



# EFECTO DE LA LISOZIMA, SO<sub>2</sub>, MICROOXIGENACIÓN, TIPO DE RECIPIENTE Y ADICIÓN DE CULTIVOS MALOLÁCTICOS SOBRE LA GENERACIÓN DE AMINAS EN VINOS DE TEMPRANILLO

Lucía Polo, Sergi Ferrer, Isabel Pardo

Dpto. Microbiología y Ecología. Facultad de Biología. Universidad de Valencia 963544390. Lucia.Polo@uv.es

## Resumen:

Las aminos biógenas son bases orgánicas de bajo peso molecular, que se forman con frecuencia en bebidas y alimentos fermentados y que pueden ser peligrosas para la salud. En vinos se han identificado putrescina, isoamilamina, histamina, tiramina, cadaverina y feniletilamina. Las aminos pueden estar presentes de forma natural en el mosto, pero también pueden ser formadas por las bacterias lácticas como consecuencia de la descarboxilación de los aminoácidos presentes en el mosto o en el vino. Las bacterias lácticas están presentes a lo largo de toda la vinificación. Se ha propuesto el uso de lisozima para controlar a la población láctica en determinados momentos, por ejemplo antes de utilizar cultivos malolácticos. Se ha descrito que la generación de aminos se ve propiciada en bodega y tras la fermentación maloláctica y que los cultivos comerciales pueden contribuir a disminuirlas. La microoxigenación es una técnica que ayuda a la estabilización del color de los vinos, pero de la cual se desconocen sus efectos sobre la microbiota y sobre la formación de aminos.

Los objetivos de este trabajo han sido: 1) analizar el efecto de la microoxigenación, adición de sulfuroso y lisozima y tipo de recipiente sobre la microbiota y generación de aminos.; 2) evaluar la efectividad del uso de cultivos malolácticos seleccionados para minimizar estos compuestos; 3) dilucidar en qué momento del proceso de vinificación se generan las distintas aminos biógenas y 4) determinar cuáles son las bacterias responsables de la generación de aminos.

**Palabras clave:** lisozima, bacterias lácticas, aminos biógenas, microoxigenación

## 1. INTRODUCCIÓN

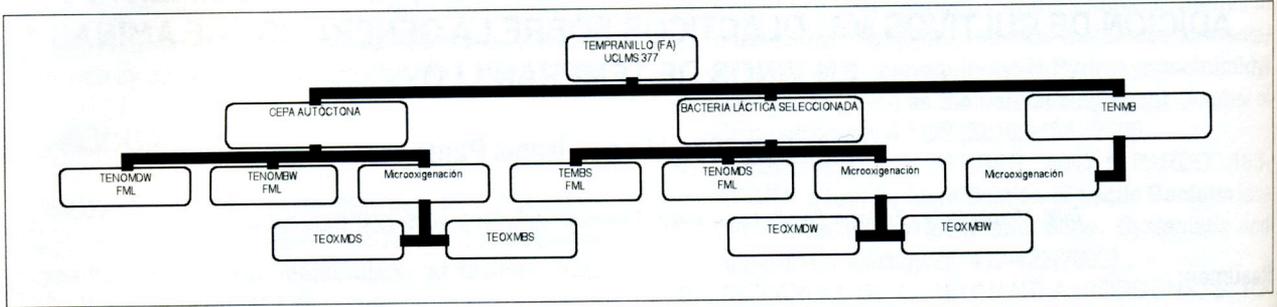
Las aminos biógenas (AB) son bases orgánicas de bajo peso molecular formadas frecuentemente en alimentos y productos fermentados. Estos compuestos causan problemas en la salud humana ingeridos en altas concentraciones [1]. Se han identificado veinticuatro aminos diferentes en vino, siendo las putrescina la más abundante [2]. Las aminos pueden estar presentes de forma natural en el mosto, pero también pueden formarse por las bacterias lácticas (BAL) durante la FML o envejecimiento por la descarboxilación de los aminoácidos presentes en el vino. La concentración de los aminoácidos depende de la variedad de uva, condiciones climáticas, composición del suelo [3] y maduración del grano [4, 5] y varía durante la vinificación. Algunos autores han demostrado que cepas pertenecientes a *Pediococcus parvulus*, *Oenococcus oeni*, *Lactobacillus hilgardii*, *Lactobacillus brevis* y *Lactobacillus buchneri* son capaces de producir histamina, tiramina, feniletilamina y cadaverina [6-11]. La aplicación de la lisozima para limitar el desarrollo de las BAL han mostrado resultados variables [12, 13]. El SO<sub>2</sub> utilizado en vinificación actúa inhibiendo el crecimiento de bacterias. Generalmente se asume que la generación de aminos es más importante en bodega y que se puede limitar con el uso de bacterias seleccionadas [16]. Aunque se han hecho muchos estudios sobre la microoxigenación de los vinos, éstos se han centrado en la estabilización del color pero no sobre la microbiota láctica. Los objetivos de este trabajo han sido estudiar la influencia que tienen la lisozima y el SO<sub>2</sub>, la microoxigenación, el tipo de recipiente en el que se realiza la

FML y la adición de cultivos malolácticos sobre la generación de aminos en vinos.

## 2. MATERIAL Y MÉTODOS

Los experimentos se realizaron durante la vinificación de un mosto de Tempranillo (D.O. Somontano). El mosto se inoculó a razón de 20 mg/L, con la levadura UCLMS 377 (Bio Springer Maisons-Alfort, Francia), y realizó la fermentación alcohólica (FA) en depósito. Tras la FA se adicionaron dosis distintas de sulfuroso (3-5 g/HL) y trascurridas 48 h la lisozima (20-50 g/HL) según el tipo de experimento (Fig.1). Posteriormente se microoxigenó en depósito con dosis de 60 mg/L/mes. El vino se distribuyó en depósito y barricas donde se realizó la fermentación maloláctica (FML) bien por las BAL autóctonas o bien por bacterias seleccionadas a razón de 5.8 mg/L (*V. oenos*, Christian Hansen, Hoersholm, DK) (Fig.1). Los vinos que realizaron la FML en depósito se distribuyeron posteriormente en barricas. Todos envejecieron por un periodo de 6 meses. Los momentos de muestreo fueron: mosto, antes de fermentación, tras fermentación alcohólica (FA), 48 h tras la adición de SO<sub>2</sub>, 48 h tras la adición de lisozima, tras FML, a los 2, 4 y 6 meses de crianza en bodega. El recuento de BAL se realizó por siembra en placas de MRS y MLO que se incubaron a 28° C durante 4-7 días, finalmente se procedió a un aislamiento de colonias que se identificaron a nivel de especie mediante 16S-ARDRA [14] y a nivel de cepa en el caso de *O. oeni* por RAPD, utilizando el cebador M13 [15]. Histamina, tiramina, putrescina, y cadaverina se cuantificaron mediante HPLC [17].

Fig.1. Esquema de trabajo para la adición y dosis de SO<sub>2</sub>, lisozima y microoxigenación.



TENOMDW: Tempranillo no oxigenado maloláctica en depósito con bacterias autóctonas. (3 g/HL SO<sub>2</sub>)  
 TENOMBW: Tempranillo no oxigenado maloláctica en bodega con bacterias autóctonas. (3 g/HL SO<sub>2</sub>)  
 TENOMBS: Tempranillo no oxigenado maloláctica en bodega con bacteria láctica seleccionada. (3 g/HLSO<sub>2</sub>+20 g/HL lisozima).  
 TENOMDS: Tempranillo no oxigenado maloláctica en depósito con bacteria láctica seleccionada. (3 g/HLSO<sub>2</sub>+20 g/HL lisozima).  
 TENONMB: Tempranillo no maloláctica bodega. (5 g/HL SO<sub>2</sub>+ 50 g/HL lisozima)  
 TEOXMBS: Tempranillo oxigenado maloláctica en bodega con bacteria láctica seleccionada. (3 g/HLSO<sub>2</sub>+20 g/HL lisozima).  
 TEOXMDS: Tempranillo oxigenado maloláctica en depósito con bacteria láctica seleccionada. (3 g/HLSO<sub>2</sub>+20 g/HL lisozima).  
 TEOXMBW: Tempranillo oxigenado maloláctica en bodega con bacterias autóctonas. (3 g/HL SO<sub>2</sub>)  
 TEOXNMB: Tempranillo oxigenado no maloláctica en bodega. (5 g/HL SO<sub>2</sub>+ 50 g/HL lisozima)

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1. Efectos de lisozima, SO<sub>2</sub> y microoxigenación sobre la población láctica y AB.

Se observó que la microoxigenación no influye en la evolución de la población láctica. El efecto de la lisozima es difícil de interpretar: solo se aprecia inhibición de crecimiento de BAL con las dosis más altas de lisozima (TENONMB). El SO<sub>2</sub> solo consigue reducir a la mitad la población láctica cuando se utiliza a dosis de 5 g/HL, dosis más bajas no muestran un efecto claro. Hay un aumento de BAL de aproximadamente dos órdenes de magnitud durante la FA, coincidente con un aumento de casi 2 mg/L de histamina, 1.5 mg/L de tiramina y putrescina y 0.2 mg/L de cadaverina (las responsables de su síntesis pueden ser las levaduras o las BAL). En mosto aparecen pequeñas poblaciones de *L. paracasei* (10<sup>3</sup> ufc/mL) y *Leuc. mesenteroides* (10<sup>2</sup> ufc/mL) que disminuyen en FA, mientras que dos cepas de *O. oeni*, V. oenos y S1, aparecen en elevadas concentraciones (10<sup>5</sup> ufc/mL) al final de FA. El uso conjunto de lisozima y SO<sub>2</sub> solo provoca una reducción de 1/3 la población de BAL cuando se emplean las dosis más altas de ambos casos. En el resto de casos ni uno ni otro disminuyen los recuentos.

#### 3.2. Efecto del tipo de recipiente y adición de cultivos malolácticos sobre la generación de AB.

La evolución de las AB desde FFA hasta FFML es que disminuye la histamina en aquellos vinos que fueron tratados con lisozima mientras que hubo un aumento en el resto de hasta 4.5 mg/L. Sin embargo, la putrescina aumento en todos los casos hasta 5.5 mg/L siendo mayor su incremento en los depósitos en los que no se añadió lisozima y relacionándose en este caso con un aumento de la población láctica. Las otras aminas aumentan ligeramente en todos los casos. Hay una implantación de la bacteria inoculada, y en los no inoculados coexisten S1 y V. oenos en concentraciones similares. Durante el envejecimiento hay una mayor pro-

ducción de histamina en vinos no inoculados que en inoculados. El aumento de la putrescina se produce por igual en inoculados y no inoculados y parece más alto en bodega que en depósito. Tiramina desciende en vinos en los que ha habido adición de lisozima y se mantiene o aumenta en los otros. La cadaverina aumenta ligeramente en todos los casos excepto en TENONMB. El incremento en histamina parece estar relacionado con la concentración de *O. oeni* durante el envejecimiento mientras que el aumento de putrescina parece estar relacionado con los recuentos de la cepa autóctona S2 en ese periodo. No se aprecia efecto de la inoculación en ese periodo. Hay un aumento de bacterias desde el final de la FA hasta el final de la FML en todos los casos, excepto en los casos en los que se previno. Se hallan recuentos del orden de 10<sup>8</sup> ufc/mL en aquellos vinos no inoculados que han hecho la FML, mientras que en los inoculados la población máxima alcanzada está entre 7.12 x 10<sup>6</sup> en bodega, y 3.2 x 10<sup>7</sup> ufc/mL en depósito de acero. Al final de la FML hemos detectado la presencia de las cepas V. oenos y S1 en cantidades muy semejantes en vinos no inoculados, mientras que en vinos inoculados sólo hemos detectado V. oenos.

Tabla 1. Efecto del sulfuroso y lisozima sobre la microbiota láctica.

	ufc/mL		
		48H SO <sub>2</sub>	48H LYS
MOSTO ANTES FA	2.40E+03		
FINAL FA	5.30E+05		
TENONMB		2.34E+05	1.71E+05
TENOMDS		3.55E+05	6.60E+05
TENOMBS		8.60E+05	2.59E+06
TENOMBW		5.40E+05	---

El muestreo realizado en el vino en el que se previno la FML al tiempo en el que los otros la finalizaron, demostró la presencia única de la cepa V. oenos en baja concentración (5.8 x 10<sup>4</sup> ufc/mL). Durante el envejecimiento, el número de BAL va decreciendo, y en la mayor parte de los casos no se detectan bacterias viables tras los dos primeros meses de envejecimiento (Tabla 2). Durante el envejecimiento aparece la cepa S2 de *O. oeni*, aunque su desarrollo es muy limitado y no supera en ningún caso las concentraciones de 10<sup>3</sup> ufc/mL; la



única excepción es del vino inoculado que llevó a cabo la FML en barrica, en el cual la cepa S2 alcanzó niveles de  $10^5$  ufc/mL. En todos los vinos en los que se observó la presencia de esta cepa se encontró una mayor cantidad de putrescina. Durante el periodo de crianza se han detectado aumentos notables en putrescina (entre 7-11 mg/L) e histamina (3.5-8.4 mg/L) en todos los casos. S2 es la cepa que produce mayor cantidad de putrescina, aunque también produce histamina y tiramina en menor cantidad. S1 también produce putrescina pero en menor cantidad que S2; V. oenos es una de las responsables del aumento de histamina. En este sentido, no se observan diferencias significativas entre la FML efectuada en depósito o en barrica para los vinos sin inocular, ni siquiera en relación a los tiempos de aparición de dichas AB. Sí que se observó un claro aumento de la putrescina cuando la FML se realizó en barrica y no en depósito en los vinos inoculados con V. oenos.

Tabla 2. Efecto tipo de recipiente, cultivos malolácticos y momentos de vinificación.

	FFML	20 días después FFML	2 meses	4 meses	6 meses
TENOMDS	3.20E+07	2.00E+04	9.00E+01	1	1.20E+02
TENOMDW	1.31E+08	2.51E+06	8.30E+03	4.60E+02	3.04E+03
TENOMBS	7.12E+06	7.60E+06	1.17E+04	0.00E+00	2.50E+02
TENOMBW	1.81E+08	1.02E+06	1.00E+04	1.05E+03	5.00E+01
TENOMNB	5.8E+04	3.00E+02	2.00E+01	0.00E+00	6.00E+02

No se aprecia influencia del tipo de recipiente sobre los recuentos obtenidos al final de la FML, ni sobre los tipos de cepas encontrados en ese momento, que son V. oenos y S1: en ambos tipos de recipientes aparecen ambas cepas. V. oenos aparece como cepa única al final de la FML en los vinos inoculados, independientemente de en qué tipo de recipiente haya tenido lugar esta fermentación, mientras que en los no inoculados se presenta asociada a S1 tanto en vinos que han realizado la FML en barrica como en depósito.

#### 4. CONCLUSIONES

1. No se aprecia efecto inhibitorio de la lisozima, solo recuentos más bajos en los experimentos con dosis de lisozima de 50 g/Hl.
2. La microoxigenación y el SO<sub>2</sub> no influyen en la evolución de la población láctica
3. La menores concentraciones de histamina en vinos inoculados podría relacionarse con la implantación de la bacteria comercial pero no explicaría la disminución que sufre esta amina desde FFA hasta FFML. Esto podría relacionarse con la adición de lisozima.
4. No se aprecia influencia del tipo de recipiente sobre los recuentos obtenidos a final de FML, ni sobre los tipos de cepas encontrados ni sobre el contenido de aminas.
5. La cepa S2 aparecida durante el envejecimiento es la mayor productora de putrescina.
6. El incremento en histamina parece estar correlacionado con la presencia de niveles medios o altos de V. oenos y S1 durante la crianza.

#### 5. BIBLIOGRAFÍA

1. TEN BRINK B. ET AL Occurrence and formation of biologically active amines in foods. *Int J Food Microbiol* 1990 11 73-84

2. LEHTONEN, P., **Determination of Amines and Amino Acids in Wine — A Review.** *Am. J. Enol. Vitic.*, 1996. 47: p. 127-133.
3. SPONHOLZ, W.R., **Nitrogen compounds in grapes, must and wine.** *In: Proceedings of the International Symposium on Nitrogen in Grapes and Wine.* ASEV ed., 1991.
4. HERNÁNDEZ-ORTE P. ET AL. **Relationship between Varietal Amino Acid Profile of Grapes and Wine Aromatic Composition. Experiments with Model Solutions and Chemometric Study.** *J. Agric. Food Chem.*, 2002. 50: p. 2891-2899.
5. FLANZY, C. C. POUX, **Note sur le teneur en acides aminés du moût de raisin et du vin en fonction des conditions de l'année.** *Ann. Technol. Agr.* 15, 303-309., 1965. 14: p. 87-91.
6. LANDETE, J.M., S. FERRER, I. PARDO, **Which lactic acid bacteria are responsible of histamine production in wine?** *Journal of Applied Microbiology*, 2005. 99(3): p. 580-586.
7. MORENO-ARRIBAS, V., ET AL., **Isolation, properties and behaviour of tyramine-producing lactic acid bacteria from wine.** *J. App. Microbiol.* 2000 . 88(4): p. 584-593.
8. GUERRINI, S., ET AL., **Biogenic Amine Production by Oenococcus oeni.** *Current Microbiology*, 2002. 44(5): p. 374-378.
9. ARENA, M.E.; M.C. MANCA DE NADRA, **Biogenic amine production by Lactobacillus.** *J. App. Microbiol.* 2001 90: 158-162.
10. MANGANI, S., ET AL., **Putrescine Accumulation in Wine: Role of Oenococcus oeni.** *Current Microbiology*, 2005. 51: 6-10.
11. MORENO-ARRIBAS, M.V., ET AL., **Screening of biogenic amine production by lactic acid bacteria isolated from grape must and wine.** *Int. J. Food Microbiol.* 2003. 84: 117-123.
12. GERBAUX V., ET AL., (1997). **Use of lysozyme to inhibit malolactic fermentation and to stabilize wine after malolactic fermentation.** *Am. J. Enol. Vitic.* 48:49-54.
13. SIEGEL, A. 2005. **Empleo de lisozima para postergar la fermentación maloláctica en vino Carménère.** Proyecto título Ingeniero Agrónomo, Pontificia Universidad Católica de Chile.
14. RODAS, A. M., S. FERRER, I. PARDO. 2005. **Polyphasic study of wine Lactobacillus strains: taxonomic implications.** *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55:197-207.
15. ZAPPAROLI, G., ET AL. 2000. **Genomic DNA fingerprinting of Oenococcus oeni strains by pulsed-field gel electrophoresis and randomly amplified polymorphic DNA-PCR.** *Curr. Microbiol.* 40:351-355.
16. RIBEREAU- GAYON, J., ET AL. 2000. **Handbook of Enology.** Vol I. *The microbiology of wine and vinifications.*
17. HERNÁNDEZ-ORTE P ET AL **Determination of the biogenic amines in must and wines before and after malolactic fermentation using 6-Aminoquinoly Carbamate (AQC) as the derivatizing agent.** *J Chromatogr. A.*1129 160-164 2006.