



Comparación Influencia de factores de importancia enológica en la actividad de las enzimas amino oxidasas

Sara Callejón¹, Sergi Ferrer¹, Isabel Pardo¹

¹ENOLAB. Dpt. de Microbiología i Ecologia, Universitat de València. 46100. Burjassot-Valencia. 963543145.
e-mail: Sara.Callejon@uv.es

Resumen

Dado que algunas prácticas enológicas actuales favorecen la presencia de aminas biógenas en los vinos, y que éstas constituyen un problema de salud pública que impide la buena comercialización de los vinos, hemos desarrollado una estrategia que disminuye su cantidad una vez producidas. Esta estrategia supone la utilización de enzimas amino oxidasas que transforman las aminas en derivados no tóxicos.

En el presente trabajo se ha estudiado la influencia de diversos factores físico-químicos de importancia enológica sobre la actividad de cuatro amino oxidasas, con el fin de aplicarlas si fuera posible a la degradación en vino. Los factores estudiados han sido: SO₂, temperatura, pH, etanol, glucosa, fructosa y ácidos orgánicos. El método utilizado para este estudio ha sido un método fluorimétrico miniaturizado en microplaca.

En general teniendo en cuenta los resultados detallados, los factores que estimulan la actividad son, la fructosa, y algunos ácidos como el cítrico y láctico a concentraciones moderadas en un enzima en concreto. Los que disminuyen la actividad son los ácidos en general, la glucosa y el SO₂. La actividad varía en función del pH, y el etanol no parece afectar en la mayoría de los casos, aunque en algún caso se ha mostrado ligeramente estimulador.

Palabras clave: Amino oxidasa, Aminas biógenas.

1. Introducción

Las aminas biógenas son bases orgánicas de bajo peso molecular que se forman frecuentemente en alimentos y bebidas fermentados [1, 2]. Estos compuestos pueden causar algunos problemas de salud en el hombre si se encuentran en alta concentración: dolores de cabeza, alteraciones respiratorias, palpitaciones, hiper o hipotensión, náuseas, rubores, sudoración, enrojecimiento y calores súbitos [2]. Los niveles de toxicidad de las aminas son muy difíciles de establecer, porque dependen de las características de cada individuo y de la presencia de otras aminas o compuestos en el alimento que aumenten sus efectos, como es el caso del etanol [1].

El vino es considerado como la bebida de mayor consumo a nivel mundial, especialmente en aquellos países con una importante actividad vitícola. En la actualidad, el vino de mayor aceptación es el tinto, seguido por el blanco y el rosado. Aunque el vino blanco fue preferido durante mucho tiempo, en los últimos años se produjo un aumento en el consumo de vino tinto, debido a que éste parece tener la propiedad de reducir el riesgo de desarrollar afecciones coronarias, como consecuencia de la disminución en la concentración del colesterol sanguíneo.

La mayoría de vinos tintos y algunos vinos blancos se someten a fermentación maloláctica y procesos de crianza que pudieran facilitar o al menos permitir la formación de aminas biógenas.

Además de los problemas de la salud, la presencia de elevadas concentraciones de aminas en vinos puede suponer una barrera a la exportación, ya que varios países se están planteando establecer límites recomendados a los contenidos de histamina de los vinos mientras que en otros, como Suiza, ya se ha hecho. No existe un valor promedio del límite máximo permisible de aminas biógenas en vinos por la Unión Europea, encontrándose en cada país distintos valores aceptados como niveles máximos: en Alemania 2

mg/L, Bélgica 5-6 mg/L, Suiza y Austria 10 mg/L, Francia 8 mg/L y en Holanda 3 mg/L, sin lograrse un consenso en cuanto a este parámetro.

Todas las aproximaciones utilizadas hasta ahora en vino para evitar el problema de la contaminación por aminas se han basado en evitar su producción, pero nosotros hemos abordado otra forma de solucionar la contaminación de aminas *a posteriori*, que consiste en eliminar las aminas que se hayan formado a lo largo del proceso de vinificación.

Esta aproximación consiste en el uso de enzimas oxidasas. En este sentido, existen varias patentes en las cuales se describe la utilización de enzimas aislados de distintas fuentes, como órganos animales [3, 4, 5] o microorganismos [6, 4]. En 1985 se describe la preparación y el uso de la amino oxidasa de *Aspergillus niger* IM117454 en queso, cerveza, mosto o extracto de levadura. Según esta patente, este enzima sería toxicológicamente seguro, y podría incluirse en alimentos. Sin embargo, aunque los autores mencionan que esta oxidasa se podría utilizar en el mosto antes de la fermentación, no proporcionan datos acerca de su efectividad en mosto ni de su aplicación en vino, la cual parece dudosa teniendo en cuenta que este enzima poseen unos valores de pH óptimo cercanos a la neutralidad, o incluso alcalinos. Lo mismo ocurre con otros que se han empleado para eliminar aminas en embutidos [7]. Estos trabajos arriba mencionados no demuestran ser realmente útiles para la enología por ello nosotros hemos considerado en este estudio los principales sustratos que componen el vino para observar la respuesta que tienen las distintas amino oxidasas a las condiciones habituales en vinos.

2. Material y Métodos

Hemos utilizado 4 enzimas de amino oxidasas y hemos comprobado su actividad frente a la adición de distintas concentraciones de los sustratos a ensayar. Se han estudiado los efectos de azúcares, ácidos orgánicos, SO₂, pH, etanol y temperatura tras incubación de una hora con el enzima en tampón fosfato sódico 0.25 M a pH 7.5 para los sustratos, temperatura y etanol, y con el mismo tampón pero con una concentración de 50 mM a distintos pH para determinar la actividad en función de este parámetro. Los sustratos de origen ácido se han neutralizado con NaOH para no sumar el posible efecto de bajada del pH.

2.1. Reacciones de degradación con sustratos de importancia enológica.

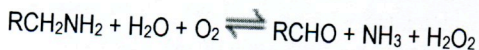
Se diluyeron 10 L de la solución enzimática en 80 L de tampón fosfato sódico, se le adicionaron 10 mg/L de tiramina y 10 L del metabolito objeto de estudio 10 veces concentrado para obtener para cada sustrato las concentraciones deseadas (Tabla 1) y se incubaron durante 1 hora a 28°C para los experimentos de los sustratos, y a las temperatura a las indicadas en la tabla anexa para los efectos de dicho parámetro.

Tabla 1. Concentraciones finales de los sustratos ensayados

Parámetro	Condiciones ensayadas
pH	3-8 (unidades de pH)
Glucosa	2-5-25 (g/l)
Fructosa	1-1,5-2-5-25 (g/l)
Ac. Láctico	0,5-1-2,5-5 (g/l)
Ac. Cítrico	0,2-0,4-0,6-0,8-1 (g/l)
Ac. Tartárico	1-2-4-5-10 (g/l)
Ac. Málico	0,5-1-2-3-5-10 (g/l)
SO ₂	5-10-25 (mg/l)
Etanol	4-8-12 (%)
Temperatura	4-15-28-37 (°C)

2.1. Detección de la actividad enzimática.

Tras la incubación de la reacción se procedió a realizar la cuantificación de las actividades usando un método fluorimétrico miniaturizado y desarrollado en este laboratorio, basado en la detección de agua oxigenada como producto de degradación de la amina por el enzima:



3. Resultados y Conclusiones

Los datos se han obtenido en tanto por ciento tomando como punto de partida el 100% de actividad resultante de la solución de enzima que ha realizado la reacción de degradación sin ningún sustrato añadido (Figura 1).

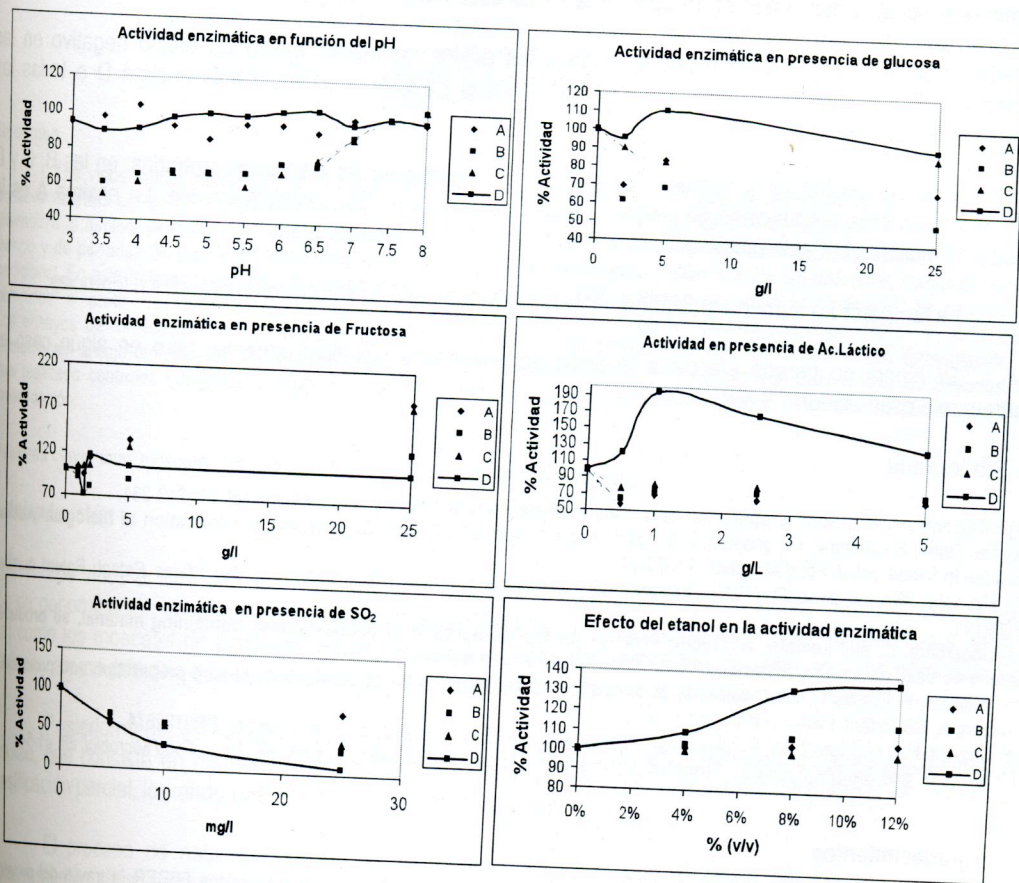


Figura 2. Efecto de los distintos parámetros en la actividad enzimática.

En cuanto al efecto del pH las enzimas A y D muestran pocas diferencias para los pH ensayados ya que la actividad no disminuye por debajo del 85%. Las enzimas B y C son más dependientes del pH pero en ningún caso baja la actividad por debajo del 50% para el pH del vino.

El efecto de la glucosa es en tres de las enzimas ensayadas negativo bajando la actividad, y en concreto en dos de ellas el descenso de actividad es mayor para las concentraciones más pequeñas ensayadas. El mínimo de actividad alcanzado es del 50%, sólo una de las enzimas ensayadas responde positivamente al efecto del azúcar, estimulando ligeramente su actividad a una concentración de 5 g/L. La fructosa estimula la actividad progresivamente conforme aumenta la concentración ensayada en tres de las enzimas probadas, la otra mantiene invariable su actividad entorno al 100%.

En cuanto a los ácidos ensayados, el láctico en tres de las enzimas disminuye la actividad y este

efecto es mayor a la menor concentración ensayada; aun así las actividades no llegan a estar por debajo del 70% para las mayores concentraciones. En la enzima D el efecto es todo lo contrario a lo dicho anteriormente: es estimulador a cualquier concentración de las ensayadas.

Los mismos resultados se han obtenido para el ácido tartárico, llegando las tres enzimas que disminuyen su actividad al 80% para la mayor concentración. La enzima D es estimulada pero en menor medida que antes.

La respuesta frente al ácido cítrico ha sido igual que las de los dos ácidos anteriores: las enzimas A, B y C disminuyen su actividad hasta el 40-60%, y la D es estimulada hasta 0.6 g/L. Concentraciones mayores provocan una disminución hasta el 20%.

El ácido málico tiene el mismo efecto que todos los ácidos anteriores: ejerce un efecto negativo en las enzimas A, B y C, que disminuyen su actividad hasta el 80-95%, y estimula a la enzima D a todas las concentraciones ensayadas.

El efecto del SO₂ es el que tiene un efecto más negativo en las 4 enzimas probadas: en las B, C y D este efecto es más pronunciado llegando a niveles de 50, 40 y 10% respectivamente. La enzima A es la menos perjudicada por este efecto a las mayores concentraciones ensayadas.

La temperatura aumenta paulatinamente la actividad pero no se observan grandes diferencias.

El etanol no parece afectar a la actividad enzimática significativamente, pero en algún caso es ligeramente estimulador.

4. Bibliografía

- [1] Silla Santos, M.H. (1996). **Biogenic amines: their importance in foods**. *Int. J. Food Microbiol.* 29: 213-231.
- [2] Ten Brink, B.; Damink, C.; Joosten, H.M., and Huis in't Veld, J.H. (1990). **Occurrence and formation of biologically active amines in foods**. *Int. J. Food Microbiol.* 11: 73-84.
- [3] Hiemenz, W. and Setz, P. (1942). **Process of making histaminase preparations**. *United States Patent*. Patent number: 2289194.
- [4] Underberg, E. and Lembke, A. (1988). **Process for the preparation of amine-oxidase containing material, so produced amine-oxidase containing material**. *United States Patent*. Patent number: 4725540.
- [5] Williams, W.P. (1943). **Improvements in or relating to the production of stable histaminase preparation and process of making it**. *GB Patent*. Patent number: 551154.
- [6] Charles, H.J. and Georgina, A.D.A. (1985). **Amine removal**. *European Patent*. Patent number: EP0132674.
- [7] Suzzi, G. and Gardini, F. (2003). **Biogenic amines in dry fermented sausages: a review**. *Int. J. Food Microbiol.* 88: 41-54.

5. Agradecimientos

Este proyecto ha sido cofinanciado por el Ministerio de Educación y Ciencia y fondos FEDER (a través del proyecto AGL2006-08495) y por el Excmo. Ayuntamiento de Valencia.