Zubía Monográfico 16-17 69-82 Logroño 2004-2005

INFLUENCIA DEL PH DE LA UVA EN LA CALIDAD DEL VINO Y EN LA FORMACIÓN DE AMINAS BIÓGENAS[1]

PILAR SANTAMARÍA[2]
CARMEN TENORIO[2]
CARMEN SOTA[2]
PATROCINIO GARIJO[2]
ANA ROSA GUTIÉRREZ[3]
ROSA LÓPEZ[2]

RESUMEN

La enología moderna no sólo exige elaborar vinos de calidad, sino también vinos beneficiosos para la salud, libres de histamina y otras aminas biógenas. Se ha pensado hasta el momento que una de las posibles actuaciones para disminuir este problema sería llevar a cabo la vinificación a pH bajo, para eliminar contaminaciones de bacterias lácticas con alta capacidad productora de aminas biógenas. En este trabajo se realizaron vinificaciones a tres pH distintos, conseguidos mediante modificación del pH de la uva con adición de carbonato cálcico. Una mayor acidez dio lugar a vinos con mayor intensidad de color y se encontraron pocas diferencias en la composición aromática y la calidad organoléptica. Se observó asimismo, que el pH de la uva influyó en la duración de la fermentación maloláctica, en la población de bacterias lácticas y también en la distribución de clones de la especie *Oenococcus oeni* que la dirigieron. Por otra parte, el consumo de aminoácidos durante la fermentación alcohólica fue menor a mayores pH, lo que pudo dar lugar a que la concentración en aminas biógenas fuera mayor en estas condiciones.

Palabras clave: pH, bacterias lácticas, aminoácidos, aminas biógenas.

Modern oenology not only means making fine quality wines, it also means wines which are good for the health, free, among other compounds, of histamine and other biogen amines. Until now it was believed that one possible ways of reducing its content could be to vinify with a low pH so as to eliminate contamination from lactic bacteria with a high capacity for producing biogen amines. In this study vinification experiments were conducted with three pH levels, achieved by altering the grapes'pH through the addition of calcium carbonate. Higher acidity led to wines with more depth of colour and microbiological stability, with few differences in the aromatic composition and organoleptic qualities. It was also noted that the pH of the grapes had an influence on the length of the malolactic fermentation, on the population of

1. Este trabajo ha sido cofinanciado con fondos FEDER por el Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias (I.N.I.A.), dentro del Proyecto de Investigación "VIN 03-047".

2. Servicio de Investigación y Desarrollo Tecnológico de La Rioja. Ctra Mendavia-Logroño NA-134, km 87.8. 26071 Logroño.

3. Departamento de Agricultura y Alimentación. Universidad de La Rioja.

lactic bacteria and also in the distribution of clones of the Oenococcus oeni *species which were responsible for this process. Furthermore, the consumption of amino acids during alcoholic fermentation was lower at higher pH levels, which could lead to a higher concentration of biogen amines in these conditions.*

Key words*: pH, lactic bacteria, amino acids, biogen amines.*

0. INTRODUCCIÓN

El vino es producto de una serie de transformaciones complejas tanto químicas como microbiológicas. La evolución del mosto a vino se lleva a cabo a través de la fermentación alcohólica, proceso realizado por levaduras. A esta primera transformación le sigue la llamada fermentación maloláctica (FML), producida por las bacterias lácticas (BL). Durante la misma, se produce la descarboxilación del ácido L-málico, dando lugar básicamente a ácido L(+)-láctico y CO_2, así como a otros productos secundarios. Ambos procesos microbiológicos son una contribución importante a la calidad final del producto.

La enología moderna no sólo exige elaborar vinos de calidad, sino también vinos beneficiosos para la salud, libres de compuestos tóxicos para el organismo humano, particularmente histamina y otras aminas biógenas.

El término aminas biógenas se aplica a una serie de compuestos formados en los alimentos por descarboxilación de los aminoácidos precursores, fundamentalmente por la acción de bacterias lácticas. Las más importantes en el vino son histamina, tiramina, putrescina y cadaverina (Coton *et al.*, 1999; Lonvaud-Funel A., 2001; Soufleros *et al.*, 1998). La histamina se origina por la degradación de la histidina (Coton *et al.*, 1998), la tiramina se produce por la descarboxilación de la tirosina (Eitenmiller *et al.*, 1978), la putrescina lo hace a partir de la arginina (Coton *et al.*, 1999; Soufleros *et al.*, 1998) y la cadaverina proviene de la descarboxilación de la lisina (Torrea y Ancín, 2001). Estos compuestos van aumentando a lo largo de la FML, por lo que se les puede relacionar claramente como dependientes de la misma (Soufleros *et al.*, 1998).

La mayor o menor formación de estos compuestos tóxicos durante el proceso de elaboración depende fundamentalmente de tres requisitos (Ten Brink *et al.*, 1990): disponibilidad de aminoácidos libres, presencia de microorganismos con actividad descarboxilasa y condiciones que permitan el crecimiento bacteriano y su actividad descarboxilasa. Por el momento, no parecen existir metodologías curativas capaces de eliminar las aminas biógenas una vez que se han producido, por lo que solamente las tecnologías preventivas pueden servir para este propósito.

Como propuestas para solucionar este problema existen varias, pero quizás las más importantes sean: la vinificación a pH bajo, que permite inhibir posibles contaminaciones de bacterias lácticas con alta capacidad productora de aminas biógenas, como son las cepas del género *Pediococcus* (Lonvaud-Funel y Joyeux, 1993); la utilización de bacterias seleccionadas para inducir la FML (Fuster y Krieger, 2002; Theodore y Gerland, 2002) y una nutrición integral pensada de manera que la adición de materia nitrogenada se debiera de realizar cuando sea estrictamente necesario (López *et al.*, 1995; Santamaría *et al.*, 1996 y 1997).

El pH es uno de los factores esenciales de la estabilidad biológica, especialmente en lo referente a las bacterias lácticas, de tal manera que puede llegar a ser un factor selectivo sobre las especies que participan en la microbiota de los vinos (Wibowo *et al.*, 1985), así como en la tasa de crecimiento, en la actividad maloláctica y en la naturaleza de los sustratos formados (Ribereau-Gayon *et al.*, 1998).

En este trabajo se pretende abordar la influencia que el pH de la uva tiene sobre el desarrollo de la FML, sobre la calidad de los vinos y sobre la formación de aminas biógenas.

1. MATERIAL Y MÉTODOS

Elaboración

El ensayo se realizó en la campaña de 2004 a partir de 2000 kg de uva de la variedad Tempranillo procedente de la Rioja Baja con las siguientes características analíticas: pH 3.40; Acidez total 6.97 g/l de ácido tartárico; Acido málico 3.00 g/l; Grado probable 15.0; Amonio 68 mg/l y Nitrógeno fácilmente asimilable 117 mg/l de N.

Después del despalillado, estrujado y sulfitado con 50 mg de SO_2/kg de uva, se añadió 150 mg/l de fosfato diamónico y se repartió homogéneamente la uva en tres depósitos de 600 litros. Dada la elevada acidez de la uva en dicha campaña, la modificación del pH no se realizó mediante adición de ácido tartárico (normal en la D.O.Ca de La Rioja), sino mediante adición de carbonato cálcico. Así, en primer depósito no se modificó el pH; en el segundo se añadió 1 g/l de carbonato cálcico, de manera que se obtuvo un pH de 3.55 y en el tercero se añadieron 1.97 g/l de carbonato cálcico para alcanzar un pH de 3.7.

Para llevar a cabo la fermentación alcohólica, se inocularon levaduras comerciales (Uvaferm VRB). Una vez finalizada, se procedió a un prensado suave y cada uno de los vinos de diferente pH se trasegó a 3 depósitos de 100 litros de capacidad. Tras la FML espontánea, se analizaron los vinos, se trasegaron y sulfitaron a razón de 30 mg/l de SO_2 y se volvieron a analizar al mes y después de 7 meses de conservación a 15ºC.

Recuento e identificación de bacterias lácticas

El recuento de BL se realizó en varios momentos durante la FML y a los siete meses después de la conservación del vino. Se llevó a cabo mediante siembra en placa de una dilución apropiada de la muestra de vino en medio MRS-agar modificado, e incubación a 30º C en jarras de anaerobiosis (Gas Pak System) durante un periodo de al menos 10 días.

En dos momentos: plena fermentación maloláctica (60% de degradación de ácido málico), y transcurridos 7 meses de la elaboración del vino, se aislaron de cada placa 20 colonias al azar para realizar la identificación de las bacterias. Para llevarla a cabo, se utilizaron las técnicas de microbiología clásica recomendadas en el manual Bergey (Holt *et al.*, 2000) y las pruebas API 50HCL (bioMérieux SA, Francia). Para identificar las cepas de *Oenococcus oeni (O. oeni)* se aplicó la técnica de PCR específica de esta especie (Zapparoli *et al.*, 1998). Para identificar clones de *O. oeni* se recurrió a la técnica de Electroforesis de campos pulsantes (PFGE), utlizando la enzima de restricción *SfiI* y el sistema CHEF-DR II de Bio-Rad, de acuerdo al método descrito por Birren *et al.* (1993).

Determinaciones analíticas

Los parámetros generales se analizaron utilizando los métodos establecidos por el Reglamento de la CEE Nº 2676/90 de la comisión de 17 de septiembre de 1990: "Métodos de análisis comunitarios del Sector del vino". Para el análisis de antocianos se utilizó el método propuesto por Ribereau-Gayon y Stronestreet (1965), basado en la decoloración de antocianos con bisulfito sódico. El porcentaje de antocianos

ionizados se determinó por el método propuesto por Glories (1978) y el índice de polimerización se analizó mediante el método propuesto por Ruiz (1999).

Los compuestos volátiles se analizaron por cromatografía de gases (Ortega *et al.*, 2001). Así se determinaron acetaldehído, acetato de etilo, alcoholes superiores (propanol, 1 butanol, isobutanol y alcoholes amílicos), 2 fenil etanol, acetatos de alcoholes superiores (acetato de isoamilo, acetato de hexilo, acetato de 2 fenil etilo), ésteres (propionato de etilo, isobutirato de etilo, butirato de etilo, hexanoato de etilo y octanoato de etilo), ácidos (ácido isobutírico, ácido butírico, ácido isovalérico, ácido hexanoico y ácido octanoico), diacetilo, acetoína, lactato de etilo y succinato de dietilo.

Los aminoácidos se analizaron por cromatografía líquida (HPLC), mediante inyección de los derivados formados con Orto-ftaldeheído (OPA) y 9-fluorenmetilcloroformato (FMOC). La separación se llevó a cabo mediante una columna Hypersil ODS de 4x250 mm y 5 µm de tamaño de partícula. Para la detección de los aminoácidos se utilizó un detector diode de array a 338 nm para la cuantificación de cistina y lisina (DAD HP Series 1100), mientras que el resto de los aminoácidos se cuantificaron mediante el detector de fluorescencia (FLD HP Series 1100) con una longitud de onda de excitación de 340 nm y de emisión de 450 nm. La fase móvil consistió en dos solventes: Solvente A: Tampón acetato (pH 7.2), 0.018% de trietilamina, 0.3% de tetrahidrofurano; solvente B: Agua, metanol, acetonitrilo (20:40:40 v/v/v).

Las aminas biógenas se determinaron mediante inyección de los derivados formados con Orto-ftaldehído (OPA) mediante método propuesto en el Ensayo de intercomparación H-2/04 del Ministerio de Agricultura en un cromatógrafo de líquidos HP Series 1100.

Análisis organoléptico

Se realizó por un panel de 8 catadores, utilizando una ficha de cata propuesta por el CIDA en la que entra a formar parte de manera cuantitativamente importante la preferencia del vino. En esta ficha, mayor valoración implica mejor calidad.

Análisis estadístico

Todos los resultados obtenidos se estudiaron estadísticamente mediante el análisis de varianza, para comprobar la existencia o no de diferencias significativas en función de los tratamientos realizados. En caso positivo, $p>0.05$, se utilizó el test de Tukey para la separación de medias. Se empleó el programa estadístico SYSTAT 7.0.

2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la fase inicial, la fermentación alcohólica fue más lenta a pH más bajo, pero más adelante su velocidad se igualó y los tres vinos elaborados a diferente pH completaron la fermentación en 10 días.

Evolución de la FML

La duración de la FML fue inversamente proporcional al pH (Figura 1). Así, la fermentación fue respectivamente 12 y 16 días más corta a pH alto que a los otros dos pH estudiados, resultados que están de acuerdo con los obtenidos por otros autores (Gerbaux, 1998). El recuento de bacterias (Figura 2) estuvo directamente relacionado con el pH. Así, a pH más elevado, la fase exponencial de crecimiento fue más rápida y el número máximo de bacterias alcanzado mayor.

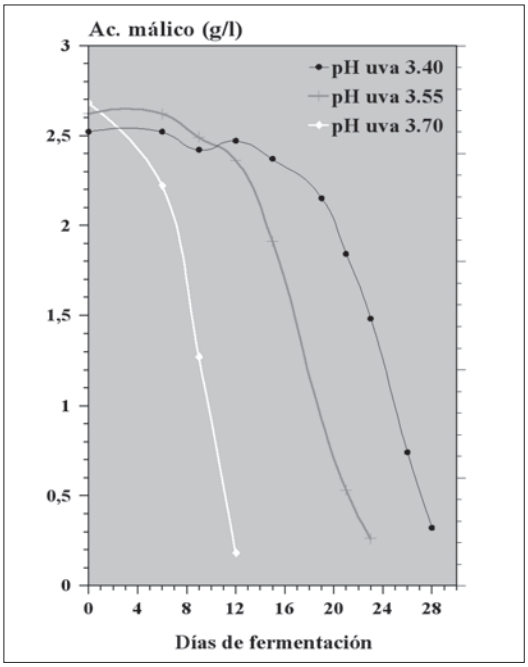

Fig. 1. Degradación del ácido málico durante la FML.

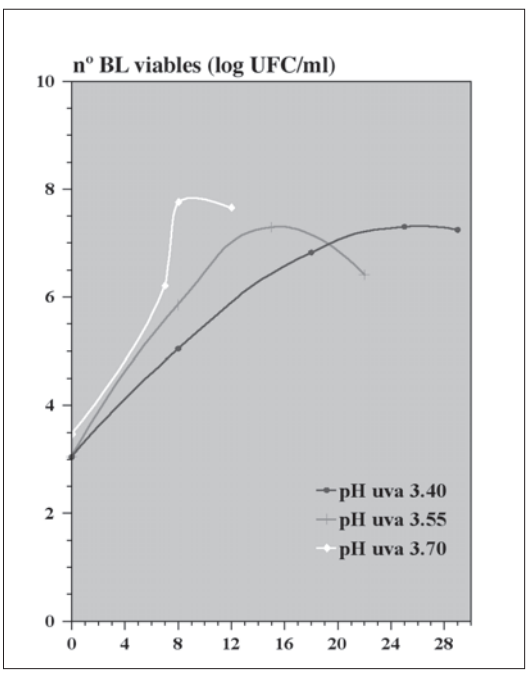

Fig. 2. Recuento de bacterias lácticas durante la FML.

Zubía Monográfico | *núm. 16-17 (2004-2005), pp. 69-82*
ISSN 1131-5423

Todas las colonias aisladas en el momento de plena fermentación (60% de degradación de ácido málico) pertenecieron a la especie *Oenococcus oeni*. Su identificación a nivel clonal mostró una distribución diferente de cepas, que fue dependiente del pH (Tabla 1). Así, a pH más bajo fue sólo un clon (clon B) el que dirigió la FML; a pH intermedio la proporción de este clon disminuyó considerablemente hasta alcanzar el 50%, apareciendo otros clones (C, D, E) en proporciones variables, mientras que al pH más elevado el clon B desapareció totalmente, destacando el clon D por su mayor proporción.

Por lo tanto, se observa que hay una estrecha relación entre los clones de *Oenococcus oeni* que llevan a cabo la FML y la acidez del vino, imponiéndose uno u otro en función del pH, probablemente por su mejor adaptación a las condiciones del medio. En trabajos realizados por otros investigadores (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1998) ya se había constatado el hecho de que en vinos menos ácidos, la flora láctica encontrada es no sólo más abundante, sino también más variada, pero no tenemos constancia de la existencia de estudios referentes a la distribución de clones de *O. oeni* en función del pH.

Características analíticas de los vinos

Al finalizar la fermentación alcohólica, se encontraron diferencias lógicas entre los vinos en los parámetros relacionados con la acidez, que estuvieron en relación con el pH inicial de la uva (Tabla 2). Además, aunque el contenido total de antocianos fue similar, una mayor acidez en el mosto dio lugar a vinos con más intensidad de color, debido a un mayor porcentaje de antocianos en sus formas coloreadas y a una mayor estabilidad de color, determinada por un índice de polimerización más elevado.

Teniendo en cuenta los resultados analíticos de los vinos una vez realizada la FML, se observa, como era de esperar, que ésta ha supuesto un incremento de pH y una modificación en los parámetros relacionados con el color, con una disminución de la intensidad de color y de los polifenoles totales como consecuencia de una disminución del contenido de antocianos, principalmente en sus formas coloreadas. Al mismo tiempo, se incrementó la estabilidad de color del vino, demostrado por el aumento del índice de polimerización.

Las diferencias encontradas por efecto del pH en los resultados de los parámetros analíticos de los vinos después de la fermentación alcohólica, se mantuvieron después de la fermentación maloláctica en cuanto a los parámetros relacionados con la acidez y el color. La acidez volátil fue significativamente diferente, viéndose ligeramente favorecidos los vinos de mayor pH.

Es de destacar que el incremento de pH durante todo el proceso de la elaboración fue mayor cuanto más alto era el pH inicial de la uva: un 10% para el pH de 3.40; un 12% para el de 3.55 y un 16% para el pH de 3.70.

Por otra parte, el pH al que se llevó a cabo la fermentación alcohólica influyó en el contenido de la mayoría de los compuestos aromáticos (Tabla 3). Determinados compuestos (alcoholes superiores, diacetilo y acetoína) que resultan beneficiosos para el aroma del vino en cantidades moderadas, pero perjudiciales en altas concentraciones (Martineau y Henick-Kling, 1995), se incrementaron al hacerlo el pH. El 2 fenil etanol, positivo por su carácter afrutado aumentó también con el pH. La concentración de acetatos de alcoholes superiores, ésteres fermentativos y ácidos apenas se modificó.

Tabla 1.
Distribución (%) y recuento (UFC/ml) de las cepas de bacterias lácticas aisladas en el momento de plena FML a distinto pH

Clones *O. oeni*	pH uva 3.40	pH uva 3.55	pH uva 3.70
A	--	--	6.25
B	100	50	--
C	--	8	6.25
D	--	25	56
E	--	17	--
F	--	--	31.5
Recuento de BL (UFC/ml)	$2.40x10^7$	$4.17x10^7$	$8.32x10^7$

Tabla 2.
Composición analítica media de los vinos después de la fermentación alcohólica y de la maloláctica a distinto pH

	Después de FA			Después de FML		
	Vino I pH uva 3.40	Vino II pH uva 3.55	Vino III pH uva 3.70	Vino I pH uva 3.40	Vino II pH uva 3.55	Vino III pH uva 3.70
Grado alcohólico (% v/v)	15.0	14.9	14.6	--	--	--
pH	3.60	3.82	3.96	3.75 **a**	3.98 **b**	4.19 **c**
Acidez total (g/l tartárico)	7.35	6.62	5.99	6.01 **c**	5.52 **b**	4.76 **a**
Acidez volátil (g/l acético)	0.38	0.34	0.32	0.55 **b**	0.52 **a**	0.51 **a**
Acido málico (g/l)	2.52	2.62	2.68	0.05 **a**	0.09 **a**	0.18 **b**
Acido láctico (g/l)	--	--	--	1.69 **a**	1.84 **b**	1.86 **b**
Acido cítrico (mg/l)	331	326	329	17 **a**	13 **a**	26 **b**
Glicerol (g/l)	9.39	9.53	9.48	9.16	9.62	9.40
Intensidad de color	16.8	15.2	13.5	12.3 **c**	11.5 **b**	10.2 **a**
Tonalidad	0.468	0.530	0.591	0.597 **a**	0.660 **b**	0.751 **c**
IPT (Abs 280 nm)	63.1	66.1	68.1	60.8 **a**	65.6 **b**	66.2 **c**
Antocianos (mg/l)	766	757	775	633 **a**	660 **b**	770 **c**
Índice de ionización (%)	43.6	35.0	30.1	33.2 **b**	25.5 **a**	22.0 **a**
Índice de polimerización	2.31	2.15	2.02	2.74 c	2.50 **b**	2.22 **a**

Letras diferentes en la misma fila para después de FML indican diferencias significativas según el test de Tukey para p≥0.05.

De acuerdo a lo observado en otros trabajos (López *et al.*, 2005), a excepción del acetaldehído, los demás compuestos aromáticos estudiados se incrementaron en mayor o menor medida durante la fermentación maloláctica, lo que justifica la mayor complejidad aromática que proporciona a los vinos este proceso. En este momento se encontraron diferencias significativas por efecto del pH en el contenido en acetatos de alcoholes superiores, de acetoína y de lactato de etilo.

Zubía Monográfico *núm. 16-17 (2004-2005), pp. 69-82*
ISSN 1131-5423

Tabla 3.
Compuestos volátiles de los vinos después de la fermentación alcohólica y maloláctica a diferente pH.

Compuestos volátiles (mg/l)	Después de FA			Después de FML		
	Vino I pH uva 3.40	Vino II pH uva 3.55	Vino III pH uva 3.70	Vino I pH uva 3.40	Vino II pH uva 3.55	Vino III pH uva 3.70
Acetaldehído	9.30	11.4	10.5	1.78 **a**	2.56 **b**	1.57 **a**
Acetato de etilo	23.1	32.3	29.6	37.4	33.7	32.0
Σ Acoholes superiores	365	409	445	398	397	417
2 fenil etanol	51.0	58.9	65.4	55.7	57.3	60.2
Σ Acetatos	0.58	0.61	0.51	0.76 **b**	0.67 **ab**	0.58 **a**
Σ Esteres	0.53	0.64	0.59	0.77	0.81	0.71
Σ Acidos	10.0	10.7	10.7	11.5	10.9	11.1
Diacetilo	0.77	0.84	2.26	2.53	2.69	2.27
Acetoína	3.24	4.41	9.08	16.4 **b**	26.3 **c**	10.6 **a**
Lactato etilo	2.03	1.78	3.10	18.8 **b**	11.4 **a**	21.7 **b**
Succinato dietilo	0.28	0.22	0.49	2.78	2.88	2.39

Letras diferentes en la misma fila para después de FML indican diferencias significativas según el test de Tukey para p≥0.05.

En la Tabla 4 se presenta la concentración de los aminoácidos considerados como precursores de las aminas biógenas más importantes, en el mosto, al final de la fermentación alcohólica y después de la fermentación maloláctica.

Tabla 4.
Composición media de aminoácidos (AA) y de aminas biógenas en diferentes momentos de la elaboración a distinto pH

mg/l	Mosto	Después de FA			Después de FML		
		pH uva 3.40	pH uva 3.55	pH uva 3.70	pH uva 3.40	pH uva 3.55	pH uva 3.70
Histidina	11.8	2.14	2.57	1.27	1.89	0.91	1.74
Arginina	74.9	2.89	3.09	2.28	3.97 b	3.74 b	2.49 a
Tirosina	4.77	1.44	1.73	0.73	0.98 b	1.09 b	0.76 a
Lisina	1.34	0.84	0	1.50	1.83 b	1.37 ab	0.81 a
Σ AA	**92.8**	**7.31**	**7.39**	**5.78**	**8.67 c**	**7.11 b**	**5.80 a**
Histamina		0.27	0.29	0.23	1.32 c	0.91 b	0.41 a
Putrescina		1.19	0.88	0.71	1.49 c	1.08 b	0.75 a
Tiramina		0.07	0.07	0.05	0.43	0.45	0.38
Cadaverina		0.33	0.30	0.29	0.43 b	0.35 a	0.30 a
Σ Aminas		**1.86**	**1.54**	**1.28**	**3,67c**	**2.79 b**	**1.84 a**

Letras diferentes en la misma fila para después de FML indican diferencias significativas según el test de Tukey para p≥0.05.

El contenido de aminoácidos del mosto fue bajo, lo que estuvo de acuerdo con la baja concentración de nitrógeno fácilmente asimilable, y se consumieron en gran medida durante la fermentación alcohólica, especialmente en las elaboraciones llevadas a cabo a mayor pH. La formación de aminas biógenas durante la fermentación alcohólica fue muy pequeña, lo que está de acuerdo a los resultados obtenidos en otros trabajos (Soufleros *et al.*, 1998).

La concentración de aminoácidos se mantuvo prácticamente constante durante la FML, a excepción de en los vinos elaborados a menor pH, en los que aumentó, probablemente debido a la mayor duración de la FML, que permitió una liberación de aminoácidos por hidrólisis de péptidos y proteínas por parte de las bacterias lácticas.

Sin embargo, el contenido de las aminas biógenas aumentó durante la fermentación maloláctica, siendo además este incremento más acusado para pH más bajos. Este resultado está en contradicción con los resultados obtenidos en otros trabajos (Lonvaud-Funel et Joyeux, 1993; Vázquez, 1998), en los que se encontraron correlaciones positivas entre bajos niveles de acidez total y mayor contenido en aminas biógenas. Los resultados obtenidos en este estudio se podrían explicar por dos motivos: por una parte, el pH influyó en la composición en materia nitrogenada de los vinos después de la fermentación alcohólica, ya que a pH más bajos el consumo de aminoácidos durante la misma fue menor, dando lugar a que en estas condiciones se encontraran mayores concentraciones de estos compuestos precursores de la producción de aminas biógenas. Por otra, el pH influyó en la distribución de los clones de bacterias lácticas de la especie *Oenococcus oeni* que dirigieron la fermentación maloláctica. Así, la formación de histamina y putrescina se podría relacionar con la presencia del clon B de la especie *Oenococcus oeni* aislado en la fase tumultuosa de la FML. Este clon fue dominante en las fermentaciones llevadas a cabo a pH menor, estuvo presente con un frecuencia del 50% en la realizadas a pH intermedio y no se encontró en las de mayor pH. El estudio de la presencia del gen histidin descarboxilasa (responsable de la descarboxilación de la histidina en histamina) en las BL aisladas dio resultados positivos en todos los casos.

Hasta hace pocos años se creía que la formación de histamina y otras aminas biógenas en el vino era debida a la acción enzimática de cepas de bacterias lácticas pertenecientes a la especie *Pediococcus damnosus* (Aerny, 1990; Delfini, 1989) y no de *Oenococcus oeni*. Sin embargo, el hecho de que el fenómeno se produzca incluso durante la FML en vinos en los que la microflora está prácticamente constituida por *O.oeni* estaba en contradicción con estos resultados (Lonvaud-Funel et Joyeux, 1994) y con los obtenidos en este trabajo.

Evolución de los vinos durante un período de estabilización de 7 meses

En la Figura 3 se observa la evolución de las aminas biógenas durante los 7 meses de conservación de los vinos. La concentración de histamina aumentó a lo largo del tiempo, manteniéndose las diferencias encontradas después de la FML favorables a los pH más altos, aunque parece existir una tendencia a un crecimiento más acusado en el último período de conservación de los vinos de mayor pH; la tiramina sólo creció de forma notable durante la conservación de los vinos de pH intermedio, manteniéndose constante en el resto. La putrescina y la cadaverina no se modificaron.

Al estudiar microbiológicamente los vinos a los 7 meses de conservación, se observa que a pH más bajo no se encontraron bacterias lácticas viables, mientras que los vinos con un pH intermedio presentaron una carga microbiana superior a

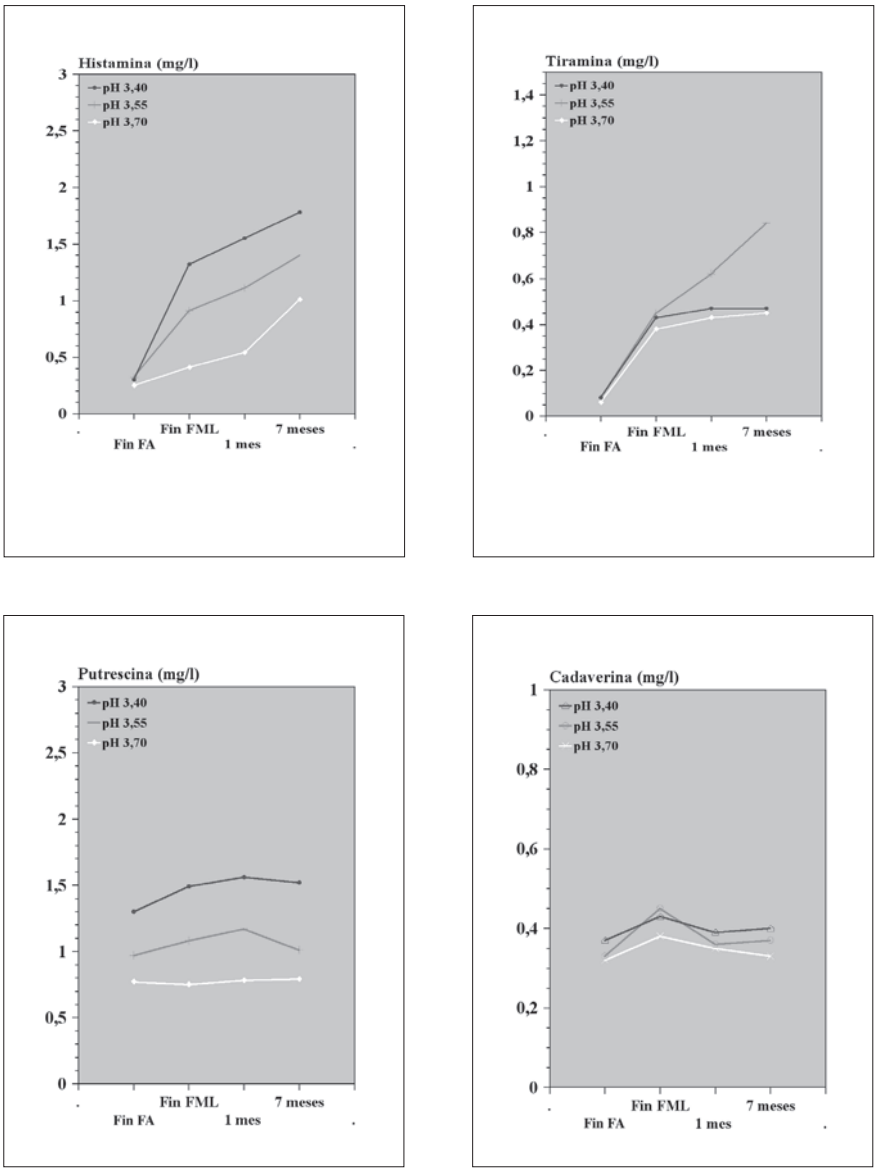

Figura 3. Evolución de las aminas biógenas durante la conservación del vino.

los de mayor pH (Tabla 5). Este hecho, probablemente se deba a algún tipo incontrolado de contaminación, que justificaría el aumento desproporcionado en tiramina que sufrieron estos vinos.

En cuanto al aumento, durante el almacenamiento, de la concentración de histamina en vinos con pH bajos cuando no hay células viables de bacterias, otros autores han mostrado en sus trabajos (Lonvaud-Funel et Joyeux, 1994) la existencia de cepas de *Oenococcus oeni* cuyas células no viables conservan su actividad histidin descarboxilasa durante largo tiempo en el vino.

Tabla 5.
Distribución (%) y recuento (UFC/ml) de las cepas de BL aisladas al mes y a los 7 meses de finalizar la FML a distinto pH

Género/Especie	Clon	pH uva 3.40	pH uva 3.55	pH uva 3.70
Oenococcus/oeni	B	--	80	20
Lactobacillus/spp		--	10	--
Pediococcus/spp		--	10	80
Número de BL		<1	$2.31x10^6$	$6.45x10^4$

La presencia del clon B en los vinos de pH medio y alto y de cepas pertenecientes al género *Pediococcus* (particularmente en los vinos de mayor pH) estaría relacionada con el incremento en la producción de histamina de estos vinos.

Valoración organoléptica

La valoración cuantitativa de los vinos a los 7 meses de estabilización mostró muy pocas diferencias, debido probablemente a que el elevado grado alcohólico impidió evaluarlas, aunque hubo ligera preferencia por el vino elaborado a pH más bajo (Tabla 6).

Tabla 6.
Análisis organoléptico de los vinos después de 7 meses de la FML

	pH uva 3.40	pH uva 3.55	pH uva 3.70
Fase visual	21.3	20.7	20.1
Fase olfativa	18.7	19.6	18.7
Fase gustativa	17.3	15.9	16.4
Preferencia	14.3	11.1	12.1
TOTAL	71.6	67.3	67.3

4. CONCLUSIONES

En contra de las expectativas creadas acerca de que pHs altos en la elaboración del vino podrían se una de las causas de la formación de aminas biógenas, en este trabajo la mayor concentración de estos compuestos se ha producido a bajo pH. Este hecho podría deberse a la diferente asimilación de la materia nitrogenada durante la fermentación alcohólica y a la influencia que tuvo el pH sobre la distribución de clones de la especie *Oenococcus oeni* que llevaron a cabo la fermentación maloláctica.

A pH elevado se produjo un mayor consumo de aminoácidos durante la fermentación alcohólica, que dio lugar a una menor disponibilidad en estos vinos de compuestos precursores de la formación de aminas biógenas. Además, el pH al que se llevó a cabo la elaboración del vino influyó directamente en el proceso de la fermentación maloláctica: duración, población de bacterias y frecuencia de la distribución de los clones de *Oenococcus oeni* que llevaron a cabo la transformación del ácido málico en ácido láctico. Este último aspecto, junto con la menor concentración de aminoácidos podría ser una de las causas de que, en este ensayo, el contenido en aminas biógenas fuera menor para vinos de mayor pH.

Por otra parte, pHs inferiores dieron lugar a vinos con mayor intensidad de color y mayor estabilidad microbiana. Se encontraron pocas diferencias en cuanto a la composición aromática y la calidad organoléptica.

5. BIBLIOGRAFÍA

Birren, B. and Lai, E., 1993. Preparation of DNA for pulsed field analysis. In: Pulsed field gel electrophoresis. A practical guide. Academic Press, Inc. San Diego.

Coton, E., Rollan, G., Bertrand, A. and Lonvaud-Funel, A., 1998. Histamine-producing lactic acid bacteria in wines: early detection, frecuency and distribution. *Am. J. Enol. Vitic.* (49-2), 199-204.

Coton, E., Torlois, S., Bertrand, A., Lonvaud-Funel, A., 1999. Amines biogènes et bactéries lactiques du vin. *Bulletin de l'OIV*, 815-816.

Eitenmiller, R., Koehler, P., Reagen, J., 1978. Tyramine in fermented sausages: factors affecting formation of tyramine and tyrosine descarboxylase. *J. Food. Agric.* (43), 689-693.

Fuster, A., Krieger, S., 2002. Contrôle de la fermentation malolactique: une approche pratique. *Révue Française d'Oenologie.* (194), 14-17.

Gerbaux, V., 1998. Le point sur la maîtrise de la fermentation malolactique par l'ensemencement bactérien des vins. *Révue française d'Oenologie*, 173.

Glories, Y., 1978. Recherches sûr la matière colorante des vins rouges. Thèse Doctorat des Sciences. Université de Bordeaux II.

Holt, J., Krieg, N., Sneath, P., Staley, J. and Williams, S., 2000. Bergey's manual of determinative bacteriology. Ed. Lippincott Williams &Wilkins. Philadelphia, USA

Lonvaud-Funel, A. and Joyeux, A., 1993. Antagonism between lactic acid bacteria of wines: inhibition of *Leuconostoc oenos* by *Lactobacillus plantarum* and *Pediococcus pentosaceus*. *Food. Micobiol.* (10), 411-419.

Lonvaud-Funel, A. and Joyeux, A., 1994. *J. Appl. Bacteriol.* (74), 41-47.

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

López, R., Santamaría, P., Gutiérrez, A.R., García-Escudero, E., 1995. Estudio analítico de vinos afectados por paradas de fermentación. Comparación con vinos secos. *Vitic. Enol. Profesional*, (38), 40-45.

López, R., Gutiérrez, A.R., Tenorio, C., Garito, P., Santamaría, P., 2005. Fermentación maloláctica en barrica. Efectos en las características organolépticas de los vinos tintos y en la estabilidad del color. *Vinos de España. Bodegas & viñedos*, (7), 15-20.

Martineau, B. and Henick-Kling, T., 1995. Performance and diacetyl production of commercial strains of malolactic bacteria in wine. *J. Appl. Bacteriol.,* (78), 526-536.

Ortega, C., López, R., Cacho, J., Ferreira, V., 2001. Fast analysis of important wine volatile compounds. Development and validation of a new method base on gas chromatographic-flame ionisation detection analysis of dichloromethane micro-extracts. *J. of Chromatography.*

Ribéreau-Gayon, P., Stonestreet, E., 1965. Le dosage des anthocyanes dans le vin rouge. *Bull. Soc. Chim.* (9), 2649-2652.

Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B., Lonvaud, A., 1998. Traité d'Oenologie. 1. Microbiologie du vin. Vinifications. Ed. Dunod. Paris.

Ruiz, M., 1999. La crianza del vino tinto desde la perspectiva vitícola. Ed. A. Madrid Vicente. Madrid

Santamaría, P., López, R., Gutiérrez, A.R., 1996. Estudio del proceso fermentativo durante la elaboración de vinos blancos y rosados de calidad: causas que determinan su ralentización. Estudio de recursos aplicables. *Memoria del CIDA de La Rioja.* 34-38.

Santamaría, P., López, R., Gutiérrez, A.R., Epifanio, S., 1998. Fermentación alcohólica de vinos blancos y rosados. Ed. Gobierno de La Rioja, 111 pág. ISBN: 84-87110-05-03.

Soufleros, E., Barrios, M-L. and Bertrand, A., 1998. Correlation between the content of biogenic amines and other wine compounds. *Am. J. Enol. Vitic.* (52-3), 266-277.

Ten Brink, B., Damink, C., 1990. Occurrence and formation of biologically active amines in foods. *Int. J. Food Microbiol.* (11), 73-84.

Theodore, D., Gerland, C., 2002. La fermentation malolactique: un meilleur suivi pour une meilleure maîtrise. *Révue des Oenologues.* (89), 27-29.

Torrea, D. and Ancín, C., 2001. Influence of yeast strain of biogenic amines content in wines: relationship with the utilization of amino acids during fermentation. *Am. J. Enol. Vitic.* (52-3). 185-190.

Vázquez, M., 1998. Determinación de aminas biógenas en vinos de Rioja. Tesis Doctoral. Universidad del País Vasco. España.

Wibowo, D., Eschenbruch, R., Davis, C., Fleet, G. and Lee, T., 1985. Occurrence and growth of lactic acid bacteria in wine: a review. *Am. J. Enol. Vitic.* (36), 302-313.