

ier

Instituto de Estudios Riojanos

ZUBÍA. MONOGRÁFICO
REVISTA DE CIENCIAS.
Nº 29 (2017). Logroño (España).
P. 1-200, ISSN: 1131-5423



DIRECTORA

Patricia Pérez Matute

CONSEJO DE REDACCIÓN

Luis Español González
Rubén Esteban Pérez
Rafael Francia Verde
Juana Hernández Hernández
Alfredo Martínez Ramírez
Luis Miguel Medrano Moreno
Ana María Palomar Urbina
Ignacio Pérez Moreno
Enrique Requeta Loza
Purificación Ruiz Flaño
Angélica Torices Hernández

CONSEJO CIENTÍFICO

José Antonio Arizaleta Urarte
(Instituto de Estudios Riojanos)
José Arnáez Vadillo
(Universidad de La Rioja)
Susana Caro Calatayud
(Instituto de Estudios Riojanos)
Eduardo Fernández Garbayo
(Universidad de La Rioja)
Rosario García Gómez
(Universidad de La Rioja)
José M^a García Ruiz
(Instituto Pirenaico de Ecología)
Javier Guallar Otazua
(Universidad de La Rioja)
Teodoro Lasanta Martínez
(Instituto Pirenaico de Ecología)
Joaquín Lasierra Cirujeda
(Hospital San Pedro, Logroño)
Luis Lopo Carramiñana
(Dirección General de Medio Natural del Gobierno de La Rioja)
Fernando Martínez de Toda
(Universidad de La Rioja)
Juan Pablo Martínez Rica
(Instituto Pirenaico de Ecología-CSIC)
José Luis Nieto Amado
(Universidad de Zaragoza)
José Luis Peña Monné
(Universidad de Zaragoza)
Félix Pérez-Lorente
(Universidad de La Rioja)
Diego Troya Corcuera
(Instituto Politécnico y Universidad Estatal de Virginia, Estados Unidos)
Eduardo Viladés Juan
(Hospital San Pedro, Logroño)
Carlos Zaldívar Ezquerro
(Dirección General de Medio Natural del Gobierno de La Rioja)

DIRECCIÓN Y ADMINISTRACIÓN

Instituto de Estudios Riojanos
C/ Portales, 2
26071 Logroño
publicaciones.ier@larioja.org

Suscripción anual España (1 número y monográfico): 15 €
Suscripción anual extranjero (1 número y monográfico): 20 €
Número suelto: 9 €
Número monográfico: 9 €

INSTITUTO DE ESTUDIOS RIOJANOS

ZUBÍA

REVISTA DE CIENCIAS

Monográfico Núm. 29

VID Y VINO

Coordinador:
IGNACIO PÉREZ MORENO



Gobierno de La Rioja
Instituto de Estudios Riojanos
LOGROÑO
2017

Vid y vino / coordinador Ignacio Pérez Moreno. – Logroño : Instituto de Estudios Riojanos, 2017
197 p. : gráf. ; 24 cm– (Zubía. Monográfico, ISSN 1131-5423; 29).-
D.L. LR 413-2012

1. Vinos - España. I. Pérez Moreno, Ignacio. II. Instituto de Estudios Riojanos. III. Serie

634.8(460)

663.2(460)

Reservados todos los derechos. Ni la totalidad ni parte de esta publicación pueden reproducirse, registrarse o transmitirse por un sistema de recuperación de información, en ninguna forma ni por medio, sea electrónico, mecánico, fotoquímico, magnético o electroóptico, por fotocopia, grabación o cualquier otro, sin permiso previo por escrito de los titulares del copyright.

© Logroño, 2017
Instituto de Estudios Riojanos
C/ Portales, 2.
26001-Logroño, La Rioja (España)

© Diseño de cubierta e interior: ICE Comunicación

© Cubierta y contracubierta: Colores rojizos de parra silvestre en un rincón del río Iregua
(Fotografía de José Manuel Valle Melón)
Vid silvestre en la parcela experimental de la Universidad de La Rioja (Fotografía de Álvaro Rodríguez Miranda)

Imprime: Gráficas Isasa, S. L. - Arnedo (La Rioja)

ISSN 1131-5423

Depósito Legal LR 413-2012

Impreso en España - Printed in Spain

ÍNDICE

CARMEN BERLANAS, BEATRIZ LÓPEZ-MANZANARES, DAVID GRAMAJE

Desarrollo de un medio de cultivo para detectar propágulos viables de hongos asociados a la enfermedad del pie negro en viñedos

Estimation of viable propagules of black-foot disease pathogens in grapevine cultivated soils and their relation to production systems and soil properties 7-24

MARÍA ÁNGELES DEL-CASTILLO-ALONSO, LAURA MONFORTE, GONZALO SORIANO, RAFAEL TOMÁS-LAS-HERAS, JAVIER MARTÍNEZ-ABAIGAR, ENCARNACIÓN NÚÑEZ-OLIVERA

Diferencias en el perfil fenólico del hollejo entre dos variedades tintas de *vitis vinifera*, Tempranillo y Garnacha, y sus correspondientes variantes blancas

Differences in the phenolic profile of berry skins among two red varieties of vitis vinifera, tempranillo and garnacha, and their corresponding white variants 25-40

ESTEBAN GARCÍA RUIZ, VICENTE S. MARCO MANCEBÓN, IGNACIO PÉREZ MORENO

Análisis geoestadístico de la distribución espacio-temporal de *Lobesia Botrana* (Lepidoptera: Tortricidae) en Rioja Alta (España)

Geostatistical analysis of space-time distribution of Lobesia Botrana (Lepidoptera: Tortricidae) in Rioja Alta (Spain) 41-66

JUANA MARTÍNEZ, ANA GONZALO-DIAGO, ELISA BAROJA, ENRIQUE GARCÍA-ESCUADERO

Características agronómicas y potencial enológico de las variedades de vid blancas autorizadas en la D.O.Ca. Rioja.

Agronomic characteristics and enological potential of white vine varieties authorized in the D.O.Ca. Rioja 67-82

FERNANDO MARTÍNEZ DE TODA FERNÁNDEZ, JESÚS GARCÍA MARTÍN, PEDRO BALDA

Adaptación al calentamiento climático de veinte variedades de vid, minoritarias de la DOCa Rioja, por su potencial de acidez

Adaptation to climate warming of twenty vine varieties, minorities in the DOCa Rioja, through their acidity potential 83-94

FERNANDO MARTÍNEZ DE TODA FERNÁNDEZ, RAFAEL OCETE RUBIO, EDUARDO PRADO VILLAR, ÁLVARO RODRÍGUEZ MIRANDA, JOSÉ MANUEL VALLE MELÓN

La vid silvestre en La Rioja (España): situación actual y difusión mediante infraestructuras de datos espaciales

Wild grapevine in La Rioja, Spain: current situation and dissemination through spatial data infrastructures 95-120

**MAITE RODRÍGUEZ-LORENZO, CAROLINA ROYO,
PABLO CARBONELL-BEJERANO, FÉLIX CIBRIÁIN SABALZA,
JULIÁN SUBERVIOLA RIPA, ANA SAGÜÉS SARASA, JAVIER IBÁÑEZ,
JOSÉ M. MARTÍNEZ ZAPATER**

Caracterización de deleciones causantes de cambios en el color de la uva mediante
evaluación de la heterocigosidad de marcadores SNP

*Characterization of deletions responsible for grape berry color changes through
the study of loss of heterozygosity of SNP markers.....*121-144

**JAVIER PORTU, ROSA LÓPEZ, PILAR SANTAMARÍA,
TERESA GARDE CERDÁN**

Efecto de la aplicación foliar de jasmonato de metilo en la composición fenólica
de la uva y del vino

*Effect of methyl jasmonate foliar application on the grape and wine phenolic
composition.....*141-154

**PILAR RUBIO-BRETÓN, MATTEO BORDIGA, JUANA MARTÍNEZ, ANA
GONZALO-DIAGO, EVA P. PÉREZ-ÁLVAREZ, TERESA GARDE-CERDÁN**

Envejecimiento de vinos en barricas y alternativos de roble

Aging of wines in oak barrels and alternatives155-176

**LUCÍA GONZÁLEZ-ARENZANA, PATROCINIO GARIJO,
ANA ROSA GUTIÉRREZ, ROSA LÓPEZ, PILAR SANTAMARÍA,
ISABEL LÓPEZ-ALFARO, CARMEN OLARTE, SUSANA SANZ**

Factores implicados en la alteración de vinos tintos por *Brettanomyces bruxellensis*

Factors involved in the red wines spoilage produced by Brettanomyces bruxellensis.....177-194

FACTORES IMPLICADOS EN LA ALTERACIÓN DE VINOS TINTOS POR *BRETTANOMYCES BRUXELLENSIS*

LUCÍA GONZÁLEZ-ARENZANA¹

PATROCINIO GARIJO¹

ANA ROSA GUTIÉRREZ¹

ROSA LÓPEZ¹

PILAR SANTAMARÍA¹

ISABEL LÓPEZ-ALFARO¹

CARMEN OLARTE²

SUSANA SANZ^{3*}

RESUMEN

Se analizaron 100 vinos jóvenes de la D.O.Ca. Rioja de la campaña conflictiva del 2013, y 100 vinos del 2012, que transcurrió con normalidad. Se encontraron diferencias en parámetros analíticos y en la incidencia de la levadura alterante *Brettanomyces bruxellensis*, mucho mayor en la campaña de 2013. Algunos vinos con recuentos de *Brettanomyces* superiores a 10² céls/ml, no desarrollaron carácter “Brett”, indicando que la contaminación con esta levadura no es el único factor implicado. Los vinos con alteración presentaron valores ligeramente inferiores de pH, pero superiores de acidez volátil, azúcares reductores y densidad, así como menor grado alcohólico, que los vinos que no la desarrollaron. La contaminación por *Brettanomyces* no es fácilmente evitable, especialmente en campañas conflictivas y el control del carácter “Brett” debe realizarse previniendo su multiplicación. También debería estudiarse la importancia que los compuestos minoritarios y los clones de *B. bruxellensis* tienen sobre esta alteración.

Palabras Clave: *Control de calidad, contaminación microbiana, Brettanomyces, vendimias conflictivas, vino tinto.*

Hundred young wines from the D.O.Ca. Rioja from the difficult 2013 vintage, and 100 wines from the 2012, with normal conditions, were analy-

1. ICVV, Instituto de Ciencias de la Vid y el Vino (Universidad de La Rioja, Gobierno de La Rioja, CSIC). Finca La Grajera, Autovía del Camino de Santiago LO-20 Salida 13, 26007 Logroño, Spain.

2. Área de Tecnología de los Alimentos. Dpto. Agricultura y Alimentación. Universidad de La Rioja. C/ Madre de Dios 51, 26006 Logroño, Spain.

3. Departamento de Agricultura y Alimentación. - Universidad de La Rioja - C/Madre de Dios, 51 - 26006 Logroño (Spain) - Telephone Number: 34 941 299729.

* Autor de referencia (*corresponding author*): susana.sanz@unirioja.es.

*sed. Differences were found in analytical parameters and in the presence of the yeast *Brettanomyces bruxellensis*, which was much more prevalent in the 2013 vintage. Some wines with *B. bruxellensis* counts above 10^2 cells/ml, no "Brett" features were found. This indicates that the contamination by this yeast is not the only factor involved. The wines which developed spoilage had slightly lower pH and alcoholic strength values but higher levels of volatile acidity, reducing sugars and density than the not affected wines. *B. bruxellensis* contamination is not easily avoidable, especially in difficult harvests, and the control of the "Brett" character must be performed by measures which prevent its multiplication. The importance that the minority compounds and the *Brettanomyces* strains have in the spoilage must be studied.*

Key words: *Quality control, microbial contamination, Brettanomyces, difficult vintage, red wine.*

1. INTRODUCCIÓN

Las condiciones climatológicas en las que tiene lugar una vendimia afectan a las características de las uvas, a los microorganismos presentes en las mismas y al desarrollo de la vinificación y, en consecuencia, a las características de los vinos finales obtenidos. En la Denominación de Origen Calificada Rioja (D.O.Ca. Rioja), los vinos resultantes de cada campaña son analizados y evaluados por su Consejo Regulador y cada añada es calificada acorde a sus características. Vendimias conflictivas, realizadas en condiciones climatológicas no favorables, pueden presentar problemas en la composición y sanidad de la uva y exigen a las bodegas la aplicación de tecnologías que intenten paliar el descenso de la calidad de la materia prima para poder obtener vinos que cumplan los requisitos exigidos en la Denominación. A pesar de ello, un cierto porcentaje de vinos no alcanzan los estándares de calidad exigidos y son descalificados por el Consejo Regulador. En vendimias conflictivas, el porcentaje de vinos descalificados siempre es superior al de vendimias realizadas en años que han transcurrido sin problemas.

Uno de los principales problemas que se puede presentar en los vinos es el desarrollo de levaduras de la especie *Brettanomyces bruxellensis*, ya que esta levadura está implicada en la alteración de los mismos y es responsable de la aparición de serios problemas de calidad al provocar cambios organolépticos en el vino debidos a la aparición de olores fenólicos, el llamado carácter "Brett", que se describen como olor a animal, establo, sudor de caballo, plástico quemado y lana húmeda (Licker *et al.* 1998). *B. bruxellensis* es la forma anamórfica no esporulada de la levadura, mientras que *Dekkera bruxellensis* es la forma telomórfica de la misma especie, que forma ascosporas. Ambas han sido descritas en la literatura como parte de la microbiota de muchos productos fermentados tales como vino, cerveza, sidra y kéfir (Suárez *et al.* 2007).

Aunque estas levaduras han sido encontradas en uvas (Renouf y Lonvaud-Funel 2007) y en mostos en fermentación (Renouf *et al.* 2006), normalmente se detectan en vinos tintos durante su envejecimiento en barricas (Conterno *et al.*, 2006; Fugelsang y Zoecklein, 2003; Martorell, 2006). *Brettanomyces* llega a la bodega a través del viñedo y pueden colonizar determinadas superficies y equipos que no siempre son fáciles de limpiar y esterilizar (Alguacil *et al.*, 1998; Baleiras-Couto *et al.*, 2011; Fugelsang, 1998; Loureiro y Malfeito-Ferreira, 2003; Renouf *et al.*, 2007a; Pretorious, 2000; Renouf y Lonvaud-Funel, 2007). Un reciente trabajo realizado en bodegas y vinos de la D.O.Ca. Rioja (Garijo *et al.*, 2015) demostró que la mayoría de la contaminación de vinos por este microorganismo tiene lugar durante las primeras etapas de la vinificación y antes del comienzo del envejecimiento.

La presencia de *Brettanomyces* en vinos supone un problema de importancia internacional, ya que todas las regiones vinícolas se encuentran afectadas en mayor o menor medida. Dadas las importantes pérdidas económicas que se derivan de la contaminación de vinos con *Brettanomyces*, la monitorización y el control de este microorganismo constituye el mayor reto de la enología moderna (Suárez *et al.*, 2007; Wedral *et al.*, 2010; Zuehlke *et al.*, 2013). La identificación y cuantificación de esta levadura es extremadamente importante para los enólogos para poder evitar las desviaciones sensoriales. Sin embargo, el control de estos microorganismos es difícil debido a las adaptaciones que han realizado para poder sobrevivir en las condiciones fisiológicamente estresantes de los vinos acabados: alto contenido en alcohol, sin suministro (o en cantidades residuales) de azúcares, anaerobiosis y presión de CO₂ (Suárez *et al.*, 2007).

Los métodos tradicionales de identificación y enumeración de *Brettanomyces* en vino se basan en su cultivo en medios selectivos y normalmente tardan entre una y dos semanas en desarrollarse. Sin embargo, aislar *Brettanomyces* directamente del mosto puede resultar difícil ya que su limitada velocidad de crecimiento y la reducida concentración celular en la que suele encontrarse, hace que su identificación sea complicada en comparación con otras levaduras presentes en mayor cantidad. Además, las células de *Brettanomyces* se pueden encontrar en estado viable pero no cultivable (*Viable But Not Cultivable*, VBNC) (Divol y Lonvaud-Funel, 2005; Du Toit *et al.*, 2005; Millet y Lonvaud-Funel, 2000) y por tanto su estudio puede resultar difícil si se realiza con las técnicas microbiológicas convencionales.

Para superar esta dificultad, en los últimos años se han desarrollado métodos de Biología Molecular, independientes de cultivo, para la rápida detección e identificación de *Brettanomyces* en vino. Así, la PCR a tiempo real o cuantitativa (qPCR) ofrece la posibilidad de detectar e identificar, con alta especificidad y eficacia, un ADN diana específico permitiendo la cuantificación de la población de la levadura presente en el vino. Por lo tanto, estas innovadoras metodologías posibilitan al enólogo tomar decisiones oportunas en el momento adecuado (Delaherche *et al.*, 2004; Bleve *et al.*, 2003; Hierro *et al.*, 2006; Martorell *et al.*, 2005; Phister y Milis, 2003;

Phister *et al.*, 2007; Salinas *et al.*, 2009; Tessonnière *et al.*, 2009; Zott *et al.*, 2010). Sin embargo, la aplicación de este método requiere disponer de un laboratorio con equipamiento sofisticado que raramente se encuentra en las bodegas, cuyos laboratorios están preparados para otro tipo de determinaciones. Por ello, últimamente se está generalizando el uso de métodos de detección odorimétricos que resultan rápidos, fiables y de gran aplicación práctica en bodega. Estos métodos se basan en inocular la muestra de vino problema sobre medios de cultivo que contienen los compuestos químicos precursores de la aparición de etilfenoles. El tiempo que transcurre entre la inoculación de la muestra y la percepción de estos compuestos permite estimar el grado de contaminación por *Brettanomyces* del vino analizado (Couto *et al.*, 2005; Kheir *et al.*, 2013).

A pesar de toda la información disponible, todavía no es posible establecer qué factores están realmente implicados en la aparición de carácter “Brett” en los vinos. Cada vinificación puede presentar circunstancias específicas que impliquen un origen y vía de contaminación concreta (Oelofse *et al.*, 2008). Un mayor conocimiento de los factores que determinan si los vinos contaminados por *Brettanomyces* desarrollan o no alteraciones organolépticas, es esencial para establecer el origen de la alteración del vino, las vías y puntos críticos de contaminación por esta levadura. Este conocimiento es especialmente necesario en las vinificaciones conflictivas en las que son mayores los riesgos de contaminación y proliferación de *Brettanomyces* y la aparición de vinos defectuosos.

El objetivo de este trabajo es estudiar la incidencia de *B. bruxelliensis* en vinos correspondientes a una de las campañas más conflictivas en la D.O.Ca. Rioja de los últimos años y los factores que pudieran estar implicados en la aparición de carácter “Brett”.

2. METODOLOGÍA

2.1. Recogida de muestras

El estudio fue realizado con 100 vinos tintos jóvenes que acababan de terminar las fermentaciones alcohólica y la maloláctica correspondientes a la vendimia del 2013. Los vinos procedían de bodegas situadas en diferentes subzonas de la D.O.Ca. Rioja: 30 de Rioja Alta y Rioja Baja respectivamente, y 20 de Rioja Alavesa. Las 20 restantes fueron muestras “difíciles” correspondientes a vinos que habían sufrido problemas durante la vinificación (fermentaciones alcohólicas o malolácticas que tardaron en arrancar o se desarrollaron muy lentamente).

Los datos obtenidos se compararon con los resultados del análisis de 100 vinos tintos jóvenes de la vendimia del 2012 obtenidos con los mismos procedimientos de elaboración y la misma procedencia.

2.2. Análisis químico

Los análisis químicos realizados a los vinos se llevaron a cabo mediante los métodos recogidos en el Reglamento CEE nº 2676/1990 por el que se determinan los métodos de análisis aplicables en el sector del vino (Diario oficial de la Comunidad Europea de 3.10.1990, <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/%3furi%3dOJ:L:1990:272:TOC>).

2.3. Análisis por qPCR

Las muestras de vino fueron trasladadas desde las bodegas al laboratorio en botellas de vidrio estériles de 500 ml. Los análisis se realizaron utilizando el sistema ETS Scorpions con el que se realiza un ensayo de PCR múltiple, cuantitativo y a tiempo-real. Se utilizó un termociclador a tiempo-real (Smart cyler II. Cepheid) y marcadores fluorescentes para identificar y cuantificar los microorganismos presentes. Se extrajo el ADN total de las muestras de los vinos utilizando los reactivos de lisis adecuados. El límite de detección del método es 1 céls/ml.

Es necesario señalar que este método no es capaz de distinguir entre cepas de *Brettanomyces* (no diferencia las especies *B. bruxellensis* y *B. anomalous*) ni establecer diferencias entre células viables, VBNC o células muertas.

2.4. Análisis odorimétrico

20 ml de un caldo de enriquecimiento selectivo (Couto *et al.*, 2005) se inocularon con una muestra de 20 ml de vino. Este caldo favorece especialmente el crecimiento y la actividad de *Brettanomyces* e incorpora ácido p-cumárico, precursor del 4-etil-fenol, en una concentración lo suficientemente elevada (20 mg/l) como para producir la mayor señal olfativa posible. Tras la inoculación con el vino, el medio se incubaba a 30°C durante 10 días y se monitoriza diariamente mediante análisis olfativo. Los vinos contaminados producen 4-etil-fenol, que puede ser fácilmente detectado olfativamente. Para cada muestra se registra el tiempo necesario (días) para obtener un resultado positivo (detección de 4-etil-fenol).

2.5. Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos se realizó utilizando el paquete estadístico *Statistica* Version 9.0 para Windows (Statsoft Inc, Tulsa, OK, USA). Los datos fueron analizados mediante análisis de varianza; con un nivel de significancia de $p < 0,05$.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Características de los vinos

El año 2013 resultó ser una campaña conflictiva porque hubo retrasos en la maduración y en la vendimia, se presentaron problemas sanitarios en la uva y dificultades durante la vinificación. Esta situación quedó posteriormente reflejada en los datos de la campaña (Memorias del Consejo Regulador de la D.O.Ca. Rioja 2013, <http://es.riojawine.com>) en la que se recoge que en este año el 2,6% de los vinos fueron descalificados y la cosecha fue calificada únicamente como Buena (en una escala que incluye las categorías de Regular, Buena, Muy Buena y Excelente).

Estas condiciones determinaron las características de los vinos de esa campaña. De hecho, los datos analíticos de las 100 muestras de vino procedentes de la vendimia del año 2013 mostraron diferencias estadísticamente significativas con respecto a los vinos correspondientes al año anterior. En el 2012, la campaña fue seca, sin problemas sanitarios y con fermentaciones normales. En esta campaña, sólo el 1,3% de las muestras de vino fueron descalificadas y la cosecha fue calificada como Muy Buena (Memorias del Consejo Regulador de la D.O.Ca. Rioja, 2012, <http://es.riojawine.com>). Las diferencias entre los vinos de ambas campañas se muestran en la Figura 1, observándose diferencias estadísticamente significativas para los parámetros pH, acidez total, ácido málico, contenido en azúcares reductores, grado alcohólico, sulfuroso libre, Índice de Color (IC), Índice de Polifenoles Totales (IPT) y extracto seco.

Atendiendo a las zonas de procedencia de los vinos, es necesario señalar que los métodos de vinificación utilizados en las distintas zonas fueron diferentes: en Rioja Alta y Baja todos los vinos fueron producidos por el método de despalillado y prensado, mientras que en Rioja Alavesa un gran número de vinos se elaboraron mediante maceración carbónica. Aunque cabría esperar que los vinos fueran distintos, el análisis estadístico de las 100 muestras pertenecientes al 2013 no mostró diferencias significativas por procedencia (Rioja Alta, Alavesa o Rioja Baja) para ninguno de los parámetros analíticos evaluados. Tampoco en la campaña del 2012 se encontraron diferencias por esta causa.

No se observaron diferencias significativas entre los vinos “difíciles” que habían tenido problemas de elaboración (Vinos Problemáticos) y el resto de los vinos, salvo en el contenido en ácido málico, que fue significativamente superior en los 20 vinos problemáticos evaluados procedentes de la campaña del 2013 (1,44 g/l) respecto al resto de vinos que no presentaron problemas (0,61g/l). Esta diferencia podría reflejar que estas muestras “difíciles” habían sufrido problemas durante la fermentación maloláctica (difícil arranque, progreso lento...).

El papel del SO₂ en la prevención de la aparición del carácter “Brett” en vinos ha sido objeto de numerosos estudios en los que se ha señalado

los bajos niveles de SO₂ en un vino como factor de riesgo del desarrollo de *Brettanomyces* (Barata *et al.*, 2008; Du Toit *et al.*, 2005; Serpagi *et al.*, 2012; Laforgue y Lonvaud-Funel, 2012). En los vinos analizados en este trabajo se observó que las muestras correspondientes al año 2013 tuvieron un contenido de SO₂ libre significativamente inferior a los vinos del año 2012 (Figura 1).

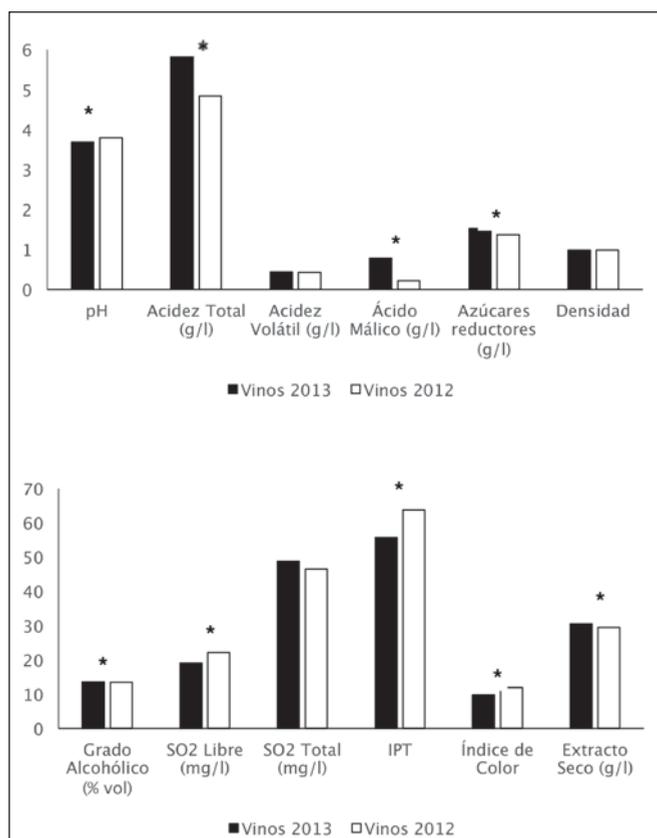


Figura 1. Parámetros analíticos de los 100 vinos tintos del 2013 y su comparación con los 100 vinos tintos del 2012. Con un asterisco los parámetros que muestran diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

3.2. Presencia de levaduras *Brettanomyces* en los vinos

Todos los vinos se analizaron para determinar la presencia de *Brettanomyces* utilizando dos métodos de detección: PCR cuantitativa y método odorimétrico. La PCR cuantitativa permite no sólo determinar la presencia de *Brettanomyces* sino también cuantificar el grado de contaminación. La

PCR cuantitativa es una herramienta apropiada para detectar *B. bruxellensis* viables-pero-no-cultivables (VBNC) en vino (Willenburg y Divol, 2012). Cuando *B. bruxellensis* entra en un estado viable-pero-no-cultivable o estado latente, las células no pueden cultivarse mediante métodos convencionales (incubación en placa en medios selectivos). De hecho, se estima que la población de VBNC en vinos secos podría ser 10 veces mayor que la población cultivable (Millet y Lonvaud-Funel, 2000). Así pues, la cuantificación de VBNC *Brettanomyces* es importante por su potencial capacidad de revivir y multiplicarse, produciendo la alteración del vino.

La cuantificación de los niveles de *Brettanomyces* podría resultar importante ya que la mera detección de la presencia de *Brettanomyces* en un vino no va necesariamente relacionada con la aparición de carácter “Brett”. Así, aunque en la bibliografía existe cierta controversia, se admite que existe riesgo de una excesiva acumulación de fenoles volátiles cuando los recuentos de *Brettanomyces* en el vino superan 10^2 - 10^3 céls/ml (Renouf y Lonvaud-Funel, 2005).

Por su parte, el método odorimétrico, utilizado en las bodegas por su simplicidad, estima el nivel de contaminación atendiendo al tiempo que transcurre desde la inoculación del test con la muestra de vino hasta la aparición de olor característico que producen estas levaduras (carácter “Brett”). Este test permite determinar la predisposición de un vino para desarrollar el carácter “Brett”. Así, se ha establecido una relación aproximada entre el número de *Brettanomyces* presentes en el vino y el tiempo que tarda en aparecer el olor anómalo característico en el medio inoculado (a menor tiempo transcurrido, mayor presencia de *Brettanomyces* en el vino) (Couto *et al.*, 2005). Aunque se recomienda que la incubación del test se prolongue durante 10 días, los vinos con mayor riesgo de presentar carácter “Brett” dan respuesta positiva en los 4 primeros días de incubación.

La Figura 2 recoge el número de vinos de la campaña del año 2013 clasificados como positivos o negativos atendiendo a los diferentes criterios aplicados en este trabajo: (1) presencia o ausencia de *Brettanomyces* por PCR cuantitativa, (2) presencia o ausencia de recuentos de *Brettanomyces* superiores a 10^2 céls/ml por PCR cuantitativa y (3) aparición de olor característico en el test odorimétrico antes de 4 días desde la inoculación. También, y para comparar ambas campañas, se recogen los resultados de los vinos del 2012.

Cuando se considera la detección de *Brettanomyces* mediante PCR cuantitativa (criterio 1), en el año 2013 se encontraron 47 muestras positivas. Este número fue notablemente superior al registrado en la campaña del 2012 con sólo 27 muestras de vino positivas. Las mayores dificultades durante la maduración y vinificación registradas en la campaña del 2013 justificarían el mayor número de muestras con presencia de *Brettanomyces*, e indicarían que la calidad de la uva y la evolución de las fermentaciones podrían ser factores muy relacionados con la presencia en los vinos de estas levaduras alterantes (Garijo *et al.*, 2015). También es necesario señalar que los vinos del 2013 tuvieron un contenido de SO_2 libre significativamente

inferior a los vinos del 2012 (Figura 1). Este dato corrobora la importancia del SO₂ en el control de *Brettanomyces*.

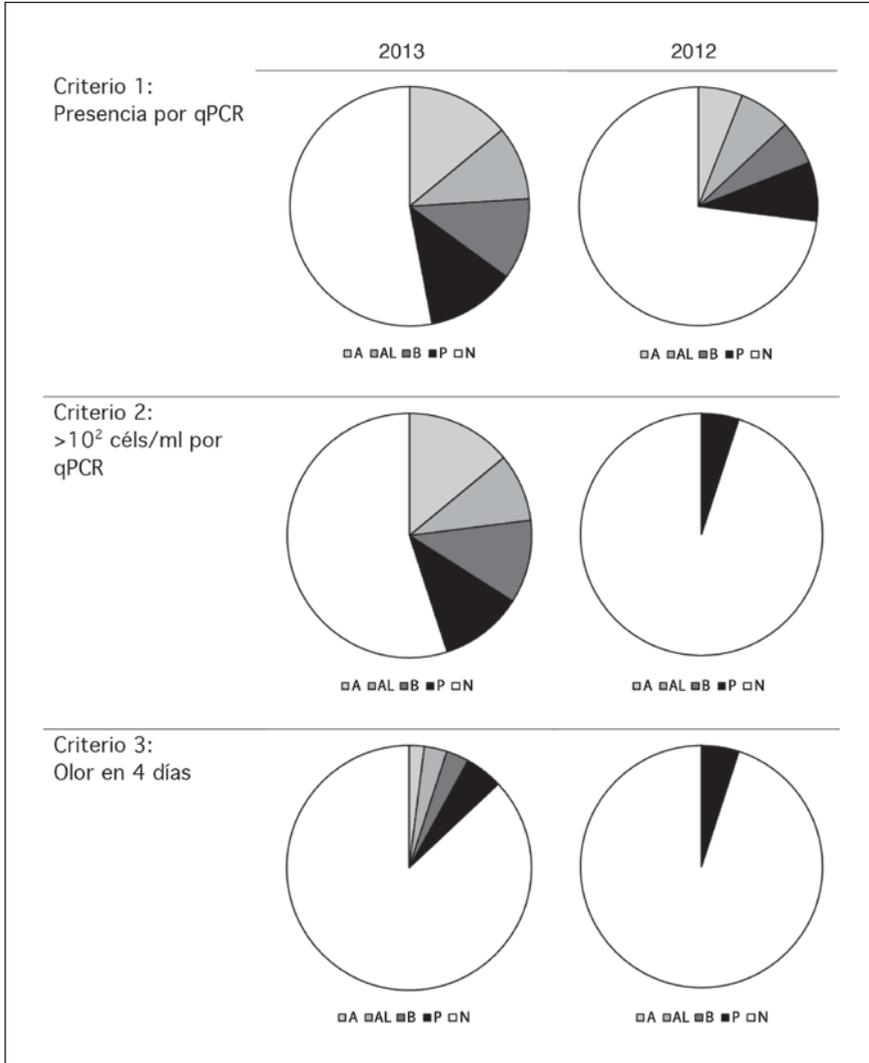


Figura 2. Distribución de los vinos clasificados como *Brettanomyces*-positivos según los tres criterios utilizados, por año y origen (A: Rioja Alta; AL: Rioja Alavesa; B: Rioja Baja y P: vinos problemáticos), N: Vinos negativos.

Aplicando el criterio 1, los vinos procedentes de Rioja Alavesa presentaron un porcentaje de contaminación ligeramente superior al de los vinos de las otras zonas de procedencia. En 2013, el 50% de los vinos de Rioja Alavesa fueron catalogados como positivos por presencia de *Brettanomyces*.

En 2012 la proporción fue algo menor: en 7 de los 20 vinos analizados de esta zona se detectó *Brettanomyces* (35%). Sin embargo, los vinos procedentes de esta zona no fueron estadísticamente distintos al resto en ninguno de los parámetros químicos analizados. La causa de la mayor presencia de *Brettanomyces* en los vinos de esta zona podría atribuirse al hecho de que en Rioja Alavesa muchos vinos son elaborados mediante maceración carbónica. Las características específicas de este proceso de vinificación (alta temperatura, método de aplicación de SO₂, elevada manipulación...) podrían favorecer la contaminación de los vinos con *Brettanomyces* y explicar así los mayores porcentajes hallados.

Cuando los vinos fueron analizados atendiendo al progreso de la vinificación, encontramos que el mayor porcentaje de vinos alterados se correspondió con aquellos que habían presentado problemas durante la fermentación: 12 de 20 en la campaña del 2013 (60%). En el año 2012, el porcentaje de vinos positivos encontrados entre las muestras problemáticas analizadas fue menor: 8 de 20 (40%). Otros autores han asociado la presencia de *Brettanomyces* con paradas o progresos muy lentos en la fermentación alcohólica y maloláctica (Dias *et al.*, 2003; Silva *et al.*, 2004). La fermentación maloláctica es una etapa especialmente vulnerable para la contaminación con *Brettanomyces* al presentar los vinos bajos niveles de SO₂ libre (Oelofse *et al.*, 2008). Como ya se señaló anteriormente, en este estudio, los vinos problemáticos presentaron un contenido en ácido málico superior al resto de los vinos.

Cuando se considera el nivel de contaminación y se estiman como positivas las muestras con recuentos de *Brettanomyces* superiores a 10² céls/ml mediante PCR cuantitativa (criterio 2), el número de vinos positivos se redujo hasta 45 en 2013. Sin embargo, en el 2012 sólo 5 de los 100 vinos analizados presentaron niveles de contaminación por encima de 10² céls/ml y todas estas muestras correspondían al grupo de vinos con problemas en la vinificación. Estos resultados indican que, efectivamente, en campañas sanas y salvo en vinos con problemas, no sólo la frecuencia de vinos contaminados por *Brettanomyces* es baja sino que, además, la presencia de esta levadura no llega a alcanzar poblaciones que puedan originar defectos. Sin embargo, en añadas difíciles no sólo la incidencia de *Brettanomyces* es mayor sino que además los recuentos son elevados. De hecho en 2013, de los 47 vinos en los que se había detectado *Brettanomyces* aplicando el criterio 1, se encontraron recuentos superiores a 10² céls/ml en 45 de ellos.

Al comparar las características químicas de los vinos del 2013 clasificados como positivos y negativos según el criterio 2 (Figura 3), sólo se encontraron diferencias significativas en los valores de pH. Los 45 vinos positivos presentaron un valor de pH ligeramente inferior (3,66) al de las muestras consideradas como negativas (3,72). Estos resultados contradicen lo indicado por otros autores quienes indican que los vinos con mayor valor de pH son más susceptibles de sufrir alteración por *Brettanomyces* (Dias *et al.*, 2003). Aunque esos mismos autores también señalan que, efectivamente, este no es el único factor implicado en el desarrollo de esta levadura.

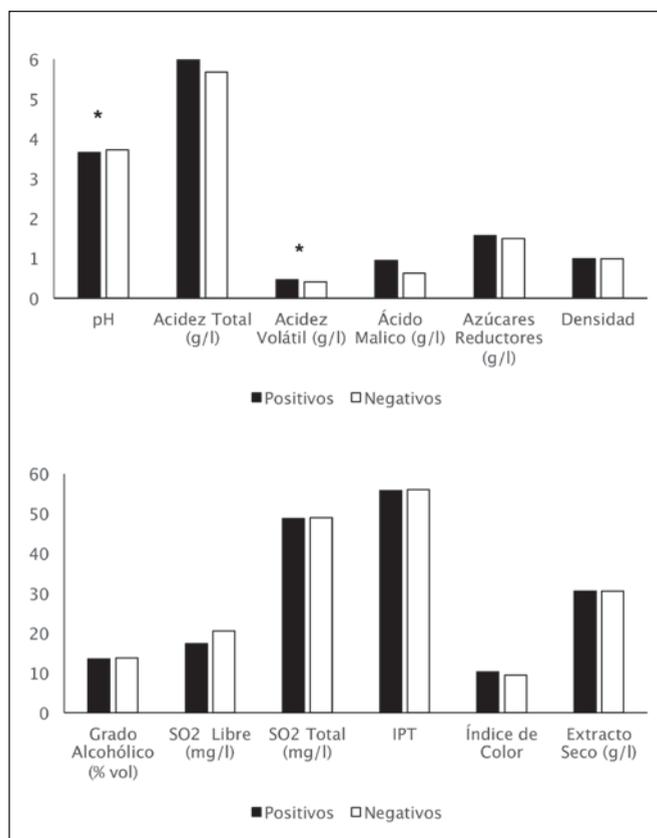


Figura 3. Parámetros analíticos de los vinos del 2013 calificados como positivos con recuentos por qPCR $>10^2$ céls/ml *Brettanomyces* (n=45) o como negativos con recuentos $<10^2$ céls/ml *Brettanomyces* (n=55). Con un asterisco los parámetros que muestran diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

La acidez volátil también presentó valores significativamente más elevados en los vinos positivos frente a los negativos (0,46 y 0,41, respectivamente), lo que podría indicar una alteración incipiente de estos vinos. Para el resto de los parámetros químicos analizados, los vinos con niveles de *Brettanomyces* superiores a 10^2 céls/ml por PCR cuantitativa fueron estadísticamente indistinguibles de los vinos con poca o ninguna presencia de esta levadura.

Finalmente, al aplicar el método odorimétrico (criterio 3) en la determinación de vinos positivos en *Brettanomyces* de la campaña de 2013, los resultados obtenidos fueron totalmente diferentes. El número de muestras positivas se redujo drásticamente a 13. Esta disminución en el número de vinos positivos podría explicarse por las características de los métodos de detección empleados.

Así, la técnica PCR cuantitativa contabiliza el DNA de todas las células de *Brettanomyces* presentes en la muestra, ya estén vivas, muertas o se encuentren en estado VBNC, así como clones de esta especie incapaces de producir etilfenoles. Por su lado, el método odorimétrico sólo detecta como positivas las muestras de vino que presentan células vivas de *Brettanomyces* y que sean capaces de producir etilfenoles.

Por otra parte, de las 13 muestras de 2013 consideradas positivas por el método odorimétrico, 12 de ellas presentaron, efectivamente, recuentos claramente superiores a 10^2 céls/ml por PCR cuantitativa. Sin embargo, hubo una muestra que, siendo positiva por el criterio odorimétrico, los recuentos por PCR no alcanzaron las 10^2 céls/ml. Además, también se observó que vinos con altos recuentos en *Brettanomyces*, no desarrollaron carácter "Brett". Así encontramos 5 muestras con recuentos superiores a 10^3 céls/ml, 2 con recuentos superiores a 10^4 céls/ml e incluso 3 muestras con recuentos superiores a 10^5 céls/ml en las que no se detectó el carácter "Brett" por odorimetría. Este hecho parece indicar que aunque la presencia de microorganismos viables es necesaria para la producción de fenoles volátiles (Silva *et al.*, 2004), la existencia de altas poblaciones de *Brettanomyces* en un vino no siempre se traduce en la aparición de defectos sensoriales y que otros factores podrían estar implicados. Así, diferentes autores han descrito que distintos clones de *Brettanomyces* presentan diferente capacidad en la producción de etilfenoles (Coulon *et al.* 2010, Woolfit *et al.* 2007). En nuestro caso, el método de qPCR utilizado no es capaz de distinguir entre cepas de *Brettanomyces* (ni siquiera distingue las especies *B. bruxellensis* y *B. anomalus*). Además, la presencia de altos porcentajes de VBNC o células muertas (no distinguibles mediante qPCR) podrían ser la causa de esta falta de correlación. Por otro lado, la cantidad y naturaleza en el vino de compuestos minoritarios susceptibles de ser transformados por *Brettanomyces* en compuestos causantes de olores anómalos, podría ser otro factor de influencia (Agnolucci *et al.*, 2009, Coterno *et al.*, 2006).

Al considerar las características analíticas de los vinos de 2013 clasificados como positivos con el criterio odorimétrico (Figura 4), se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los vinos positivos y negativos para el pH, la acidez volátil, azúcares reductores y grado alcohólico. Puede apreciarse que los vinos con carácter "Brett" presentaban unos valores de pH inferiores a los vinos que no desarrollaron este carácter (3,57 y 3,71 respectivamente), así como mayores valores de acidez volátil (0,45 y 0,38 g/l respectivamente). También presentaron menores niveles de grado alcohólico (13,23 los positivos y 13,69 los negativos) mientras que el contenido en azúcares reductores fue superior (1,76 g/l en los positivos y 1,50 g/l en los negativos). El mayor contenido en azúcar y menor grado alcohólico de los vinos positivos se reflejó, consecuentemente, en una densidad significativamente mayor que en los vinos negativos (0,9935 y 0,9926 respectivamente). Por lo tanto, los vinos en los que el crecimiento de levaduras *Brettanomyces* provocó la aparición del carácter "Brett", detectable por el método odorimétrico, eran vinos más ácidos, con mayor acidez volátil, más azúcares reductores y menor grado alcohólico.

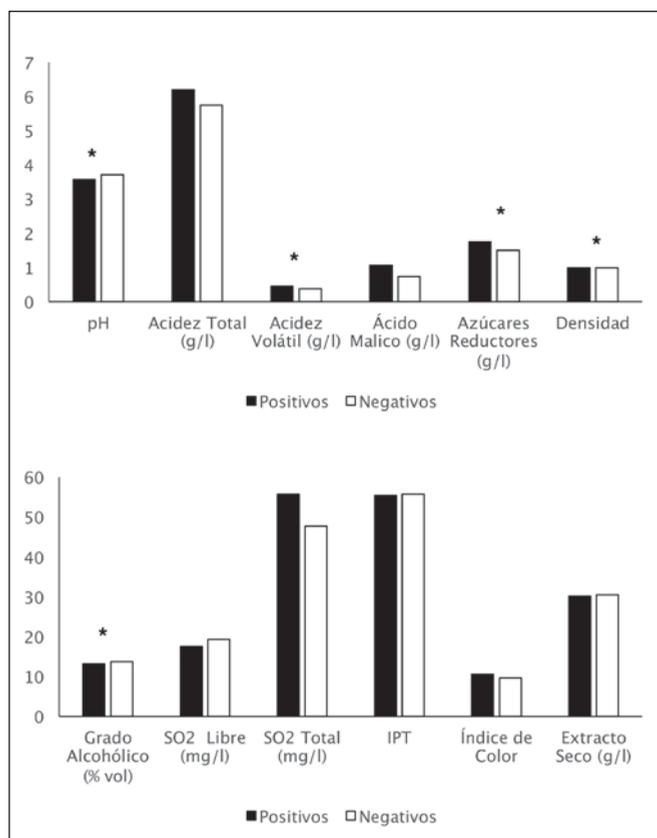


Figura 4. Parámetros analíticos de los vinos del 2013 calificados como positivos con olor a “Brett” por el método olorimétrico en < 4 días (n=13) o como negativos con olor a “Brett” por el método olorimétrico en > 4 días (n=87). Con un asterisco los parámetros que muestran diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

Los vinos considerados como positivos y negativos (tanto con el criterio 2 como con el criterio 3) no mostraron diferencias significativas en el contenido en SO₂ libre. Sin embargo, los vinos del año 2013 considerados positivos con los criterios utilizados presentaron un contenido inferior en SO₂ que los vinos considerados negativos (Figuras 3 y 4), lo que podría señalar la influencia de los niveles de SO₂ en la presencia y desarrollo de levaduras *Brettanomyces* (Barata *et al.*, 2008; Du Toit *et al.*, 2005; Serpagi *et al.*, 2012; Laforgue y Lonvaud-Funel, 2012)

Por otra parte, indicar que aunque en este estudio los vinos clasificados como positivos para el carácter “Brett” no presentaron diferencias significativas en los niveles de índice de polifenoles totales, sería necesario profundizar en la composición de estos componentes del vino puesto que son los

precursores de los etilfenoles. En este sentido, la intensidad y tiempo de maceración, las condiciones de manipulación y la creciente aplicación de tratamientos enzimáticos en las prácticas enológicas encaminadas a la obtención de mayor intensidad colorante podrían ser las causas de la modificación en la composición de la fracción fenólica y proporcionar a *Brettanomyces* un sustrato transformable en etilfenoles y hacer al vino más susceptible a la aparición de carácter “Brett”.

5. CONCLUSIONES

Las condiciones climatológicas en las que tiene lugar una campaña influyen el desarrollo de la vinificación y, a su vez, en las características de los vinos finales obtenidos. Así, los vinos de la campaña conflictiva del 2013 fueron marcadamente diferentes a los de la campaña del 2012, que había transcurrido con normalidad. Las diferencias se reflejaron no sólo en parámetros analíticos sino también en la incidencia y desarrollo de *Brettanomyces*, que resultó mucho mayor en la campaña de 2013. Por lo tanto, campañas complicadas exigen una mayor atención al desarrollo de *Brettanomyces* y la aparición de carácter “Brett”.

Los diferentes resultados obtenidos cuando se compara el número de vinos en los que *Brettanomyces* está presente, incluso a niveles superiores a 10^2 céls/ml, con los vinos que muestran carácter “Brett” en el test odorimétrico, indican que la contaminación de un vino con esta levadura no es el único factor determinante de la alteración. De hecho, se han encontrado vinos con elevados recuentos de *Brettanomyces* (incluso superiores a 10^5 céls/ml) que resultaron negativos en el test odorimétrico.

La diferente capacidad de los distintos clones de *Brettanomyces* presentes en el vino para producir alteraciones y la existencia de compuestos susceptibles de ser transformados por esta levadura en los etilfenoles responsables del carácter “Brett”, podrían ser determinantes.

En este estudio, los vinos clasificados como positivos en carácter “Brett” por odorimetría presentaron valores ligeramente inferiores de pH, pero superiores de acidez volátil, azúcares reductores y densidad así como menor grado alcohólico que los vinos negativos. Sin embargo, no se encontraron diferencias en el contenido en polifenoles totales, si bien este resultado no significa necesariamente que la composición de esta fracción fenólica fuera la misma.

Puesto que la contaminación por *Brettanomyces* de los vinos no parece ser fácilmente evitable, ya que son muy raros los vinos en los que *B. bruxellensis* esté totalmente ausente durante todo el proceso de producción y aspirar a la completa ausencia de este microorganismo en el vino no es realista, especialmente en campañas conflictivas, el control del desarrollo del carácter “Brett” debería igualmente buscarse a través de los compuestos minoritarios del vino. Así, además de medidas tecnológicas para prevenir la

contaminación, desarrollo y crecimiento de *Brettanomyces*, resultaría necesario controlar las prácticas enológicas que influyen en la composición de la fracción fenólica.

6. AGRADECIMIENTOS

Este estudio ha sido realizado mediante la ayuda del Gobierno de La Rioja (Proyecto “PR-08-12”, Proyecto “PR-07-13”), de la Universidad de La Rioja-Banco Santander (Project PROFAI 13/02), y del INIA (Proyecto RTA 2013-00053-C03-03). Los autores desean mostrar su agradecimiento a Victor Llop Santamaría por su excelente asistencia técnica.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alguacil, M., Fidalgo M, Jiménez, J., Lozano, J.I., Neva, M.A., Perdigones, F., 1998. Detección de *Dekkera/Brettanomyces* en instalaciones de vendimia mediante PCR. Alimentos, Equipos y Tecnología. 10, 81-85.
- Agnolucci, M., Vigentini, I., Capurso, G., Merico, A., Tirelli, A., Compagno, C., Foschino, R., Nuti, M., 2009. Genetic diversity and physiological traits of *Brettanomyces bruxellensis* strain isolated from Toscan Sangiovese wines. Int. J. Food Microbiol. 3, 238-244.
- Baleiras-Couto, M.M., Gomes, A.S., Casal, M., Duarte, F.L., 2011. Survey of yeast diversity during bottling processes using restriction analysis of 26S ribosomal DNA (rDNA). Austr. J. Grape Wine Res. 18, 39-42.
- Barata, A., Caldeira, J., Botheleiro, R., Pagliara, D., Malfeito-Ferreira, M., Loureiro, V., 2008. Survival patterns of *Dekkera bruxellensis* in wines and inhibitory effect of sulphur dioxide. Int J. Food Microbiol. 121, 201-207.
- Bleve, G., Rizzotti, L., Dellaglio, F., Torriani, S., 2003. Development of reverse transcription (RT)-PCR and realtime RT-PCR assays for rapid detection and quantification of viable and molds contaminating yogurts and pasteurized food products. Appl. Environ. Microbiol. 69, 4116-4122.
- Conterno, L., Joseph, C.M.L., Arvik, T.J., Hening-Kling, T., Bisson, L.F., 2006. Genetic and physiological characterization of *Brettanomyces bruxellensis* strains isolated from wines. Am. J. Enol. Vitic. 57, 139-147.
- Coulon, J., Perello, M.C., Lonvaud-Funel, A., De Revel, G., Renouf, V., 2010. *Brettanomyces bruxellensis* evolution and volatile phenols production in red wines during storage in bottles. J. Appl. Microbiol. 108, 1450-1458.
- Couto, J.A., Barbosa, A., Hogg, T., 2005. A simple cultural method for the presumptive detection of the yeast *Brettanomyces/Dekkera* in wines. Lett. Appl. Microbiol. 41, 505-510.

- Delaherche, A., Claisse, O., Lonvaud-Funel, A., 2004. Detection and quantification of *Brettanomyces bruxellensis* and 'ropy' *Pediococcus damnosus* strains in wine by real-time polymerase chain reaction. *J. Appl. Microbiol.* 97, 910-915.
- Dias, L., Pereira-da-Silva, S., Tavares, M., Malfeito-Ferreira, M., Loureiro, V., 2003. Factor affecting the production of 4-ethylphenol by the yeast *Dekkera bruxellensis* in enological conditions. *Food Microbiol.* 20, 377-384.
- Divol, B., Lonvaud-Funel, A., 2005. Evidence for viable but non culturable yeasts in botrytis-affected wine. *J. Appl. Microbiol.* 99, 85-93.
- Du Toit, W.J., Pretorius, I.S., Lonvaud-Funel, A., 2005. The effect of sulphur dioxide and oxygen on the viability and culturability of a strain of *Acetobacter pasteurianus* and a strain of *Brettanomyces bruxellensis* isolated from wine. *J. Appl. Microbiol.* 98, 862-871.
- Fugelsang, P.K., 1998. *Brettanomyces*: Dr Jekyll ou Mr Hyde des vins? *Biofutur.* 182, 22-23.
- Fugelsang, K.C., Zoecklein, C.G., 2003. Population dynamics and effects of *Brettanomyces bruxellensis* strains on Pinot noir (*Vitis vinifera* L.) wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 54, 294-300.
- Garijo, P., González-Arenzana, L., López-Alfaro, I., Garde-Cerdán, T., López, R., Santamaría, P., Gutiérrez, A.R., 2015. Analysis of grapes and the first stages of vinification process in wine contamination with *Brettanomyces bruxellensis*. *Eur. Food Res. Technol.* 240, 525-532.
- Hierro, N., Esteve-Zarzoso, B., González, A., Mas, A., Guillamón, J.M., 2006. Real-time quantitative PCR (QPCR) and reverse transcription-QPCR for detection and enumeration of total yeasts in wine. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 7148-7155.
- Kheir, J., Salamech, D., Strehaiano, P., Brandam, C., Lteif, R., 2013. Impact of volatile phenols and their precursors on wine quality and control measures of *Brettanomyces/Dekkera* yeasts. *Eur. Food Res. Technol.* 237, 655-671.
- Laforge, R., Lonvaud-Funel, A., 2012. Hydroxycinnamic acid decarboxylase activity of *Brettanomyces bruxellensis* involved in volatile phenol production: relationship with cell viability. *Food Microbiol.* 32, 230-234.
- Licker, J.L., Acree, T.E., Heníck-Kling, T., 1998. What is "Brett" (*Brettanomyces*) flavor? A preliminary investigation, in: Waterhouse, A.L., Ebeler, S.E. (Eds.), *Chemistry of Wine Flavor*. Am. Chemical Society, Washington DC., pp. 96-115.
- Loureiro, V., Malfeito-Ferreira, M., 2003. Spoilage yeasts in the wine industry. *Int. J. Food Microbiol.* 86, 23-50.
- Martorell, P., 2006. Desarrollo y aplicación de sistemas rápidos para la detección, identificación y caracterización de levaduras alterantes en alimentos. Tesis Doctoral. Universidad de Valencia, España.
- Martorell, P., Querol, A., Fernández-Espinar, M.T., 2005. Rapid identification and enumeration of *Saccharomyces cerevisiae* cells in wine by real-time PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 6823-6830.

- Millet, V., Lonvaud-Funel, A., 2000. The viable but non-culturable state of wine microorganisms during storage. *Lett. Appl. Microbiol.* 30, 136-141.
- Oelofse, A., Pretorius, I.S., Du Toit, M., 2008. Significance of *Brettanomyces* and *Dekkera* during winemaking: a synoptic review. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 29, 128-144.
- Phister, T.G., Mills, D.A., 2003. Real-time PCR assay for detection and enumeration of *Dekkera bruxellensis* in wine. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 7430-7434.
- Phister, T.G., Rawsthorne, H., Joseph, C.M.L., Mills, D.A., 2007. Real-time PCR assay for detection and enumeration of *Hanseniaspora* species from wine and juice. *Am. J. Enol. Vitic.* 58, 229-233.
- Pretorius, I.S., 2000. Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast* 16, 675-729.
- Renouf, V., Lonvaud-Funel, A., 2005. Effet microbiologique de l'usage de barriques neuves et/ou de barriques anciannes. *Rev. Fr. Oenol.* 211, 10-14.
- Renouf, V., Falcou, M., Miot-Sertier, C., Perello, M.C., De Revel, G., Lonvaud-Funel, A., 2006. Interactions between *Brettanomyces bruxellensis* and other yeast species during the initial stages of winemaking. *J. Appl. Microbiol.* 100, 1208-1219.
- Renouf, V., Lonvaud-Funel, A., 2007. Development of an enrichment medium to detect *Dekkera/Brettanomyces bruxellensis*, a spoilage wine yeast, on the surface of grape berries. *Microbial. Res.* 162, 154-167.
- Renouf, V., Lonvaud-Funel, A., Coulon, J., 2007a. The origin of *Brettanomyces bruxellensis* in wines: a Review. *J. Int. Sci. Vigne Vin* 41-3, 161-173.
- Renouf, V., Claisse, O., Lonvaud-Funel, A., 2007b. Inventory and monitoring of wine microbial consortia. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 75, 149-164.
- Salinas, F., Garrido, D., Ganga, A., Veliz, G., Martínez, C., 2009. Taqman real-time PCR for the detection and enumeration of *Saccharomyces cerevisiae* in wine. *Food Microbiol.* 26, 328-332.
- Serpagi, V., Remize, F., Recorbet, G., Gaudot-Dumas, E., Sequeira-Le Grand, A., Alexandre, H., 2012. Characterization of the "viable but non culturable" (VBNC) state in the wine spoilage yeast *Brettanomyces*. *Food Microbiol.* 30, 438-447.
- Silva, P., Cardoso, H., Gerós, H., 2004. Studies on the wine spoilage capacity of the *Brettanomyces/Dekkera spp.* *Am. J. Enol. Vitic.* 55, 65-72.
- Suárez, R., Suárez-Lepe, J.A., Morata, A., Calderón, F., 2007. The production of ethylphenols in wine by yeasts of the genera *Brettanomyces* and *Dekkera*. A review. *Food Chem.* 102, 10-21.
- Tessonnière, H., Vidal, S., Barnavon, L., Alexandre, H., Remize, F., 2009. Design and performance testing of a real-time PCR assay for sensitive and reliable direct quantification of *Brettanomyces* in wine. *Int. J. Food Microbiol.* 129, 237-243.

- Wedral, D., Shewfelt, R., Frank, J. 2010. The challenge of *Brettanomyces* in wine. *LWT- Food Sci. Technol.* 43, 1474-1479.
- Woolfit, M., Rozpedowska, E., Piskur, J., Wolfe, K.H., 2007. Genome survey sequencing of the wine spoilage yeast *Dekkera (Brettanomyces) bruxellensis*. *Eukaryot. Cell* 6, 721-733.
- Willenburg, E., Divol, B., 2012. Quantitative PCR: An appropriate tool to detect viable but not culturable *Brettanomyces bruxellensis* in wine. *Int. J. Food Microbiol.* 160, 131-136.
- Zuehlke, J.M., Petrova, B., Edwards, C.G., 2013. Advances in the control of wine spoilage by *Zygosaccharomyces* and *Dekkera/Brettanomyces*. *Ann. Rev. Sci. Technol.* 4, 57-78.
- Zott, K., Claisse, O., Lucas, P., Coulon, J., Lonvaud-Funel, A. Masneuf-Pomarede, I. 2010. Characterization of the yeast ecosystem in grape must and wine using real-time PCR. *Food Microbiol.* 27, 559-567.



ZUBÍA

29



Gobierno de La Rioja
www.larioja.org

ier
**Instituto
de Estudios
Riojanos**