



## RESOLUCIÓN OIV/OENO 348/2010

### MÉTODO CUALITATIVO PARA LA DETECCIÓN DE LAS AMINAS BIÓGENAS PRODUCIDAS POR BACTERIAS LÁCTICAS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA (TLC)

LA ASAMBLEA GENERAL,

Considerando el apartado 2 iv del Artículo 2 del Acuerdo del 3 de abril de 2001 por el cual se creó la Organización Internacional de la Viña y el Vino,

A propuesta de la Subcomisión "Métodos de análisis" y del grupo de trabajo "Especificación de los productos enológicos",

DECIDE completar el Capítulo II del Codex enológico internacional con la técnica de análisis y de control siguiente:

### **Método cualitativo para la detección de las aminas biógenas producidas por bacterias lácticas mediante cromatografía en capa fina (TLC)**

#### **1. PRINCIPIO**

El presente método detecta la capacidad de producción de aminas biógenas de las bacterias lácticas en un medio de cultivo líquido que contenga el aminoácido precursor correspondiente. Este método permite separar e identificar histamina, tiramina, putrescina, cadaverina y feniletilamina (HIS, TYR, PUT, CAD y PEA) mediante la cromatografía en capa fina.

#### **2. REACTIVOS**

**2.1 Aminoácidos:** monohidróclorato de L-histidina, sal disódica de L-tirosina, clorhidrato de L-ornitina, monohidróclorato de L-lisina y L-fenilalanina.

**2.2 Aminas:** dihidróclorato de histamina, hidróclorato de tiramina, dihidróclorato de 1,4-diaminobutano, dihidróclorato de 1,5-diaminopentano y hidróclorato de  $\beta$ -feniletilamina.

**2.3 Cloruro de dansilo**

**2.4 Acetona**

**2.5 Cloroformo**

**2.6 Trietilamina**

**2.7 Isopropanol**

**2.8 Trietanolamina**

**2.9 Placas de cromatografía en capa fina** (placas de 10 × 20 recubiertas con una lámina de 0,20 mm de gel de sílice 60 F<sub>254</sub>)

*Certificado conforme  
Tbilisi, 25 de junio de 2010  
El Director General de la OIV  
Secretario de la Asamblea general*

*Federico CASTELLUCCI*

### 3. SOLUCIONES ESTANDAR

Se prepara un conjunto de soluciones estándar disolviendo de forma independiente 0.2 g de cada amina (HIS, TYR, PUT, CAD y PEA) en 10mL de etanol al 40%. La solución estándar de trabajo se prepara mezclando 1 ml de cada una de estas soluciones y llevándola a un volumen final de 10 ml en agua.

Las aminas se transforman en sus derivados fluorescentes de dansilo de la manera siguiente: a un volumen de la muestra se le agrega un volumen de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (250 mM), 0.1 volumen de NaOH (4N) y dos volúmenes de solución de cloruro de dansilo (5mg/mL cloruro de dansilo en acetona). Se mezcla bien y se incuba durante una hora a 55 °C en oscuridad .

### 4. CONDICIONES DE CRECIMIENTO MICROBIANO

Las cepas de *O. oeni* se cultivan en medio MRS (Merck) a pH 4,8 enriquecido con jugo de tomate al 10 %. Las cepas de *Lactobacillus* y *Pediococcus* se cultivan en medio MRS a pH 6,3. Se incuba a 30 °C.

A los medios de cultivo se les añaden los aminoácidos histidina (5 mg/l), tirosina (5 mg/l), ornitina (5 mg/l), lisina (5 mg/l) y fenilalanina (5 mg/l), precursores de las aminas biógenas correspondientes. Las muestras se analizan tras un período de crecimiento de entre 9 y 12 días.

### 5. CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS

Las aminas se separan en placas de gel de sílice (60 F<sub>254</sub>). Mediante capilares se depositan 10 µl de los extractos de los compuestos dansilados derivados de las aminas a 2 centímetros del borde inferior de las placas. Los compuestos dansilados se separan por migración vertical (17 cm de recorrido) en una mezcla de cloroformo y trietilamina (4:1). Las manchas se observan con luz ultravioleta mediante un transiluminador acoplado a un equipo fotográfico. Si no se dispone de dicho aparato, se puede utilizar una fuente convencional de luz ultravioleta aunque en este caso se necesita intensificar la fluorescencia de las manchas mediante el tratamiento de la placa con una mezcla de isopropanol y trietanolamina (8:2).

El límite de detección de las aminas TYR, PUT, CAD y PEA es de 0,01 mg/ml y el límite de detección de HIS es de 1 mg/mL. El método presenta menos sensibilidad respecto a HIS, aunque el nivel de detección es suficiente para detectar la producción de HIS cuando la bacteria se encuentra en un medio de cultivo suplementado con 5mg/mL de histidina, como se indica más arriba.

### 6. ANÁLISIS DE LAS AMINAS BIÓGENAS DE LOS CULTIVOS BACTERIANOS

Las cepas bacterianas se cultivan según lo descrito en el apartado 4. Después de la incubación , los medios de cultivo se centrifugan y en los sobrenadantes obtenidos se les aplica la técnica descrita anteriormente.

Las manchas de aminas que aparecen en la superficie de la placa corresponden a feniletilamina, tiramina, histamina, cadaverina y putrescina (PEA, TYR, HIS, CAD, PUT), respectivamente.

*Certificado conforme  
Tbilisi, 25 de junio de 2010  
El Director General de la OIV  
Secretario de la Asamblea general*

## **7. BIBLIOGRAFIA**

1. Costantini A., Cersosimo M., Del Prete V., Garcia-Moruno E. (2006). Production of biogenic amines by lactic acid bacteria: screening by PCR, TLC and HPLC of strains isolated from wine and must. *Journal of food protection*, 69 (2): 391-396.
2. Garcia-Moruno E., Carrascosa A.V., Muñoz R. (2005). A rapid and inexpensive method for the determination of biogenic amines from bacterial cultures by thin-layer chromatography. *Journal of food protection*, 68 (3): 625-629.
3. Garcia-Moruno E. A method for the determination of biogenic amines from bacterial cultures by thin-layer chromatography (TLC), 2007 OIV FV 1243

*Certificado conforme  
Tbilisi, 25 de junio de 2010  
El Director General de la OIV  
Secretario de la Asamblea general*