada muestra al equipo, para la determinación de ácidos orgánicos, se realizó una extracción de cualquier otro compuesto que pueda interferir en la medición. Para esto se utilizó una Columna de extracción Backerbond SPE Octadecil C18, en donde se hizo eluir 2 mL de medio sintético “medio V50”, previamente centrifugado por 10 minutos a 3000 rpm, para luego en un matraz aforado de 10 mL, recibir la muestra eluída por la columna de extracción. Luego, la columna de extracción se lava con 2 mL de buffer fosfato (KH_2PO_4 , 0,1 M, pH 3) y por último se afora y agita el matraz hasta completar 10 mL de solución, para luego inyectar en el equipo. Para la activación de las columnas de extracción se hizo eluir 1 mL de metanol (grado HPLC) y 10 mL de agua bidestilada.

Las muestras se inyectaron en un volumen de 20 μL , con un flujo de $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, utilizando longitudes de onda de 220 nm. La fase móvil estaba compuesta de un buffer fosfato (KH_2PO_4 , 0,1 M, pH 3). La columna cromatográfica utilizada fue la Discovery RP Amide C16 que es de 25 cm x 4,6 cm, de 5 μM de espesor, y la temperatura del horno del cromatógrafo fue de 30° C.

4.2.2. Identificación

La identificación de los ácidos orgánicos se hizo por comparación de estos compuestos con el tiempo de retención de estándares comerciales (Cuadro 4) inyectados en las mismas condiciones cromatográficas, las cuales se asemejan a las condiciones que se emplearon para elaborar las rectas de calibrado, que se utilizaron para la cuantificación de los compuestos de interés en las muestras analizadas.

5. Diseño experimental y análisis estadístico

El diseño experimental utilizado es completamente al azar, con una estructura factorial de 2^3 , y cada tratamiento consta de 3 repeticiones.

La unidad experimental fueron botellas de vidrio con 250 mL de medio sintético “medio V50”, inoculadas con la cepa tipo *Lactobacillus hilgardii* cepa 464.

Se realizó análisis de varianza (ANDEVA) a cada una de los tratamientos, por separado en los diferentes momentos de la FML, con el fin de determinar las diferencias significativas entre los tratamientos en cada etapa analizada.

Se hicieron pruebas de comparación múltiple utilizando el test de SNK.

Para estos análisis estadísticos se utilizó el programa STATGRAPHICS Centurion XV versión 15.2.06

RESULTADOS Y DISCUSION

La FML durante este estudio, tuvo una duración de 5 meses, en los cuales las mediciones se dividieron en 2 etapas, para poder agrupar los resultados obtenidos. La primera etapa comprende las primeras 4 semanas una vez inoculada la BL *Lactobacillus hilgardii* cepa 464 y la segunda etapa corresponde a la última parte de la FML, después de las 4 semanas iniciales hasta los 5 meses, donde se evaluaron las últimas inyecciones.

Varios estudios asumen que la etapa de FML por acción de las BL, las cuales transforman el ácido málico del vino en ácido láctico, es la principal etapa donde se generan las AB (Pramateftaki *et al.*, 2006; Landete *et al.*, 2007).

El número de inyecciones de cada tratamiento en el equipo de cromatografía por etapa, no es igual. Las primeras inyecciones fueron más frecuente, dado que se encontraban en la fase exponencial del crecimiento de la población de la bacteria *Lactobacillus hilgardii*. Luego de esto se observó que la FML aún estaba en progreso cuando ya habían pasado 4 semanas, en las cuales ya se habían hecho 8 inyecciones en el cromatografo para medir AB y 4 inyecciones en el cromatografo para medir ácidos orgánicos. Luego se continuó midiendo 1 vez al mes, tanto ácidos orgánicos como AB (manteniendo las condiciones de cultivo en que estaban los tratamientos). Por lo cual se hicieron 4 inyecciones en el cromatografo por los siguientes 4 meses, siendo 4 en total para medición de AB y 4 para medición de ácidos orgánicos.

A continuación se muestran los resultados, que serán analizados por etapa y en su conjunto.

1. Aminas Biógenas

Las concentraciones de AB en la primera etapa y en la segunda etapa presentaron diferentes resultados para cada una de ellas, los cuales se resumen en el cuadro 5 y 6 respectivamente.

Cuadro 5. Promedio de aminas biógenas encontradas en la primera etapa de la fermentación maloláctica.

Tratamientos [mg*L-1]	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8
Agmatina	5,17 ^A	3,58 ^A	4,28 ^A	1,18 ^A	5,88 ^B	7,80 ^B	7,63 ^B	4,58 ^B
Histamina	47,76	50,66	55,72	43,58	65,05	45,89	55,20	57,57
Putrescina	15,75 ^b	14,54 ^a	16,56 ^b	13,95 ^a	18,30 ^b	13,49 ^a	16,40 ^b	16,30 ^a
Tiramina	63,35 ^{bA}	63,70 ^{aA}	79,12 ^{bA}	51,50 ^{aA}	92,25 ^{bB}	56,85 ^{aB}	83,26 ^{bB}	63,33 ^{aB}
Total	132,03	132,48	155,69	110,21	181,47	124,04	162,49	141,78

Las concentraciones de las aminas biógenas se presentan en mg*L⁻¹. Superíndice en letra minúscula, corresponde a las diferencias significativas ($p \leq 0.05$) para los tratamientos con diferente contenido de aminoácidos. Superíndice en letra mayúscula, corresponde a diferencias significativas ($p \leq 0.05$) para los tratamientos con diferente pH. Sin letras indica que no hubo diferencias significativas ($p > 0.05$) para ese factor.

Cuadro 6. Promedio de aminas biógenas encontrados en la segunda etapa de la fermentación maloláctica

Tratamientos [mg*L-1]	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8
Agmatina	14,82 ^b	17,83 ^b	15,55 ^a	11,67 ^a	31,77 ^b	21,36 ^b	12,97 ^a	14,75 ^a
Histamina	5,50 ^A	4,96 ^A	4,61 ^A	4,22 ^A	16,66 ^B	15,62 ^B	11,59 ^B	14,03 ^B
Putrescina	25,70	28,55	32,42	30,95	33,12	31,79	25,16	27,49
Tiramina	42,02	54,03	57,40	55,25	65,08	51,74	49,83	48,74
Total	88,04	105,37	109,97	102,09	146,63	120,51	99,55	105,01

Las concentraciones de las aminas biógenas se presentan en mg*L⁻¹. Superíndice en letra minúscula, corresponde a diferencias significativas ($p \leq 0.05$) para los tratamientos con diferente contenido de ácido málico. Superíndice en letra mayúscula corresponde a diferencias significativas ($p \leq 0.05$) para los tratamientos con diferente pH. Sin letras indica que no hubo diferencias significativas ($p > 0.05$) para ese factor.

1.1. Agmatina

Esta amina biógena es la que presentó menores concentraciones al final de la primera etapa, pero a su vez, al final de la segunda etapa estos aumentaron considerablemente. Para Ancín *et al.*, (2007) y Halabangana *et al.*, (2006) esta amina se encuentra en forma esporádica en vinos de los cvs. Cabernet sauvignon y Chardonnay. Algunos autores mencionan que la agmatina es producida sólo por cepas de *Lactobacillus hilgardii* (Arena y Manca de Nadra, 2001), siguiendo una vía anómala para el catabolismo de la arginina, descarboxilando la agmatina, ya que habitualmente ésta es metabolizada directamente a putrescina o metabolizada primero a ornitina, y luego a putrescina (König *et al.*, 2009; Moreno-Arribas y Polo, 2008). Landete *et al.*, (2008) señalan que la agmatina puede ser transformada a putrescina mediante dos vías, una directa mediante la agmatina deiminasa y una segunda vía mediante la formación de N-carbamoilputrescina por la agmatinasa para luego ser transformada a putrescina por acción de la N-carbamoilputrescina hidrolasa.

El promedio más bajo de agmatina, encontrado en la primera etapa, fue de 1,18 mg*L⁻¹ en el tratamiento 4, donde la mayor restricción para la BL utilizada en este estudio fue el pH de 3,4, dado que poseía una alta concentración de ácido málico (5 g*L⁻¹) y alto contenido de aminoácidos. El promedio más alto de la agmatina en la primera etapa fue de 7,80 mg*L⁻¹ en el tratamiento 6, cuyo pH (3,9) es más favorable para el desarrollo bacteriano, con una concentración de ácido málico menor (2 g*L⁻¹) y un alto contenido de aminoácidos, tal como se puede ver la figura 7. En la segunda etapa, los promedios aumentaron en todos los tratamientos, siendo el menor promedio el del tratamiento 4 con 11,67 mg*L⁻¹, el que poseía un pH de 3,2, un contenido de ácido málico de 5 g*L⁻¹, y una alta concentración de aminoácidos. El mayor promedio alcanzado de agmatina fue de 31,77 mg*L⁻¹ en el tratamiento 5, el cual posee un pH de 3,9, pero que a su vez poseía la limitante de una bajo contenido de ácido málico (2 g*L⁻¹) y una baja concentración de aminoácidos. Estos promedios de concentraciones son mayores a los encontrados por Gálvez (2008), quien en los estudios sobre el cv. Cabernet sauvignon encontró como promedio para la agmatina un valor de 2,10 mg*L⁻¹ y en el cv. Chardonnay obtuvo un promedio de 1,09

$\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Estos resultados se contraponen a los obtenidos por Salinas (2009), donde agmatina no fue detectada para el cv. Merlot, ni tampoco en el cv. Carmènère, siendo ambos estudios sobre vinos comerciales chilenos. De los resultados obtenidos por Pérez de Arce (2010), la agmatina presentó valores promedio de $27,05 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, y siempre los valores obtenidos fueron menores cuando el grado alcohólico fue mayor, muy por el contrario a los resultados cuando el contenido de fosfato de amonio fue mayor, ya que éstos entregaron concentraciones de AB mayores. Este fenómeno se puede deber a que el grado alcohólico altera la actividad metabólica bacterial, al encontrarse en un medio más limitante, disminuyendo el crecimiento o la actividad metabólica (Fleet, 1993).

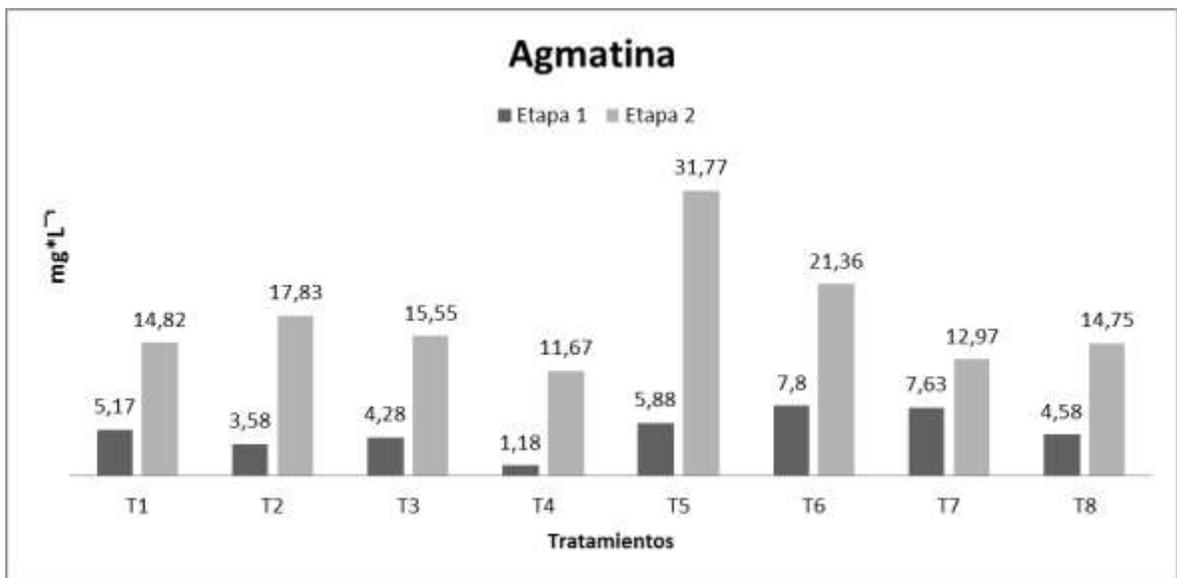


Figura 7. Comparación de promedios entre etapa 1 y etapa 2 de Agmatina.

Según el análisis estadístico, con un nivel de significancia del 5% se encontraron diferencias significativas para el factor pH en la primera etapa, con valores de p de 0,0041. Para los otros 2 factores (contenido de ácido málico y contenido de aminoácidos) no se encontraron diferencias significativas, pero cabe destacar que aunque no lo sean, la interacción entre los factores de concentración de aminoácidos y contenido de ácido málico presenta valores de p de 0,0791, siendo este un valor menor a las otras interacciones que se pudieron medir, y que aunque no es significativo, es importante destacarlo. Esto se pudo

deber, a que la bacteria *Lactobacillus hilgardii* cepa 464, en las primera etapa encontró una mejor adaptación a pH 3,9 que a pH 3,4, lo que provocó mayores promedios en la concentración de agmatina, para todos los tratamientos a pH 3,9. Para Landete (2005) a pH altos, concentraciones bajas de SO₂ o de etanol en el vino, limitan el desarrollo de bacterias lácticas que son las responsables de la formación de AB.

En la segunda etapa, con un mismo valor de significancia de 5% se encontraron diferencias significativas, para el factor ácido málico, con un valor de p de 0,0089, y los dos factores restantes (pH y concentración de aminoácidos) no presentaron diferencias significativas. Así, para concentraciones de 2 g*L⁻¹ de ácido málico, las concentraciones de agmatina fueron mayores cuando la concentración era de 5 g*L⁻¹ de ácido málico. Además estos valores de agmatina fueron mayores a pH 3,9 que a pH 3,4, esto explica que el valor de significancia para pH en esta etapa, aunque no es estadísticamente significativo, es muy cercano al valor de significancia del 5% (valor de p de 0,0593). Para la relación que existe entre el ácido málico y la transformación hacia ácido láctico durante la FML, con la producción de AB durante la misma, hay que destacar que la descarboxilación de aminoácidos por bacterias lácticas tiene como objetivo la obtención de energía y la regulación del pH interno (Molenaar *et al.*, 1993). Esto se explica que cuando las bacterias lácticas no disponen de medios para obtener energía, descarboxilan los aminoácidos y forman AB.

1.2. Histamina

Esta amina biógena presentó concentraciones muy altas al final de la primera etapa, pero que al finalizar la FML disminuyeron de manera considerable. En todos los tratamientos, comparando la primera con la segunda etapa, se observa una disminución en la concentración de histamina.

La histamina, es sin duda, la más importante entre todas las aminas, y se han centrado en ella todos los estudios, debido a su diversa sintomatología en el ser humano cuando se

presentan en elevadas concentraciones. Landete *et al.*, (2005a) encontraron que *Lactobacillus hilgardii* produce elevadas concentraciones de histamina, el cual es un dato importante si se considera que es la cepa de BL utilizada en este estudio, por lo que la alta concentración encontrada en la primera etapa puede estar influenciada por el crecimiento exponencial que tuvieron las poblaciones de la BL utilizada. Aunque Soufleros *et al.*, (1998) destacan que el incremento de la histamina estaba relacionado con una disminución de ácido málico y ácido cítrico, asociándolo a medios nutricionalmente pobres. Éste es otro dato a aportar si se tiene en cuenta el alto nivel de concentración encontrado en la primera etapa donde el ácido málico estaba en mayor nivel que a finales de la FML. Hay autores que encontraron que el contenido de ácido láctico no estaría influenciando la producción de la histamina (Landete, 2005), mientras que otros hallaron que tendría una influencia negativa sobre su producción (Rollan *et al.*, 1995). Farías *et al.*, (1993) observaron que el ácido málico y el ácido cítrico aumentarían la actividad de la enzima descarboxilasa, mientras que Landete (2005) no encontró ningún efecto.

Las concentraciones encontradas en la primera etapa variaron de $43,58 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ como menor valor para el tratamiento 4 (el cual poseía un pH de 3,4 un contenido de ácido málico de $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ y una alta concentración de aminoácidos) a $65,05 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ como promedio mayor en el tratamiento 5, que tiene un pH de 3,9, el cual es más favorable para la BL, pero con bajo contenido de ácido málico ($2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) y además una baja concentración de aminoácidos. Ver figura 8.

Como ya se comentó, al final de la FML, en la segunda etapa la histamina fue la amina biógena que bajó en mayor cantidad en sus concentraciones, siendo el promedio más alto de $16,66 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ para el tratamiento a pH de 3,9, pero con bajos contenido de ácido málico ($2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) y baja concentración de aminoácidos. El menor promedio encontrado en esta etapa fue de $4,22 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ para el tratamiento 4, con un pH de 3,4, pero con alta concentración de aminoácido y un contenido de ácido málico mayor ($5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) que el promedio anterior. Esta variación en el contenido de histamina al final de la fermentación maloláctica concuerda con lo afirmado por algunos autores que dicen que esta amina

biógena se degradaría al final de este proceso por la acción residual de enzimas oxidasas (Enes-Dapkevicius *et al.*, 2000; Voigt y Eitenmiller, 1978), por lo cual es una alternativa a lo que pudo haber pasado para que la concentración de histamina se redujera de manera considerable.

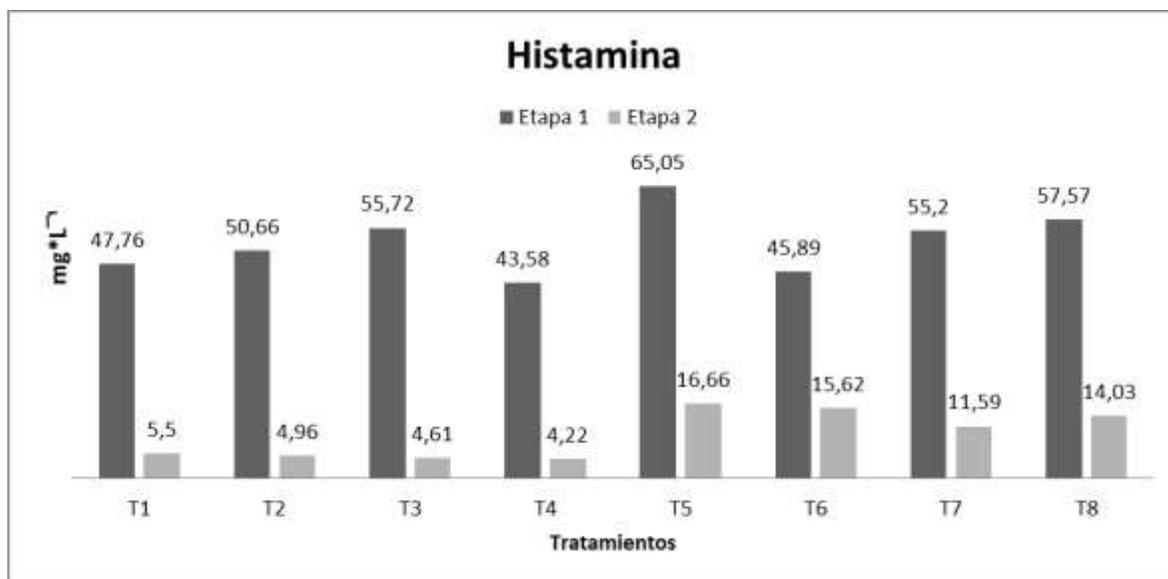


Figura 8. Comparación de promedios entre etapa 1 y etapa 2 de Histamina.

En los estudios de Gálvez (2008) en vinos del cv. Cabernet Sauvignon, esta amina no fue detectada en el 52,9% de los casos y en un 67,6% de las muestras se detectó menos de 2 mg*L⁻¹, y para el cv. Chardonnay no hubo detección en el 73,3% de las muestras y se observaron concentraciones menores a 2 mg*L⁻¹ en el 86,7% de los casos. Salinas (2009), encontró histamina en una baja concentración, con porcentajes del 31,8 % en los vinos del cv. Merlot y con una concentración del 1,46 mg*L⁻¹, en cambio para el cv. Carmenère se presentó en el 80 % de las muestras analizadas con un promedio de 2,64 mg*L⁻¹. Estos valores son inferiores a los obtenidos en este estudio. No obstante en los estudios de Pérez de Arce (2010), esta amina representa un 23% del total promediado en todos sus tratamientos, con un rango de 6,27 a 17,19 mg*L⁻¹, y Ganga *et al.*, (2005) en un estudio de vinos chilenos superó en promedio los 4 mg*L⁻¹ para algunas variedades tintas. Estos

últimos resultados encontrados por los autores mencionados son muy similares a los obtenidos al final de la segunda etapa.

En la primera etapa no se encontraron diferencias significativas para ninguno de los factores en estudio (pH, ácido málico y aminoácidos), y el valor de p más cercano a una significancia del 5% fue de 0,0580 para el factor pH. En la segunda etapa, y con una significancia del 5% se encontraron diferencias significativas para el factor pH, con un valor de p de 0. Para los factores analizados, como el contenido de ácido málico y la concentración de aminoácidos, no hubo diferencias significativas. Tal como se observa en la figura 8 a pH 3,4, se encontraron promedios de histamina desde 4,22 mg*L⁻¹ hasta 5,5 mg*L⁻¹ y a pH 3,9 se encontraron promedios de histamina que estaban entre 11,59 mg*L⁻¹ y 16,66 mg*L⁻¹. Landete (2005), comprobó que el pH no actúa sobre la expresión génica pero sí sobre la actividad enzimática y demostró que la máxima actividad de la enzima se da a pH 8,0, sin embargo, otros autores encontraron que la máxima actividad enzimática ocurría a pH 4,0 y 4,8 respectivamente, además concluye que la producción de histamina por *Lactobacillus hilgardii* a pH 4,0 era el doble que a pH 3,0, lo cual puede explicar este aumento de concentración de histamina en los dos pH estudiados.

Las concentraciones de histamina encontradas en este estudio son altas, y aunque disminuyeron de una etapa a la otra, siguen estando sobre valores que algunos autores han considerado nocivos para salud. Así, Radler y Fäth (1991) consideraron como nocivas para el organismo aquellas concentraciones superiores a 8 mg*L⁻¹ de histamina después de consumir una alta cantidad de vino. Según Leitão *et al.*, (2005), el interés por el estudio de la presencia y origen de las AB en vinos, responde tanto a criterios de seguridad alimentaria como económicos. Además señalan que en el aspecto económico no existe consenso a los límites máximos de AB en vinos, no obstante muchos países han establecido una recomendación sobre los niveles máximos admisibles de histamina, así por ejemplo Alemania establece concentraciones de 2 mg*L⁻¹, Bélgica 5-6 mg*L⁻¹, Francia 8 mg*L⁻¹, Suiza y Austria 10 mg*L⁻¹ y Holanda 3 mg*L⁻¹, por lo que la presencia de AB en vinos puede llegar a suponer una barrera no arancelaria, que imponga un freno a la exportación a

esos mercados. La Organización Internacional de la Viña y el Vino (OIV), en su Codex Enológico Internacional (2005) señala que las BL no deben producir AB, a menos que sea en cantidades mínimas y no deben transmitir gusto extraño, ni producir sustancias nocivas para la salud humana. Sus recomendaciones señalan que no se debe superar los $12 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (Viader, 2003). Hyötyläinen *et al.*, (2001) analizaron los vinos provenientes de diferentes regiones vitivinícolas mundiales, incluyendo a Chile, y determinaron que los vinos chilenos junto con los italianos, fueron los que mostraron mayores concentraciones de histamina, alcanzando un valor cercano a $7 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$.

1.3. Putrescina

Esta amina presentó elevadas concentraciones en la primera etapa, y al final de la segunda etapa aumentaron en todos los tratamientos como se muestra en la figura 9. En los vinos blancos, las cantidades de 10 a $15 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de putrescina producen un sabor desagradable, mientras que a valores de 10 a $20 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ pueden redondear el sabor a los vinos tintos, no obstante, a concentraciones superiores de $30 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ estos vinos tienen un sabor defectuoso, maloliente o pútrido (Woller, 2005).

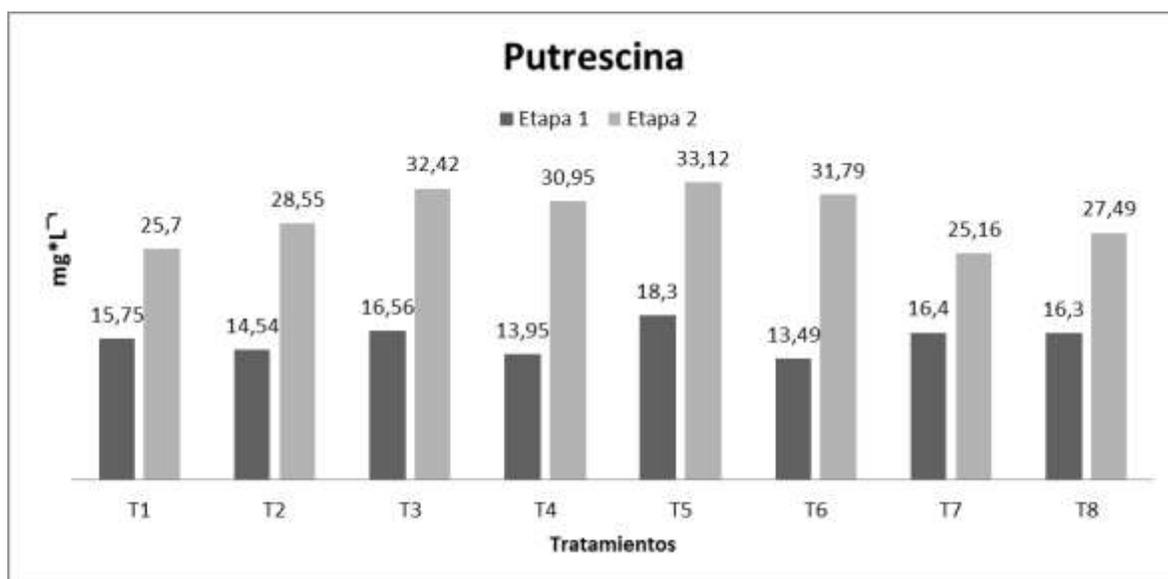


Figura 9. Comparación de promedios entre etapa 1 y etapa 2 de Putrescina.

El menor promedio encontrado en la primera etapa fue de $13,49 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ en el tratamiento 6, con pH de 3,9, con un contenido de ácido málico de $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ y una mayor concentración de aminoácidos. El mayor promedio de putrescina encontrado en la primera etapa, fue de $18,30 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ en el tratamiento con el mismo pH y similar contenido de ácido málico, pero con una menor concentración de aminoácidos. Estas concentraciones de putrescina aumentaron en la segunda etapa, y el menor promedio encontrado fue de $25,16 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, en el tratamiento 7 con pH de 3,9, un contenido de ácido málico de $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ y una menor concentración de aminoácidos. El mayor promedio encontrado en esta etapa fue de $33,12 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ en el tratamiento con el mismo pH al anterior, e idéntica concentración de aminoácidos, pero con un contenido de ácido málico de $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. Aunque los valores de la primera etapa son menores a la segunda etapa, estos son mayores a los encontrados en otros estudios en Chile. Así Gálvez (2008), encontró que las concentraciones de putrescina para vinos del cv. Cabernet sauvignon se encuentran entre las observadas por Hyötyläinen *et al.* (2001) y Ganga *et al.* (2005), siendo éstas de 11,5 y $4,34 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, respectivamente para vinos tintos y para los vinos del cv. Chardonnay, los resultados fluctúan entre lo no detectado a $5,78 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (promedio $1,49 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), lo cual se ajusta a lo expuesto por variados autores que afirman que el vino blanco posee menores concentraciones de esta amina biógena (Bover-Cid *et al.*, 2006; Romero *et al.*, 2002; Soufleros *et al.* 2007). En los estudios de Salinas (2009), la putrescina fue la que presentó valores mayores, en comparación con el resto de las aminas $6,27 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ para la cv. Merlot y $5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ para Carménère. Ganga *et al.* (2005), determinaron que esta amina biógena es la que se presenta una mayor concentración en los vinos chilenos, con 4,7 y $4,34 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, en los cvs. Merlot y Carménère respectivamente. Las concentraciones encontradas por Pérez de Arce (2010) fluctúan entre no detectado a $0,87 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ valores por debajo a los encontrados en este estudio.

Según el análisis estadístico, con un nivel de significancia del 5% se encontraron diferencias significativas para la concentración de aminoácidos en la primera etapa, con un valor de p de 0,0178. En esta etapa para el factor pH y para el factor del contenido de ácido

málico no se encontraron diferencias significativas. Herbert *et al.*, (2005), encontraron que en los cultivares con un nivel más alto de AB, también presentaban un mayor contenido en aminoácidos libres en el mosto. Gálvez (2008) estableció que los factores que afectan la presencia de AB en el vino son el contenido de aminoácidos en la materia prima y la aplicación de aminoácidos en las diferentes técnicas de elaboración. Hay que destacar lo evaluado por Landete (2005), que establece que la biosíntesis de las AB comienza por la conversión de ornitina en putrescina por acción de la enzima ornitina descarboxilasa (ODC), siendo ésta fundamental en la regulación de la síntesis de las AB, y además una vía alternativa para la síntesis de la putrescina, que implica a la enzima arginina descarboxilasa (ADC), cuyo sustrato es el aminoácido arginina y la descarboxilación de éste produce agmatina, que puede ser transformada directamente a putrescina por las BL, con actividad enzimática de agmatina deiminasa o indirectamente mediante la formación del intermediario N-carbamilputrescina y la acción secuencial de las enzimas agmatinasa y N-carbamilputrescina hidrolasa, que en este estudio son relevantes dado que los tratamientos estudiados en esta tesis, poseen los aminoácidos arginina y ornitina. Como ya se ha comentado, la descarboxilación de un aminoácido para originar su correspondiente amina y dióxido de carbono, genera energía metabólica y regula el pH intracelular.

En la segunda etapa, y con una significancia del 5% no se encontraron diferencias significativas para ninguno de los factores. Pero la interacción entre los factores pH y contenido de ácido málico y con la misma significancia del 5%, se encontró diferencias significativas con un valor de p de 0,0019 y que aunque por sí solo no son significantes, su interacción si lo es. Farías *et al.* (1993) encontraron que la máxima actividad de las enzimas descarboxilasas en la formación de las AB ocurría a pH 4,0 y que el ácido málico aumentaba dicha actividad.

1.4. Tiramina

Esta amina biógena fue la que se presentó en mayor cantidad en ambas etapas. Landete (2005), estableció que las especies productoras de los niveles más altos de tiramina eran

Lactobacillus brevis y *Lactobacillus hilgardii*. El menor promedio encontrado fue de 51,50 mg*L⁻¹ en el tratamiento 4 de la primera etapa, con pH 3,4, con una alta concentración de aminoácidos y 5 g*L⁻¹ de ácido málico. El mayor promedio encontrado en la primera etapa fue de 92,25 mg*L⁻¹ en el tratamiento 5 con pH de 3,9, baja concentración de aminoácidos y 2 g*L⁻¹ de ácido málico. El menor promedio encontrado en la segunda etapa fue de 42,02 mg*L⁻¹ en el tratamiento 1, con un pH de 3,4, una baja concentración de aminoácidos y 2 g*L⁻¹ de ácido málico. El mayor promedio encontrado fue de 65,08 mg*L⁻¹, con un pH de 3,9 y menor concentración de aminoácidos de acuerdo a como se observa en la figura 10. Estos valores son muy superiores a los encontrados por Gálvez (2008), quién en el cv. Cabernet Sauvignon encontró valores de 1,27 mg*L⁻¹ y en Chardonnay 0,72 mg*L⁻¹. También, son valores muy superiores a los encontrados por Salinas (2009) en los cvs Merlot y Carménère, con concentraciones de 1,47 mg*L⁻¹ y 2,25 mg*L⁻¹, respectivamente. Los valores encontrados superan los 25 mg*L⁻¹ en ambas etapas y que para Rivas-Gonzalo y Mariné (1983) son mencionados como nivel tóxico para la salud humana. En general, esta amina biógena no es producida comúnmente por las bacterias lácticas, sin embargo, algunas cepas de *Lactobacillus hilgardii* se encuentran dentro de las que expresan el gen para la descarboxilación de la tirosina (König *et al.*, 2009).

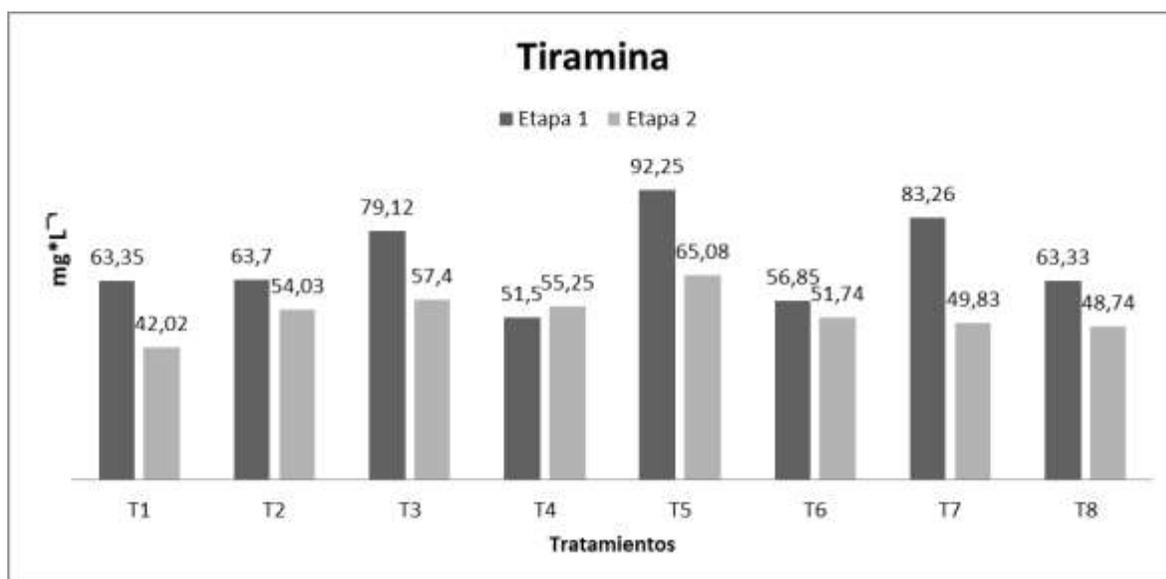


Figura 10. Comparación de promedios entre etapa 1 y etapa 2 de Tiramina.

Según el análisis estadístico, con un nivel de significancia del 5%, se encontraron diferencias significativas para el factor aminoácidos y para el factor pH en la primera etapa, con un valor de p 0,0002 y 0,0419, respectivamente. En la segunda etapa, con una significancia del 5% no se encontraron diferencias significativas para ninguno de los factores estudiados.

CONCLUSIONES

Según los resultados obtenidos en este estudio, se puede concluir lo siguiente:

- El pH favoreció la síntesis de Agmatina y Tiramina a inicios de la FML, además de la formación de Histamina, al final de la FML.
- La concentración de ácido málico aumentó la síntesis de Agmatina al final de la FML.
- La concentración de aminoácidos resultó ser un factor importante en la síntesis de Putrescina y Tiramina a inicios de la FML.
- La combinación de los factores pH (3,9), concentración baja de aminoácidos y 2 g*L⁻¹ de ácido málico, es la que provoca la mayor producción de Histamina, Putrescina y Tiramina.
- Condiciones extremas de pH, concentración de aminoácidos y ácido málico, pueden favorecer la producción de AB, pudiendo afectar las exportaciones y ser una barrera para futuros negocios por los límites en las concentraciones de las AB.

BIBLIOGRAFÍA

ANCÍN, C.; JIMÉNEZ, N. y GONZÁLEZ, A. 2007. Evolución de compuestos volátiles y de aminos biógenos en vinos envejecidos en barricas de roble. *Revista Enología* Sept/Oct.

ARENA, M. and MANCA DE NADRA, M. 2001. Biogenic Amine production by *Lactobacillus*. *Journal Applied Microbiology* 90 : 158-162.

BAUZA, T. and TEISSEDE, P. 1995. Les amines biogènes du vin. *Métabolisme et toxicité. Bulletin l' OIV* 68 : 42-67

BELL, S. and HENSCHKE, P. 2005. Implications of nitrogen nutrition for grapes, fermentation and wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 11 : 242-295.

BORDEAU, E. y J. SCARPA. 1998. *Análisis químico del vino*. Ediciones Universidad Católica de Chile. 253p

BOVER-CID, S.; IQUIERDO-PULIDO, M.; MARINÉ-FONT, A. and VIDAL-CAROU, M.C. 2006. Biogenic mono-, di- and polyamine contents in Spanish wines and influence of a limited irrigation. *Food Chemistry* 96: 43-47.

BROQUEDIS, M. ; DUMERY, B. et BOUCARD, J. 1989. Ise en evidence de polyamines (putrescine, cadaverine, nor-spermidine et spermine) dans les feuilles et les grappes de *Vitis vinifera* L. *Connaissance de la Vigne et du Vin* 23: 1-6.

CARRASCOSA, A.; MUÑOZ, R. y GONZÁLEZ, R. 2005. *Microbiología del vino*. Ediciones A. Madrid Vicente, España. 398p.

CILLIERS, J. and VAN WYK, C. 1985. Histamine and tyramine content in South African wines. *South African Journal of Enology and Viticulture* 6: 35-40.

COTON, E.; ROLLAN, G.; BERTRAND, A. and LONVAUD-FUNEL, A. 1998. Histamine-producing lactic acid bacteria in wines: early detection, frequency, and distribution. *American Journal of Enology and Viticulture* 49: 199–204.

DIVIES, C.; FEUILLAT, M.; CAVIN, J.F.; GUILLOUX-BENATIER, M. y GUZZO, J. 2000. Bacterias lácticas en enología. pp.323-340. In: Flanzy, C. (Ed). *Enología: Fundamentos Científicos y Tecnológicos*. AMV Ediciones, Madrid, España. 782p.

ENES-DAPKEVICIUS, M.; NOUT, M. and WYMENGA, W. 2000. Biogenic Amine formation and degradation by potencial fish silage starter microorganisms. *International Journal of Food Microbiology* 57: 107-114.

FERRER, S.; LANDETE, J.; POLO, L.; PARDO, I. 2007. Las bacterias y su repercusión sobre las aminas biógenas. In: Sesión 3 Las bacterias y los factores de calidad y Seguridad Alimentaria, 10p. Eduard Mata y Joan Aguado. Simposio internacional de Microbiología y calidad integral del vino. Vilafranca del Penedès, Barcelona, España 20-21 de Noviembre, 2007. Agencia Catalana de Seguridad Alimentaria y el Instituto Catalán de la Vid y el Vino. Barcelona, España. Disponible en: <http://www.gencat.net/salut/acsa/Du12/html/ca/dir1311/dd16608/15-p-ferrer.pdf> Leído el 10 de agosto de 2008.

FLANZY, C. 2000. *Enología: Fundamentos Científicos y Tecnológicos*. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, España. 783p.

FLEET, G. 1993. *Wine Microbiology and Biotechnology*. Harwood academic publishers. Sydney, Australia. 510 p.

GALVEZ, C. 2008. Aminas biógenas en vinos chilenos: Incidencia según el origen y microorganismos involucrados. Tesis de Magíster en Enología y Vitivinicultura. Facultad de ciencias Agronómicas, Universidad de Chile. 105p.

GANGA, M.; YAÑEZ, L.; ROMO, C.; MARTÍNEZ, C.; LAVÍN, A. and OYARCE. M. 2005. Aminas biogénicas en vinos chilenos. *Revista Vendimia* 45(7): 18-20.

GARDINI, F.; ZACCARELLI, A.; BELLETI, N.; FAUSTINI, F.; CAVAZZA, A.; MARTUSCELLI, M.; MASTROCOLA, D. and SUZZI, G. 2005. Factors influencing biogenic amine production by strain of *Oenococcus oeni* in model system. *Food Control* 16: 609-616.

GLORIA, M.; WATSON, B.; SIMON-SARKADI, L. and DAESCHEL, M. 1998. A survey of biogenic amines in Oregon Pinot noir and Cabernet Sauvignon wines. *American Journal of Enology and Viticulture*. 49: 279-281.

GOÑI, D. and AZPILICUETA, C. 2001. Influence of yeast strain on biogenic amines content in wines: Relationship with the utilization of amino acids during fermentation. *American Journal of Enology and Viticulture* 52: 185-190.

HERBERT, P.; CABRITA, M.J.; RATOLA, N.; LAUREANO, O. and ALVES, A. 2005. Free amino acids and biogenic amines in wines and must from the Alentejo region. Evolution of amines during alcoholic fermentation and relationship with variety, sub-region and vintage. *Journal of food Engineering* 66: 315-322.

HERNÁNDEZ-ORTE, P.; PEÑA-GALLEGO, A.; IBARZ, M.; CACHO, J. and FERREIRA, V. 2006. Determination of the biogenic amines in musts and wines before and after malolactic fermentation using 6-aminoquinolyl-*N*-hydroxysuccinimidyl carbamate as the derivatizing agent. *Journal of Chromatography A*, 1129: 160–164.

HLABANGANA, L.; HERNÁNDEZ-CASSOU, S. and SAURINA, J. 2006. Determination of biogenic amines in wines by ion-pair liquid chromatography and post-column derivatization with 1,2-naphthoquinone-4-sulphonate. *Journal of Chromatography A* 1130: 130-136.

HYÖTYLÄINEN, T.; SAVOLA, N.; LEHTONEN, P. and RIEKKOLA, M-L. 2001. Determination of biogenic amines in wine by multidimensional liquid chromatography with online derivatisation. *Analyst* 126: 2124-2127.

JARA, C. 2009. Desarrollo de métodos de biología molecular para el análisis directo de bacterias acéticas de vinagre. Tesis Doctoral. Departamento de Bioquímica y Biotecnología, Departamento de Enología, Universidad de Rovira y Virgili, Tarragona, España. 184 p

KÖNIG, H.; UNDEN, G.; and FRÖHLICH, J. 2009. Biology of Microorganisms on Grapes, in *Must and Wine*. 522p.

LANDETE, J. 2005. Estudio y caracterización molecular de la producción de aminas biógenas por parte de bacterias lácticas de origen enológico. Tesis Doctoral. Universidad de Valencia, Facultad de Ciencias Biológicas. Valencia, España. 178p.

LANDETE, J. ; FERRER, S. and PARDO, I. 2005a. Which lactic acid bacteria are responsible for histamine production in wine?. *Journal of Applied Microbiology* 2005: 39-44.

LANDETE, J. ; FERRER, S. and PARDO, I. 2007. Biogenic amine production by lactic acid bacteria, acetic bacteria, and yeast isolated from wine. *Food Control* 18: 1569-1574.

LEITÃO, M.C.; TEIXEIRA, H. C.; BARRETO CRESPO, M.T. and SAO ROMÃO, M.V. 2000. Biogenic amines occurrence in wine. Amino acid decarboxylase and proteolytic

activities expression by *Oenococcus oeni*. Journal of Agricultural Food and Chemistry 48: 2780-2784.

LEITÃO, M.; MARQUES, A. and ROMÃO, M. 2005. A survey of biogenic amines in commercial Portuguese wines. Food Control 16: 199-204.

LONVAUD-FUNEL, A. 1999. Lactic acid bacteria in the quality improvement and depreciation of wine. Antoine van Leeuwenhoek 76: 317– 331.

LONVAUD-FUNEL, A. 2001. Biogenic amines in wines: role of lactic acid bacteria. FEMS Microbiology Letters 199: 9-13.

MOLENAAR, D.; BOSSCHER, J.; TEN BRINK, B.; DRIESSEN, J. and KONINGS, W. 1993. Generation of a proton motive force by histidine decarboxylation and electrogenic histidine/histamine antiport in *Lactobacillus buchneri*. Journal Bacteriology 175: 2864-2870.

MORENO-ARRIBAS, M. 2007. Control de la formación de aminas biógenas durante la elaboración y crianza del vino. In: Sesión 2 Las levaduras y las repercusiones de su comportamiento metabólico, 13p. Eduard Mata y Joan Aguado. Simposio internacional de Microbiología y calidad integral del vino. Vilafranca del Penedès, Barcelona, España 20-21 de Noviembre, 2007. Agencia Catalana de seguridad alimentaria y el Instituto Catalán de la Vid y el vino. Barcelona, España. Disponible en: <http://www.gencat.net/salut/acsa/Du12/html/ca/dir1311/dd16608/11-p-moreno.pdf>. Leído el 11 de Agosto de 2008.

MORENO-ARRIBAS, M. and POLO, C. 2008. Wine Chemistry and Biochemistry. 736 p.

NAVASCUES, E. 2005. Aminas biógenas en el vino. Estrategias para evitar su generación. Viticultura/Enología profesional. Vol. 97: 29-37.

ORGANIZACIÓN INTERNACIONAL DE LA VIÑA Y EL VINO (OIV). 2005. Codex Enológico Internacional. Disponible en: http://news.reseau-concept.net/images/oiv_es/Client/CODEX_2006_ES.pdf. Leído el 10 de noviembre de 2010.

OUGH, C.S. ; DAUDT, C. E. and CROWELL, E. A. 1981. Identification of new volatile amines in grapes and wines. *Journal of Agricultural Food and Chemistry* 29: 938-941.

PÉREZ, J. 2006. Resultados de aminas biógenas en vinos de variedades canarias. In: Antonia Bellido, Ruth Lozano. Gobierno de Canarias. III Jornadas Enológicas de Canarias. Lanzarote, Canarias, España. 29-30 Junio, 1 de Julio. Disponible en: <http://www.gobiernodecanarias.org/agricultura/icca/jornadas/enologicas/ponencias/juanpedroperez.pdf>. Leído el 10 de noviembre de 2007.

PEREZ DE ARCE, F. 2010. Efecto de la concentración de fosfato diamónico y etanol sobre el contenido de aminas biógenas en vino. Memoria de Título para optar al grado de Ingeniero Agrónomo. Facultad de ciencias Agronómicas, Universidad de Chile. 29p.

POLO, C. y MORENO-ARRIBAS, M.C. 2005. Origen de las aminas biógenas del vino y métodos de cuantificación. Disponible en: http://www.acenologia.com/ciencia70_02.htm. Leído el 10 de diciembre de 2007.

PRAMATEFTAKI, P.V; METAFI, M.; KALLITHRAKA, S. and LANARIDIS, P. 2006. Evolution of maloláctica bacteria and biogenic amines during spontaneous maloláctica fermentations in a Greek winery. *Letters in Applied Microbiology* 43: 155-160.

QUINTERO, Y. 2010. Análisis de la expresión génica del metabolismo oxidativo del etanol como indicador de recuperación de cepas para la elaboración de vinagres. Tesis Doctoral. Departamento de Bioquímica y Biotecnología, Universidad de Rovira y Virgili, Tarragona, España. 129 p

RADLER, F. and FÄTH, K.P. 1991. Histamine and other biogenic amines in wines. Pp. 185-195. In: International Symposium on Nitrogen in Grapes and Wine. Davis, California, EEUU

RIVAS-GONZALO, J. y MARINÉ, A. 1983. Migrañas de orden alimentario: Aspectos relacionados con la Tiramina. Circular Farmacéutica 278: 1-6

ROLLAN, G. ; COTON, C. and LONVAUD-FUNEL, A. 1995. Histidine decarboxylase activity of *Leuconostoc oenos* 9204. Food Microbiology 12: 455-461.

ROMERO, R.; SANCHEZ-VIÑAS, M.; GÁZQUEZ, D. and BAGUR, M.G. 2002. Characterization of selected Spanish table wine samples according to their biogenic amine content from liquid chromatographic determination. Journal of Agricultural and Food Chemistry 50: 4713-4717.

SASS-KISS, A.; SZERDAHELYI, E. and HAJOS, G. 2000. Study of biologically active amines in grapes and wines by HPLC. Chromatographia 51: 316–320.

SALINAS, P. 2009. Perfil de aminas biógenas en vinos de los cvs. Merlot y Carmenere provenientes de cinco regiones vitivinícolas. Tesis de Magíster en Enología y Vitivinicultura. Facultad de ciencias Agronómicas, Universidad de Chile. 49p.

SILLA SANTOS, M. 1996. Biogenic amines: their importance in foods. International Journal of Food Microbiology 29: 213–231.

SUOFLEROS, E.H.; MARIE-LYSE, B. and BERTRAND, A. 1998. Correlation between the content of biogenic amines and other wine compounds. American Journal of Enology and Viticulture 49: 266-277.

SOUFLEROS, E.H. ; BOULOUMPASI, E.; ZOTOU, A. and LOUKOU, Z. 2007. Determination of biogenic amines in Greek wines by HPLC and ultraviolet detection after dansylation and examination of factors affecting their presence and concentration. Food Chemistry 101: 704-716.

VIADER, R. 2003. Contaminantes de origen biológico. Código de Buenas Prácticas para su reducción o eliminación. Revista Tecnología del Vino. Sept/Oct 39-44.

VOIGT, M. and EITENMILLER, R. 1978. Role of histidine and tyrosine descarboxylases and mono and diamine oxidases in amine build-up in cheese. Journal of Food Protection 41: 182-186.

WOLLER, R. 2005. Aminas biogénas: presencia en el vino y efectos en el organismo. ACE Revista de Enología. Disponible en: http://www.acenologia.com/ciencia70_2.htm leído el 30 de agosto de 2008.

ZOECKLEIN, B., FUGELSANG, K., GUMP, B. y NURY, F. 2001. Análisis y producción de vino. Editorial Acribia, Zaragoza, España. 613 p.

ANEXOS**Anexo 1. Medio V 50 (vino sintético).****Composición:**

- Extracto de levadura 0,4 %
- Glicerol 0,2 %
- K_2HPO_4 0,05 %
- $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,05 %
- $MnSO_4 \cdot H_2O$ 0,02 %
- $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0,01 %
- Acetato de Sodio 0,1 %
- Ácido Tartárico 0,2 %
- Ácido Málico 0,2 y 0,5 %
- Etanol 14 %

Anexo 2. Método de Determinación de Aminas Biógenas

Materiales y Reactivos

- Vaso precipitado 100 mL
- Membrana filtrante 0,22 μ m
- Tubos eppendorf 1 mL
- Centrifuga (tubos eppendorf 1mL)
- Agitador (Tubos eppendorf)
- Micro pipeta 100 μ L
- Kit derivatizante (incluye Buffer Borato, Reactivo Acetonitrilo, reactivo derivatizante)
- Insertos 150 μ L
- Acetato de Sodio trihidrato
- Trietilamina
- Metanol
- Agua destilada
- Equipo filtración fase móvil
- HPLC con detector Fluorescencia
- Derivatizante

Condiciones Cromatográficas

- Modo: Gradiente
- Columna: Luna 5u C18 100A, 250x4,6mm
- Fase móvil: Solvente A: Tampón acetato/TEA, pH.- 5,05
- Solvente B: Metanol

Gradiente:

Tiempo	%Solv. A	%Solv. B
0	80	20
5	80	20
17	60	40
42	35	65
50	15	85
55	0	100
60	0	100
62	80	20
70	80	20

- Flujo: 1mL/min.
- Temperatura Horno: 65 °C
- Volumen inyección: 5 μ L
- Detección: Ex: 250nm, Em: 395nm

• **Preparación Tampón Acetato / Trietilamina pH.5.05**

Pesar 26,6 g de Acetato de Sodio trihidrato y disolver en 700 mL de agua destilada, agregar 2,4 mL de Trietilamina, agitar por cinco minutos con agitador magnético. Ajustar el pH introduciendo el electrodo de un peachimetro previamente calibrado llevando a pH 5,05, utilizando una solución de ácido fosfórico al 85%. Llevar a 1000 mL con agua destilada, agitar por 10 minutos para homogeneizar. Filtrar por membrana 0,22 μ m de poro.

• **Preparación Derivatizante**

Medir exactamente con una micropipeta 1 mL de reactivo diluyente 2B (Kit), agregarlo en el frasco 2A (Kit), previamente agitado para desprender el polvo reactivo de las paredes, agitar el tiempo necesario para disolver completamente el reactivo, en caso de ser necesario poner el frasco en incubadora por algunos minutos a 30° C para ayudar a la disolución.

- **Preparación muestras pre-derivatización.**

Inicialmente homogeneizar la muestra a analizar. Tomar 10 mL y centrifugarla en un tubo eppendorf de capacidad adecuada a 3500 rpm durante 15 minutos. Del sobrenadante filtrar 1 mL a través de membrana 0,22 μm de diámetro. Posteriormente de ésta solución diluir 1:5 con agua destilada en un tubo eppendorf, para ello tomar con micro pipeta 200 μL de muestra agregando luego 800 μL de agua destilada. Cerrar luego el tubo eppendorf y mezclar con un agitador mecánico por algunos segundos. Finalmente filtrar nuevamente a través de membrana 0,22 μm .

- **Derivatización de muestras**

De la muestra obtenida en el punto anterior, tomar exactamente en un tubo eppendorf de 1.5 mL, 20 μL de muestra, agregar inmediatamente 50 μL de Buffer Borato (Kit) y agitar en un vortex por aproximadamente 15 segundos. Agregar posteriormente 30 μL de derivatizante AQC (Kit) y agitar por 15 segundos más. Esperar un par de minutos para asegurar la reacción y luego traspasar la solución final a un inserto puesto en el interior de un vial (Poner cuidado que el inserto quede libre de burbujas en la parte inferior).

- **Derivatización Estándares Aminas Biógenas**

Preparar a partir de las soluciones madres de estándares concentraciones medias en agua destilada para luego derivatizar. Tomar exactamente en un tubo eppendorf de 1,5 mL, 20 μL de estándar, agregar inmediatamente 50 μL de Buffer Borato (Kit) y agitar en un vortex por aproximadamente 15 segundos. Agregar posteriormente 30 μL de derivatizante Aqc (Kit) y agitar por 15 segundos más. Esperar un par de minutos para asegurar la reacción y luego traspasar la solución final a un inserto puesto en el interior de un vial (Poner cuidado que el inserto quede libre de burbujas en la parte inferior).

- **Preparación solución estándares**

Para efecto de cuantificar cada amina se realizará rectas de calibrado, las cuales deberán ser hechas para cada uno de los compuestos en particular. Preparar una solución madre a una

concentración de 1000 ppm en medio acuoso, luego tomar una alícuota de 0,2 μ L en un matraz aforado de 10 mL, enrasar con agua destilada.

Proceder a derivatizar, colocando 20 μ L de estándar en un tubo eppendorf de 1,5 mL, agregar 60 μ L buffer Borato y agitar por algunos segundos en el vortex. Finalmente agregar 30 μ L de derivatizante, agitar por algunos segundos en el vortex e inyectar.

(ppm)	ug	Vol Iny (μL)
0.25	0.005	0.25
0.50	0.010	0.50
0.75	0.015	0.75
1.00	0.020	1.00
1.50	0.030	1.50
2.00	0.040	2.00
5.00	0.100	5.00
10.00	0.200	10.00
15.00	0.300	15.00
<u>20.00</u>	<u>0.400</u>	<u>20.00</u>

• **Factores de conversión a compuestos base**

Compuesto	Factor
Etilamina HCl	0,5524
Metilamina HCl	0,4594
Triptamina HCL	0,8144
Agmatina Sulfato	0,5794
Tiramina HCL	0,7898
Histamina 2HCL	0,6034
Putresina 2HCL	0,5468
Cadaverina 2HCL	0,572

- **Orden de elusión en el Cromatograma**

Histamina

Agmatina

Metilamina

Etilamina

Tiramina

Putresina

Cadaverina

Triptamina

Anexo 3. Método de Determinación de Ácidos Orgánicos

Materiales y Reactivos

- Dihidrógeno Fosfato de Potasio
- Ácido fosfórico
- Metanol
- Agua Bidestilada
- Pipeta graduada 10 mL
- Pipeta aforada 2 mL
- Matraz aforado 10 mL
- Columnas extracción fase sólida C-18

Condiciones Cromatográficas

- Modo: Isocrático
- Fase Mobil: Buffer KH_2PO_4 0,1 M pH:3,0
- Flujo: 1 mL/min
- Columna: Discovery RP Amide C16 25x4.6, 5 μm
- Temperatura Horno: 30° C
- Detección: DAD 220nm
- Vol. Inyección: 20 μL

• **Preparación Buffer Fosfato pH 3.0**

Pesar 13.6 g de KH_2PO_4 en 800 mL de agua bidestilada, disolver en un agitador mecánico, ajustar luego a pH 3,0 con ácido fosfórico concentrado. Aforar a 1000 mL con agua bidestilada.

• **Activación columnas extracción**

Hacer eluir 1 mL de Metanol (grado HPLC) y luego 10 mL de agua bidestilada completamente.

- **Extracción ácidos orgánicos**

Una vez activada la columna de extracción en fase sólida, inicialmente centrifugar 25 mL de muestra a analizar por 10 minutos a 3000 rpm. Con pipeta aforada tomar 2 mL del sobrenadante y colocarlas en la columna de extracción. Recoger la solución eluída en un matraz aforado de 10 mL. Lavar la columna de extracción con 2 mL de solución buffer fosfato pH 3,0 y dejar eluir completamente recibiendo en el mismo matraz de 10 mL. Aforar el matraz con solución Buffer fosfato pH 3,0 y agitar. Finalmente filtrar por membrana 0,22 μ m de diámetro de poro. Luego inyectar.

- **Orden de elusión ácidos orgánicos**

Compuesto	Tiempo retención (min)
Acido Tartárico	3,2 min
Acido Málico	3,7 min
Acido Láctico	4,1 min