



# ESTUDIO COMPARATIVO DEL CONSUMO DE AMINOÁCIDOS Y AMONIO EN ACETIFICACIONES CON CULTIVO SUPERFICIAL Y AMONIO EN ACETIFICACIONES CON CULTIVO SUPERFICIAL Y SUMERGIDO

Raquel M<sup>a</sup> Callejón<sup>1</sup>, Wendu Tesfaye<sup>1</sup>, M<sup>a</sup> Jesús Torija<sup>2</sup>, Albert Mas<sup>2</sup>, Ana M<sup>a</sup> Troncoso<sup>1</sup>,  
M<sup>a</sup> Lourdes Morales<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Área de Nutrición y Bromatología. Facultad de Farmacia. Universidad de Sevilla. Tfno: 954556761. [raqcalfer@alum.us.es](mailto:raqcalfer@alum.us.es)

<sup>2</sup> Departamento de Bioquímica y Biotecnología. Facultad de Enología. Universitat Rovira i Virgili.

## Resumen:

Se han estudiado los cambios en el contenido de aminoácidos y amonio durante diferentes procesos de acetificación de tres vinos tintos mediante cultivo superficial y cultivo sumergido (8 acetificaciones superficiales y 3 sumergidas). Se tomaron muestras al inicio y al final de las mismas.

La determinación de aminoácidos y amonio se realizó por CLAE-fluorescencia empleando AQC como agente de derivatización precolumna. Este método, validado satisfactoriamente, demostró su utilidad para el análisis rutinario de dichos compuestos durante la acetificación.

Los resultados mostraron que al inicio de la acetificación el aminoácido más abundante fue prolina seguido de arginina. Se observó un comportamiento diferente entre los dos métodos de acetificación, siendo mucho menor el consumo de aminoácidos en la acetificación sumergida que en la superficial. En esta última, el más consumido fue la prolina, siendo la arginina la principal fuente de nitrógeno en los sistemas sumergidos, lo cual parece estar relacionado con la especie de bacterias acéticas implicadas en el proceso. Además, parece existir cierta correlación entre requerimiento de nitrógeno de estas bacterias y duración del proceso de acetificación.

**Palabras clave:** vinagre de vino, aminoácidos, AQC, vino, bacteria acética.

## 1. INTRODUCCIÓN

La conversión del vino en vinagre se lleva a cabo por las bacterias acéticas, las cuales se sitúan bien en la superficie o sumergidas en el líquido a acetificar [1]. Las bacterias acéticas son microorganismos aerobios y utilizan como fuente de nitrógeno los aminoácidos presentes en el medio [2,3]. Estos compuestos, son precursores de compuestos aromáticos [4] y de aminas biógenas [5].

El consumo de nitrógeno y de aminoácidos durante la fermentación alcohólica ha sido estudiado [6-9], pero sin embargo existen pocos trabajos sobre este tema en la fermentación acética [3].

El objetivo de este trabajo es usar el 6-Aminoquinolil-N-Hidroxisuccinimidil Carbamato (AQC) como agente derivatizante para la determinación de aminoácidos durante los procesos de acetificación. Este agente reacciona con aminoácidos primarios y secundarios produciendo derivados estables y altamente fluorescentes. Además el exceso de reactivo se hidroliza durante la reacción de derivatización evitando interferencias [10]. Asimismo se pretende conocer los diferentes requerimientos de estos compuestos para las bacterias acéticas tanto en los métodos superficiales como en los sumergidos.

## 2. MATERIAL Y MÉTODOS

### 2.1. Muestras

Se han seguido tres acetificaciones sumergidas llevadas a cabo en un fermentador a escala de laboratorio y

nueve acetificaciones superficiales obtenidas en barriles (60 L de capacidad) de diferentes maderas. Como material de partida se ha empleado tres vinos tintos. Las muestras se tomaron al inicio y al final de la acetificación (6-7 grados acéticos), resultando un total de 22 muestras.

### 2.2. Derivatización y análisis por CLAE

Para la derivatización de los 22 aminoácidos y amonio estudiados en este trabajo se utilizó el kit "AccQ-Fluor" (Waters, USA), siguiendo las instrucciones del mismo.

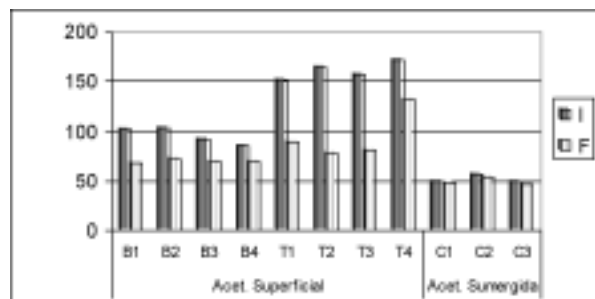
El análisis por CLAE se llevó a cabo en un equipo Waters conectado a un detector de fluorescencia, empleando una  $\lambda_{ex}$  de 250 nm y una  $\lambda_{em}$  de 395 nm. El volumen de inyección fue 20 mL, el flujo 1 mL/min, a 34°C y se empleó un gradiente cuaternario.

## 3. RESULTADOS

El nitrógeno total fue evaluado considerando conjuntamente el nitrógeno aportado por los aminoácidos libres y el procedente del amonio. Con respecto a la acetificación superficial, se observaron consumos de nitrógeno muy variables, constatándose descensos entre el 41 y 23%, que pueden ser debidos a los diferentes tiempos invertidos en las acetificaciones. En las acetificaciones con cultivo sumergido, el descenso medio del nitrógeno fue de 2.9%, por tanto, las demandas de éste son menores cuanto más rápidos son los procesos (Fig. 1.). Además, esta diferencia de consumo también puede ser debida a que el crecimiento de la biomasa y

en el metabolismo secundario de las bacterias es más activo en las acetificaciones superficiales. Los descensos en la concentración total de nitrógeno resultaron ser estadísticamente significativos para los procesos de acetificación superficial.

Fig.1. Consumo de nitrógeno en las acetificaciones superficiales y sumergidas



Al inicio de la acetificación, el aminoácido mayoritario fue prolina, siendo su consumo solamente importante en las acetificaciones superficiales, entre 200-300 mg/L. En los procesos sumergidos, la concentración de prolina permaneció constante. Este hecho puede ser debido a las diferentes cepas y especies de bacterias acéticas implicadas en ambas acetificaciones.

El segundo aminoácido en orden de abundancia, arginina (entre 8.5-26% del nitrógeno asimilable), disminuyó significativamente durante la acetificación sumergida. Este compuesto descendió en la mayoría de los procesos superficiales, pero estos cambios sólo fueron significativos en la mitad de ellos. El ácido glutámico y alanina estaban entre los cinco aminoácidos más abundantes y consumidos en la acetificación sumergida. Con respecto a las acetificaciones superficiales, hubo un consumo significativo de alanina y por el contrario, el ácido glutámico aumentó. Por otro lado, aunque la metionina apareció en baja concentración, sufrió descensos estadísticamente significativos en todos los casos siendo del orden de cuatro veces superior en las acetificaciones superficiales.

No fue posible cuantificar amonio en las acetificaciones sumergidas; sin embargo, sus áreas relativas parecen decrecer a lo largo del proceso. En las acetificaciones superficiales, este compuesto fue solamente usado por las bacterias acéticas en algunos casos, apareciendo nuevamente una correlación con la duración de la fermentación.

En un fermentador Frings empleando como sustratos sidra, vinos blancos y tintos, resultó ser la leucina el aminoácido más importante en términos de aporte y consumo de nitrógeno [3]. Sin embargo, en ninguna de nuestras experiencias ésta fue el aminoácido más consumido, ni la principal fuente de nitrógeno asimilable.

Finalmente, asparagina, glutamina, cisteína y triptófano no se detectaron en ninguna de las muestras estudiadas.

#### 4. CONCLUSIONES

Se ha seguido el consumo de nitrógeno en los dos tipos de acetificaciones, siendo mayor en las superficiales. Además, se ha observado que el requerimiento de nitrógeno de las bacterias es proporcional al tiempo invertido en el pro-

ceso de acetificación. En los sustratos iniciales, el aminoácido mayoritario, en términos de abundancia, fue prolina seguida de arginina. El aminoácido más consumido en la acetificación superficial fue prolina y arginina en la sumergida. Este diferente patrón de consumo de aminoácidos podría estar relacionado con las diferentes cepas de bacterias acéticas implicadas en los procesos.

#### 5. BIBLIOGRAFÍA

1. TEFAYE, W.; MORALES, M.L.; GARCÍA-PARRILLA, M.C.; TRONCOSO, A.M. (2002). **Wine Vinegar: technology, authenticity and quality evaluation.** *Trends Food Sci Technol* 13:12-21
2. GONZÁLEZ, A.; HIERRO, N.; POBLET, M.; ROZES, N.; MAS, A.; GUILLAMÓN, J.M. (2004). Application of molecular methods for the differentiation of acetic acid bacteria in a red wine fermentation. *J Appl Microbiol* 96:853-860
3. VALERO, E.; BERLANGA, T.M.; ROLDÁN, P.M.; JIMÉNEZ, C.; GARCÍA, I.; MAURICIO, J.C. (2005). **Free amino acids and volatile compounds in vinegars obtained from different types of substrate.** *J Sci Food Agric* 85:603-608
4. SOUFLEROS, E.H.; BOULOMPASI, E.; TSARCHOPOULOS, C.; BILIADERIS, C.G. (2003). **Primary amino acid profiles of Greek white wines and their use in classification according to variety, origin and vintage.** *Food Chem* 80:261-273
5. BAUZA, T.; BLAISE, A.; DAUMAS, F.; CABANIS, J.C. (1995). **Determination of biogenic amines and their precursor amino acids in wines of the Vallee du Rhone by high-performance liquid chromatography with precolumn derivatization and fluorimetric detection.** *J Chromatogr A* 707:373-379
6. PEREZ-COELLO, M.S.; BRIONES PEREZ, A.I.; UBEDA IRANZO, J.F.; MARTIN ÁLVAREZ, P.J. (1999). **Characteristics of wines fermented with different *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from the La Mancha region.** *Food Microbiol* 16(6):563-573
7. BELTRÁN, G.; ESTEVE-ZARZOSO, B.; MAS, A.; GUILLAMÓN, J.M. (2005). **Influence of the timing of nitrogen additions during synthetic grape must fermentations on fermentation kinetics and nitrogen consumption.** *J Agric Food Chem* 54(4):996-1002
8. HERNÁNDEZ-ORTE, P.; IBARZ, M.J.; CACHO, J.; FERRERA, V. (2005). **Effect of the addition of ammonium and amino acids to musts of Airen variety on aromatic composition and sensory properties of the obtained wine.** *Food Chem* 89:163-174
9. HERNÁNDEZ-ORTE, P.; IBARZ, M.J.; CACHO, J.; FERRERA, V. (2006). **Addition of amino acids to grape juice of the Merlot variety: Effect on amino acid uptake and aroma generation during alcoholic fermentation.** *Food Chem* 98:300-310
10. HERNÁNDEZ-ORTE, P.; IBARZ, M.J.; CACHO, J.; FERRERA, V. (2003). **Amino acid determination in grape juices and wines by HPLC using a modification of the 6-Aminoquinolyl-N-Hydroxysuccinimidyl Carbamate (AQC) method.** *Chromatogr* 58:29-35