

Control Industrial de la producción de histamina en bodega mediante la gestión de la Fermentación Maloláctica.

Alvarez, J.M., de Paola, M.

AEB Ibérica, Castellbisbal, Barcelona. AEB Group, Brescia, Italia

La fermentación maloláctica (FML) de los vinos es un proceso en el que se produce la descarboxilación del ácido L-málico y la formación del ácido L-láctico y CO₂ además de un complejo número de reacciones en las que se involucran una serie de compuestos no menos importantes, sobre todo por el impacto organoléptico que pueden llegar a desarrollar en el producto final.

En este proceso, el carácter de mejora que se puede desarrollar en los vinos está, generalmente, infravalorado.

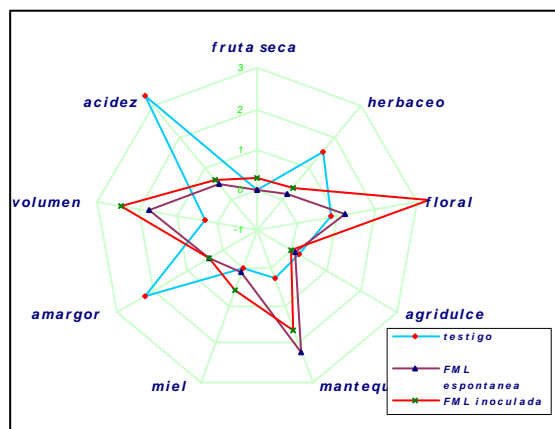


Figura 1. Valoración del aspecto sensorial de la fermentación maloláctica por un panel de catadores expertos.

Tal y como se muestra en el gráfico comparativo de la figura 1, la valoración organoléptica de los vinos en los que se realiza la FML, tanto inducida por la inoculación de un cultivo seleccionado como espontánea, muestran frente al vino testigo, sin FML un carácter de mejora significativo.

Oenococcus oeni es el microorganismo encargado, en la mayoría de los casos, de realizar este proceso en los vinos, persiguiendo la disminución de la sensación ácida de los vinos, la estabilidad microbiológica y la consiguiente mejora organoléptica comentada.

Los cultivos iniciadores de *Oenococcus oeni* persiguen, mediante su inoculación directa o vía aclimatación, la propagación en el medio (el vino) y su implantación frente a otras cepas indígenas *Oenococcus*, *Lactobacillus* o *Pediococcus* que pudieran desarrollar caracteres organolépticos negativos, así como promover la inestabilidad microbiológica de los vinos.

Estos cultivos iniciadores han de cumplir requisitos básicos para su utilización exitosa, esto es:

- alta tolerancia a condiciones estresantes del medio (pH, SO₂, grado alcohólico, IPT),
- alta viabilidad de inóculo, considerando ideal superar 1x10E6 ufc/ml,
- compatibles con la cepa de levadura utilizada en la fermentación alcohólica evitando producir antagonismos metabólicos,
- no producción de metabolitos indeseables (ácido acético, diacetilo, carbamato de etilo, aminos biógenas, etc).

Así, la gestión de una FML eficaz implica tanto la realización de la misma en tiempos razonables como el seguimiento analítico de algunos de los metabolitos generados, para el control de la calidad técnica, organoléptica y sanitaria del proceso.

Entre estos metabolitos cabe destacar la importancia que en los últimos años ha generado el control de las aminas biógenas, que provienen esencialmente de la descarboxilación enzimática de aminoácidos, tanto de manera natural en un proceso fermentativo, como debido a alguna alteración microbiana.

Las aminas biógenas más comunes en los vinos son la tiramina, putrescina, cadaverina, espermidina e histamina, a pesar de que algunos autores recogen hasta unas 22 identificadas con menor relevancia.

De todas ellas, sin lugar a dudas, la histamina ocupa un lugar de primordial importancia en el control del proceso fermentativo, realizando el seguimiento de su producción a partir de su precursor, la histidina.

Estrategias de control

Fundamentalmente las estrategias de control se basan en las cuatro premisas siguientes:

1. Selección de cepas *Oenococcus oeni* específicas, que no presenten actividad histidina descarboxilasa.
2. Mantener una masa viable alta que permita reducidos tiempos de latencia y garantice la implantación (superior a 1×10^6 ufc/ml)
3. Utilizar cultivos multicepa que permitan minimizar el riesgo de muerte súbita por presencia de bacteriófagos a favor de otras cepas indígenas *Oenococcus oeni*.
4. Someter a un control riguroso los vinos con contenidos elevados del precursor (histidina), ya que son los que presentan un mayor riesgo.

Algunos resultados del seguimiento de las estrategias de gestión de la FML se muestran en las gráficas y figuras siguientes, partiendo de vinos de la variedad tempranillo de las D.O. Ribera del Duero (8) y D.O. Rioja (6) elaborados en la campaña 2005.

Datos de los vinos

	Ribera del Duero 2005								Rioja 2005						
	V1a	V1b	V2a	V2b	V3a	V3b	V4a	V4b	V5a	V5b	V6a	V6b	V7a	V7b	
Grado alcohólico %vol.	13.2	13.3	14.1	13.9	13.9	14.2	13.9	14.1	14.2	14.0	14.1	13.9	13.9	13.5	
pH	3.51	3.58	3.65	3.73	3.66	3.71	3.54	3.63	3.72	3.68	3.62	3.56	3.68	3.6	
Acidez total H ₂ SO ₄ g/l	4.92	5.0	4.24	4.83	3.90	3.89	4.22	4.0	4.23	4.05	4.18	4.22	4.63	4.88	
Acidez volátil g/l	0.23	0.17	0.15	0.21	0.15	0.17	0.18	0.20	0.23	0.29	0.21	0.17	0.17	0.19	
Azúcares residuales g/l	≤1	1.8	1.8	2.2	1.4	≤1	2.0	2.2	2.2	1.8	1.8	1.6	2.1	1.8	
Acido Málico g/l	2.6	2.5	2.1	2.1	3.0	2.8	2.5	2.2	2.9	2.9	2.8	2.5	3.1	2.9	
Anhidrido sulfuroso libre mg/l	12	10	12	14	19	18	12	15	14	18	12	15	15	15	
Anhidrido sulfuroso total mg/l	35	35	42	40	45	39	37	40	42	42	45	40	39	42	
IPT	57	58	76	72	62	69	65	67	70	68	62	59	59	56	

Tabla 1. Datos analíticos de los vinos estudiados asociados en dos series: *serie a* corresponde a testigos y *serie b* corresponde a inoculados.

Diseño experimental

Los vinos caracterizados analíticamente se encuentran descubados en depósitos de 250 y 500 hl; se inocula la *serie b* alternativamente con dos cultivos malolácticos multicepa liofilizados codificados como *BAC3* y *BA4R*, constituidos por 3 y 4 cepas diversas de *Oenococcus Oeni* respectivamente. La *serie a* de los vinos se mantiene como testigo. La temperatura de fermentación se fija en 22 ° C.

Dentro de la estrategia que busca una rápida implantación se sigue un protocolo de aclimatación de los cultivos de siguiente manera:

1. Se incorpora el cultivo en una alícuota de 100 l del vino a fermentar, desacidificado con KHCO_3 hasta alcanzar pH 4.5.
2. Se mantiene a 24 ° C durante 24 h para realizar la aclimatación /propagación de la bacteria en el medio
3. Se inocula este volumen de cultivo al depósito a fermentar.

Mediante este proceso se consigue una población viable equivalente en el momento de inóculo superior a 1×10^7 ufc/ml.

	BAC3	BA4R
Número de cepas <i>O.oeni</i>	3	4
pH mínimo tolerado	3.1	3.2
Temperatura mín. de inóculo ° C	18	15
Tolerancia grado alcohólico máx.	14.5	14
IPT máx.	60	80

Tabla 2. Características de los cultivos multicepa empleados

Resultados y Conclusiones

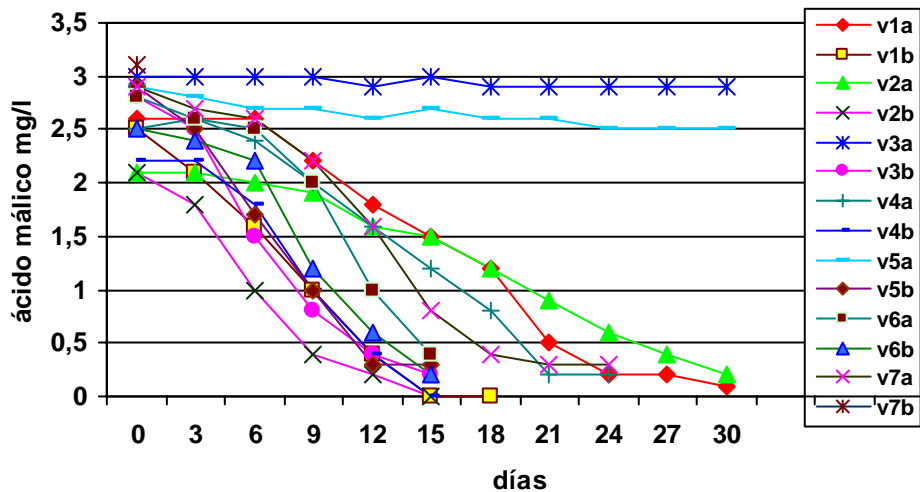


Figura 2. Seguimiento de la fermentación maloláctica de los vinos inoculados con el cultivo BAC3 (V1b, V6b, V7b) y BA4R (V2b, V3b, V4b, V5b). Los vinos de la *serie a* son los testigos correspondientes a los equivalentes de la *serie b*.

En los resultados se presenta un comportamiento similar en todos los vinos inoculados, con un perfil de cinética de fermentación regular que permite alcanzar concentraciones de ácido málico inferiores a 0,5 mg/l a los 12 días del inóculo.

En el caso de los testigos no inoculados, el comportamiento es diverso, aunque en general, las fermentaciones malolácticas espontáneas tienen una duración superior a los 21 días, y en algunos casos (V3a y V5a) no se desarrollan.

Para verificar la calidad de las FML desarrolladas se determinan las variaciones en acidez volátil así como los niveles de histamina (HPLC) alcanzados tanto en las fermentaciones inoculadas como en las espontáneas, conociendo previamente los niveles iniciales en los vinos sin FML.

	Ribera del Duero 2005								Rioja 2005					
	V1a	V1b	V2a	V2b	V3a	V3b	V4a	V4b	V5a	V5b	V6a	V6b	V7a	V7b
Histamina antes FML mg/l	2,2	0	0	2,0	2,1	2,4	0	0	5,1	3,6	2,1	4,2	2,1	1,2
Histamina después FML mg/l	8,1	0	0	2,1	2,0	2,3	8,2	0	5,4	3,6	5,3	4,0	14,1	1,2
Acidez volátil antes FML g/l	0,23	0,17	0,15	0,21	0,15	0,17	0,18	0,20	0,23	0,29	0,21	0,17	0,17	0,19
Acidez volátil después FML g/l	0,41	0,27	0,3	0,3	0,18	0,29	0,38	0,29	0,36	0,4	0,32	0,27	0,32	0,29

Tabla 3. Valores analíticos de los vinos relativos a acidez volátil y niveles de histamina antes y después de la FML.

Los resultados reflejan que en alguno caso los vinos ya partían de niveles significativos de histamina (V5a, V6b), no atribuibles al proceso FML gestionado postfermentación alcohólica. Es importante valorar que en las situaciones de inoculación de cultivos seleccionados no existen incrementos significativos de los niveles de histamina, mientras que en los casos de FML espontánea existen niveles superiores a los 5mg/l en cuatro de los casos (57% incidencia), descalificando el producto comercialmente para algunos mercados.

Fundamentalmente la utilización de cultivos seleccionados siguiendo estrategias de inoculación que aseguren la implantación de las cepas específicas (aclimatación y/o propagación de cepas *O. oeni* no histamina-productoras) adaptadas a las condiciones extremas del medio, fundamentalmente pH, grado alcohólico, temperatura y SO₂ libre. Estas determinarán en conjunto un importante poder de inhibición hacia el desarrollo de las bacterias lácticas, que puede ser calculado en un efecto antiséptico equivalente en SO₂ molecular, valorando el riesgo de implantación, incluso tratándose de cultivos seleccionados adaptados.

The image shows a software interface titled "Cálculo anhídrido sulfuroso molecular". It contains a section "Datos del vino" with four input fields and their corresponding values:

Parameter	Value
pH	3,4
Alcohol % vol.	13,9
SO ₂ libre mg/l	12
Temperatura ° C	20

Below these fields, the text "Efecto antiséptico equivalente" is displayed, followed by a calculation box showing the result:

SO₂ mol mg/l = 0,45745

The interface also features the logo for "AEB group SERVICIO TECNICO" in the bottom left corner.

Figura 3. Algoritmo de cálculo del efecto antiséptico equivalente en anhídrido sulfuroso molecular dependiente del pH, grado alcohólico, anhídrido sulfuroso libre y temperatura del vino.

Bibliografía

Bauza, T.; Blaise, A.; Teissedre, P.L.; Mestres, J.P.; Daumas, F.; Cabanis, J.C.: «Evolution des teneurs en amines biogènes des moûts et des vins au cours de la vinification», *Sciences des aliments* 1995; 15: 559-570.

Goñi, D.T.; Azpilicueta, C.A.: «Influence of yeast strain on biogenic amines content in wines: relationship with the utilization of amino acids during fermentation», *Am J Enol Viticult USA* 2001; 52: 185-190.

Grazia, L.; Suzzi, G.: «Batteri lattici agenti delle malattie dei vini: gli insilati quali possibili fonti di inquinamento», *Vignevini* (Bologna) 1984; 11: 37-39.

Guerrini, S.; Mangani, S.; Granchi, L.; Vincenzini, M.: «Biogenic amine production by *Oenococcus oeni*», *Current Microbiol* 2002; 44: 374-378.

Lehto, P.: «Determination of amines and amino acids in wine», *Am J Enol Vitic* 1996; 47: 127-133.

Moreno-Arribas, M.V.: «La fermentación maloláctica y su repercusión en la calidad del vino», *Tecnología del vino* 2003.

Moreno-Arribas, M.V.; Marcobal, A.; Muñoz, R.: «Alteraciones del vino por el metabolismo de las bacterias lácticas», *Tecnología del Vino* 2003.

Ribereau-Gayon, P.; Dubordieu, D.; Donèche, B.; Lonvaud, A.: *Traité d'œnologie. Microbiologie du vin, Vinifications*, Paris, Ed. Dunod, 1998.

Romero, R.; Sánchez-Viñas, M.; Gásquez, D.; Bagur, M.G.: «Characterization of selected Spanish table wine samples according to their biogenic amine content from liquid chromatographic determination», *J Agric Food Chem* 2002; 50: 4713-4717.

Soufleros, E.; Barrios, M.L.; Bertrand, A.: «Correlation between the content of biogenic amines and other wine compounds», *Am J Enol Viticult USA* 1998; 49: 266-278.

Suárez, J.A.; Iñigo, B.: *Microbiología enológica: fundamentos de vinificación*, Madrid, Mundi Prensa, 1992.