



UNIVERSIDAD DE LA RIOJA

TESIS DOCTORAL

Título
Detección y caracterización de <i>Brettanomyces bruxellensis</i> y <i>Trigonopsis cantarellii</i> en el contexto enológico
Autor/es
Cauré Barbosa Portugal
Director/es
Fernanda Ruiz Larrea
Facultad
Facultad de Ciencias, Estudios Agroalimentarios e Informática
Titulación
Departamento
Agricultura y Alimentación
Curso Académico



Detección y caracterización de *Brettanomyces bruxellensis* y *Trigonopsis cantarellii* en el contexto enológico, tesis doctoral
de Cauré Barbosa Portugal, dirigida por Fernanda Ruiz Larrea (publicada por la
Universidad de La Rioja), se difunde bajo una Licencia
Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 3.0 Unported.
Permisos que vayan más allá de lo cubierto por esta licencia pueden solicitarse a los
titulares del copyright.

© El autor
© Universidad de La Rioja, Servicio de Publicaciones, 2014
publicaciones.unirioja.es
E-mail: publicaciones@unirioja.es



*Detección y caracterización de *Brettanomyces bruxellensis* y
Trigonopsis cantarellii en el contexto enológico*

Cauré Barbosa Portugal



UNIVERSIDAD
DE LA RIOJA

*Departamento de Agricultura y Alimentación
Área de Bioquímica y Biología Molecular*

TESIS DOCTORAL

**DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE *BRETTANOMYCES BRUXELLENSIS*
Y *TRIGONOPSIS CANTARELLII* EN EL CONTEXTO ENOLÓGICO**

CAURÉ BARBOSA PORTUGAL



UNIVERSIDAD DE LA RIOJA

DEPARTAMENTO DE AGRICULTURA Y ALIMENTACIÓN

COMPLEJO CIENTÍFICO TECNOLÓGICO. Madre de Dios, 51. 26006 LOGROÑO (La Rioja) – Tfno. 941 299 720 Fax 941 299 721

FERNANDA RUIZ LARREA, Profesora Catedrática del área de Bioquímica y Biología Molecular del Departamento de Agricultura y Alimentación de la Universidad de La Rioja

Informa que:

D. **Cauré Barbosa Portugal** ha realizado dentro del Programa de Doctorado de Enología el trabajo de tesis doctoral titulado: “**Detección y caracterización de *Brettanomyces bruxellensis* y *Trigonopsis cantarellii* en el contexto enológico**”, desarrollado bajo su dirección en los laboratorios del Departamento de Agricultura y Alimentación de la Universidad de La Rioja, y reúne las condiciones exigidas para optar a grado de Doctor.

Lo que hace constar en Logroño, a 29 de junio de 2012.

Fdo.: Fernanda Ruiz-Larrea

DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE *BRETTANOMYCES BRUXELLENSIS* Y
TRIGONOPSIS CANTARELLII EN EL CONTEXTO ENOLÓGICO

Memória presentada por Cauré Barbosa Portugal
para optar al grado de 'Doctor Internacional' por la Universidad de La Rioja

Agradecimientos

Quisiera agradecer verdaderamente a las muchas personas que hicieron posible el haber llegado hasta aquí.

Agradezco de manera muy especial a la Dr^a Fernanda Ruiz-Larrea por haber depositado en mí la confianza necesaria durante el camino, por la orientación más que competente, por todos los esfuerzos y por la comprensión en los momentos más difíciles.

Agradezco desde el corazón por el apoyo de mi familia, incluso desde la distancia, a lo largo de estos años. A mis padres, por los valores, por la fuerza, por el hacerme avanzar siempre. A mi mujer, Vanessa, por la amistad inigualable y por no dejarme derrumbar a cada instante de nuestra andadura.

Mis sinceros agradecimientos a todos los compañeros de laboratorio, los de aquí y los que solamente pasaron, en especial a la amiga Rocío Fernández por la presencia y apoyo en muchos momentos, y a todos los amigos y compañeros del Departamento de Agricultura y Alimentación.

Mis agradecimientos personales y sinceros a la Dr^a Dejanira Franceschi de Angelis y a todo el personal del Departamento de Bioquímica y Microbiología de la *Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho' (UNESP)*, campus de Rio Claro (Brasil), por haberme facilitado todo lo necesario y por hacer tan agradable la estancia en su laboratorio.

Al Dr. Antonio Tomás Palacios, mi gratitud personal, y a la empresa Excel Ibérica por la colaboración práctica en distintos momentos y circunstancias del trabajo desarrollado.

A mis padres y a mi familia.

A mi mujer y amiga, Vanessa.

A mi hija, Oihane.

'Há um tempo em que é preciso abandonar as roupas usadas, que já têm a forma do nosso corpo,

E esquecer os nossos caminhos, que nos levam sempre aos mesmos lugares.

'É o tempo da travessia: e, se não ousarmos fazê-la, teremos ficado, para sempre, à margem de nós mesmos.'

(Abandonar as velhas roupas usadas. Fernando Pessoa)

Índice

Tablas	ix
Figuras	xi
Abreviaturas	xiv
Resumen	1
Abstract	4
Objetivos	7
Introducción	9
I. INTRODUCCIÓN	10
1. <i>Brettanomyces/Dekkera</i>	12
1.1. Contexto taxonómico	13
1.2. Fisiología	17
1.3. Contexto ecológico y enológico	19
1.4. Alteraciones organolépticas en vinos	21
1.5. Detección y cuantificación	24
1.5.1. Medios de cultivo	24
1.5.2. Métodos de Biología Molecular	26
1.5.3. Otros métodos	28
1.6. Control microbiológico en enología	30
2. Otras levaduras Saccharomycetales detectadas en ambiente de bodega	35
3. <i>Trigonopsis cantarellii</i>	39
II. MATERIALES Y MÉTODOS	43
Medios de cultivo utilizados	43
1. Detección y cuantificación de <i>Brettanomyces</i> en vinos tintos mediante los métodos de PCR cuantitativa y cultivo en medio específico	45
1.1. Muestras de vino y análisis microbiológicos	45
1.2. Cepas de levaduras y condiciones de cultivo	47
1.3. Preparación de muestras-control	47
1.4. Tratamiento previo de las muestras de vino	48
	vi

1.5.	Extracción del material genético total	49
1.6.	Análisis e identificación de aislados por PCR convencional	52
1.6.1.	Extracción del DNA	52
1.6.2.	PCR convencional específica para <i>Brettanomyces</i>	52
1.6.3.	Análisis por PCR convencional para la identificación de otras levaduras	53
1.6.4.	Electroforesis de gel de agarosa de fragmentos de DNA	53
1.6.5.	Secuenciación y comparación de datos con el banco de datos GenBank	54
1.7.	Análisis de vinos por PCR cuantitativa (qPCR)	55
1.8.	Análisis estadístico	56
2.	Susceptibilidad de <i>Brettanomyces bruxellensis</i> a agentes antimicrobianos utilizados en Enología	57
2.1.	Cepas de levaduras	57
2.2.	Cepas de levaduras y condiciones de cultivo	58
2.3.	Compuestos antimicrobianos	59
2.4.	Determinación de CMI y CMB	60
2.5.	Vinos experimentales	61
2.6.	Análisis de fenoles volátiles	62
2.7.	Análisis microbiológico	63
2.8.	Análisis estadístico	63
3.	Detección de levaduras no- <i>Saccharomyces</i> en bodega y caracterización de la levadura vínica <i>Trigonopsis cantarellii</i>	64
3.1.	Recolección en bodega y procesamiento de las muestras	64
3.2.	Caracterización molecular	65
3.2.1.	Identificación específica de aislados	65
3.2.2.	Alineamiento de secuencias y obtención de dendrogramas	65
3.2.3.	Diseño de primers y desarrollo de PCR convencional específica para <i>T. cantarellii</i>	66
3.3.	Determinación de acidogénesis y de producción de fenoles volátiles	69
3.4.	Crecimiento de <i>T. cantarellii</i> en medio de cultivo líquido	70
3.5.	Susceptibilidad de <i>Trigonopsis cantarellii</i> a agentes antimicrobianos utilizados en Enología	71
III.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	73
1.	Detección y cuantificación de <i>Brettanomyces</i> mediante los métodos de PCR cuantitativa y cultivo en medio específico en vinos tintos	74
1.1.	Métodos de extracción de DNA y análisis por PCR convencional	74
1.2.	Métodos de extracción de DNA y análisis por PCR cuantitativa	76
1.3.	Comparación del análisis por qPCR y por cultivo microbiológico	82

1.3.1.	Estudio de caso 1: vinos tintos en proceso de crianza	82
1.3.2.	Estudio de caso 2: seguimiento durante la elaboración de vinos tintos varietales	87
2.	Susceptibilidad de <i>Brettanomyces</i> a agentes antimicrobianos utilizados en Enología	93
2.1.	Actividad antimicrobiana del metabisulfito potásico	96
2.2.	Actividad antimicrobiana de taninos enológicos	100
2.3.	Actividad antimicrobiana del quitosan	103
2.4.	Actividad antimicrobiana del dicarbonato de dimetilo (DMDC)	105
2.5.	Acción del metabisulfito potásico frente a <i>Brettanomyces</i> en vino	107
3.	Detección de levaduras no- <i>Saccharomyces</i> en bodega y caracterización de la levadura vínica <i>Trigonopsis cantarellii</i>	115
3.1.	Detección de levaduras no- <i>Saccharomyces</i> en ambiente de bodega	115
3.2.	Potencial acidogénico y de producción de aromas alterantes de levaduras no- <i>Saccharomyces</i>	121
3.3.	Comparación molecular intra-específica de levaduras no- <i>Saccharomyces</i>	125
3.4.	Caracterización genotípica y fenotípica de la levadura <i>T. cantarellii</i>	132
3.4.1.	PCR convencional específica para identificación de la levadura vínica <i>Trigonopsis cantarellii</i>	132
3.4.2.	Caracterización de aislados de la especie <i>Trigonopsis cantarellii</i>	138
3.4.3.	Crecimiento de <i>T. cantarellii</i> con diferentes concentraciones de etanol en el medio de cultivo líquido	144
3.4.4.	Crecimiento de <i>T. cantarellii</i> a diferentes valores de pH	149
3.4.5.	Susceptibilidad de <i>T. cantarellii</i> a agentes antimicrobianos utilizados en Enología	152
a)	Actividad antimicrobiana del metabisulfito potásico	155
b)	Actividad antimicrobiana de taninos enológicos	159
c)	Actividad antimicrobiana del dicarbonato de dimetilo (DMDC)	161
d)	Actividad antimicrobiana del Chitosan	163
	CONCLUSIONES	164
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	171
	ANEXOS	183

Tablas

Tabla I-1. Sinonimias de la especie <i>Dekkera bruxellensis</i>	13
Tabla I-2. Especies actualmente reconocidas dentro del género <i>Brettanomyces/Dekkera</i>	14
Tabla I-3. Caracteres específicos en el género <i>Dekkera/Brettanomyces</i>	15
Tabla I-4. Características bioquímicas de fermentación y asimilación para <i>Brettanomyces bruxellensis</i>	17
Tabla I-5. Taxonomía de otras levaduras Saccharomycetales identificadas en esta tesis	36
Tabla I-6. Producción de etilfenol y origen de otras levaduras Saccharomycetales identificadas en esta tesis	38
Tabla I-7. Especies actualmente reconocidas dentro del género <i>Trigonopsis</i>	39
Tabla I-8. Sinonimias de la especie <i>Trigonopsis cantarellii</i>	40
Tabla II-1. Especies y cepas de levaduras utilizadas	57
Tabla II-2. Cepas de levaduras utilizadas para puesta a punto de PCR convencional específica de <i>T. cantarellii</i>	67
Tabla III-1. Resultados de PCR convencional específica de <i>Brettanomyces</i> a partir de DNA obtenido mediante diferentes métodos de extracción	74
Tabla III-2. Análisis de muestras de vinos tintos por cultivo microbiológico en medio específico y qPCR.....	82
Tabla III-3. Resultados de recuentos en medios selectivos en muestras de vinos varietales en diferentes etapas de producción	90
Tabla III-4. Resultados de parámetros analíticos de vinos tintos varietales Graciano y Tempranillo	91
Tabla III-5. Valores de concentraciones mínimas inhibitoria (CMI) y biocida (CMB) de diferentes agentes antimicrobianos frente a <i>B. bruxellensis</i> y <i>S. cerevisiae</i>	94
Tabla III-6. Valores de CMI ₅₀ , CMI ₉₀ , CMB ₅₀ y CMB ₉₀ de diferentes agentes antimicrobianos frente a <i>B. bruxellensis</i> y <i>S. cerevisiae</i>	95
Tabla III-7. Coeficientes de correlación de Pearson entre poblaciones microbianas y concentración de diferentes fenoles volátiles	113
Tabla III-8. Resultados de los análisis microbiológicos de las muestras enológicas estudiadas	116
Tabla III-9. Especies de levaduras identificadas en las muestras enológicas por cultivo en medio específico	117
Tabla III-10. Análisis microbiológicos y químicos de los vinos tintos estudiados.....	118
Tabla III-11. Resultados de acidogénesis y generación de olor alterante en medios sintéticos	122
Tabla III-12. Recuentos de poblaciones iniciales y máximas alcanzadas con diferentes concentraciones de etanol	145
Tabla III-13. Recuento de poblaciones iniciales y máximas alcanzadas a diferentes valores de pH	151
Tabla III-14. Valores de concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) y biocidas (CMB) de diferentes agentes antimicrobianos frente a <i>T. cantarellii</i>	153
Tabla III-15. Valores de CMI ₅₀ , CMI ₉₀ , CMB ₅₀ y CMB ₉₀ de diferentes agentes antimicrobianos frente a <i>T. cantarellii</i>	154

Figuras

Figura I-1. Filogenia del clado <i>Dekkera</i>	15
Figura I-2. Polimorfismo en células de <i>Brettanomyces/Dekkera bruxellensis</i>	16
Figura I-3. Formación de fenoles volátiles por la descarboxilación de ácidos hidroxicinámicos	22
Figura I-4. Filogenia del clado <i>Trigonopsis</i>	40
Figura I-5. Fotografía de microscopía óptica de células de <i>Trigonopsis cantarellii</i>	41
Figura III-1. Curvas de temperaturas de fusión de los amplicones obtenidos por qPCR del DNA de <i>B. bruxellensis</i>	76
Figura III-2. Curvas de amplificación generadas en análisis por qPCR específica de <i>B. bruxellensis</i>	77
Figura III-3. Resultados de qPCR obtenidos a partir de tres métodos de extracción de DNA celular de <i>B. bruxellensis</i>	78
Figura III-4. Resultados de qPCR obtenidos para los métodos A y B de tratamiento de vinos tintos con alta y baja turbidez	80
Figura III-5. Evolución de poblaciones microbianas en vinos tintos de la variedad Graciano.....	88
Figura III-6. Evolución de poblaciones microbianas en vinos tintos de la variedad Tempranillo.....	89
Figura III-7. Concentraciones mínimas inhibitorias del metabisulfito potásico a pH 4,0 y 3,5 frente <i>S. cerevisiae</i> y <i>B. bruxellensis</i> ..	96
Figura III-8. Concentraciones mínimas inhibitorias del metabisulfito potásico en presencia de etanol 6 % y 12,5 % frente a <i>S. cerevisiae</i> y <i>B. bruxellensis</i>	98
Figura III-9. Concentraciones mínimas inhibitorias de solución de taninos enológicos en ausencia y en presencia de etanol 12,5 %, frente a <i>S. cerevisiae</i> y <i>B. bruxellensis</i>	101
Figura III-10. Concentraciones mínimas inhibitorias de quitosán en ausencia y en presencia de etanol 12,5 %, frente a <i>S. cerevisiae</i> y <i>B. bruxellensis</i>	103
Figura III-11. Concentraciones mínimas inhibitorias del DMDC en ausencia y en presencia de etanol 12,5 %, frente a <i>S. cerevisiae</i> y <i>B. bruxellensis</i>	105
Figura III-12. Perfil microbiológico de muestras de vino con diferentes concentraciones de metabisulfito potásico al cabo de 4 y 22 meses de almacenamiento en botella	108
Figura III-13. Resultados de análisis de fenoles volátiles de las muestras de vinos con diferentes tratamientos de metabisulfito potásico después de 22 meses de almacenamiento en botella	110
Figura III-14. Resultado de análisis de función discriminante	112
Figura III-15. Formación del 4-propilguaiacol.....	114
Figura III-16. Alineamiento de las secuencias de los amplicones del gen del RNAr 26S y dendrograma (UPGMA) para los aislados de <i>Candida ishiwadae</i>	126
Figura III-17. Alineamiento de las secuencias de los amplicones del gen del RNAr 26S y dendrograma (UPGMA) para los aislados de <i>Pichia mandshurica</i>	128
Figura III-18. Alineamiento de las secuencias de los amplicones del gen del RNAr 26S y dendrograma (UPGMA) para los aislados de <i>Trigonopsis variabilis</i>	129
Figura III-19. Alineamiento de las secuencias de los amplicones del gen del RNAr 26S y dendrograma (UPGMA) para los aislados de <i>Arthroascus schoenii</i>	130
Figura III-20. Alineamiento de secuencias de los amplicones del gen del RNAr 26S de aislados de <i>T. cantarellii</i> y localización de los primers CAN-F/CAN-92	133

Figura III-21. Fotografía del gel de agarosa y bromuro de etidio con las amplificaciones obtenidas mediante PCR convencional específica para <i>T. cantarellii</i> de cepas de levaduras vínicas	136
Figura III-22. Fotografía del gel de agarosa y bromuro de etidio con las amplificaciones obtenidas mediante PCR convencional específica para <i>T. cantarellii</i> de cepas de <i>T. variabilis</i>	136
Figura III-23. Fotografía del gel de agarosa y bromuro de etidio con las amplificaciones obtenidas mediante PCR convencional específica para <i>T. cantarellii</i>	137
Figura III-24. Alineamiento de las secuencias del amplicón del gen del RNAr 26S y dendrograma (UPGMA) para los aislados de <i>Trigonopsis cantarellii</i>	138
Figura III-25. Curvas de crecimiento de <i>T. cantarellii</i> y <i>B. bruxellensis</i> con diferentes concentraciones de etanol	145
Figura III-26. Fotografías de microscopía óptica de <i>T. cantarellii</i> en ausencia y en presencia de etanol.....	146
Figura III-27. Curvas de crecimiento de <i>T. cantarellii</i> y <i>B. bruxellensis</i> con diferentes valores de pH.....	150
Figura III-28. Concentraciones mínimas inhibitorias del metabisulfito potásico a pH 4,0 y 3,5 frente a cepas de <i>T. cantarellii</i>	155
Figura III-29. Concentraciones mínimas inhibitorias del metabisulfito potásico a diferentes concentraciones de etanol frente a cepas de <i>T. cantarellii</i>	157
Figura III-30. Concentraciones mínimas inhibitorias de taninos enológicos frente a cepas de <i>T. cantarellii</i> en ausencia y en presencia de 12,5 % etanol	159
Figura III-31. Concentraciones mínimas inhibitorias del dicarbonato de dimetilo (DMDC) frente a cepas de <i>T. cantarellii</i> en ausencia y en presencia de 12,5 % etanol	161

Abreviaturas

ATP	Adenosín trifosfato
DNA	Ácido desoxirribonucleico
LSU	Large subunit
NAD	Nicotinamida adenina dinucleótido
RNA	Ácido ribonucleico
RNAr	Ácido ribonucleico ribosomal
SSU	Small subunit
HSP	Heat shock protein
BAA	Bacteria ácido- acética
BAL	Bacteria ácido- láctica
UFC	Unidades formadoras de colonia
v/v	Volumen/volumen
pH	Potencial de hidrógeno
pK	Constante de disociación
Av	Acidez volátil
At	Acidez total
µg	Microgramo
mg	Miligramo
g	Gramo
µL	Micro litro
mL	Mililitro
L	Litro
M	Molar
mM	Milimolar
µM	Micromolar
cm	Centímetro
nm	Nanómetro
µm	Micrómetro
°C	Grado centígrado
NTU	Nephelometric turbidity unit
MPa	Megapascal
KJ	Kilojoule
V	Voltio
KV	Kilovoltio
W	Vatio
g	Fuerza gravitatoria
rpm	Rotaciones por minuto
U	Unidad de actividad enzimática
A	Absorbancia
A600	Absorbancia a 600 nm
Tm	Melting temperature
Ct	Cycle threshold
IPT	Índice de polifenoles totales

FCM	Flow cytometry
FISH	Fluorescence in situ hybridization
GC	Gas chromatograph
HPU	High power ultrasound
ITS	Internal transcribed spacer
LAMP	Loop-mediated isothermal amplification
MS	Mass spectrometry
O	Olfatometría
PCR	Polymerase chain reaction
PNA	Peptide Nucleic Acid
qPCR	PCR cuantitativa
RAPD	Random amplification of polymorphic DNA
SPE	Solid phase extraction
UV	ultravioleta
ANOVA	Análisis de varianza
UPGMA	Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean
p	Valor-p de significancia estadística
DMDC	Dicarbonato de dimetilo
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
MBP	Metabisulfito potásico
MgCl ₂	Cloruro de magnesio
NaCl	Cloruro sódico
NaOH	Hidróxido de sodio
NH ₄	Amonio
PVPP	Polivinil polipirrolidona
SO ₂	Dióxido de azufre
SO ₂ L	Dioxido de azufre libre
TBE	Tris-Borato-EDTA
Tris	tris(hidroximetil)aminometano
C.E.	Comunidad Europea
CECT	Colección Española de Cultivos Tipo
CMB	Concentración mínima biocida
CMI	Concentración mínima inhibitoria
D.O.	Denominación de origen
D.O.Ca.	Denominación de origen calificada
DBDM	Dekkera/Brettanomyces differential medium
n/a	No analizado
n/d	No determinado
s/c	Sin crecimiento
YPD	Yeast extract pepetone dextrose medium

Resumen

Brettanomyces/Dekkera es la principal causa de las alteraciones microbiológicas que actualmente pueden sufrir los vinos, y especialmente los vinos tintos de calidad que deben ser sometidos al proceso de crianza en barricas de madera. Esta levadura es responsable de cuantiosas pérdidas económicas de la industria enológica en todos los países productores del mundo.

El primer objetivo de esta tesis fue poner a punto el método rápido de PCR cuantitativa (qPCR) para la detección y cuantificación de células de *Brettanomyces/Dekkera* en muestras vinos tintos tomadas en distintos momentos de su elaboración y conservación, así como de otras muestras de bodega que tuvieran interés para el enólogo. El primer hito alcanzado en el trabajo fue eliminar la grave interferencia que suponen las partículas sólidas de agregados macromoleculares y compuestos polifenólicos presentes en un vino no acabado y que son responsables de la inhibición de la reacción de la DNA polimerasa. Conseguida la puesta a punto del método de qPCR, se realizó el estudio comparativo con el método clásico de cultivo microbiológico en un medio selectivo, empleándose para ello un total de 324 muestras de vinos tintos de la variedad Tempranillo provenientes de las denominaciones de origen Rioja y Ribera del Duero, recogidas en el periodo 2009 - 2011. El estudio estadístico comparativo presentó una buena correlación entre los resultados obtenidos por los dos métodos, poniéndose de manifiesto la mayor especificidad del método rápido de qPCR, en el que no se encontraron resultados falsos positivos y se alcanzó el límite de detección y cuantificación entre 16 – 25 células de *Brettanomyces*/mL en vinos tintos con turbidez y en presencia de hasta $7,5 \cdot 10^5$ UFC/mL de levaduras de otras especies. El método clásico de cultivo microbiológico en medio selectivo permitió detectar y cuantificar hasta 1 UFC/mL de células viables de *Brettanomyces/Dekkera* en los vinos y además permitió la detección de *Brettanomyces/Dekkera* en el aire de bodega.

El siguiente objetivo fue estudiar la sensibilidad de *Brettanomyces/Dekkera* a distintos agentes antimicrobianos de uso en enología para determinar el método más eficaz de combatir esta levadura alterante. Los agentes antimicrobianos que se estudiaron fueron: metabisulfito potásico (MBP), solución de taninos enológicos, quitosan y dicarbonato de dimetilo (DMDC). Dentro de los respectivos rangos de concentraciones de uso permitido en enología, el agente que presentó la mayor especificidad para *Brettanomyces/Dekkera* fue el quitosan, y el agente que mostró la mayor eficacia fue el MBP, presentando actividad inhibidora del crecimiento y también biocida frente a la totalidad de las cepas

estudiadas (CMI_{90} y CMB_{90} = 48 mg/L, en presencia de 12,5 % etanol en el medio). Este agente se empleó posteriormente para el estudio en vino tinto contaminado de forma natural por *Brettanomyces/Dekkera* y conservado en botella en condiciones de bodega. Se pudo demostrar una correlación directa entre la población de células de *Brettanomyces/Dekkera* (UFC/mL) y el aumento de la concentración de los fenoles volátiles (4-etilguaiacol, 4-etilfenol, 4-vinilfenol y 4-propilguaiacol) en el vino, quedando totalmente excluida la posibilidad de que bacterias lácticas u otros microorganismos fueran los responsables de la producción de estos compuestos. Una concentración de 100 mg/L de MBP se mostró plenamente eficaz y evitó el crecimiento de *Brettanomyces/Dekkera* y por tanto también el aumento de los fenoles volátiles en los vinos estudiados.

En esta tesis además se identificaron las siguientes especies de levaduras del orden Saccharomycetales presentes en muestras de vinos en proceso de crianza en barricas de madera, recogidas en el periodo 2008 – 2011 y sospechosas de contaminación por análisis sensorial con indicios de cierta desviación aromática: *Pichia mandshurica*, *Pichia holstii*, *Trigonopsis cantarelli*, *Trigonopsis variabilis* y *Arthroascus schoenii*. La especie más recurrente resultó ser *T. cantarelli*, representando el 54,5 % de los aislados estudiados. Se caracterizó esta levadura, comprobándose su capacidad de crecer en vinos tintos secos (< 0,2 g/L de azúcares reductores) con un alto contenido en etanol (hasta 13,8 %) y su mayor resistencia al MBP que la de *Brettanomyces/Dekkera*. Las levaduras de la especie *T. cantarelli* mostraron un crecimiento lento, y la capacidad potencialmente alterante de generar ácidos se demostró en un 48 % de las cepas estudiadas, así como el potencial de generar aromas alterantes en un 72 % de las cepas, si bien con un potencial alterante aromático menor que el detectado habitualmente en *Brettanomyces/Dekkera*.

Abstract

Brettanomyces/Dekkera is currently the leading cause of microbiological alterations in wines, especially those premium red wines that undergo aging processes in wooden barrels. This yeast is responsible for huge economic losses in the winemaking industry in all producing countries of the world.

The first objective of this thesis was to develop a rapid method of quantitative PCR (qPCR) for detection and quantification of *Brettanomyces/Dekkera* cells in red wine samples taken at different stages of production and conservation, as well as in samples of interest to the winemaker. The first milestone achieved in this work was to eliminate the serious interferences involving macromolecular aggregates of solid particles and polyphenolic compounds present in non-finished wines that are responsible for inhibition of DNA polymerase reactions. Once optimization of the qPCR method was achieved, a comparative study was carried out with the method of classical microbiological culture in selective medium, using a total of 324 Tempranillo red wines from both Rioja and Ribera del Duero appellations, and collected during the period 2009 – 2011. Statistical comparisons showed a good correlation between the results of both methods, emphasizing the greater specificity of qPCR, for which no false-positive results were found and that the detection and quantification limits were between 16 – 25 *Brettanomyces* cells/mL in those red wines with turbidity and in the presence of up to $7.5 \cdot 10^5$ CFU/mL of other yeast populations. The method of microbiological culture in selective medium allowed detection and quantification of down to 1 *Brettanomyces/Dekkera* CFU/mL in wines, and also in cellar air.

The next goal was to study the sensitivity of *Brettanomyces/Dekkera* to different antimicrobial agents used in winemaking and to determine the most effective method against this spoiling yeast. The antimicrobial agents studied were: potassium metabisulphite, enological tannins solution, chitosan and dimethyl dicarbonate. Within the respective ranges of concentrations permitted in enology, the agent that showed the highest specificity against *Brettanomyces/Dekkera* was chitosan, and the agent that showed the greatest efficacy was potassium metabisulphite, showing growth inhibitory activity and biocide effect against all the strains tested (MIC_{90} and $MBC_{90} = 48$ mg/L, in the presence of 12.5 % ethanol in the medium). This agent was used subsequently to study *Brettanomyces/Dekkera* naturally contaminated red wines stored in bottles and kept under cellar conditions. A direct correlation was demonstrated between the *Brettanomyces/Dekkera*

populations (CFU/mL) and the increase of concentrations of volatile phenols (4-ethylguaiacol, 4-ethylphenol, 4-vinylphenol and 4-propylguaiacol) in wines, being completely excluded the possibility of lactic acid bacteria or other microorganisms responsible for the production of these compounds. A concentration of 100 mg/L MBP was fully effective and prevented both the growth of *Brettanomyces/Dekkera*, and the consequent increase of volatile phenols in the studied wines.

In this thesis the following species of Saccharomycetales yeasts were also identified in samples of wines undergoing aging in wooden barrels collected in the period 2008 – 2011 and suspected of being contaminated under sensory analysis once they presented some evidence of aromatic deviation: *Pichia mandshurica*, *Pichia holstii*, *Arthroascus schoenii*, *Trigonopsis variabilis*, and *Trigonopsis cantarelli*. The most recurrent species was *T. cantarelli*, and represented 54.5 % of all studied isolates. This yeast species was characterized and proved its ability to grow in dry red wines (< 0.2 g/L reducing sugars) with a high ethanol content (up 13.8 %) and greater resistance to potassium metabisulphite than *Brettanomyces/Dekkera*. *T. cantarelli* yeasts showed very slow growth, and the ability to generate potentially spoiling acids was demonstrated in 48 % of the studied strains, and likewise, the potential to generate some deviation aromas was found on 72 % of strains, although with a lower potential than those usually found for *Brettanomyces/Dekkera*.

Objetivos

Los objetivos que se plantearon para la realización de esta tesis fueron los siguientes:

1. Poner a punto el método rápido de PCR cuantitativa para la detección y cuantificación de células de *Brettanomyces/Dekkera* en muestras vinos tintos independientemente de la etapa de vinificación, así como de muestras de bodega de interés para el enólogo.
2. Resolver el problema que supone la turbidez, los agregados macromoleculares y los compuestos fenólicos durante la extracción de DNA para el análisis por PCR cuantitativa de muestras de vinos tintos tomadas en distintas etapas de la elaboración.
3. Proponer un método de procesamiento y extracción de material genético para PCR cuantitativa específica de *Brettanomyces* que sea simple, de coste reducido y aplicable a cualquier muestra de mosto, vino o agua de lavado.
4. Hacer un estudio comparativo de la sensibilidad y eficacia del método rápido de PCR en tiempo real con el método clásico de cultivo microbiológico en un medio selectivo para la detección y cuantificación de células de *Brettanomyces/Dekkera*.
5. Hacer un estudio de la susceptibilidad de *Brettanomyces/Dekkera* a distintos agentes antimicrobianos utilizados en enología, y realizar el estudio comparativo con *Saccharomyces cerevisiae*.
6. Llevar a cabo ensayos con vinos tintos en bodega perteneciente a la D.O.Ca. Rioja con el agente antimicrobiano que demostrase mayor eficacia frente a *Brettanomyces/Dekkera* en experimentos previos de laboratorio.
7. Determinar la posible correlación entre la producción de fenoles volátiles en un vino tinto, con la población de *Brettanomyces/Dekkera*.
8. Identificar levaduras no-*Brettanomyces* presentes en vinos sospechosos de algún tipo de desviación organoléptica, y por tanto, potencialmente alterantes.
9. Caracterizar la levadura vínica *Trigonopsis cantarellii* a partir de los aislados de esta especie obtenidos de distintos muestreos en bodega y proponer un método de PCR convencional específica para la identificación de ese microorganismo.

Introducción

I. Introducción

Uno de los avances claves de la Enología moderna es el reconocimiento de la importancia de las levaduras como agentes imprescindibles para la adecuada obtención del vino. De este reconocimiento nace, de manera inmediata, la necesidad de controlar las propiedades genéticas y metabólicas de las cepas empleadas para las fermentaciones enológicas, así como desarrollar sistemas analíticos capaces de distinguir entre las diferentes cepas de levadura, tanto las deseadas como las contaminantes. La presencia de determinadas especies de levaduras en diferentes etapas de la vinificación puede dar lugar a metabolitos secundarios (sulfuros de hidrógeno, sulfuros volátiles, ácido acético, ésteres y fenoles volátiles) que modifiquen las cualidades organolépticas del vino (Fleet 2003).

El concepto de levaduras alterantes del vino ha cambiado a lo largo de los últimos años y su importancia ha aumentado considerablemente, especialmente debido a las importantes pérdidas económicas que ocasionan (Loureiro y Querol 1999). El almacenamiento en tanques y barricas antes del embotellado es uno de los puntos críticos para el desarrollo de microorganismos indeseables, así como la ocasional exposición al aire que puede dar lugar a la formación de una flora de levaduras oxidativas que metabolizan etanol, glicerol y ácidos con la consecuente e inapropiada aparición de acetaldehídos, ésteres y ácido acético. Asimismo, el vino almacenado en tanques o incluso embotellado puede ser contaminado por especies fermentativas que pueden causar carbonatación, formación de sedimentos y turbidez, además de alteraciones organolépticas provenientes de la formación de ésteres y ácidos (Sponholz 1993; Fleet 2003).

Se ha documentado una diversidad considerable de levaduras alterantes en el vino, pero entre todas ellas destaca *Brettanomyces/Dekkera*, que ha sido detectada en todas las regiones productoras de vino y es la causante de las mayores pérdidas económicas de la industria enológica (Fugelsang y Edwards 2007; Oelofse et al. 2008)

1. *Brettanomyces/Dekkera*

El nacimiento del término "*Brettanomyces*" tuvo lugar en abril de 1904, cuando el entonces director del laboratorio de la empresa New Carlsber en Copenhague (Dinamarca), N.H. Clausen presentó el nuevo término "*Brettanomyces*" en una reunión del Instituto de Fermentaciones (Licker et al., 1998). Clausen demostró que la cerveza inglesa conocida entonces como "stock beer" (cerveza del fondo de los depósitos), sufría una lenta fermentación secundaria después de la ya conocida fermentación primaria. La fermentación secundaria se inducía inoculando en las cervezas del fondo de los depósitos de fermentación una cepa pura de *Brettanomyces*: una levadura no-*Saccharomyces*, tipo-*Torula* y asporogénica (no-formadora de esporas). Los aromas generados durante esta fermentación secundaria eran característicos de las cervezas fuertes británicas de aquella época. Clausen eligió el nombre *Brettanomyces* aludiendo al término "British brewing industry" de la industria cervecera británica, y a *mykes*, del Griego, "hongo". Clausen patentó en Inglaterra este proceso de inocular *Brettanomyces* para "impartir el flavor característico y la condición de cervezas inglesas" (Licker et al. 1998). Sin embargo, el gusto de los consumidores fue decantándose hacia cervezas con sabores más suaves, y el método de elaboración incluyó el inmediato descube de la cerveza y su embotellado, evitando el contacto con los restos de los fondos de los depósitos. Los primeros estudios sistemáticos de levaduras *Brettanomyces* se realizaron con cepas aisladas de cervezas y la única excepción fue una cepa obtenida Krumbholz y Tauschanhoff en 1933 de la fermentación de un vino francés (Kurtzman y Fell 1998), todas ellas pertenecientes a la especie *Brettanomyces bruxellensis*.

1.1. Contexto taxonómico

Tal y como se indicó anteriormente, la caracterización de levaduras alterantes de los vinos no es sencilla y en muchos casos la existencia de innumerables sinonimias puede dar lugar a informaciones equivocadas. En la TABLA I-1 se recogen todas las sinonimias actualmente reconocidas para la especie *B. bruxellensis*, según las bases de datos *Index Fungorum* (<http://www.indexfungorum.org>), *Mycobank* (<http://www.mycobank.org>) y *NCBI* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Tabla I-1. Sinonimias de la especie *Dekkera bruxellensis*

Sinonimia	Autores	Publicación
<i>Brettanomyces bruxellensis</i>	Kufferath y Van Laer (1921)	Bull. Soc. Chim. Belg. 30: 276
<i>Brettanomyces lambicus</i>	Kufferath y Van Laer (1921)	Bull. Soc. Chim. Belg. 30: 276
<i>Mycotorula intermedia</i>	Krumbholz y Tauschan (1933)	Zentbl. Bakt. ParasitKde, Abt. II 88: 366
<i>Brettanomyces intermedius</i>	Van der Walt y Kerken (1959)	Antonie van Leeuwenhoek 25: 150
<i>Brettanomyces custersii</i>	Florenz (1950)	Ric. Sci. 20: 1498
<i>Brettanomyces patavinus</i>	Florenz (1951)	Atti. Accad. Ital. Vite Vino: 3
<i>Candida aaseri</i>	Dietrichson (1954)	Ann. Parasit. Hum. Comp. 29: 476
<i>Brettanomyces vini</i>	Peynaud y Domercq (1956)	Arch. Mikrobiol. 24:279
<i>Brettanomyces schanderlii</i>	Peynaud y Domercq (1956)	Arch. Mikrobiol. 24:279
<i>Azymocandida aaseri</i>	Dietrichson (1961)	Acta Bot. Hung. 7:134
<i>Dekkera intermedia</i>	Van der Walt (1964)	Antonie van Leeuwenhoek 30: 278
<i>Brettanomyces abstinens</i>	Yarrow y Ahearn (1971)	Antonie van Leeuwenhoek, 37(3): 296
<i>Candida butyri</i>	Nakase (1971)	J. Gen. Appl. Microbiol., 17(6): 475
<i>Dekkera abstinens</i>	Lee y Jong (1986)	Mycologia 78(1): 150
<i>Dekkera lambica</i>	Lee y Jong (1986)	Mycotaxon 25(2): 457

La designación *Brettanomyces* se refiere a la forma anamórfica o asexual que se caracteriza por reproducción vegetativa tanto por gemación multilateral o, más raramente, por gemación bipolar. Por otro lado, el término *Dekkera* es la forma teleomórfica que se reproduce sexualmente por la formación de 1 a 4 ascosporas, que surgen sin conjugación (Kurtzman y Fell 1998). Actualmente *Dekkera bruxellensis* es la designación aceptada taxonómicamente para esta especie (Kurtzman y Fell 1998), sin embargo en el ámbito de la enología la nomenclatura *Brettanomyces bruxellensis* es la más

ampliamente adoptada, incluso con la simple referencia *Brettanomyces* o “Brett” (Stender et al. 2001). De este modo, a efectos de practicidad, en esta tesis se utilizará esta última designación.

El género *Brettanomyces/Dekkera* (Ascomycota: Saccharomycetes: Saccharomycetales: Pichiaceae) incluye actualmente cinco especies, las cuales se muestran en la TABLA I-2. Sin embargo, cabe mencionar que otras especies identificadas entre los años 1940-50 dentro del género *Brettanomyces* fueron posteriormente reclasificadas dentro del género *Candida* (banco de datos: Index Fungorum): *B. italicus* (= *Candida stellata*), *B. petrophilum* (= *C. parapsilosis*), *B. sphaericus* (= *C. etchellsii*) y *B. versatilis* (= *C. versatilis*).

Tabla I-2. Especies actualmente reconocidas dentro del género *Brettanomyces/Dekkera*

Especie	Autores	Publicación
<i>Dekkera anomala</i>	Smith y Grinsven (1984)	Antonie van Leeuwenhoek, 50 (2): 144
<i>Dekkera bruxellensis</i>	Van der Walt (1964)	Antonie van Leeuwenhoek, 30 : 278
<i>Dekkera custersiana</i>	Lee y Jong (1986)	Mycotaxon, 25 (2): 455
<i>Dekkera naardenensis</i>	Jong y Lee (1986)	Mycotaxon 25 (1): 148
<i>Dekkera nana</i>	Kirk (2011)	The Catalogue of Life: 2011 Annual Checklist

Las especies de la TABLA I-2 se recogen en los bancos de datos MycoBank y IndexFungorum, que además incluyen también una especie denominada *Dekkera proliferans*; sin embargo, los autores (Smith y Grinsven 1984) la nombran como *D. anomala*.

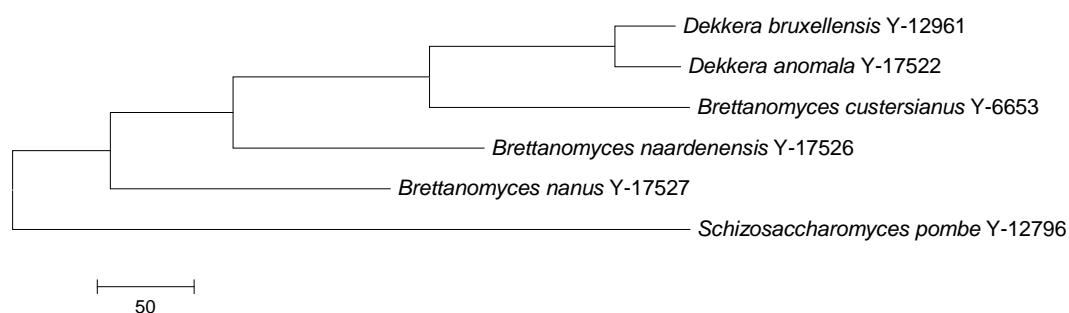
Según la taxonomía clásica, las principales diferencias a nivel de clasificación dicotómica entre estas especies se presentan en la TABLA I-3 (Kurtzman y Fell 1998), y se basan esencialmente en la capacidad fermentativa de la glucosa, asimilación de azúcares y formación de filamentos no-septados.

Tabla I-3. Caracteres específicos en el género *Dekkera*/*Brettanomyces*

Especie	Fermentación de lactosa	Asimilación			Filamentos no septados
		Galactosa	Glucitol	Succinato	
<i>Dekkera anomala</i>	v	+	-	v	+
<i>Dekkera bruxellensis</i>	-	v	-	-	-
<i>Dekkera custersiana</i>	-	-	-	+	-
<i>Dekkera naardenensis</i>	-	+	+	+	-
<i>Dekkera nana</i>	-	+	+	-	-

Llave de caracteres específicos del género según Kurtzman y Fell (1998)
(v) variable

Con los avances de la Biología Molecular, las comparaciones de secuencias génicas pasaron a tener un papel fundamental en la taxonomía, y en un contexto más reciente se han establecido relaciones filogenéticas entre los miembros del clado *Dekkera* (Kurtzman et al. 2008; Kurtzman 2011). La FIGURA I-1 ilustra la filogenia del grupo basada en el análisis de los genes de las subunidades grande (LSU) y pequeña (SSU) de RNA ribosomal así como de una sección del gen EF-1a de elongación de la traducción (Kurtzman et al. 2008; Kurtzman 2011).

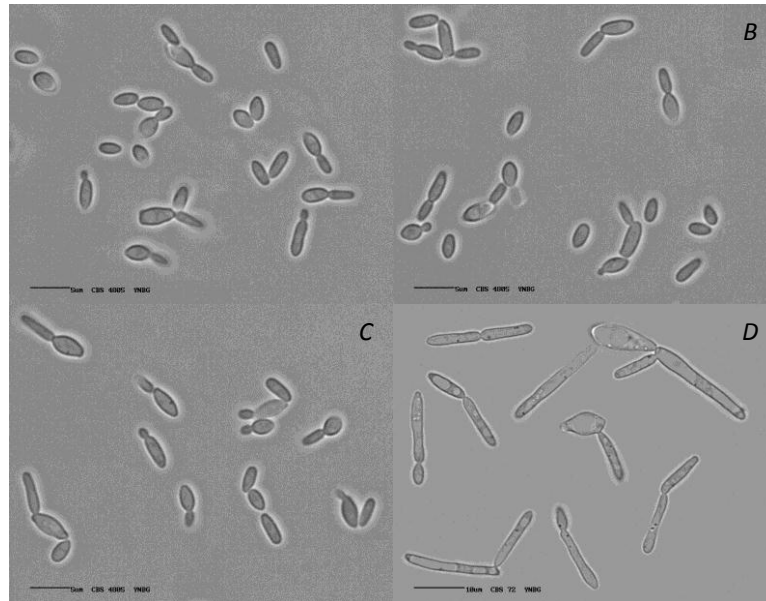
Figura I-1. Filogenia del clado *Dekkera*

Filogenia según Kurtzman et al. (2008). La escala de distancia representa el número de diferencias de bases por secuencia.

El primer estudio sistemático de *Brettanomyces* se realizó en 1940 por M.T.J. Custers, a partir de 16 cepas aisladas de cerveza y 1 cepa de mosto-vino, tal y como se ha mencionado en el apartado anterior, definiendo su morfología tipo como ojival (Licker et al. 1998). Actualmente las células de *Brettanomyces/Dekkera bruxellensis* se describen como polimórficas, asumiendo morfologías esferoidales, sub-globulares a elipsoidales, y frecuentemente ojivales o cilíndricas a alargadas (FIGURA I-

2). En determinados casos se observa la formación de pseudohifa (gemaciones encadenadas no separadas de la célula-madre), y también de elongaciones celulares (FIGURA I-2D) que se ramifican formando un aparente micelio no-septado (Kurtzman y Fell 1998).

Figura I-2. Polimorfismo en células de *Brettanomyces/Dekkera bruxellensis*



Escala: (A-C) 5 µm, (D) 10 µm. Fuente: CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre.

1.2. Fisiología

Las principales características bioquímicas de referencia para la especie-tipo *Brettanomyces bruxellensis* se presentan en la TABLA I.4.

Tabla I-4. Características bioquímicas de fermentación y asimilación para *Brettanomyces bruxellensis*

Fermentación			
Glucosa	+	Lactosa	-
Galactosa	v	Rafinosa	-
Sacarosa	v	Trehalosa	v
Maltosa	v		
Asimilación			
Glucosa	+	N-Acetil-D-glucosamina	n/d
Galactosa	v	Metanol	-
L-Sorbosa	-	Etanol	v
Sacarosa	v	Glicerol	v
Maltosa	v	Eritritol	-
Celobiosa	v	Ribitol	-
Trehalosa	v	Galactitol	-
Lactosa	-	D-Manitol	-
Malibiosa	-	D-Glucitol	-
Rafinosa	v	α -Metil-D-glucósido	v
Melezitosa	v	Salicina	v
Inulina	-	D-Gluconato	-
Almidón soluble	-	DL-Lactato	v
D-Xilosa	-	Succinato	-
L-Arabinosa	-	Citrato	-
D-Arabinosa	-	Inositol	-
D-Ribosa	v	Hexadecano	n/d
L-Ramnosa	-	Nitrato	v
D-Glucosamina	v	Vitamina libre	-

Kurtzman y Fell (1998)
(v) variable, (n/d) no disponible.

Un punto importante con respecto a la fisiología de *Brettanomyces* es la utilización que hace de los hidratos de carbono. Por un lado se conoce que realiza la vía glucolítica al igual que otras especies de levaduras en la producción de etanol. Sin embargo, estas levaduras tienen una naturaleza acidogénica bastante conocida, y los hidratos de carbono también pueden ser oxidados en ácido acético a través de acetaldehído. Otra fuente de ese metabolito típico del crecimiento de *Brettanomyces* es la oxidación del

etanol, también teniendo el acetaldehído como intermediario (Fugelsang y Edwards 2007). La presencia de oxígeno puede influir significativamente en la concentración de ácido acético producido (Aguilar-Uscanga et al. 2003; Ciani et al. 2003) ya que mantiene la disponibilidad de NAD^+ y la consecuente formación de etanol durante la oxidación de los hidratos de carbono, fenómeno conocido como efecto Custer o “Pasteur negativo” (Aguilar-Uscanga et al. 2003; Blomqvist et al. 2010; Licker et al. 1998). En condiciones limitantes o nulas de oxigenación, la ruta glucolítica se ve inhibida, y *Brettanomyces* lleva a cabo una fermentación alcohólica limitada debido a la ausencia de NAD^+ (Ciani y Ferraro 1997). No obstante, cuando estas levaduras se desarrollan en vinos tintos disponen de otro modo de obtener NAD^+ mediante la formación de fenoles volátiles (Fugelsang y Edwards 2007).

Otro aspecto importante de su fisiología es que se trata de una levadura con resistencia excepcional a condiciones mínimas de nutrientes, factor de supervivencia determinante en lo que se refiere, por ejemplo, a procesos de producción y almacenamiento de vinos (Blackburn 2006). En ese contexto, se sabe que es capaz de fermentar concentraciones mínimas de azúcares y etanol y producir una gran gama de metabolitos como fenoles volátiles y ácidos grasos de cadena media (Fugelsang y Zoecklein 2003). Además, puede también utilizar etanol como única fuente de carbono en medio sintético en concentraciones de hasta 9% (v/v) (Silva et al. 2004).

Finalmente, en lo que se refiere a su tasa de crecimiento, se ha comprobado que *Brettanomyces* crece más lentamente, por ejemplo en presencia de glucosa al compararlo con *S. cerevisiae* o *Zygosaccharomyces bailii* (Rodrigues et al. 2001a), característica que se refleja también en los largos periodos de incubación necesarios para su aislamiento en medios selectivos (Rodrigues et al. 2001b).

1.3. Contexto ecológico y enológico

Brettanomyces es un microorganismo ubicuo, con poblaciones escasas pero repartidas en suelos, cortezas de árboles y sustratos azucarados como frutos y miel (Navascués 2009). Se conoce la existencia de la levadura *Brettanomyces* también en medios tan diversos como el kéfir y otros fermentados lácteos (Narvhus y Gadaga 2003), fermentados de té (Teoh et al. 2004), refrescos (Smith y Grinsven, 1984), sidra (Morrissey et al. 2004), cerveza (Martens et al. 1997), superficie de uvas (Renouf y Lonvaud-Funel, 2007), mosto de uva (Grbin y Henschke, 2000), vino (Chatonnet et al. 1992, 1995; Dias et al. 2003; Heresztyn 1986; Ibeas et al. 1996; Licker et al. 1998; Querol et al. 1990) e incluso en la producción de alcohol combustible (Abbott et al. 2005a, b). En el ámbito de la enología, como ya se ha mencionado en un apartado anterior, en 1930 se aisló por primera vez de un vino francés una cepa inicialmente clasificada como *Mycotorula intermedia* que fue posteriormente reclasificada como *B. bruxellensis*. No obstante, solamente entre los años 1950 y 1955 se documenta la ocurrencia de *Brettanomyces* en vinos blancos y tintos embotellados en Alemania, Italia y Francia y en ese momento se relaciona su existencia también a instalaciones de bodegas y se establecen las primeras necesidades de sanidad para evitar su desarrollo (Licker et al. 1998).

Las dos formas de la levadura, *Brettanomyces* (anamórfica, asexuada) y *Dekkera* (teleomórfica, sexuada y formadora de esporas o esporulada), pueden ser encontradas en el contexto vitivinícola. Su presencia ha sido observada en mostos de uva (Grbin y Henschke 2000) y en mostos en plena fermentación alcohólica (Licker et al. 1998; Pretorius 2000; Jolly et al. 2003; Prakitchaiwattana et al. 2004). Su diseminación podría darse de bodega a bodega a través de vinos y equipamientos, y también hay indicios de que la mosca de la fruta pueda actuar como su vector (Hornsey 2007). No obstante, es en el mismo ambiente de la bodega donde se encuentran los mejores nichos para el crecimiento de esa levadura, pudiendo ser aislada en las superficies de cubas, bombas, mangueras y equipamientos en que la asepsia es más difícil (Fugelsang 1998). Su presencia puede pasar desapercibida durante todo el proceso de vinificación y sin embargo, las alteraciones organolépticas debidas a su crecimiento pueden aparecer en los estadios más tardíos de la crianza del vino, ya que es en los vinos de alta gama que pasan largos periodos de envejecimiento en barricas de roble donde *Brettanomyces* representa el peor

problema. Si por un lado la utilización de barricas viejas ya favorece su proliferación, especialmente por la dificultad de asepsia que ofrecen, hay referencias que prueban que *Brettanomyces* es también capaz de asimilar la celobiosa de la misma madera (Blomqvist et al. 2010; Blomqvist et al. 2011; Suárez et al. 2007; Wyman et al. 1987).

Durante la fermentación alcohólica, las células de *Brettanomyces* sufren una selección negativa debido a la extrema competitividad energética frente a *Saccharomyces*, y es después de esa etapa cuando las poblaciones de *Brettanomyces* pueden presentar un crecimiento significativo (Saavedra 2005; Stender et al. 2001). Si el vino es sometido a fermentación maloláctica, obligará a que el enólogo mantenga el vino durante un periodo largo de tiempo en unas condiciones favorables para el crecimiento de las bacterias lácticas (temperaturas de 20 a 21 °C, muy bajas concentraciones de dióxido de azufre) y consecuentemente otros microorganismos se verán beneficiados, entre los cuales *Brettanomyces* será uno de los más prolíficos dada su capacidad de crecer en presencia de cantidades mínimas de azúcares reductores, o incluso de utilizar otras fuentes de carbono como el etanol o la celobiosa de la madera como se ha mencionado anteriormente. Pero es durante la crianza cuando el crecimiento de *Brettanomyces* ocurre sin competencia, aunque de modo lento. Las barricas utilizadas para el envejecimiento de los vinos son sin duda la principal fuente de contaminación, sus características físicas, tales como grietas y fisuras, permiten el crecimiento de las células y constituyen la principal dificultad para la erradicación de los organismos que ahí se instalan (Saavedra et al. 2005).

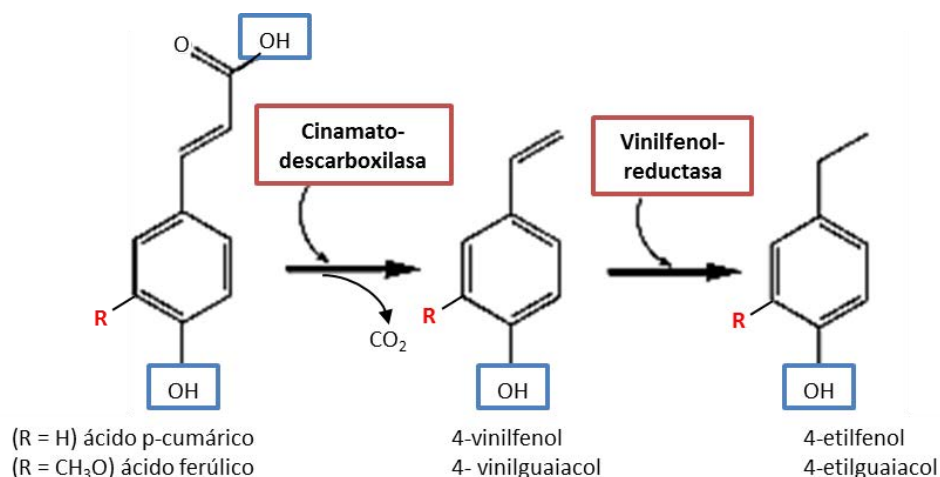
Algunos factores pueden favorecer el crecimiento de *Brettanomyces* en el vino, como por ejemplo la presencia de azúcares residuales, el tiempo de crianza, temperaturas más elevadas, presencia de oxígeno (aunque no es esencial para su desarrollo), considerándose también que es un microorganismos metabólicamente muy plástico y capaz de adaptarse perfectamente a valores de pH más bajos y elevadas concentraciones de etanol (Fleet 1999). Por esta razón en la actualidad podemos encontrar trabajos que describen su aislamiento en vinos alrededor de todo el mundo, predominantemente en tintos pero también en blancos, aunque sea más raro en gran medida por la eficacia que presenta el dióxido de azufre a valores de pH más bajos y a que los blancos se sulfitan tempranamente para evitar el crecimiento de bacterias y cualquier otro microorganismo (Oelofse et al. 2008).

1.4. Alteraciones organolépticas en vinos

La formación del “carácter-Brett” encontrado en vinos alterados es multifactorial, dependiendo de la cepa en cuestión, del pH, disponibilidad de nutriente en el mosto y de la etapa cuando la contaminación acontece (Romano et al. 2008). Esa desviación organoléptica en los vinos resulta de una mezcla compleja de compuestos odoríferos activos (ácidos, alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres y fenoles), pudiendo originar descriptores tan diversos como “sudor de caballo”, “establo”, “plástico quemado”, “animal”, “cuero mojado”, “ratón”, entre otros. De este modo, el impacto organoléptico en los vinos afectados puede resultar en la pérdida de hasta 50% de características aromáticas florales y afrutadas y en el incremento de hasta 60% en la intensidad de descriptores como “rancio” o “plástico” (Licker et al. 1998).

Como ilustra la FIGURA I.3, los compuestos relacionados con los principales descriptores son esencialmente fenoles volátiles como el 4-vinilfenol, 4-vinilguaiacol, 4-etilfenol y 4-etilguaiacol y se originan por la acción sucesiva de dos enzimas a partir de un ácido hidroxicinámico (Chatonnet et al. 1992; Chatonnet et al. 1995; Rodrigues et al. 2001). Los ácidos hidroxicinámicos como ferúlico, cafeico y p-cumárico son inicialmente descarboxilados por la enzima cinamato-descarboxilasa, originando hidroxiestirenos, y estos a su vez son reducidos a sus respectivos etilos por la acción de la vinilfenol-reductasa (Benito et al. 2009; Chatonnet et al. 1992; Coulon et al. 2010; Dias et al. 2003; Edlin et al. 1995; Harris et al. 2008; Tchobanov et al. 2008). Se ha demostrado que otras levaduras y bacterias lácticas son capaces de producir hidroxiestirenos a partir de ácidos hidroxicinámicos (Chatonnet et al. 1992) y que incluso algunas bacterias lácticas como *Lactobacillus plantarum* son capaces de formar esos fenoles volátiles, pero solamente en *Brettanomyces* se ha comprobado la actividad enzimática vinilfenol-reductasa una producción excesiva de estos compuestos y la capacidad de alcanzar los umbrales de detección en el vino (Chatonnet et al. 1995). El “carácter-Brett” en vinos tintos puede ser detectado cuando la concentración de estos fenoles volátiles sobrepasan la concentración de 426 µg/L, considerando una mezcla de 1:10 de etilfenol y etilguaiacol (Chatonnet et al. 1992), y que puede ocurrir cuando hay una población activa de *Brettanomyces* en el vino de 10^3 células/mL (Chatonnet et al. 1995; Lonvaud-Funel y Renouf 2005).

Figura I-3. Formación de fenoles volátiles por la descarboxilación de ácidos hidroxicinámicos



Otros compuestos también pueden estar asociados a defectos organolépticos generados por la proliferación de *Brettanomyces*, como es el caso de determinadas piridinas. Estos compuestos N-heterocíclicos (2-acetiltetrahidropiridina, 2-etiltetrahidropiridina y 2-acetilpirrolina) derivados de aminoácidos, azúcares y etanol (Costello y Henschke 2002; Romano et al. 2008; Snowdon et al. 2006) pueden originar lo que se conoce por el “gusto a ratón” en los vinos alterados, siendo muy persistente, desagradable y capaz de producir sensaciones en boca aún peores por la acción secuestrante que estos compuestos ejercen sobre los mucílago de la saliva (Suárez et al. 2007).

Sin lugar a dudas, otra alteración importante que tiene lugar tras la proliferación de *Brettanomyces* en vinos es el incremento de la acidez volátil, ya que esta levadura acidogénica produce cantidades importantes de ácido acético a partir de azúcares (glucosa) y etanol en condiciones de aerobiosis (Aguilar-Uscanga et al. 2007; Ciani y Ferraro 1997; Freer 2002; Freer et al. 2003; Silva et al. 2004). Parece ser que la formación de ácido acético está relacionada fundamentalmente con la oxidación del acetaldehído, de modo que la conversión continua de acetaldehído en acetato en condiciones aeróbicas también afectan al equilibrio redox y estancan la vía glucolítica (efecto Custer) (Gerós et al. 2000). Además de la producción de desviaciones organolépticas importantes en los vinos infectados, también se ha documentado la capacidad de *Brettanomyces* de promover o acelerar alteraciones en el color del vino, ya que esta levadura es capaz de hidrolizar las antocianinas, liberando glucosa en el medio y desestabilizando de este modo la molécula (Mansfield et al. 2002).

Otro problema que últimamente ha despertado la atención de muchas denominaciones de origen en todo el mundo es la presencia de las aminas biógenas en el vino. *Brettanomyces*, aparte de su potencial para producir alteraciones en el vino como turbidez, acidez volátil y precipitación de materia colorante (Sponholz, 1993), así como aromas alterantes, también es una de las especies de levaduras que producen más aminas biógenas (hasta 15 mg/L), especialmente la feniletilamina y la etanolamina, mientras algunas cepas de *S. cerevisiae* en determinadas condiciones llegarían a producir 12,14 mg/L (Caruso et al. 2002).

1.5. Detección y cuantificación

Los métodos tradicionales de detección de *Brettanomyces* en el vino incluyen por un lado técnicas de cultivo en medios enriquecidos específicos durante un tiempo prolongado y cuantifican únicamente las poblaciones de células viables y metabólicamente activas. Por otro lado, las técnicas rápidas de biología molecular han permitido el desarrollo de nuevos métodos que permiten una reducción de tiempo y además aseguran especificidad en la identificación.

1.5.1. Medios de cultivo

Uno de los mayores problemas para el aislamiento e identificación de *Brettanomyces* es el hecho de que estas levaduras presentan crecimiento lento y muy frecuentemente se encuentran en medios densamente poblados por otras levaduras, especialmente *Saccharomyces* (Fugelsang 1998). Diversos trabajos propusieron diferentes medios de cultivo selectivos para la detección y cuantificación de *Brettanomyces* viables en vinos considerando determinadas características bioquímicas de esa levadura (Alguacil et al. 1998; Benito et al. 2006; Couto et al. 2005; Dias et al. 2003; Harris et al. 2008; Rodrigues et al. 2001b; Renouf y Lonvaud-Funel, 2007), como se mencionan a continuación:

- a) La característica primaria considerada en muchos casos es la inclusión de ácidos hidroxicinámicos en el medio, especialmente el ácido p-cumárico que es el precursor del 4-etilfenol. La presencia de esos compuestos en el medio permite la aparición del defecto olfativo típico que favorece la detección de *Brettanomyces*.
- b) Considerando la naturaleza acidogénica de *Brettanomyces*, los medios selectivos también suelen incluir un indicador de pH que permite una identificación positiva por el viraje de color.
- c) Actualmente se conoce la capacidad de *Brettanomyces* en utilizar etanol como fuente de carbono (Rodrigues et al. 2001b), motivo por el cual se considera su adición para el diseño de un medio diferencial.

- d) La utilización de antimicrobianos inhibidores de bacterias gram-positivas, gram-negativas, mohos y otras levaduras *Saccharomyces* también constituye uno de los criterios indispensables. El principal agente utilizado en estos casos es la cicloheximida, especialmente porque se conoce la especial resistencia de *Brettanomyces* a concentraciones elevadas (100 mg/L) de ese antibiótico (Kurtzman y Fell 1998).

Sin lugar a dudas, la siembra en medios selectivos diferenciales representa el método menos costoso y más sencillo para detectar y cuantificar esas levaduras en el vino, pero son parcialmente selectivos y falsas colonias positivas siempre pueden aparecer, entre las cuales se pueden mencionar especies como *Kloeckera apiculata*, *Candida tropicalis* y *Pichia guilliermondii* (= *Meyerozyma guilliermondii*) (Dias et al. 2003). Otro inconveniente de la técnica en enología es el hecho de requerir un tiempo largo de incubación (1 a 2 semanas) debido al crecimiento lento de esa levadura. Este factor supone un problema importante ya que muchas especies no alterantes presentan crecimiento rápido y pueden llevar a una inhibición directa del crecimiento de aquellas que son verdaderamente contaminantes (Loureiro y Malfeito-Ferreira 2003). De todos modos, algunos autores argumentan que este tipo de método se puede considerar bastante sensible y en algunos casos se ha logrado aislar *Brettanomyces* en vinos cuando su población representaba menos del 1 % de la flora microbiana total (Rodrigues et al. 2001b).

Específicamente en el caso de aislamientos a partir de muestras de vino, el etanol se ha presentado como un agente selectivo muy apropiado para detectar *Brettanomyces* y otras levaduras alterantes, especialmente si sustituye otras fuentes de carbono convencionales, como la glucosa, que pueden favorecer el enmascaramiento por otras levaduras de crecimiento rápido como *Kloeckera apiculata* y *Meyerozyma guilliermondii* (Loureiro y Malfeito-Ferreira 2003). Entre los medios sólidos propuestos recientemente y que están disponibles en el mercado para la cuantificación de *Brettanomyces* en enología se pueden destacar: AZ3 (Oenodev), BSM (Millipore Corp.), DBDM (Rodrigues et al. 2001b) y DHSA (Chatonnet et al. 1992).

En otros casos, esos medios son líquidos y permiten la detección de *Brettanomyces* por el olor generado debido a la conversión de ácido p-cumárico en 4-etilfenol, además de una estimación de la población según la intensidad del olor generado y el tiempo de incubación requerido (Benito et al. 2009;

Couto et al. 2005; Renouf y Lonvaud-Funel 2007). De cualquier modo, el medio DBDM es uno de los más ampliamente utilizados en el ámbito enológico, basándose en etanol como fuente de carbono y energía y en la cicloheximida como agente antimicrobiano selectivo. El medio incorpora también un indicador de pH, debido a la característica acidogénica de esa especie, y ácido p-cumárico como precursor de 4-etilfenol (Rodrigues et al. 2001b; Loureiro y Malfeito-Ferreira 2003).

1.5.2. Métodos de Biología Molecular

En el intento de superar los inconvenientes de tiempo y especificidad en la detección y cuantificación de *Brettanomyces* en vinos, recientemente diversos trabajos han propuesto métodos basados en técnicas de biología molecular. Por un lado se puede mencionar la técnica de hibridación *in situ* por fluorescencia (FISH) con sondas de péptidos de ácidos nucleicos (PNA) que se hibridan con el RNA ribosómico de *B. bruxellensis* (Stender et al. 2001). Este método se puede usar en la identificación de colonias por microscopía a partir de un medio enriquecido y presenta la ventaja de ser muy sensible y específico, además de no requerir lisis celular ya que las sondas atraviesan la pared de la célula.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una alternativa sensible, específica y rápida para esta detección rápida. En ese sentido, se ha propuesto el uso de amplificación aleatoria de DNA polimórfico (RAPD-PCR) para la identificación de aislados y diferenciación de cepas de *Brettanomyces* a partir de vinos (Mittrakul et al. 1999). También se ha utilizado la identificación basada en el polimorfismo de regiones ITS del RNA ribosómico, que son menos conservadas evolutivamente y pueden ser usadas para discriminar especies de un mismo género (Egli y Henick-Kling 2001).

En ese contexto, Ibeas et al. (1996) desarrollaron un protocolo específico de PCR anidada, o de dos etapas, capaz de detectar directamente poblaciones de hasta 10 células/mL. Cocolin et al. (2004) también elaboraron un método de PCR específica para amplificación de un fragmento del dominio D1-D2 del gen 26S de RNAr, seguida de análisis con la endonucleasa *DdeI*. Los autores lograron detectar e

identificar las especies *B. bruxellensis* y *B. anomalus* directamente en el vino; sin embargo, la técnica apenas se mostró eficaz cuando en las muestras había poblaciones por encima de 10^4 UFC/mL.

También se ha descrito la utilización de una variante de la PCR, la amplificación isotérmica denominada LAMP (loop-mediated isothermal amplification). La técnica se asemeja a una PCR anidada y usa diversos cebadores y condiciones isotérmicas para la amplificación de secuencias específicas. En un primer trabajo (Tsuchiya et al. 2005) los autores describían el método para la detección de *Dekkera/Brettanomyces* utilizando secuencias de la región D2 de RNAr, el cual no permitía una discriminación a nivel de especies. En un trabajo posterior, Hayashi et al. 2007 ya describe un conjunto de cebadores de LAMP que amplifican secuencias diana de la región ITS para la discriminación específica de *D. anomala*, *D. bruxellensis*, *D. custersiana* y *B. naardenensis* con una sensibilidad de hasta 10 UFC/mL en suspensión acuosa y en vino filtrado amicróbicamente.

El surgimiento de la PCR en tiempo real o cuantitativa (qPCR) permitió no solo la detección rápida y específica de células de *Brettanomyces/Dekkera* sino también su cuantificación. La detección directa de *Brettanomyces* en el vino por qPCR se basa en la extracción del DNA total de la muestra de vino y en el uso de primers específicos para *Brettanomyces*. Específicamente en el caso de *B. bruxellensis*, Phister y Mills (2003) hicieron la primera propuesta en ese sentido y desarrollaron un método de qPCR con primers específicos a partir del dominio D1/D2 de la subunidad mayor (LSU) del gen de RNA ribosomal de *D. anomala*, *D. bruxellensis*, *B. custersii*, *B. naardenensis* y *B. nanus*. En ese caso, los autores ya señalaban los problemas de enmascaramiento de los resultados por sustancias inhibitoras, pero trabajando con diluciones de la muestra de DNA total lograron detectar hasta 1 UFC/mL de *B. bruxellensis* en muestras que contenían un alto número de células de levaduras de otras especies.

Debido a la importancia que *B. bruxellensis* representa en la industria enológica de todo el mundo y con la demanda por métodos rápidos no solamente de detección sino que también de cuantificación, posteriormente Delaherche et al. (2004) presentaron un protocolo de qPCR para su cuantificación utilizando primers provenientes del gen RAD4. Sin embargo, el límite de detección alcanzado en los casos de análisis de muestras de vino tinto era de solamente 10^4 UFC/mL.

Uno de los principales problemas provenientes de esos métodos de detección y cuantificación de *Brettanomyces* en vinos tintos es que la presencia de elevadas concentraciones de polifenoles y otras sustancias colorantes presentes inhibe la reacción en cadena de la enzima Taq-polimerasa (Phister y Mills 2003; Wilson 1998). Intentando hacer frente a estos percances de la técnica, Tessonière et al. (2009) plantearon mejoras para la cuantificación de esa levadura, centrándose en el protocolo de aislamiento de DNA total a partir de muestras de vino con la utilización de polivinil-polipirrolidona (PVPP). Los autores desarrollaron un análisis por qPCR usando cebadores del gen RAD4 y un control interno de una levadura no-*Brettanomyces* y fueron capaces de cuantificar hasta 31 UFC/mL de *B. bruxellensis*.

1.5.3. Otros métodos

Uno de los enfoques usados para detectar la presencia de *Brettanomyces* en el vino puede ser la determinación analítica de los principales productos de su actividad metabólica, por ejemplo por cromatografía gaseosa (Chatonnet et al. 1995, Rodrigues et al. 2001b). Sin embargo, uno de los problemas de ese planteamiento es que la detección de esos compuestos significa la existencia de células metabólicamente activas, lo que puede comprometer cualquier acción profiláctica en bodega. La aplicación de cromatografía gaseosa combinada con espectrometría de masas (GC-MS) es otra alternativa más en ese sentido y permite identificar y cuantificar sensiblemente tanto el 4-etilfenol como el 4-etilguaicol (Coulon et al. 2010; Romano et al. 2008). La producción de fenoles volátiles por *Brettanomyces* puede constituir uno de los principales factores críticos en la calidad organoléptica de vinos tintos de modo general, así que también se ha planteado un enfoque integrado de detección y cuantificación de sus productos metabólicos por cromatografía gaseosa y olfatometría (GC-O) (Culleré et al. 2004). La cromatografía gaseosa por otro lado también se ha propuesto como un método para detectar *Brettanomyces* por medio de la identificación y cuantificación de los ésteres de metilo como

biomarcadores de la levadura, los cuales son generados a partir de la descomposición de los ácidos grasos (Malfeito-Ferreira et al. 1997).

En relación a otras técnicas, el potencial de la citometría de flujo en combinación con marcadores fluorescentes en la identificación de microorganismos representa una posibilidad más en la detección de *Brettanomyces* (Malacrinò et al. 2001). La citometría de flujo (FCM) consiste en un análisis óptico que permite una estimación directa de las células en suspensión en el vino y cuando combinada con la hibridación *in situ* por fluorescencia (FISH) permite identificar y cuantificar el organismo en cuestión. Esta técnica fue específicamente aplicada para *B. bruxellensis* en vinos tintos usando sondas fluorescentes del gen 26S del RNA ribosomal, permitiendo la cuantificación específica de hasta 100 células/mL (Serpaggi et al. 2010).

1.6. Control microbiológico en enología

La detección de *Brettanomyces* en el vino es de suma importancia en las prácticas enológicas pues puede permitir a la bodega un tratamiento preventivo en vez de aplicar técnicas paliativas al problema. Parece ser que en condiciones enológicas las células de esa levadura se encuentran mejor adaptadas para superar las condiciones de estrés ambiental que en el laboratorio (Barata et al. 2008a), así que el control de determinados parámetros es esencial para prevenir el desarrollo de la levadura y las consecuentes alteraciones que conllevan su proliferación en etapas críticas de la vinificación.

A lo largo de todo el proceso de producción de los vinos, especialmente de vinos tintos, diversos nichos y condiciones pueden albergar y favorecer el crecimiento de *Brettanomyces* (Licker et al. 1998), como es el caso de las bayas de uva en malas condiciones fitosanitarias, especialmente aquellas atacadas por *Botrytis* (Oelofse et al. 2008). Por otra parte, es ampliamente conocido que instalaciones y equipamientos de bodega no adecuadamente desinfectados son una de las principales causas de diseminación de esa levadura (Fugelsang 1998), y unido a esto, también hay que mencionar que es imprescindible tener en cuenta factores como bajos niveles de dióxido de azufre libre, existencia de azúcares residuales (fructosa y glucosa) y liberación de nutrientes por la autólisis celular de otras levaduras (Barata et al. 2008b; Oelofse et al. 2008). Recientemente se ha demostrado que ciertas prácticas de vinificación también pueden favorecer el éxito adaptativo de *Brettanomyces* en bodega: (a) el uso de barricas en un mal estado de higienización para la crianza del vino asociado al aporte de pequeñas cantidades de oxígeno a través de los poros de la madera (Loureiro y Malfeito-Ferreira 2006; Malfeito-Ferreira 2011); (b) temperaturas inadecuadas de vinificación y de almacenamiento (Dias et al. 2003; Barata et al. 2008b); (c) prácticas de embotellado sin filtrar (Henick-Kling et al. 2000).

De cualquier modo, dentro de ese contexto, el simple control de los valores de pH y niveles de oxígeno, así como de las temperaturas y la prevención de maceraciones muy intensas o prolongadas son variables que pueden y deben ser vigiladas para disminuir las condiciones favorables al crecimiento y proliferación (Suárez et al. 2007). Además, los procedimientos rutinarios de filtrado de los vinos pueden en gran medida ayudar a controlar la existencia de levaduras en las etapas finales de vinificación. No

obstante, cuando hay constancia de microorganismos alterantes incluso después de los filtrados, se hace necesario un control microbiológico riguroso para asegurar la estabilidad de los vinos una vez embotellados (Úbeda y Briones 1999).

Además de mantener unas prácticas profilácticas en todos los aspectos mencionados anteriormente, también es necesario el conocimiento y manejo adecuado, en los casos de contaminaciones evidentes en cualquiera de las etapas de producción, de agentes antimicrobianos a la hora de decidir sobre un tratamiento adecuado para eliminar una contaminación por esta levadura alterante. Sin lugar a dudas, el agente antimicrobiano por excelencia, además de agente antioxidante, empleado en bodega es el dióxido de azufre (Du Toit et al. 2005), capaz de inhibir el crecimiento de una innumerable cantidad de bacterias (lácticas y acéticas) y de levaduras, pero que a su vez permite el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae*, adicionado en concentraciones dentro de los límites permitidos, y favorece la correcta fermentación alcohólica de los mostos.

Otras alternativas han sido propuestas a lo largo de los últimos años para combatir *Brettanomyces* en vinos, como por ejemplo el quitosan. Este compuesto es un derivado desacetilado de la quitina de origen fúngico y está actualmente permitido en las prácticas enológicas tanto para la eliminación de contaminantes orgánicos (ocratoxina A) y minerales (hierro, plomo y cadmio) (Bornet y Teissedre 2008), como para el combate a *Brettanomyces*. Además de ser biodegradable y no tóxico, el quitosan presenta acción antifúngica por su carácter catiónico (mayor cuanto más alto sea el grado de desacetilación y a pH's más ácidos), de modo que cuanto mayor la densidad de cargas positivas, más intensa será la acción antimicrobiana (Kong et al. 2010).

El uso de dicarbonato de dimetilo (DMDC) es otro ejemplo, y está permitido exclusivamente para el saneamiento de vinos con un contenido igual o superior a 5 g/L en azúcares (reglamento UE 634/2006). El DMDC actúa penetrando en la célula e inhibiendo determinadas enzimas glucolíticas, en especial la alcohol deshidrogenasa y gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, por metoxicarbonilación de residuos nucleofílicos (Renouf et al. 2008).

También se ha encontrado que incluso compuestos fenólicos simples del vino como lo son los ácidos hidroxicinámicos pueden tener acción antimicrobiana. Tanto el ácido p-cumárico como el cafeico

parecen inhibir el crecimiento de *Brettanomyces*, pero especialmente el ácido ferúlico se ha demostrado eficaz en condiciones enológicas (Harris et al. 2010).

Además de tratamientos con agentes antifúngicos, otras metodologías han sido propuestas con diferentes enfoques. Entre ellos se puede citar el tratamiento térmico, donde se ha encontrado que en condiciones enológicas se consigue una inactivación efectiva de las células exponiendo el vino a una temperatura de 35 °C durante unos pocos minutos, efecto este que se ve potencializado en presencia de etanol. Sin embargo, la exposición a tales temperaturas, aunque por un corto periodo de tiempo, puede tener un impacto negativo sobre las características aromáticas y del flavor de los vinos (Couto et al. 2005b).

En ese sentido, otros autores proponen alternativas que teóricamente no afectarían a las propiedades organolépticas de los vinos, como es el caso de la exposición a altas presiones (400 – 500 MPa) que podría prácticamente eliminar las poblaciones de bacterias y levaduras, incluida *Brettanomyces* (Puig et al. 2003). Lustrato et al. (2010), por otro lado, propusieron la aplicación de corriente eléctrica de baja potencia a vinos durante 60 días, aparentemente con la misma eficacia de un tratamiento convencional con dióxido de azufre. El uso de campos eléctricos pulsados es otro sistema propuesto para reducción de la microflora del vino, incluyendo *D. anomala* y *D. bruxellensis*, de forma que un tratamiento de 186 KJ/Kg a 29 KV/cm podría ser capaz de reducir casi completamente a la biota existente (Puértolas et al. 2009).

Recientemente se han buscado posibilidades basadas en mecanismos biológicos de inhibición interespecífica para actuar frente a *Brettanomyces*, como es el caso de las toxinas “killer”. Se conoce la producción de dichas toxinas por diversos géneros de levaduras de origen vínico (*Saccharomyces*, *Candida*, *Debaryomyces*, *Hanseniaspora*, *Hansenula*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Zygosaccharomyces*, etc.), y que en su mayoría son sensibles a la proteasa y activas a pH ácido (Ciani y Comitini 2011). Comitini et al. (2004) describieron por primera vez la producción de toxinas producidas por *Pichia anomala* y *Kluyveromyces wickerhamii* y demostraron que su efecto inhibitorio puede ser estable hasta diez días en el vino y proponen su aplicación como antimicrobiano selectivo. En ese caso, la toxina *Kwkt* purificada de *K. wickerhamii* se mostró especialmente activa frente a levaduras *Brettanomyces* llegando a presentar efecto fungicida a muy bajas concentraciones y bajo condiciones enológicas (Comitini y Ciani

2011). En el caso de *Pichia membranifaciens* se ha descrito la toxina *PMKT2*, capaz de inhibir eficazmente a *Brettanomyces* mientras *S. cerevisiae* se mostró resistente, sugiriendo su potencial uso en fermentaciones vínicas (Santos et al. 2009). El hongo *Ustilago maydis* también se ha mostrado un potencial productor de esa clase de proteínas. En ese caso, la toxina *KP6* mostró acción inhibitoria selectiva frente a *Brettanomyces*, reduciendo los niveles de etilfenol en los vinos tratados, y a concentraciones más elevadas presentó acción biocida (Santos et al. 2011).

La acción antimicrobiana de péptidos sintéticos contra levaduras alterantes del vino también se ha descrito. Un ejemplo de ello es la lactoferrina de la leche e sus derivados, como la lactoferricina bovina (LfcinB), que presentan un amplio espectro de acción inhibitoria o biocida, eso sí dependientes del medio y del organismo en cuestión (Enrique et al. 2007). En particular, la LfcinB₁₇₋₃₁ – un péptido de 15 residuos – presenta efecto biocida frente a cepas de *B. bruxellensis* de origen vínico en condiciones de laboratorio; en contrapartida, en condiciones enológicas el péptido apenas llega a inhibir el crecimiento de la levadura cuando esta se encuentra en poblaciones iguales o superiores a 10 UFC/mL (Enrique et al. 2008).

No obstante, tal y como se ha mencionado anteriormente, es durante el envejecimiento del vino en barricas de roble donde *Brettanomyces* realmente representa un gran problema y, por consiguiente, las barricas requieren un cuidado y atención especiales porque es bastante complicada su limpieza y son prácticamente imposibles de esterilizar una vez contaminadas por microorganismos alterantes (Boulton et al. 1996). Paradójicamente, frente a los avances tecnológicos en la producción de vinos de calidad, los métodos y tecnologías para desinfección de barricas han cambiado muy poco y hay indicios de que los tratamientos químicos habituales y los lavados con agua caliente no son tan efectivos para el control de *Brettanomyces* (Yap et al. 2008).

Una de las propuestas en ese sentido es la utilización de ultrasonidos de alta potencia (HPU) para la inactivación de la viabilidad celular de esa levadura en lo que se puede considerar el nicho que representa la madera de las barricas. Este método ha sido comparado con tratamiento por ozono y con lavado convencional y de alta presión con agua caliente, ofreciendo las siguientes ventajas sobre estos últimos: a) eliminación o reducción drástica de *Brettanomyces*; b) eliminación de pigmentos de antocianina (que pueden ser metabolizados por *Brettanomyces*); c) reducción de residuos químicos

resultante del proceso de limpieza; d) ahorro energético; e) ampliación de la vida útil de las barricas; f) reducción del empleo de dióxido de azufre (Yap et al. 2008; Yap y Bagnall 2009).

Otros enfoques para la desinfección de barricas contaminadas por *Brettanomyces* pueden ser el tratamiento por radiación UV, aplicación de vapor o bien de ozono (en estado gaseoso o en solución). Guzzon et al. (2011) realizaron un estudio comparativo de estos métodos y concluyeron que los tratamientos por ozono y vapor fueron los más eficaces, consiguiendo la eliminación de hasta 70 % de la población de levaduras. Aparentemente, la sensibilidad de *Brettanomyces* a dichos tratamientos es mayor, pero no se conoce hasta la fecha los motivos de una posible acción selectiva de estas técnicas.

Más recientemente, fruto de nuevas iniciativas en investigación y desarrollo, también se está poniendo a punto la aplicación de microondas basada e tecnología aeroespacial para la limpieza y desinfección de barricas contaminadas por *Brettanomyces* (Palacios et al 2011; Palacios et al. 2012). El método propone la utilización de diferentes trenes de ondas electromagnéticas de alta frecuencia sobre duelas de barricas que han contenido vino contaminado y los ensayos llevados a cabo hasta el momento han mostrado resultados muy eficientes, eliminando cualquier indicio de células viables de *Brettanomyces*, además de ser una alternativa prometedora a la utilización de dióxido de azufre en los tratamientos de barricas usadas.

2. Otras levaduras Saccharomycetales detectadas en ambiente de bodega

En el vino la actividad de las levaduras es parte esencial de la producción y de hecho ese proceso ocurre en presencia de una gran diversidad de especies, siendo muy difícil determinar cuál es una levadura alterante. Justamente por ese motivo, raras veces se encuentra un organismo alterante durante el proceso fermentativo, pero más bien durante las etapas de almacenamiento, crianza y embotellado (Loureiro y Malfeito-Ferreira 2003). Determinadas levaduras típicamente caracterizadas como alterantes (*Zygosaccharomyces* spp. y *Torulaspota* spp.) colonizan y crecen muy lentamente en medios con altos contenidos en azúcares y sales como el mosto (Blackburn 2006). En otros casos, algunas cepas de las propias especies fermentadoras del género *Saccharomyces* pueden producir altos niveles de sulfuro de hidrógeno y ácido acético, resultando en vinos organolépticamente inaceptables (Blackburn 2006). Por otra parte, levaduras de los géneros *Pichia*, *Metchnikowia*, *Hansenula*, *Kloeckera* y *Debaryomyces* son característicamente formadoras de film en el contexto vinícola (Loureiro y Malfeito-Ferreira 2003).

La microbiota presente en los ecosistemas vitivinícolas es muy compleja y sus orígenes pueden estar asociados al ecosistema del viñedo y al ambiente de bodega propiamente. En este último caso el nicho de acción de levaduras puede estar asociado a la zona de elaboración y almacenamiento (paredes, estrujadoras, prensas, suelos, tanques de fermentación, depósitos, filtros, maguera y en el mismo aire) o bien a la línea de embotellado (botellas, esterilizador de botellas, filtros, encorchadora y aire) (Loureiro y Malfeito-Ferreira 2003; Malfeito-Ferreira et al. 1997).

En este estudio, además de *B. bruxellensis*, también se han aislado otras especies de levaduras en ambiente de bodega a partir del cultivo en medio específico, todas pertenecientes al orden Saccharomycetales: *Trigonopsis cantarellii*, *T. variabilis*, *Candida ishiwadae*, *Pichia holstii*, *Arthroascus schoenii*, *Pichia mandshurica* y *Meyerozyma guilliermondii*. De este modo, en el presente apartado se recopila de la bibliografía disponible toda la información acerca de los microorganismos a los que se hace referencia en el CAPÍTULO 3 de RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

La TABLA I-5 muestra la nomenclatura actualmente reconocida así como todas las posibles sinonimias para cada especie según la base de datos MycoBank (<http://www.mycobank.org>) y de acuerdo con los otros bancos de datos: Index Fungorum (<http://www.indexfungorum.org>), y NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/taxonomy/>).

Tabla I-5. Taxonomía de otras levaduras Saccharomycetales identificadas en esta tesis

Nombre de la especie actualmente en uso	Sinonimias	Autores	Publicación
<i>Trigonopsis cantarellii</i>		Kurtzman y Robnett (2007)	FEMS Yeast Res. 7 (1)
	<i>Torulopsis cantarellii</i> *	van der Walt et al. (1961)	Antonie van Leeuwenhoek 27
	<i>Candida cantarellii</i> *	Yarrow et al. (1978)	J. Syst. Bacteriol. 28
	<i>Torulopsis vinacea</i> *	Ohara et al. (1964)	J. Gen. Appl. Microbiol. 10(1)
<i>Trigonopsis variabilis</i>		Schachner J. (1929)	Z. ges. Brauwesen 52
<i>Pichia holstii</i>		Kurtzman (1984)	Antonie van Leeuwenhoek 50 (3)
	<i>Nakazawaea holstii</i> *	Yamada et al. (1994)	Biosci. Biotechnol. Biochem. 58 (7)
	<i>Hansenula holstii</i> *	Wickerham et al. (1960)	Mycologia 52(2)
	<i>Endomycopsis holstii</i> *	Novák y Zsolt (1964)	Acta Microbiol. Hung. 10
<i>Arthroascus schoenii</i>		Bab'eva et al. (1985)	Mikrobiologiya 54
	<i>Saccharomycopsis schoenii</i> *	Kurtzman y Robnett (1995)	Can. J. Bot. 73 (1)
	<i>Endomyces schoenii</i> *	Nadson et al. (1932)	Dokl. Akad. Nauk S.S.S.R. 13 (323)
	<i>Pichia nonfermentans</i> *	Nakase et al. (1971)	Gen. Appl. Microbiol. 17 (6)
<i>Pichia mandshurica</i>		Saito (1914)	Mikrobiologische Studien über die Bereitung des mandschurischen Branntweins
	<i>Pichia galeiformis</i> *	Goto et al. (1984)	J. Gen. Appl. Microbiol. 33 (3)
	<i>Zygosaccharomyces chevalieri</i> *	Saito	no consta
	<i>Zygosaccharomyces mali</i> *	Negrone	no consta
<i>Candida ishiwadae</i>		Sugiyama y Goto (1969)	J. Fac. Sci. Tokyo Univ. 10 (7-10)
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>		Kurtzman y Suzuki (2010)	Mycoscience 51 (1)
	<i>Pichia guilliermondii</i> *	Wicherham (1966)	J. Bacteriol. 92
	<i>Yamadazyma guilliermondii</i> *	Billion-Grand (1989)	Mycotaxon 35 (2)
	<i>Endomyces lacteus</i> *	Castellani (1912)	Lancet 1 (1)
	<i>Endomyces laticolor</i> *	Castellani (1912)	Lancet 1 (1)
	<i>Endomyces guilliermondii</i> *	Wicherham et al. (1964)	J. Bacteriol. 68(5)

*Taxones cuyo uso está desaconsejado según las recomendaciones de MycoBank (<http://www.mycobank.org>).

En el ámbito enológico, de las especies mencionadas anteriormente, *Meyerozyma guilliermondii* es una levadura potencialmente alterante, y hay referencias sobre su asilamiento a partir de uva, mosto,

vino, insectos, en el mismo ambiente de bodega, en sus equipamientos y barricas (Barata et al. 2006; Martorell et al. 2006; Zott et al. 2008). Su acción como microorganismo contaminante está principalmente asociada a la producción de fenoles volátiles, con determinadas cepas pudiendo presentar (en medio sintético) tasas de conversión de ácido p-cumárico en 4-etilfenol equivalentes a las de *B. bruxellensis* (Barata et al. 2006; Barata et al. 2008b; Dias et al. 2003; Lopes et al. 2009; Loureiro y Malfeito-Ferreira 2003). Guzzon et al. (2011a), por otro lado, mencionan que esa especie solamente es capaz de producir vinilfenol. De todos modos su proliferación y potencial riesgo estén íntimamente relacionados con falta de control en los mostos de uva antes de la inoculación controlada y que su habilidad en producir 4-etilfenol en vino propiamente es muy inferior a la observada en *Brettanomyces* (Lopes et al. 2009; Martorell et al. 2006).

Con respecto a la levadura oxidativa *Pichia mandshurica*, hay registros de su detección durante todo el transcurso de la fermentación alcohólica, particularmente de mostos procedentes de uvas atacadas por podredumbre (Barata et al. 2008c) y también en vinos con desviación aromática y equipamientos de filtrado en bodega (Sáez et al. 2011). Sáez et al. (2011) encontraron que, aunque sea una característica cepa-dependiente, ese microorganismo es capaz de producir 4-vinilguaiacol, 4-etilguaiacol, 4-vinilfenol y 4-etilfenol al cabo de 60 días en vinos tintos suplementados con ácido p-cumárico.

De *Candida ishiwadae* se conocen registros de su aislamiento en medio DBDM a partir de mostos de uva y también de barricas (Guzzon et al. 2011a). Además, también hay evidencias de que determinados aislados de esa especie encontrados en barricas pueden producir ciertos niveles de 4-vinilguaiacol y 4-vinilfenol en medio sintético con los precursores ácido p-cumárico y ferúlico (Guzzon et al. 2011b).

De *Trigonopsis cantarellii* se tratará en el apartado siguiente y relacionado con la especie tipo del mismo género, *Trigonopsis variabilis*, se describió en su momento a partir de muestras de cerveza en Alemania (Schachner 1929) pero también consta información de su aislamiento a partir de uvas en Italia (Kurtzman y Fell 1998). De *Arthroascus schoenii* hay referencia de que fue aislada de uvas con podredumbre (Naumov et al. 2003), en mostos e incluso durante la fermentación alcohólica, tanto en fermentaciones convencionales como con aquellas que pasaron por maceración en frío previamente

(Zott et al. 2008). Finalmente, de *Pichia holstii* se sabe que es más bien una especie comúnmente relacionada a ecosistemas oleicos: olivas, pasta de aceitunas, alpechín (líquido proveniente del centrifugado de la pasta) y orujo (Romo-Sánchez et al. 2010; Sinigaglia et al. 2010).

La TABLA I-6 resume la información anterior disponible en la literatura con respecto a los orígenes de los primeros aislamientos de las levaduras Saccharomycetales de las especies identificadas en el ambiente de bodega a lo largo del trabajo de esta tesis, así como del registro de la posible producción de etilfenol.

Tabla I-6. Producción de etilfenol y origen de otras levaduras Saccharomycetales identificadas en esta tesis

Especie	Origen	Referencia	Generación de etilfenol
<i>T. cantarellii</i>	uvas, mosto, vino, insectos	Ohara et al. (1994); Barata et al. (2012); Dias et al. (2003)	+ Dias et al. (2003)
<i>T. variabilis</i>	cerveza, uvas	Schachner (1929); Kurtzman y Fell (1998)	
<i>P. holstii</i>	olivas, pasta de aceituna, alpechín, orujo de oliva	Romo-Sánchez et al. (2010); Sinigaglia et al. (2012)	
<i>A. schoenii</i>	uvas, mosto, vino	Naumov et al. (2003); Zott et al. (2008)	
<i>P. mandshurica</i>	uvas, mosto, vino, ambiente de bodega	Barata et al. (2008); Sáez et al. (2011)	+ Sáez et al. (2011)
<i>C. ishiwadae</i>	uvas, barrica	Guzzon et al. (2011a,b)	+ Guzzon et al. (2011a)
<i>M. guilliermondii</i>	uvas, mosto, vino, ambiente de bodega	Barata et al. (2008); Dias et al. (2003); Guzzon et al. (2011a); Martorell et al. (2006); Zott et al. (2008)	+ Barata et al. (2008); Martorell et al. (2006)

Recopilación de datos de referencias bibliográficas sobre aislamientos y producción de etilfenol.

3. *Trigonopsis cantarellii*

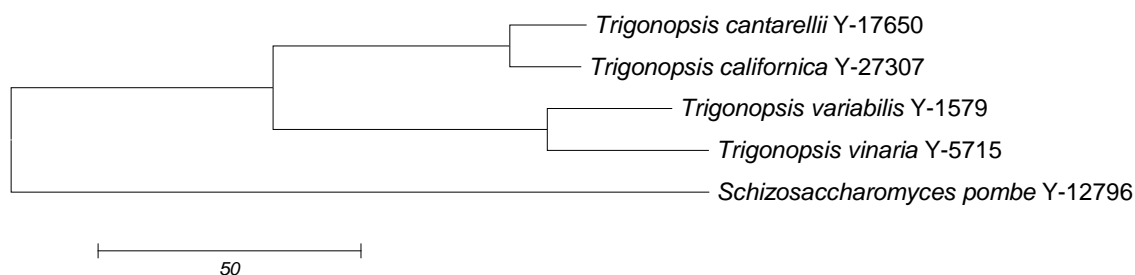
El género monofilético *Trigonopsis* (Ascomycota: Saccharomycetes: Saccharomycetales: *incertae sedis*) se encontraba descrito a partir *T. variabilis*, una especie aislada en 1929 de cerveza en Alemania (base de datos [MycoBank](#)) y caracterizada por una reproducción por gemación a partir de células con formato triangular ([Kurtzman y Fell 1998](#)).

Recientemente, basándose en análisis filogenéticos de secuencias génicas, [Kurtzman y Robnett \(2007\)](#) transfirieron *Candida cantarellii* y *C. vinaria* a este género. Posteriormente otra especie más, *Trigonopsis californica*, también fue incluida en el mismo género ([Kurtzman 2007](#)). La [TABLA I-7](#) presenta la configuración actual del género *Trigonopsis* (según banco de datos [Index Fungorum](#) y [MycoBank](#)), en que curiosamente las cuatro especies reconocidas se aislaron de mosto de uva – a excepción de la cepa de *T. variabilis* aislada de cerveza ([Kurtzman y Robnett 2007](#)).

Tabla I-7. Especies actualmente reconocidas dentro del género *Trigonopsis*

Espece	Autores	Publicación
<i>Trigonopsis variabilis</i>	Schachner (1929)	Z. Ges. Brauwesen 52 : 137
<i>Trigonopsis californica</i>	Kurtzman (2007)	Antonie van Leeuwenhoek 92 (2): 230
<i>Trigonopsis cantarellii</i>	Kurtzman y Robnett (2007)	FEMS Yeast Res. 7 (1): 150
<i>Trigonopsis vinaria</i>	Kurtzman y Robnett (2007)	FEMS Yeast Res. 7 (1): 150

Según [Kurtzman y Robnett \(2007\)](#), las levaduras de ese género pueden asumir morfologías celulares triangulares, tetraédricas, romboidales o elipsoidales; su reproducción se da por gemación multilateral o por gemación a partir de proyecciones en las células triangulares y tetraédricas; forman pseudohifa pero hifas verdaderas no están presentes; son fermentadoras de azúcares. Según los mismos autores y basándose en el análisis de secuencias génicas, actualmente se reconoce la disposición filogenética presentada en la [FIGURA I-4](#). La [TABLA I-8](#), por otro lado, presenta las sinonimias para la especie *T. cantarellii* de las cuales hay registro en las bases de datos.

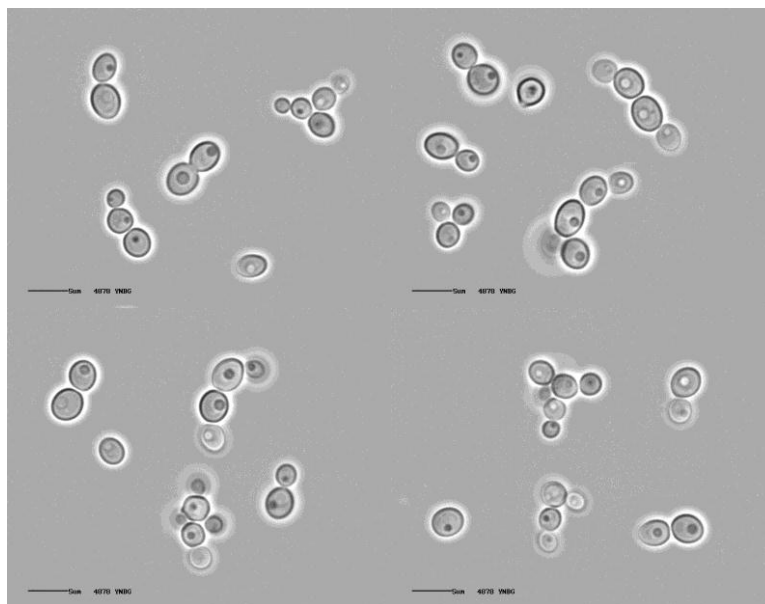
Figura I-4. Filogenia del clado *Trigonopsis*

Filogenia del clado *Trigonopsis* según Kurtzman (2007). La escala de distancia representa el número de diferencias de bases por secuencia.

Tabla I-8. Sinonimias de la especie *Trigonopsis cantarellii*

Sinonimia	Autores	Publicación
<i>Candida cantarellii</i>	Meyer y Yarrow (1978)	Int. J. Syst. Bacteriol. 28 (4): 612
<i>Torulopsis cantarellii</i>	Van der Walt y Kerken (1961)	Antonie van Leeuwenhoek 27 : 210
<i>Torulopsis vinacea</i>	Ohara et al. (1964)	J. Gen. Appl. Microbiol. 10 : 77

Las levaduras de la especie *T. cantarellii* (FIGURA I-5) se caracterizan por ser no-ascosporógenas y se reproducen por gemación multilateral (Kurtzman y Fell 1998). Pertenece a un grupo de levaduras caracterizadas por la presencia de galactosa en la composición de azúcares neutros de la célula y por el sistema de ubiquinona del tipo Q9 (Suzuki et al. 1999). Respecto a su fisiología se conoce que es capaz de asimilar glucosa, etanol y glicerol (Kurtzman y Fell 1998) y que es incapaz de asimilar inositol (Suzuki et al. 1999).

Figura I-5. Fotografía de microscopía óptica de células de *Trigonopsis cantarellii*

Escalas: 5 µm. (Fuente: CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre)

La especie *Trigonopsis cantarellii* es conocida como integrante de la flora de uvas y también ha sido aislada de mostos frescos, al inicio de la fermentación alcohólica (Renouf et al. 2006) y en vinos (Barata et al. 2012). Como parte integrante de la microbiota indígena, su utilización fue incluso propuesta para la producción de vinos varietales Syrah en Argentina como inóculo en los primeros días de la fermentación alcohólica seguida de inoculación secuencial con *S. cerevisiae* (Toro y Vázquez 2002); según los autores, con esa práctica se pueden obtener resultados atractivos, consiguiéndose un importante incremento en glicerol, acetoína, propanol y ácido succínico en los vinos producidos.

Poco se conoce sobre los aspectos fisiológicos que *T. cantarellii* puede presentar en el vino. Por un lado se ha registrado que presenta actividad β -D-xilosidasa, y que dicha característica puede estar relacionada con procesos de liberación de sabores en el vino siempre y cuando su acción se limite a los primeros momentos de la fermentación alcohólica (Manzanares et al. 1999). Por otro lado también se ha demostrado que posee actividad β -D-glucosidasa y en ese sentido su desarrollo en etapas tardías podría suponer liberación de antocianidinas y su consecuente conversión a compuestos de color marrón o decolorados (Manzanares et al. 2000).

Materiales y Métodos

II. Materiales y Métodos

Los materiales y métodos empleados a lo largo de esta tesis se fragmentan en tres bloques que corresponden a los tres capítulos presentados posteriormente en **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**.

Medios de cultivo utilizados

a) Medio YPD-agar:

10 g/L extracto de levadura (Oxoid, Inglaterra), 20 g/L peptona (Becton, Dickinson & Co., Francia), 20 g/L glucosa (Panreac Química S.A., España), 20 g/L agar (Becton, Dickinson & Co.), 50 µg/mL penicilina (Sigma, Estados Unidos); 100 µg/mL estreptomycin (Sigma).

b) Medio específico para *Brettanomyces*

Se empleó el medio descrito por **Rodrigues et al. (2001b)** con las siguientes modificaciones: 10 g/L extracto de levadura (Oxoid), 20 g/L peptona (Becton, Dickinson & Co., Francia), 20 g/L glucosa (Panreac Química S.A., España), 20 g/L agar (Becton, Dickinson & Co.), 10 % (v/v) etanol (Panreac Química S.A.), 100 mg/L ácido p-cumárico, 22 mg/L verde-bromocresol, 20 g/L agar, 50 µg/mL penicilina (Sigma), antibacterianos (Sigma).

c) Medio manitol-agar: 5 g/L extracto de levadura (Oxoid), 3 g/L peptona (Becton, Dickinson & Co.), 25 g/L D-manitol (Sigma-Aldrich, Alemania), 20 g/L agar (Becton, Dickinson & Co.), 100 mg/L nistatina (Acofarma, España).

d) Medio MRS-agar (Oxoid), 100 mg/L nistatina (Acofarma).

- e) **Medio líquido YPD:** 10 g/L extracto de levadura (Oxoid), 20 g/L peptona (Becton, Dickinson & Co.), 20 g/L glucosa (Panreac Química S.A.)
- f) **YPD líquido concentrado:** 20 g/L de extracto de levadura (Oxoid), 40 g/L de peptona (Becton, Dickinson & Co.), 40 g/L de glucosa (Panreac Química S.A.).

1. Detección y cuantificación de *Brettanomyces* en vinos tintos mediante los métodos de PCR cuantitativa y cultivo en medio específico

1.1. Muestras de vino y análisis microbiológicos

Estudio de caso 1: Vinos tintos en proceso de crianza

Los análisis microbiológicos convencionales fueron realizados a partir de 324 muestras de vinos tintos de la variedad Tempranillo provenientes de D.O.Ca. Rioja y D.O. Ribera del Duero, en el periodo 2009 - 2011. Todas las muestras provenían de vinos en proceso de crianza en barricas de roble y eran sospechosas de contaminación, por análisis sensorial e indicios de cierta desviación aromática.

Los vinos se procesaron para análisis microbiológico tomándose 10 mL de la muestra homogénea en un tubo estéril. Se centrifugaron a 3000 g durante 10 minutos y se desechó el sobrenadante. Se resuspendieron los pellets en 1 mL de solución salina (0,15 M NaCl) estéril, se realizaron diluciones decimales de la suspensión y se sembraron 100 µL en placa con medio YPD-agar para el recuento de levaduras totales, y medio específico para el recuento de *Brettanomyces*. Las placas se incubaron a 30 °C en condiciones de aerobiosis. De aquellas muestras que presentaron recuentos en medio específico para *Brettanomyces* se seleccionaron hasta 6 colonias representativas que se procesaron posteriormente para identificación específica, como descrito a continuación en el apartado 1.6 de **MATERIALES Y MÉTODOS**.

Por otro lado, las muestras también se procesaron para análisis por PCR cuantitativa como descrito en los apartados 1.4, 1.5 y 1.7 de **MATERIALES Y MÉTODOS**, para las respectivas etapas.

Estudio de caso 2: seguimiento durante la elaboración de vinos tintos varietales

Se llevó a cabo el seguimiento durante diferentes etapas de producción en bodega de 2 vinos tintos de la variedad Graciano y 3 de la variedad Tempranillo, incluyendo muestreos de: uva pasta, fermentación alcohólica tumultuosa, fin de fermentación alcohólica, fin de fermentación maloláctica, barrica y segundo trasiego de barrica. Para la elaboración de estos vinos es importante mencionar que se trataban de procesos de vinificación llevados a cabo por fermentación espontánea con levaduras autóctonas.

Las diferentes muestras se procesaron para análisis microbiológico a partir de un volumen de 10 mL homogeneizado en un tubo estéril. Se centrifugaron a 3000 g durante 10 minutos y se desechó el sobrenadante. Se resuspendieron los pellets en 1 mL de solución salina (0,15 M NaCl) estéril, se realizaron diluciones decimales de la suspensión y se sembraron 100 μ L en placa con medio YPD-agar para el recuento de levaduras totales, y medio específico para el recuento de *Brettanomyces*. Las placas se incubaron a 30 °C en condiciones de aerobiosis. De aquellas muestras que presentaron recuentos en medio específico para *Brettanomyces* se seleccionaron hasta 6 colonias representativas que se procesaron posteriormente para identificación específica, como descrito a continuación en el apartado 1.6 de MATERIALES Y MÉTODOS.

Por otro lado, las muestras también se procesaron para análisis por PCR cuantitativa como descrito en los apartados 1.4, 1.5 y 1.7 de MATERIALES Y MÉTODOS, para las respectivas etapas.

1.2. Cepas de levaduras y condiciones de cultivo

Para los ensayos realizados se utilizaron las cepas de levadura *B. bruxellensis* BY24 y *S. cerevisiae* LV5 de la colección enológica de aislados del Departamento de Agricultura y Alimentación de la Universidad de La Rioja. Los microorganismos fueron cultivados en placas de YPD-agar a 30 °C, de 24 a 48 horas, en condiciones de aerobiosis.

1.3. Preparación de muestras-control

Se prepararon soluciones de células de la cepa control *B. bruxellensis* BY24 en vino tinto para evaluar los diferentes métodos de extracción de material genético. Células de un cultivo fresco fueron resuspendidas, respectivamente, en vino tinto filtrado amicróbicamente (0,20 µm) (Corning Inc., Alemania) y en solución salina 0,15 M estéril. En ambos casos se realizaron diluciones seriadas decimales de modo que se obtuviera un rango de concentraciones de $4 \cdot 10^7$ a 4 células/mL. La concentración inicial se determinó por absorbancia en espectrofotómetro (Ultrospec 2000, Pharmacia Biotech, Inglaterra) a 600 nm, donde 1 unidad de absorbancia a 600 nm corresponde a aproximadamente $2 \cdot 10^7$ células/mL (Ausubel et al. 1992), y por recuentos en medio YPD-agar. Todas las diluciones, tanto en vino como en solución salina, contenían además una concentración fija de $2 \cdot 10^5$ células/mL de la cepa *S. cerevisiae* LV5 para simular condiciones de un vino real y proporcionar un efecto tampón, disminuyendo las pérdidas de células durante los procedimientos de extracción de DNA. Además también se repitieron los experimentos con un vino naturalmente turbio (73,6 NTU) no filtrado y previamente estudiado microbiológicamente.

1.4. Tratamiento previo de las muestras de vino

Previamente a la extracción del DNA total de la muestra de vino los siguientes procedimientos de lavado fueron llevados a cabo según los siguientes criterios:

(A) **Vinos poco turbios:** para los vinos con una turbidez igual o inferior a 50 NTU se recogió 1 mL de muestra en un microtubo estéril y se centrifugó a 13600 g durante 5 minutos en una microcentrífuga Heraeus (Biofuge Pico, Heraeus, Alemania). Se desechó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 1 mL de tampón de lavado (Tris 0,05 M; NaCl 0,15 M; 100 mL/L etanol). Después de agitar el tubo brevemente en vórtex se centrifugó nuevamente la muestra y se desechó el sobrenadante. El lavado y centrifugación se repitieron una vez más y se conservó el pellet de células para extracción del DNA.

(B) **Vinos muy turbios:** en el caso de los vinos con una turbidez superior a 50 NTU se realizaron los mismos procedimientos descritos en (A) y se añadió un paso de lavado cuando fue necesario para eliminar materia colorante perceptible visualmente. Para promover la eliminación por absorción de taninos y otros pigmentos y prevenir la inhibición de la PCR-polimerasa (Delaherche et al. 2004; Phister y Mills 2003; Tessonière et al. 2009; Jara et al. 2008), los pellets se resuspendieron en 100 µL del tampón de lavado y se distribuyó cuidadosamente con asa de siembra estéril en placa con medio YPD-agar, que se incubó durante 12 horas a 30 °C. A continuación se recogió la masa celular de la superficie de la placa de cultivo con un asa de siembra estéril y se resuspendió en 1 mL de tampón de lavado. Se centrifugó la muestra a 13600 g durante 5 minutos y se conservó el pellet de células para extracción del DNA total.

1.5. Extracción del material genético total

Tras el lavado de las muestras mencionado en el apartado anterior, se llevaron a cabo y se probaron seis protocolos para extracción y aislamiento del material genético total de las levaduras

- I. El pellet fue resuspendido en 200 μ L de InstaGene Matrix (BioRad, Estados Unidos) y tratado según las recomendaciones del fabricante, del siguiente modo: incubar a 56 °C durante 20 minutos; tras agitar vigorosamente el tubo durante 10 segundos, hervir durante 8 minutos y centrifugar a 13400 g durante 3 minutos; transferir el sobrenadante a un tubo estéril.
- II. El pellet fue resuspendido en 200 μ L de PrepMan Ultra (Applied Biosystems, Estados Unidos) y tratado según las recomendaciones del fabricante con las siguientes modificaciones: se agitó el tubo vigorosamente durante 15 segundos y se hirvió durante 10 minutos; se centrifugó la muestra a 13400 g durante 5 minutos. A continuación el sobrenadante fue transferido a una columna Amicon (Millipore) y centrifugado a 13400 g durante 10 minutos; se añadieron 500 μ L de agua ultra-pura y se volvió a centrifugar igualmente la muestra; se añadieron 100 μ L de agua ultrapura y se transfirió la columna boca abajo en un tubo estéril, centrifugándose a 3400 g durante 3 minutos y recogiendo el eluido de la columna.
- III. El pellet fue resuspendido en 200 μ L de tampón de lisis (Tris 500 mM, pH 8,0; β -mercaptoetanol 100 mM); se añadieron 25 μ L de liticasa fresca 3 mg/mL (Sigma-Aldrich, Estados Unidos) y la muestra se incubó en baño a 37 °C durante 25 minutos. Se agitó fuertemente la muestra en vórtex y se añadieron otros 25 μ L de liticasa, incubándose nuevamente durante 25 minutos. Se agitó fuertemente la muestra, se incubó en baño a 100 °C durante 15 minutos y, después de congelar y descongelar, se centrifugó a 3400 g durante 1 minuto en microcentrífuga. 250 μ L del sobrenadante fueron aspirados con una micropipeta y transferidos a un tubo estéril, utilizándose a continuación el protocolo del kit DNeasy Plant Mini (Qiagen, Alemania) según recomendaciones del fabricante con las siguientes modificaciones: se añadieron 375 μ L de la solución-AP3/E al lisado obtenido, homogeneizando bien la mezcla con auxilio de la micropipeta; la mezcla fue transferida a una columna Dneasy Plant Mini-spin y centrifugada a 6000 g durante 1 minuto; se añadieron 500 μ L de la solución-AW, transfiriéndose la columna a

un tubo limpio y se centrifugó la mezcla a 6000 g durante 1 minuto; se añadieron otros 500 µL de la solución-AW y se centrifugó la muestra a 13400 g durante 2 minutos; se añadieron 100 µL de la solución-AE para elución del DNA durante 5 minutos a temperatura ambiente, centrifugándose a continuación durante 1 minuto a 6000 g; se repitió el paso anterior una vez más.

IV. El pellet fue resuspendido en 200 µL de tampón de lisis (Tris 500 mM, pH 8,0; β-mercaptoetanol 100 mM); se añadieron 25 µL de liticasa fresca 3 mg/mL (Sigma-Aldrich, Estados Unidos) y la muestra se incubó en baño a 37 °C durante 25 min. Se agitó fuertemente la muestra en vórtex y se añadieron otros 25 µL de liticasa, incubándose nuevamente durante 25 minutos. Se agitó fuertemente la muestra, se incubó en baño a 100 °C durante 15 minutos. La muestra fue congelada y después de descongelar se centrifugó nuevamente. 100 µL del sobrenadante fueron recogidos en un microtubo estéril para precipitación de proteínas y aislamiento del DNA de acuerdo con el método de [Sambrook et al \(1989\)](#) con modificaciones, como se menciona: se añadieron 200 µL de solución-II (NaOH 0,2 M; dodecilsulfato de sodio 0,01 g/mL) al lisado obtenido, se agitó suavemente y se incubó en baño de hielo durante 15 minutos; se añadieron 150 µL de solución-III (ion potasio 3 M; ion acetato 5 M), se agitó suavemente y se incubó en baño de hielo durante 5 minutos; la muestra fue centrifugada a 13400 g durante 5 minutos a 4 °C (microcentrífuga 5415R, Eppendorf, Alemania); 900 µL de etanol (4 °C) fueron adicionados y mezclados suavemente; la muestra fue centrifugada nuevamente y el sobrenadante descartado; después de secarse completamente el pellet fue resuspendido en 50 µL de agua ultra pura.

V. El pellet de células fue resuspendido en 200 µL de tampón de lisis y sometido a lisis celular con liticasa como se ha descrito anteriormente y se centrifugó la muestra a 3400 g durante 1 minuto en microcentrífuga. El sobrenadante obtenido fue transferido cuidadosamente a una columna Amicon (0,5 mL, membrana 100K; Millipore, Irlanda) y tratado según recomendaciones del fabricante, con las siguientes modificaciones: se centrifugó la muestra a 13400 g durante 10 minutos; se añadió agua ultra-pura hasta completar un volumen final de 100 µL, transfiriéndose la columna boca abajo en un tubo estéril, y centrifugando la muestra a 3400 g durante 3 minutos.

VI. El pellet fue resuspendido en 200 μ L de tampón de lisis y sometido a lisis celular con liticasa como se ha descrito anteriormente y se centrifugó la muestra a 3400 g durante 1 minuto en microcentrífuga. A continuación se añadieron 25 μ L del polímero polivinilpolipirrolidona (PVPP) (PolyClar, Laffort, España) y se mantuvo en agitación suave durante 60 minutos, a 4 °C. Se centrifugó la muestra a 13400 g durante 1 minuto, 4 °C (microcentrífuga 5415R, Eppendorf) y se recogieron 100 μ L del sobrenadante en un eppendorf estéril. La precipitación de proteínas y aislamiento del DNA se llevaron a cabo como anteriormente mencionado en el método IV. Se probaron dos concentraciones de PVPP, 10 y 20 mg/mL.

1.6. Análisis e identificación de aislados por PCR convencional

1.6.1. Extracción del DNA

Se resuspendieron células frescas de los aislados en 1 mL de solución salina 0,15 M en tubos eppendorf, se agitaron suavemente en vórtex y se centrifugaron las muestras a 13600 g en microcentrífuga (Biofuge Pico, Heraeus) durante 3 minutos. Se desechó el sobrenadante y se resuspendió el pellet de células en 200 µL de tampón de lisis (Tris 500 mM, pH 8,0; β-mercaptoetanol 100 mM), se añadieron 25 µL de liticase fresca 3 mg/mL (Sigma-Aldrich) y la muestra se incubó en baño a 37 °C durante 25 minutos. Se agitó fuertemente la muestra en vórtex y se añadieron otros 25 µL de liticase, incubándose nuevamente durante 25 minutos. Se agitó fuertemente la muestra y se hirvieron los tubos durante 15 minutos. Después de congelar y descongelar, las muestras se centrifugaron a 13600 g en microcentrífuga (Biofuge Pico, Heraeus) durante 3 minutos, y se recogió el sobrenadante obtenido para los respectivos protocolos de PCR.

1.6.2. PCR convencional específica para *Brettanomyces*

Para confirmación específica de *Brettanomyces* de los aislados obtenidos en el medio específico se utilizó el protocolo propuesto por Cocolin et al. (2004) basado en la amplificación del dominio D1-D2 del gen 26S de RNAr, con las modificaciones descritas a continuación. Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 50 µL: 20 µL de la muestra de DNA, 0,5 µM de los respectivos primers (DB90F 5'-GAY ACT AGA GAG AGR RGG ARG GC-3'; DB394R 5'-ACG AGG AAC GGG CCG CT-3'), 5 µL del tampón de reacción 10xNH₄ (Bioline, United Kingdom), 3 µL de solución MgCl₂ 50 mM (Bioline), 0,05 mM de cada desoxiribonucleótido (Deoxynucleotide Mix; Sigma, Estados Unidos), y 1,5 U de Taq-polimerasa (Bioline). Las condiciones de la reacción fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 95 °C durante 5

minutos, seguida de 40 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 1 minuto, alineamiento a 67°C durante 45 segundos, y extensión a 72 °C durante 7 segundos.

1.6.3. Análisis por PCR convencional para la identificación de otras levaduras

En los casos de resultados negativos del análisis por PCR específica para *Brettanomyces* se utilizó el protocolo descrito por Kurtzman y Robnett (1998) para identificación de ascomicetos a partir del dominio D1/D2 del gen 26S de DNA ribosomal. Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 50 µL: 20 µL de la muestra de DNA, 0,5 µM de los respectivos primers (NL-1 5'- GCA TAT CAA TAA GCG GAG GAA AAG-3'; NL-2 5'- CTT GTT CGC TAT CGG TCT C-3'), 5 µL del tampón de reacción 10xNH₄ (Bioline, Reino Unido), 3 µL de solución MgCl₂ 50 mM (Bioline), 0,05 mM de cada desoxirribonucleótido (Deoxynucleotide Mix; Sigma), y 1,5 U de Taq-polimerasa (Bioline). Las condiciones de la reacción fueron: desnaturalización inicial a 94 °C durante 5 minutos; 36 ciclos con desnaturalización a 94 °C durante 1 minuto, alineamiento a 52°C durante 45 segundos, y extensión a 72 °C durante 2 minutos. Los resultados positivos en esta reacción confirmaban los aislados que previamente habían resultado levaduras *Brettanomyces*-negativas en el análisis de PCR específica para *Brettanomyces*.

1.6.4. Electroforesis de gel de agarosa de fragmentos de DNA

Un volumen de 10 µL de los productos de PCR obtenidos mezclados con tampón de carga [2,5 mg/mL azul de bromofenol (Panreac, España); 2,5 mg/mL xileno cianol (Sigma); 0,4 g/mL sacarosa (Panreac)] fueron analizados en gel de agarosa 1% en tampón TBE (10,8 g/L Tris (Panreac); 5,5 g/L ácido bórico (Panreac); EDTA pH 8,0 (Panreac) 0,1 M). Los procedimientos de electroforesis fueron llevados a

cabo a 96 V y 100 W e un equipo EPS600 (Pharmacia Biotech, Estados Unidos) y los geles analizados en un equipo ChemiGenius (Syngene, Estados Unidos) con el programa GeneSnap 7.12 (Syngene).

1.6.5. Secuenciación y comparación de datos con el banco de datos GenBank

En determinados casos de interés, el producto de la amplificación obtenido en la reacción de PCR descrita en el apartado 1.6.3 fue secuenciado para posterior identificación de especies. La secuenciación de los amplicones fue llevada a cabo por el Laboratorio de Genómica del Centro de Investigación Biomédica de La Rioja (CIBIR). Posteriormente, las secuencias fueron procesadas utilizándose el software Chromas-Pro 1.49 (Technelysium Pty Ltd., Australia). El alineamiento de las secuencias 5' – 3' y la correspondiente reversa y complementaria de 3' – 5' se llevó a cabo con la herramienta EMBOSS Needle (European Bioinformatics Institute, Rice et al. 2000) para comprobar y corregir eventuales errores en la secuenciación. La secuencia consenso obtenida a partir del alineamiento fue analizada con la herramienta de búsqueda BLAST (National Center for Biotechnology Information, Altschul et al. 1997) y se comparó con las secuencias incluidas en el banco de datos de genes GenBank del National Centre for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) para la determinación de la especie.

1.7. Análisis de vinos por PCR cuantitativa (qPCR)

El material genético total obtenido a partir de 1 mL de vino, según el método-V de extracción, como descrito en el apartado 1.5 de **MATERIALES Y MÉTODOS**, fue utilizado para el análisis por PCR en tiempo real (qPCR), empleándose el protocolo descrito por **Phister y Mills (2003)**. Las reacciones se realizaron siempre por triplicado, usándose un termociclador iCycler – Optical Module (BioRad) y en un volumen final de 25 μL : 12,5 μL de iQ-SYBR-Green Supermix (BioRad); 7,2 μL de agua ultra-pura; 0,225 μL (900 nM) del primer DBRUXF (5' -GGA TGG GTG CAC CTG GTT TAC AC- 3'); 0,075 μL (300 nM) del primer DBRUXR (5' -GAA GGG CCA CAT TCA CGA ACC CCG- 3'); 5 μL de la muestra de DNA. Los resultados obtenidos fueron analizados con el software iCycler-iQ 3.1.7050 (BioRad).

1.8. Análisis estadístico

Para aquellos casos en que los resultados del análisis por qPCR y por recuentos en medio semi-sólido fueron positivos, se evaluó la concordancia en la cuantificación entre ambos métodos utilizándose el análisis estadístico de correlación de Pearson, con un nivel de significancia de 0,01. Los estudios estadísticos se llevaron a cabo con el software IBM-SPSS Statistics 19.0 (IBM-SPSS Inc., Estados Unidos).

Una vez evaluada la concordancia en los casos positivos para la detección de *Brettanomyces* entre los dos métodos, se llevó a cabo una comparación global de los resultados obtenidos por cultivo en placa y por qPCR, calculándose el índice Kappa (Cohen, 1960) con el software IBM-SPSS Statistics 19.0. El índice Kappa obtenido, que excluye la posibilidad de concordancia inducida, se interpretó de la siguiente manera, por convención: valores por debajo de 0,4 representan “concordancia escasa”; valores comprendidos entre 0,4 y 0,6 representan “concordancia moderada”; entre 0,6 y 0,8, la concordancia es “buena”; y por encima de 0,8 la concordancia es “excelente”.

2. Susceptibilidad de *Brettanomyces bruxellensis* a agentes antimicrobianos utilizados en Enología

2.1. Cepas de levaduras

En los ensayos de laboratorio realizados se utilizaron cepas de dos especies distintas de levaduras, *Brettanomyces bruxellensis* y *Saccharomyces cerevisiae*, que se especifican en la TABLA II-1.

Tabla II-1. Especies y cepas de levaduras utilizadas

Especie	Cepa	Origen
<i>Brettanomyces bruxellensis</i>	BY3 ¹	Vino
	BY24 ¹	Vino
	BY48 ¹	Vino
	CP1 ¹	Vino
	CP16 ¹	Vino
	CP34 ¹	Vino
	NA36f ¹	Vino
	PL2 ¹	Vino
	PL45 ¹	Vino
	PL52 ¹	Vino
	PL80 ¹	Vino
	PL126 ¹	Vino
	PL144 ¹	Vino
	PL155 ¹	Vino
	PL463 ¹	Vino
CECT-1009 ³	Cerveza	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	CNL14a ¹	Vino
	CNL15a ¹	Vino
	CNL16a ¹	Vino
	CNL21a ¹	Vino
	CNL23a ¹	Vino
	Actiflore-F33 ² (Laffort, Burdeos, Francia)	Vino
	Lalvin-71B ² (Lallemand, Blagnac, Francia)	Vino
	Lalvin-BRL97 ² (Lallemand)	Vino
	Enoferm-QA23 ² (Lallemand)	Vino
	Uvaferm-WAM ² (Lallemand)	Vino
	Uvaferm-VRB (Lallemand)	Vino
	CECT-1678 ³	Uva blanca
	CECT-1182 ³	desconocido
	C208 ¹	desconocido
	C209 ¹	desconocido

¹ Colección Lab. Bioquímica, Dept. Agricultura y Alimentación, Univ. La Rioja

² Cepa comercial

³ Colección Española de Cultivos Tipo

Las cepas se obtuvieron de muestras enológicas cuyo origen se indica en la **Tabla 2.1**. Las células frescas de cada cepa habían sido sembradas en medio YPD-agar y recogidas después de 24 a 48 horas de crecimiento a 30°C, resuspendidas en viales con 1 mL de leche descremada estéril (Becton, Dickinson & Co., Francia) y almacenadas a - 80°C.

2.2. Cepas de levaduras y condiciones de cultivo

Se estudiaron las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) y las concentraciones mínimas biocidas (CMB) de distintos agentes antimicrobianos frente a las 16 cepas de *Brettanomyces*, 15 cepas de *S. cerevisiae* de la **Tabla II-1**, en total 31 cepas. Estas se crecieron en medio YPD-agar o a 30 °C durante un periodo de 24 a 48 horas y fueron utilizadas en los ensayos que se describen a continuación.

2.3. Compuestos antimicrobianos

Se estudió la sensibilidad de las levaduras frente a los compuestos utilizados actualmente en la elaboración de vinos que se indican a continuación. En todos los casos se probó el efecto inhibitor y biocida del agente solo y en combinación con 12,5 % (v/v) etanol.

a) **Metabisulfito potásico (MBP)**: MBP (Dolmar, Gimileo, España) se ensayó en un intervalo de concentraciones de 6,25 - 0,003 g/L.

b) **Chitosan**: chitosan de origen fúngico para aplicación enológica (Lallemand, Toulouse, Francia) se ensayó en un intervalo de concentraciones de 250 - 0,12 mg/L.

c) **Taninos enológicos**: taninos enológicos (índice de polifenoles totales = 29,2) (Tanistop, Dolmar) se ensayaron en un intervalo de concentraciones de 4 - 0,002 mL/L.

d) **Dimetil-dicarbonato (DMDC)**: DMDC comercializado como Velcorin® (Lanxess, Leverkusen, Alemania), se ensayó en un intervalo de concentraciones de 5 - 0,002 g/L.

2.4. Determinación de CMI y CMB

Para la determinación de las concentraciones mínimas inhibitoria y biocida se utilizaron placas con pocillos de micro-valoración (Costar, Corning Inc., Estados Unidos).

Los ensayos se realizaron en volúmenes de 100 μL :

- 50 μL de medio YPD líquido concentrado pH 3,5;
- 12,5 μL de solución salina 0,15 M estéril;
- 25 μL de la dilución del agente antimicrobiano;
- 12,5 μL de suspensión celular ($A_{600} = 0,6$).

Cada compuesto fue ensayado en diluciones seriadas (1, $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{4}$, ... 1/1024) por duplicado frente a cada cepa de *B. bruxellensis* y *S. cerevisiae*. Las placas de micro-valoración fueron incubadas en condiciones de aerobiosis a 25 °C. El crecimiento celular se determinó por absorbancia a 655 nm en un espectrofotómetro Microplate Reader 680 (BioRad, Estados Unidos) y los datos analizados con el software Microplate Manager v. 5.2 (BioRad).

Los valores de CMI se determinaron como la concentración más baja del compuesto utilizado capaz de inhibir el crecimiento de la cepa de levadura en más de 50% después de un periodo de incubación de 48 a 72 horas. Los valores de CMB se determinaron como la concentración mínima del agente antimicrobiano capaz de matar a más de 99,9% del inóculo inicial después de 48 a 72 horas de incubación. La determinación de los valores de CMB se realizó tras comprobar la viabilidad celular después de ese periodo de incubación de 48 a 72 h en presencia del agente antimicrobiano y se determinó sembrándose en medio YPD-agar un volumen de 25 μL de los pocillos con concentraciones superiores y adyacentes al pocillo correspondiente de la CMI previamente determinada. A continuación, las placas se incubaron a 25 °C y hasta un máximo de 7 días para comprobar la existencia o ausencia de crecimiento celular. CMI_{50} y CMI_{90} fueron definidas como las concentraciones capaces de inhibir, respectivamente, al 50% y 90% de los microorganismos estudiados. Igualmente se adoptaron las mismas definiciones para CMB_{50} y CMB_{90} .

2.5. Vinos experimentales

El vino tinto empleado en los ensayos de la actividad anti-*Brettanomyces* del MBP fue producido a partir de uvas de la variedad Tempranillo de viñas de la D.O.Ca. Rioja. La fermentación se llevó a cabo tras el sulfitado en un depósito de madera de 15000 L, en presencia de los hollejos, semillas y raspones y únicamente con levaduras indígenas. Al término de la fermentación alcohólica, las lías fueron separadas del vino (trasiego) y éste fue introducido en barricas de roble donde se realizó la fermentación maloláctica. La fermentación maloláctica se llevó a cabo bajo temperatura constante de unos 22 °C y una vez terminada (contenido de ácido málico < 0,10 g/L), el vino recuperado del fondo de las barricas y conteniendo partículas sólidas fue utilizado en los ensayos.

La turbidez del vino fue determinada (Turbidimeter 2100N, Hatch Co.) y el valor obtenido fue de 219 NTU. La composición química del vino se determinó según los métodos oficiales de la C.E. (1990), y se obtuvieron los siguientes datos: pH 3,8; acidez volátil 0,61 g/L; acidez total 3,09 g/L; azúcares residuales < 1,8 g/L; dióxido de azufre total 14 mg/L.

A continuación se separó el volumen obtenido en tres partes y se adicionó el metabisulfito potásico en las cantidades adecuadas para obtener concentraciones finales de 28 mg/L, 50 mg/L y 100 mg/L y se embotellaron en botellas de vidrio estándar de 750 mL. Se realizaron los ensayos con 15 repeticiones para cada caso y las muestras fueron almacenadas a 15 °C y en condiciones de bodega hasta 22 meses.

2.6. Análisis de fenoles volátiles

Los análisis de detección y cuantificación de fenoles volátiles se llevaron a cabo por el grupo de investigación del Dr. Juan Cacho en el Departamento de Química Analítica (Facultad de Ciencias) de la Universidad de Zaragoza.

Al cabo de 22 meses de almacenamiento de los vinos experimentales descritos en el apartado anterior, se cuantificaron los siguientes fenoles volátiles:

- 4-vinilfenol
- 4-etilfenol
- 4-vinilguaiacol
- 4-etilguaiacol

Los análisis se realizaron según el método descrito por [López et al. \(2002\)](#), y brevemente se puede describir como una extracción en fase sólida (SPE) de compuestos volátiles utilizando la resina LiChrolut-EN (Merck, Darmstadt, Alemania), seguida del análisis mediante cromatografía gaseosa con detección por espectrometría de masas (MS) con trampa iónica.

2.7. Análisis microbiológico

Las muestras de vino se analizaron microbiológicamente a los 4 y 22 meses de almacenamiento como se describe a continuación: se recogieron en un tubo estéril 10 mL de la muestra de vino homogeneizado. Se centrifugó a 3000 g durante 10 minutos. Se desechó el sobrenadante y el pellet fue resuspendido en 1 mL de solución salina 0,15 M. Un volumen de 100 µL de la suspensión celular fue sembrado en superficie en placas de medio YPD-agar para el recuento de levaduras totales, en medio específico para el recuento de *Brettanomyces*, y en medio manitol-agar para el recuento de bacterias ácido acéticas (BAA). Las placas se incubaron a 30 °C en aerobiosis. Para la cuantificación de bacterias ácido lácticas se usó medio MRS-agar y se incubó 30 °C en condiciones de anaerobiosis.

Se aislaron hasta un máximo de seis colonias representativas de cada muestra por placa de medio específico para *Brettanomyces* y los aislados obtenidos fueron posteriormente confirmados como *Brettanomyces* por análisis de PCR específica según Cocolin et al. (2004), como previamente indicado (Materiales y Métodos – 1.6.2).

2.8. Análisis estadístico

Para comprobar la posibilidad de relación entre las poblaciones microbianas y las concentraciones de fenoles volátiles detectadas en las muestras ensayadas se utilizó el análisis de función discriminante y la correlación bilateral de Pearson. El análisis de variancia (ANOVA) se empleó para los datos con distribución normal y variancias homogéneas, seguido del análisis post-hoc de Tukey, y por otro lado, la prueba de Kruskal-Wallis se empleó para aquellos datos que no cumplían esos requisitos. Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo con el software IBM-SPSS Statistics (IBM-SPP Inc.).

3. Detección de levaduras no-*Saccharomyces* en bodega y caracterización de la levadura vínica *Trigonopsis cantarellii*

3.1. Recolección en bodega y procesamiento de las muestras

Un total de 8 muestras de agua de lavado de tinas de madera, 3 muestras de aire de distintas zonas de bodega y 29 muestras de vino tinto fueron recogidas en el periodo 2008 – 2011 en bodegas de la D.O. Ribera del Duero y D.O.Ca. Rioja.

a) Muestras de vino y agua de lavado

Las muestras de vino procedían de barricas de roble y fueron tomadas en tubos estériles de 50 mL y las muestras de agua fueron recogidas en tubos de 50 mL estériles al final del proceso de lavado de tinas de fermentación de madera. Las muestras de vino y de agua posteriormente se procesaron para análisis microbiológico tomándose un volumen de 10 mL de muestra homogénea en un tubo estéril; se centrifugó a 3000 g durante 10 minutos y se desechó el sobrenadante; el pellet se resuspendió en 1 mL de solución salina 0,15 M estéril y se realizaron diluciones decimales de la suspensión, sembrándose 100 µL en medio YPD-agar para el recuento de levaduras totales y en específico para *Brettanomyces* para el recuento de *Brettanomyces*. Las placas se incubaron a 30 °C en condiciones de aerobiosis hasta su recuento y por un máximo de 15 días.

b) Muestras de aire

Las muestras de aire en diferentes ambientes de bodega (nave de elaboración, zona de barricas y zona de embotellado) fueron recogidas según Garijo et al. (2008), como se indica a continuación: se forzó el paso directo de 1500L de aire sobre una placa conteniendo medio específico para *Brettanomyces* utilizándose para ello un equipo bio-colector de aire AirIdeal® 3P (BioMérieux, Francia) a una velocidad de 100L/minuto. Las placas de medio de cultivo se incubaron a 30 °C en aerobiosis hasta su recuento y por un máximo de 15 días.

3.2. Caracterización molecular

3.2.1. Identificación específica de aislados

Tras el recuento en medio específico para *Brettanomyces* de las muestras de vino, agua y aire, se aislaron hasta 6 colonias representativas del total. Se realizó un doble reisolamiento para asegurar la presencia de un cultivo puro y se realizó la posterior extracción del DNA e identificación por PCR específica para *Brettanomyces* (Cocolin et al. 2004) de los aislados como está descrito en los apartados 1.6.1 y 1.6.2 de MATERIALES Y MÉTODOS. En los casos de resultados negativos de la reacción específica para *Brettanomyces* se utilizó el protocolo descrito por Kurtzman y Robnett (1998) para identificación de ascomicetos (MATERIALES Y MÉTODOS – 1.6.3) y se seleccionaron aquellos más representativos para secuenciación del producto de PCR obtenido. La secuenciación de los amplicones y procesamiento de los resultados para identificación específica de los aislados se llevaron a cabo como mencionado anteriormente en el apartado 1.6.4 de MATERIALES Y MÉTODOS.

3.2.2. Alineamiento de secuencias y obtención de dendrogramas

El alineamiento de las secuencias consenso obtenidas fue llevado a cabo con la herramienta ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2>). Los datos para obtención de los dendrogramas intra-específicos fueron procesados por el método de UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) a partir de secuencias nucleotídicas y mediante el software MEGA 5.05 (<http://www.megasoftware.net>). Las distancias en los dendrogramas se generaron según el método de “número de diferencias, es decir, el número de bases distintas por secuencia y considerando que todas

las posiciones conteniendo brechas ("gaps") y datos faltantes se eliminan por defecto al aplicar el programa (MEGA 5.05, <http://www.megasoftware.net>).

3.2.3. Diseño de primers y desarrollo de PCR convencional específica para *T. cantarellii*

En el caso de las especies identificadas como *Trigonopsis cantarellii* siguiendo el método descrito anteriormente (apartado 3.2.1), se seleccionaron las secuencias más relevantes para el diseño de primers específicos. Un total de 24 secuencias fueron alineadas con la herramienta ClustalW2 y tras seleccionar el fragmento con mayor número de coincidencias se utilizó la herramienta informática Primer3Plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>), para el diseño de los primers. Se usó la herramienta bioinformática BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) para contrastar la secuencia obtenida con las secuencias disponibles en GenBank.

Los primers diseñados, CAN-F (*forward*) y CAN-92 (*reverse*) (Sigma), fueron empleados en una reacción de PCR en la cual se probaron inicialmente diferentes temperaturas de hibridación. Se probaron temperaturas de hibridación en un rango de 59 °C a 67,5 °C frente a 15 cepas de distintas especies de levaduras comunes al entorno vinícola y 16 aislados de *T. cantarellii* obtenidos en este estudio (TABLA II-2).

Tabla II-2. Cepas de levaduras utilizadas para puesta a punto de PCR convencional específica de *T. cantarellii*

Cepa	Origen del aislado
<i>Saccharomyces bayanus</i> CECT-11035 ¹	Cerveza
<i>Saccharomyces ellipsoideus</i> CECT1887 ¹	Vino blanco
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> CECT-1678 ¹	Uva blanca
<i>Meyerozyma guilliermondii</i> CPA-4 ²	Aire de bodega
<i>Nakazawaea holstii</i> PEV45c ²	Vino tinto
<i>Pichia mandshurica</i> PL551 ²	Vino tinto
<i>Hanseniaspora uvarum</i> CECT-12946 ¹	Vino blanco
<i>Candida ishiwadae</i> CP23 ²	Vino
<i>Wickerhamomyces anomalus</i> CECT-12765 ¹	Vino
<i>Metschnikowia pulcherrima</i> CECT-12825 ¹	Mosto de uva
<i>Kluyveromyces dobzhanskii</i> CECT-1952 ¹	Mosca de la fruta
<i>Schizosaccharomyces pombe</i> C198 ²	Vino
<i>Zygoascus hellenicus</i> CECT-11163 ¹	Mosto de uva
<i>Zygosaccharomyces veronae</i> CECT-1679 ¹	Uvas
<i>Pichia membranifaciens</i> CECT-1115 ¹	Exudado de olmo
<i>Brettanomyces bruxellensis</i> CECT-1009 ¹	Cerveza
<i>Brettanomyces bruxellensis</i> BY24 ²	Vino tinto
<i>Trigonopsis variabilis</i> CECT-1933 ¹	Cerveza
PL307 ²	Vino
PL308 ²	Vino
PL309 ²	Vino
PL310 ²	Vino
<i>Trigonopsis cantarellii</i> CPA3 ²	Aire de bodega
PA14c ²	Vino
PA20a ²	Vino
PA23a ²	Vino
PA42a ²	Vino
PEV10a ²	Vino
PL85 ²	Vino
PL103 ²	Vino
PL186 ²	Vino
PL198 ²	Vino
PL235 ²	Vino
PL259 ²	Vino
PL312 ²	Vino
PL336 ²	Vino
TN2.2c ²	Agua de lavado
TN4f.c ²	Agua de lavado

¹ Colección Española de Cultivos Tipo² Colección del Depto. de Agricultura y Alimentación (Universidad de La Rioja)

Tras comprobar la ocurrencia de señales inespecíficos se adoptó el siguiente protocolo de PCR:

desnaturalización inicial	95,0 °C	5 minutos	35 ciclos
desnaturalización	95,0 °C	1 minuto	
hibridación	67,5 °C	1 minuto	
extensión	72,0 °C	45 segundos	
extensión final	72,0 °C	5 minutos	

Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 50 μL : 20 μL de la muestra de DNA, 0,5 μM de los respectivos primers (CAN-F 5'-CGG TCC TTG CAT ATG TTC CT-3'; CAN-92 5'-GGT AGC TGA TCA CCG AAA GC-3'), 5 μL del tampón de reacción 10xNH₄ (Bioline), 3 μL de solución MgCl₂ 50 mM (Bioline), 0,05 mM de cada desoxiribonucleótido (Deoxynucleotide Mix; Sigma), y 1,5 U de Taq-polimerasa (Bioline). Todas las reacciones se ejecutaron en un termociclador iCycler (BioRad) y los fragmentos de DNA amplificados fueron analizados por electroforesis como se describe en el apartado 1.6.4 de MATERIALES Y MÉTODOS.

3.3. Determinación de acidogénesis y de producción de fenoles volátiles

Para determinar el metabolismo acidógeno de las cepas estudiadas así como para evaluar su capacidad de producir fenoles volátiles, se utilizó un cultivo fresco (48 horas de incubación a 25 °C) de las levaduras en medio YPD-agar. Se sembró cada cepa individualmente en medio específico para *Brettanomyces*, incubándose las placas hasta un máximo de 15 días a 25 °C, para evaluar su actividad acidogénica y la generación de fenoles volátiles. Por otro lado, también se resuspendió un asa de siembra de las mismas cepas en medio líquido *Sniff-Brett* (Intelli'oeno, Francia) con 10 mL de solución salina estéril (0,15 M NaCl); este medio contiene ácido p-cumárico como precursor de los posibles etilfenoles. Se incubaron las muestras a 25 °C y hasta un máximo de 15 días para evaluar crecimiento celular y formación de fenoles volátiles mediante análisis sensorial de las muestras por un panel de tres analistas independientes. Se empleó el siguiente código:

- (-) no hay generación de aromas
- (+) generación de aromas asociados a "carácter-Brett"
- (+/-) desviación aromática distinta del "carácter-Brett"

3.4. Crecimiento de *T. cantarellii* en medio de cultivo líquido

Se monitorizó el crecimiento de la levadura *T. cantarellii* en medio líquido con diferentes concentraciones de etanol y valores de pH mediante la determinación de la absorbancia y se evaluaron mediante recuentos las poblaciones de células viables iniciales y máximas alcanzadas al cabo de 84 horas de cultivo. Para los experimentos se utilizaron las cepas de *T. cantarellii* y *Brettanomyces bruxellensis* siguientes: *T. cantarellii* PA23a, *T. cantarellii* PL103, *B. bruxellensis* BY24 y *B. bruxellensis* PL463 (Colección enológica del Dept. de Agricultura y Alimentación de la Universidad de La Rioja).

Las levaduras se crecieron en medio YPD-agar a 25 °C durante 48 horas y posteriormente se resuspendieron las células en solución salina estéril 0,15M hasta obtener una absorbancia de la suspensión celular de 1 unidad de absorbancia (600 nm). Se utilizaron 500 µL de la suspensión celular como inóculo para un volumen de 50 mL de medio YPD líquido en frascos de vidrio Pyrex® ISO 4796 100 mL (Scilabware, Reino Unido). Se evaluó el crecimiento de las levaduras a diferentes concentraciones de etanol en medio YPD líquido pH 6,8: sin etanol (control), 5 %; 10 %; 15 y 20 % (v/v) etanol (Panreac, España). Por otro lado, se utilizó medio YPD líquido sin etanol respectivamente a pH 6,8 (control) y a los pHs: 4,5; 3,7; 3,4 y 3,0. Las incubaciones se mantuvieron a 25 °C y en agitación (120 rpm) en una incubadora Innova 4000 (New Brunswick Scientific, Estados Unidos). Se tomaron muestras de cada cultivo a distintos intervalos de tiempo y hasta un máximo de 84 horas y se determinó la absorbancia en el espectrofotómetro Ultrospec 2000. Además también se determinó en número de unidades formadoras de colonia por siembra en medio YPD sólido y recuentos al inicio y al final de cada experimento. Todas las cepas fueron ensayadas por duplicado en las condiciones descritas.

3.5. Susceptibilidad de *Trigonopsis cantarellii* a agentes antimicrobianos utilizados en Enología

En los ensayos de laboratorio realizados se utilizaron los 16 aislados de origen vínico de la especie *T. cantarellii* especificados anteriormente en la TABLA II-2 del apartado 3.2.3 de MATERIALES Y MÉTODOS.

Los experimentos se realizaron para cada cepa y por duplicado según se describió anteriormente en los apartados 2.3 y 2.4 de MATERIALES Y MÉTODOS y empleando los antimicrobianos: metabisulfito potásico, quitosan, taninos enológicos y dimetil dicarbonato (DMDC).

Resultados y Discusión

III. Resultados y Discusión

Los resultados y discusiones presentados a continuación se fragmentan en tres capítulos que corresponden a sus respectivos apartados en la sección **MATERIALES Y MÉTODOS**.

1. Detección y cuantificación de *Brettanomyces* mediante los métodos de PCR cuantitativa y cultivo en medio específico en vinos tintos

1.1. Métodos de extracción de DNA y análisis por PCR convencional

Los resultados de los análisis por PCR convencional específica llevados a cabo a partir de las muestras de DNA obtenidas de las diluciones seriadas de *B. bruxellensis* BY24 en vino filtrado (control) y provenientes, respectivamente, de los seis protocolos de extracción y aislamiento de material genético (MATERIALES Y MÉTODOS 1.5) se presentan en la TABLA III-1.

Tabla III-1. Resultados de PCR convencional específica de *Brettanomyces* a partir de DNA obtenido mediante diferentes métodos de extracción

Muestra (células/mL)	Resultado de PCR específica					
	Métodos de extracción de DNA					
	I	II	III	IV	V	VI
4 10 ⁷	-	-	-	+	+	+
4 10 ⁶	-	-	-	+	+	+
4 10 ⁵	-	-	-	+	+	+
4 10 ⁴	-	-	-	+	+	+
4 10 ³	-	-	-	+	+	+
4 10 ²	-	-	-	+	+	+
40	-	-	-	-	+	+
4	-	-	-	-	-	-

Células de *Brettanomyces* control resuspendidas en vino filtrado.

Un resultado negativo (-) indica que no se obtuvo amplificación de banda. Un resultado positivo (+) indica amplificación de banda específica. Métodos de extracción: (I) InstaGene Matrix; (II) reactivo PrepMan Ultra; (III) columnas DNeasy Plant; (IV) lisis celular y precipitación de proteínas; (V) lisis celular y columnas Amicon; (VI) lisis celular y precipitación de proteínas con PVPP (20 mg/mL).

Como se puede ver en la tabla, no se obtuvieron bandas de amplificación cuando se utilizaron los métodos I, II y III para extracción y aislamiento del DNA de las células de *Brettanomyces* a partir de vino filtrado. De todos modos, es importante mencionar que, igualmente, resultados negativos también fueron obtenidos en la comprobación con PCR convencional para la identificación general de levaduras

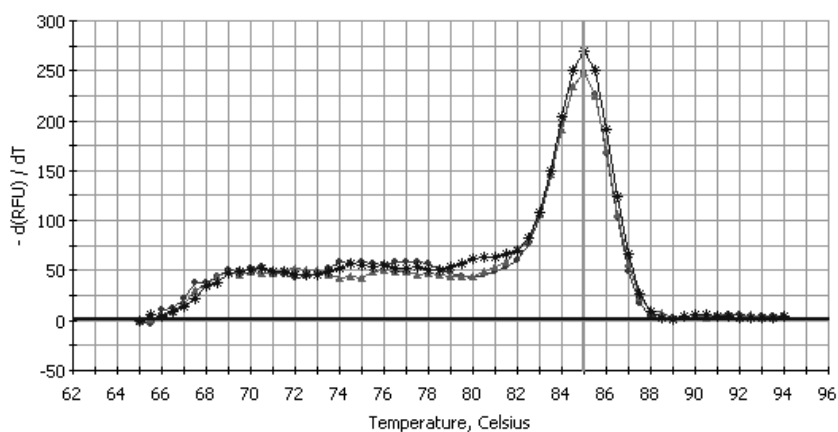
descrita en el apartado 1.6.3 de MATERIALES Y MÉTODOS (resultados no presentados), indicando que los métodos I, II y III no son adecuados para extraer DNA a partir de una matriz compleja como el vino y generan algún tipo de inhibición de la reacción de PCR. Para el método IV, bandas específicas de amplificación fueron detectadas para aquellas diluciones de $4 \cdot 10^7$ hasta $4 \cdot 10^2$ células/mL. Tanto para el método V como VI, las bandas específicas de amplificación se detectaron para cada suspensión celular y hasta un límite de 40 células/mL. En el caso del método de extracción VI, sin embargo, en que se probaron tratamientos con 10 y 20 mg/mL de PVPP, se obtuvieron bandas de amplificación por PCR específica solamente cuando la concentración de ese compuesto era de 20 mg/mL.

1.2. Métodos de extracción de DNA y análisis por PCR cuantitativa

A partir de los resultados obtenidos de análisis por PCR convencional correspondientes a los seis métodos de extracción y aislamiento de DNA, se eligieron los métodos IV, V y VI y se utilizaron para posteriormente realizar la detección y cuantificación del DNA por análisis de qPCR (MATERIALES Y MÉTODOS – 1.7).

Como se sabe, en los análisis por qPCR el aumento de la intensidad de la señal fluorescente es directamente proporcional a la cantidad de DNA amplificado durante cada ciclo y cada análisis por qPCR se puede caracterizar por el ciclo en que primeramente se detecte la emisión de fluorescencia sobre un determinado umbral predefinido, ciclo que se conoce por Ct (“cycle threshold”) (Bustin 2004). En este estudio, para la construcción de cada recta patrón se consideraron los valores de Ct obtenidos para cada triplicado. Además, en los análisis de ese tipo es siempre necesaria la comprobación de la temperatura de fusión específica, normalmente conocida por la sigla Tm (“melting temperature”), y que en el caso presentado corresponde a 85,5 °C, como se muestra en la gráfica de la FIGURA III-1.

Figura III-1. Curvas de temperaturas de fusión de los amplicones obtenidos por qPCR del DNA de *B. bruxellensis*

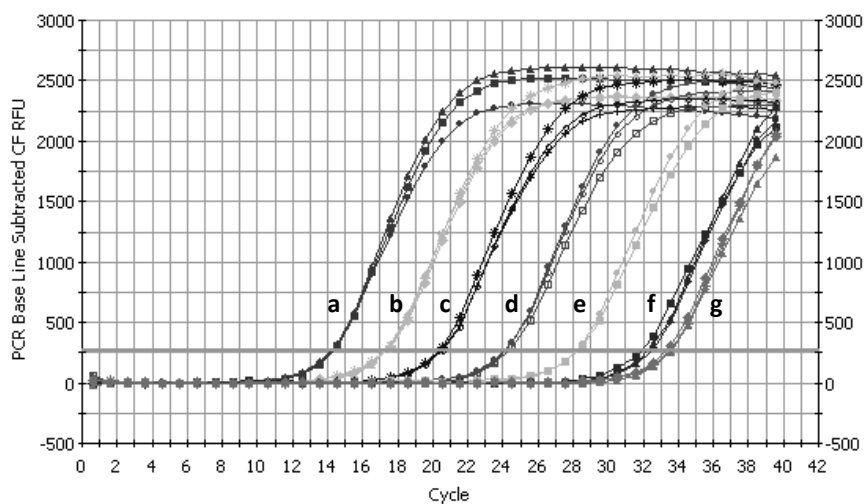


Temperatura de fusión (Tm) específica: 85,5 °C.

Producto obtenido del DNA de diluciones seriadas decimales de 3×10^6 hasta 3×10^4 células/mL.

De todos modos, la **Figura III-2** refleja las curvas de amplificación generadas por el software iCycler-iQ en el análisis por qPCR del DNA extraído según el método-V y a partir de las diluciones seriadas decimales de células de *B. bruxellensis* BY24 en vino filtrado amicrobicamente. Paralelamente, en la **Figura III-3B** se muestran los resultados de qPCR obtenidos a partir del método-V de extracción y expresados en valores de ciclo umbral (Ct) frente a la concentración de células de *B. bruxellensis* en vino filtrado (valores logarítmicos), así como el correspondiente coeficiente de correlación lineal encontrado.

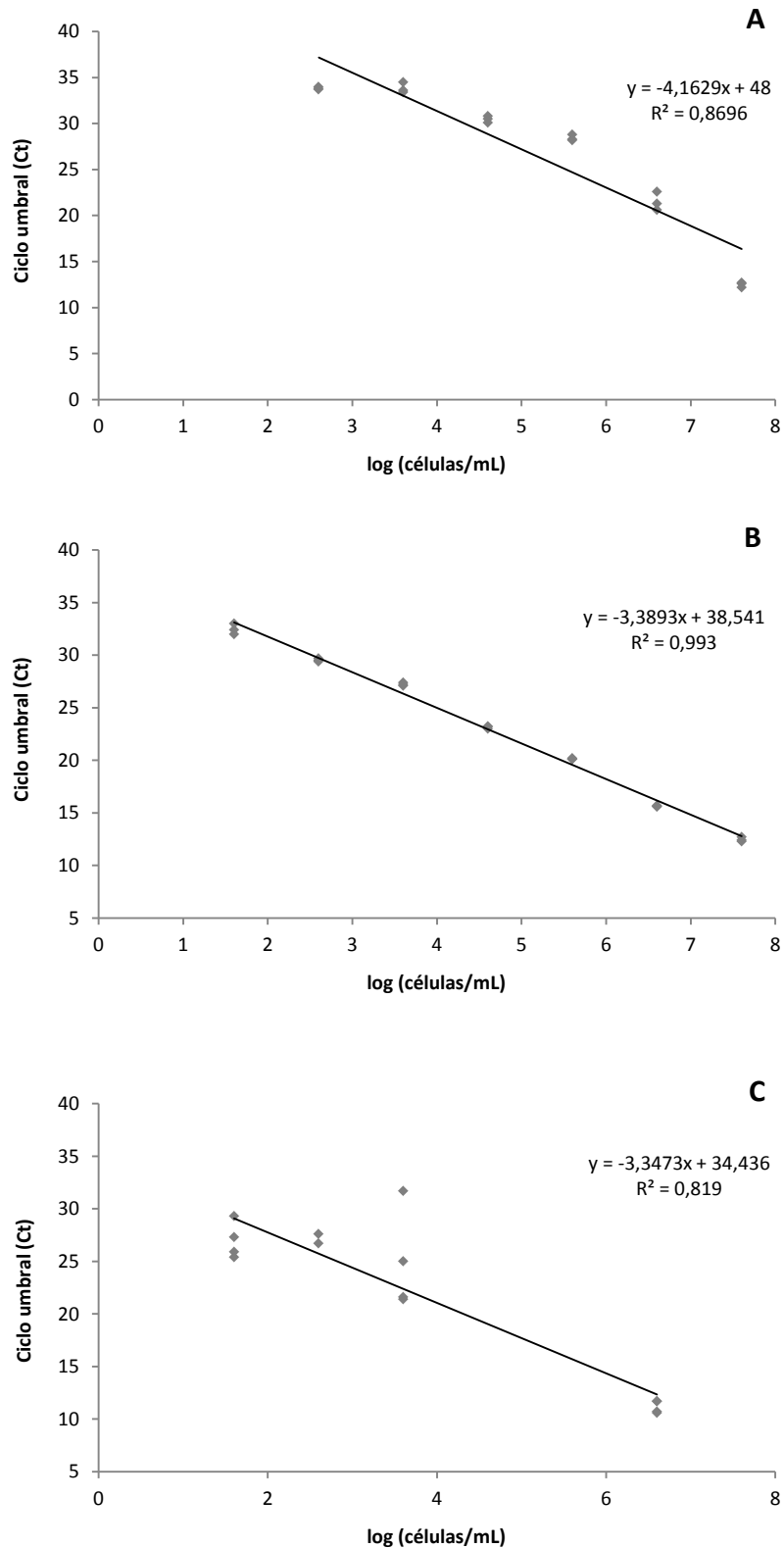
Figura III-2. Curvas de amplificación generadas en análisis por qPCR específica de *B. bruxellensis*



DNA extraído a partir de diluciones seriadas decimales desde $4 \cdot 10^6$ (a) hasta 4 células/mL (g) de células de *B. bruxellensis* en vino tinto

Los resultados provenientes del análisis por qPCR también fueron llevados a cabo siguiéndose previamente los métodos IV y VI de extracción de DNA, presentados respectivamente en la **Figura 1.3A** y en la **Figura III-3C**.

Figura III-3. Resultados de qPCR obtenidos a partir de tres métodos de extracción de DNA celular de *B. bruxellensis*

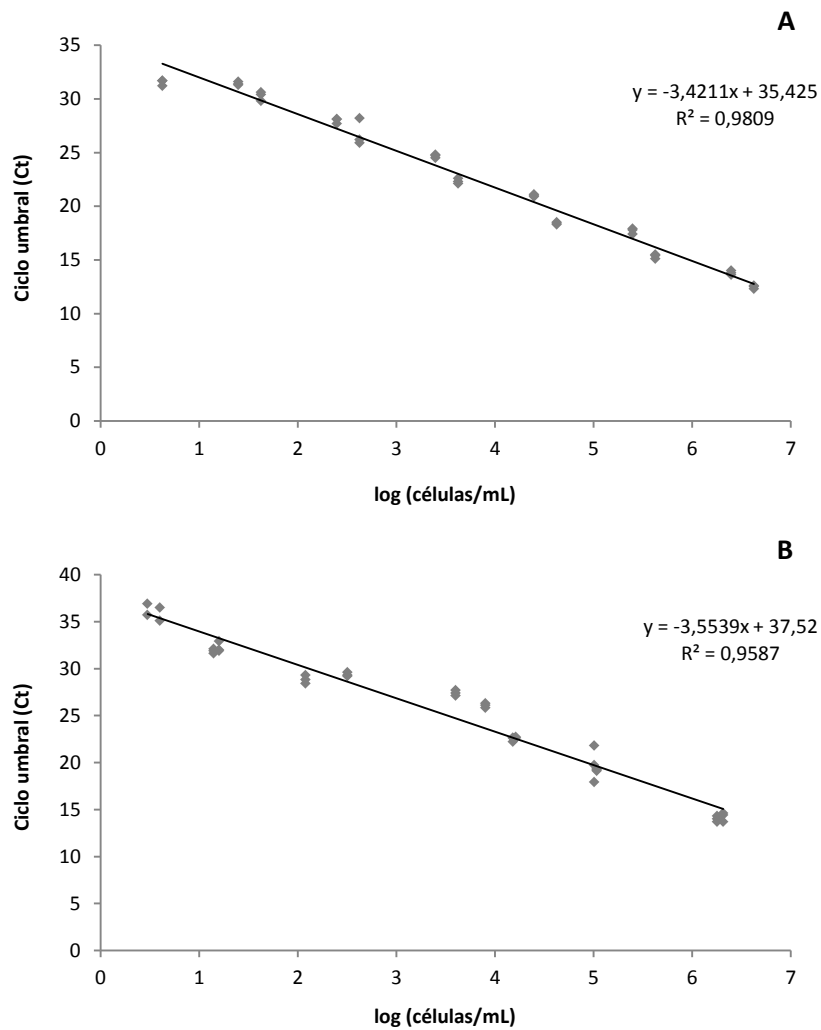


Células control de *B. bruxellensis* resuspendidas en vino tinto filtrado. Valores de ciclo umbral (Ct) de detección de fluorescencia se representan frente al logaritmo de células/mL. (A) método IV de extracción del DNA (precipitación fraccionada del DNA); (B) Método V (filtrado por columnas Amicon); (C) Método VI (precipitación fraccionada del DNA con PVPP).

Aunque los métodos IV y VI mostraron cierta eficacia en la extracción de DNA celular a partir de vino tinto y posibles compuestos inhibidores de la polimerasa fueron aparentemente eliminados, en ambos casos se obtuvieron bajas concentraciones del DNA diana y consecuentemente los resultados resultantes de los análisis por qPCR no permitieron la obtención de factores de correlación lineal aceptables. De este modo, los métodos IV y VI no se consideraron válidos para la detección y cuantificación de *Brettanomyces*, sobre todo cuando se tiene en consideración que la contaminación de los vinos ya es considerada crítica cuando las poblaciones de esa levadura alcanzan niveles de 10^3 células/mL (Chatonnet et al. 1995; Lonvaud-Funel y Renouf 2005). El método-V (Figura 1.3B), sin embargo, mostró resultados satisfactorios, con pérdidas mínimas de material genético así como la eliminación de inhibidores que pudiesen interferir en la reacción de qPCR, y en ese caso la correlación lineal se mantuvo en un rango de 40 a $4 \cdot 10^7$ células/mL.

Por otro lado, cuando el método-V de extracción fue aplicado directamente para el análisis de vinos tintos naturalmente turbios, los resultados encontrados fueron muy variados y frecuentemente se observó inhibición de la reacción de qPCR. En estos casos, la adopción de un protocolo diferenciado, el método-B de tratamiento previo para aquellos vinos con una turbidez superior a 50 NTU (MATERIALES Y MÉTODOS – 1.4B) seguida del método-V para extracción de DNA celular fueron llevados a cabo. La FIGURA III-4A presenta los resultados obtenidos a partir de tres repeticiones del experimento con células control de *B. bruxellensis* BY24 resuspendidas en vino tinto filtrado amicróbicamente, y por lo tanto libres de turbidez, utilizando el método-A de tratamiento (MATERIALES Y MÉTODOS – 1.4A) seguido del método-V para extracción del DNA. Paralelamente, la Figura 1.4B refleja los resultados cuando los experimentos fueron llevados a cabo en vino tinto naturalmente turbio (73,6 NTU) siguiendo el método previo de tratamiento B seguido del método-V para extracción del DNA celular.

Figura III-4. Resultados de qPCR obtenidos para los métodos A y B de tratamiento de vinos tintos con alta y baja turbidez



(A) Método A de tratamiento previo para vinos con poca turbidez (≤ 50 NTU).

(B) Método B de tratamiento previo para vinos con elevada turbidez (> 50 NTU).

R^2 : coeficiente de correlación lineal

Valores de ciclo umbral (Ct) de detección de fluorescencia se representan frente al logaritmo de células/mL.

Como se observa en la FIGURA III-4, en los resultados obtenidos para ambos casos se obtuvieron coeficientes de correlación lineal satisfactorios ($R^2 \geq 0,96$). Los límites de detección alcanzados fueron de 4 a $4 \cdot 10^6$ células/mL y se logró la cuantificación de *Brettanomyces* en hasta 25 células/mL para aquellos vinos con poca turbidez (≤ 50 NTU), y 16 células/mL para vinos tintos con turbidez superior a 50 NTU y sometidos al método-B de tratamiento previo.

La aplicación de qPCR para cuantificación de *Brettanomyces* directamente a partir de vinos tintos ha sido propuesta con éxito en trabajos anteriores, sin embargo, con límites de detección de 10^4 células/mL (Delaherche et al. 2004). Es importante subrayar en este caso, que los autores atribuían la baja sensibilidad de la técnica a la hora de cuantificar esta levadura principalmente a la permanencia de inhibidores de la reacción proveniente de la matriz o bien a interacciones entre compuestos fenólicos con componentes celulares. La propuesta de Phister y Mills (2003) en ese sentido era trabajar a partir de diluciones decimales de la muestra de DNA obtenida antes de los análisis por qPCR, pero incluso los resultados presentados en su trabajo eran con células de *Brettanomyces* resuspendidas en vinos tintos previamente filtrados amicrobicamente y por tanto completamente libres de turbidez. Posteriormente, resultados más concretos y aplicados para evitar ese tipo de percances a la hora de analizar muestras reales de vinos tintos, Tessonière et al. (2009) lograron detectar *Brettanomyces* por qPCR en un rango de 26 – 100 células/mL utilizando PVPP para obtener el DNA de las levaduras de las muestras enológicas, pero mencionan en su artículo que los problemas de inhibición de la reacción seguían siendo una constante a la hora de procesar vinos con cierta turbidez.

La principal desventaja de los métodos discutidos en estos trabajos a la hora de aplicar el proceso a vinos tintos naturalmente contaminados es la presencia de partículas sólidas en suspensión, o sea vinos con alguna turbidez, y también de taninos y otros pigmentos que posteriormente llevan a una inhibición de la reacción de qPCR. De ese modo, la relevancia de la propuesta del presente trabajo es que la cuantificación de *Brettanomyces*, respaldada por una correlación lineal consistente, es posible hasta un límite entre 16 y 25 células/mL (datos no presentados) en muestras de vino con turbidez, y permite cuantificar dicha levadura en cualquier etapa de la vinificación, independientemente de turbidez que pueda presentar la muestra. Con este método propuesto, método sencillo y económico de lavado y en su caso de enriquecimiento de las células recogidas de las muestras de vino, y la posterior extracción del DNA celular total, se consigue la eliminación de pigmentos de color y otras partículas, consecuentemente eliminando los problemas de inhibición en las reacciones de qPCR.

1.3. Comparación del análisis por qPCR y por cultivo microbiológico

1.3.1. Estudio de caso 1: vinos tintos en proceso de crianza

En la TABLA III-2 se presentan los resultados de las 324 muestras de vino sometidas a ambos métodos de análisis, cultivo microbiológico en medio específico y qPCR.

Tabla III-2. Análisis de muestras de vinos tintos por cultivo microbiológico en medio específico y qPCR

Grupo	Análisis por qPCR	Análisis por cultivo en medio específico	Número de muestras de vino (%) ²	Índice Kappa
1	+	+	68 (21,0 %)	
2	-	-	112 (34,6 %)	
3	-	+	25 (7,7 %)	
4	+	-	103 (31,8 %)	
5	-	falsos positivos ¹	16 (4,9 %)	
Número total de muestras analizadas			324	0,69

Un resultado positivo (+) para qPCR indica la detección de señal fluorescente específica y cuantificación. Un resultado positivo (+) para cultivo en medio específico significa la detección y recuento de colonias acidogénicas en el medio.

¹ Falsos positivos: aislados detectados en medio específico y confirmados por PCR como no-*Brettanomyces*.

² Porcentaje respecto al número total de muestras de vino analizadas.

De acuerdo con los resultados de ambos tipos de análisis, las muestras fueron clasificadas en 5 grupos, como se mencionan:

- 1) Aquellas que presentaron tanto amplificación específica por qPCR como crecimiento de colonias acidogénicas en medio específico, y que representan 21 % del total. Los análisis de estas muestras por qPCR proporcionaron valores de cuantificación en los mismos rangos de magnitud (UFC/mL) o hasta un máximo de 10^3 veces más que aquellos obtenidos por cultivo microbiológico (resultados no presentados). Dichas discrepancias, sin embargo, se pueden explicar por el hecho de que los análisis por qPCR cuantifican igualmente células viables que no viables, incluyendo también restos de DNA de células muertas anteriormente y liberadas al

vino, mientras que nos análisis por cultivo cuantifican únicamente las células metabólicamente activas y cultivables de *Brettanomyces*. En ese contexto, los análisis por qPCR permitieron estimar poblaciones de *Brettanomyces*, tanto viables como no viables, hasta un límite de 7 células/mL y los análisis por cultivo permitieron cuantificar hasta 1 UFC/mL de células viables de ese microorganismo. Los análisis estadísticos llevados a cabo en la comparación de los datos, indican una correlación de Pearson positiva de 0,772 ($p < 0,01$) entre ambas metodologías.

- 2) Muestras que no presentaron indicios de *Brettanomyces* por ninguno de los dos análisis, representando 34,6 % del total. Entre esas muestras, el 46 % presentaba poblaciones muy bajas de levaduras no-*Brettanomyces* (hasta un máximo de 10 UFC/mL), principalmente debido a los procedimientos de clarificación llevados a cabo en bodega durante la elaboración de los vinos, y por otro lado, 54 % de esas muestras contenían poblaciones de levaduras totales en un rango de $10 - 10^6$ UFC/ml (resultados no presentados), lo cual indica la especificidad de ambos métodos que no sufrieron interferencias por esas poblaciones de otras levaduras no-*Brettanomyces*..
- 3) Muestras con resultados negativos por qPCR (falsos negativos) que, sin embargo, sí presentaron colonias de *Brettanomyces* en medio selectivo y confirmadas por PCR específica. Las muestras con esas características representaban 7,7 % del total y con poblaciones detectadas en medio específico que variaban de 1 a 10^4 UFC/mL. La mayoría de los casos estudiados este grupo (84 %) presentaban poblaciones de levaduras totales muy pequeñas (< 100 UFC/mL, resultados no presentados), factor que podría explicar los resultados negativos en los análisis por qPCR, ya que se podrían haber perdido células y material genético durante las etapas de lavado y extracción de DNA.
- 4) Muestras de vinos con resultados positivos por qPCR pero que no se detectaron colonias en medio específico (31,8 % del total de muestras analizadas). Al igual que las muestras del grupo 1, estos resultados pueden ser explicados por el hecho de que el análisis por qPCR aporta una cuantificación total de las células de *Brettanomyces*, incluyendo a las viables cultivables y también a las no viables, así como los restos de DNA en suspensión en la muestra. Sin embargo, la cuantificación de esas células no viables y de restos de material genético que persisten en las

muestras también indican que células de *Brettanomyces* estuvieron presentes en el vino en alguna etapa de la vinificación, indicando la utilidad del método para aportar información importante a la hora interpretar qué métodos sanitarios tuvieron más éxito y en qué momento su aplicación fue más eficaz.

- 5) En este grupo se clasificaron las muestras que presentaron solamente colonias no-*Brettanomyces* (dieron negativo el análisis de PCR específica para *Brettanomyces*) en medio de cultivo selectivo, y que representan 4,9 % del total. La ocurrencia de estas colonias no-*Brettanomyces* en medio de cultivo específico han sido documentadas también por otros autores, como es el caso, por ejemplo, de *Candida wickerhamii*, *Candida cantarellii*, *Debaryomyces hansenii*, *Dekkera anomala*, *Kluyveromyces lactis* y *Meyerozyma guilliermondii* en medio DBDM (Dias et al. 2003), así como también la existencia de otras levaduras no-*Saccharomyces* en otros medios selectivos para aislamiento de *Brettanomyces* (Morneau et al. 2011; Renouf y Lonvaud-Funel 2007).

El análisis estadístico global de estos resultados indicaron una correlación entre ambos métodos con un índice Kappa de 0,69, lo cual se considera una buena correlación (por convención "buena" incluye valores de Kappa entre 0,6 y 0,8). Hay que subrayar que estos valores de los parámetros de concordancia entre ambos métodos se obtuvieron para los resultados de la totalidad de muestras de vino tinto analizadas en este estudio (324 muestras), con valores de turbidez entre 0,06 – 1000 NTU y conteniendo sus propias poblaciones de microorganismos indígenas que incluían levaduras *S. cerevisiae* reminiscentes mayoritariamente de la fermentación alcohólica.

La aplicabilidad del método de qPCR en Enología es de gran interés para las bodegas, ya que se trata de un protocolo en que el tiempo máximo entre la extracción y el análisis (con resultado a tiempo real) es de unas 5 horas, mientras que en los métodos tradicionales por cultivo en medio selectivo se requieren tiempos de incubación de hasta 2 semanas. Por otro lado, los métodos previos de tratamiento de las muestras de vino presentados en este trabajo posibilitan el análisis de vinos tintos con elevadas turbideces (hasta 1000 NTU, en nuestros resultados), lo que significa también la detección de *Brettanomyces* en etapas más tempranas del proceso de vinificación. Es imprescindible mencionar que

una de las ventajas de todo el procesamiento para análisis por qPCR presentado en este estudio, desde los tratamientos previos de las muestras hasta la extracción de DNA, es la metodología muy simplificada para la obtención de una muestra de DNA de la calidad adecuada para el análisis por qPCR.

Por otro lado, este método rápido de detección y cuantificación presenta una alta especificidad y elimina posibles interpretaciones erróneas, como sería el caso de los falsos positivos que aparecen en los métodos de cultivo debido al crecimiento de colonias no-*Brettanomyces* en el medio específico y que son parte inherente de la microbiota vínica. No obstante, es imprescindible tener en cuenta que la cuantificación basada a través de qPCR contabiliza tanto aquellas células viables y metabólicamente activas como también las células muertas, no-viables o simplemente las trazas de DNA en suspensión, lo que puede suponer a una sobre-estimación de la población de *Brettanomyces* realmente presente en el vino.

Un punto a ser considerado en el método de análisis por qPCR es que en algunos casos durante los procesos de tratamiento de la muestra y extracción del DNA, la pérdida de material puede ser inevitable (7,7 % del total de muestras analizadas en este estudio) y cuando éste se encuentra en muy bajas concentraciones daría lugar a falsos resultados negativos. Por otra parte, dicha deficiencia del método se podría considerar de menor importancia ya que actualmente se reconoce que *Brettanomyces* puede representar un problema real con la aparición de los típicos aromas alterantes cuando alcanza poblaciones de 10^3 células/mL en el vino (Chatonnet et al. 1995; Lonvaud-Funel y Renouf 2005), las cuales se encuentran dentro del rango de linealidad de método y de detección precisa y específica de *Brettanomyces*. Se puede concluir por tanto, que este método es útil y aplicable rutinariamente en el contexto enológico.

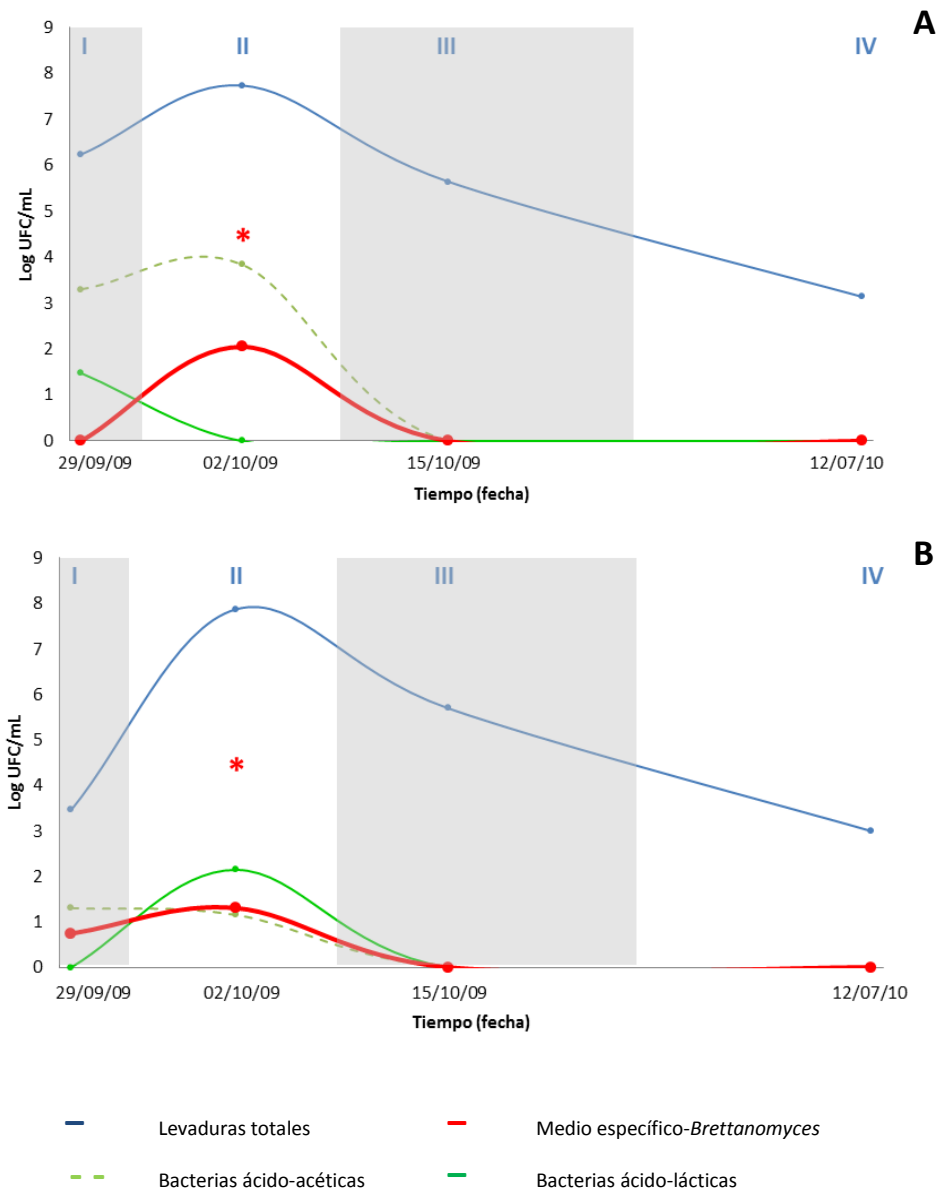
Con respecto al método clásico de cultivo en medio específico, aunque presente deficiencias relevantes en el ámbito enológico, especialmente por tiempo necesario para obtención de resultados, tiene la ventaja de no representar un alto coste para los análisis necesarios y de ser capaz de cuantificar sensiblemente células viables y metabólicamente activas de *Brettanomyces* (hasta 1 UFC/mL), y por tanto serán las directamente responsables de generar los productos alterantes en el vino.

Como conclusión podríamos decir que el enólogo será quien decida qué tipo de análisis es más conveniente para su vino, el método rápido y eficaz de qPCR que con el protocolo previo de extracción del DNA descrito en este trabajo permite detectar y cuantificar *Brettanomyces* incluso en muestras muy turbias o recogidas en etapas iniciales de la vinificación, o bien el método clásico de cultivo en un medio específico, el cual resulta mucho más barato, requiere menos equipamiento y es muy sensible (1 UFC/mL), pero tiene el inconveniente de ser más lento (requiere una incubación de unas dos semanas) y puede dar lugar a falsos positivos.

1.3.2. Estudio de caso 2: seguimiento durante la elaboración de vinos tintos varietales

El seguimiento en diferentes etapas de producción se llevó a cabo con 2 vinos tintos de la variedad Graciano (G1 y G2) y 3 de la variedad Tempranillo (T1, T2 y T3) de la vendimia de 2009. En la FIGURA III-5 se puede observar la evolución de las poblaciones microbianas de bacterias ácido-acéticas (BAA), bacterias ácido-lácticas (BAL) y levaduras totales, además de recuentos en medio específico para *Brettanomyces*, en las siguientes etapas de producción de los 2 vinos de la variedad Graciano: (I) uva pasta; (II) fermentación alcohólica tumultuosa; (III) fin de fermentación alcohólica; (IV) segundo trasiego. En la FIGURA III-6, por otro lado, se muestra también el seguimiento de las poblaciones microbianas para los 3 vinos de la variedad Tempranillo en las siguientes etapas de producción: (I) uva pasta; (II) fermentación alcohólica tumultuosa; (III) fin de fermentación alcohólica; (IV) fin de fermentación maloláctica; (V) barrica; (VI) segundo trasiego. Asimismo, en la TABLA III-3 se presentan los resultados de recuentos obtenidos para cada población microbiana en las mencionadas etapas de elaboración en las muestras estudiadas.

Figura III-5. Evolución de poblaciones microbianas en vinos tintos de la variedad Graciano

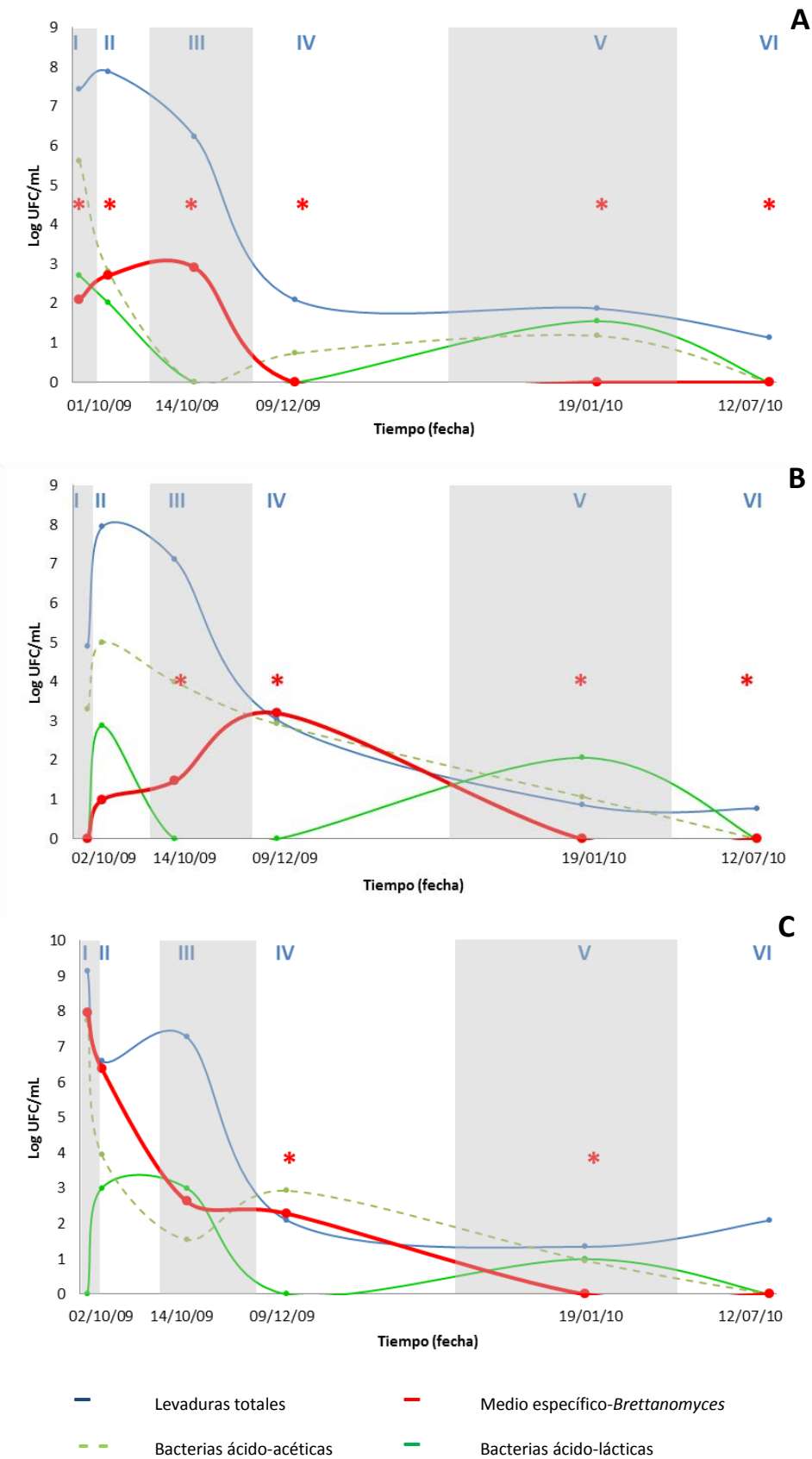


* Confirmación de *Brettanomyces* por qPCR o PCR convencional específica

(A) Vino tinto varietal Graciano 1; (B) Vino tinto varietal Graciano 2

(I) uva pasta; (II) fermentación alcohólica tumultuosa; (III) fin de fermentación alcohólica; (IV) segundo trasiego.

Figura III-6. Evolución de poblaciones microbianas en vinos tintos de la variedad Tempranillo



(A) Tempranillo 1; (B) Tempranillo 2; (C) Tempranillo 3
 (I) uva pasta; (II) fermentación alcohólica tumultuosa; (III) fin de fermentación alcohólica; (IV) fin de fermentación maloláctica; (V) barrica; (VI) segundo trasiego.

Tabla III-3. Resultados de recuentos en medios selectivos en muestras de vinos varietales en diferentes etapas de producción

	Graciano 1				Graciano 2				Tempranillo 1				Tempranillo 2				Tempranillo 3			
	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D
1	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	2,7E+05	0	3,8E+07	5,5E+01	6,8E+02	0	2,1E+04	5,3E+02	3,3E+02	0	1,6E+07	6,0E+01
2	1,9E+06	0	2,1E+03	3,0E+01	4,7E+03	1,5E+01	2,0E+01	0	2,7E+07	1,3E+02	4,2E+05	5,2E+02	7,9E+04	0	2,0E+03	0	1,4E+09	9,1E+07	5,4E+07	0
3	5,5E+07	1,4E+02	8,0E+03	0	7,5E+07	2,5E+01	1,5E+01	1,4E+02	7,8E+07	5,2E+02	6,6E+02	1,1E+02	8,8E+07	1,0E+01	1,0E+05	7,6E+02	3,9E+06	2,4E+06	9,0E+03	1,0E+03
4	4,4E+05	0	0	0	5,1E+05	0	0	0	1,7E+06	8,3E+02	0	0	1,3E+07	3,0E+01	1,0E+04	0	1,8E+07	4,3E+02	3,5E+01	1,0E+03
5	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	1,3E+02	0	6,5E+00	0	1,1E+03	1,7E+03	8,6E+02	0	1,3E+02	2,0E+02	8,6E+02	0
6	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	7,8E+01	0	1,7E+01	4,1E+01	7,5E+00	0	1,4E+01	7,6E+02	2,3E+01	0	9,0E+00	1,1E+01
7	1,4E+03	0	0	0	9,8E+02	0	0	0	1,4E+01	0	0	0	6,0E+00	0	0	0	1,2E+02	0	0	0

(1) Agua de lavado de tina de madera; (2) uva pasta; (3) fermentación alcohólica tumultuosa; (4) final de fermentación alcohólica; (5) final de fermentación maloláctica; (6) barrica; segundo trasiego.

(A) Levaduras totales; (B) Recuentos en medio específico para *Brettanomyces*; (C) Bacterias ácido-acéticas; (D) Bacterias ácido-lácticas.

En la TABLA III-4 se presentan los datos analíticos de los principales parámetros en las 5 vinos estudiados.

Tabla III-4. Resultados de parámetros analíticos de vinos tintos varietales Graciano y Tempranillo

Vino	SO ₂ libre (g/L)	pH	At (g/L)	Av (g/L)	IPT
G 1	20	3,15	4,03	0,50	80,55
G 2	34	3,04	4,72	0,58	87,00
T 1	15	3,62	3,22	0,47	65,50
T 2	21	3,59	3,44	0,36	68,80
T 3	23	3,50	2,87	n/d	69,80

Vinos varietales Graciano (G1, G2) y Tempranillo (T1, T2, T3).
(At) acidez total; (Av) acidez volátil; (IPT) índice de polifenoles totales

En los dos vinos varietales Graciano (FIGURA III-5), se detectó la presencia de *Brettanomyces* solamente durante la fermentación alcohólica tumultuosa y ya en el segundo trasiego realizado los dos vinos no presentaban indicios de esa levadura contaminante. En ambos casos *Brettanomyces* parece provenir del utillaje de bodega pero no persiste en las etapas posteriores, desapareciendo a los 10 días después de la fermentación alcohólica. Por otro lado, *Brettanomyces* se encontraba presente durante prácticamente todo el proceso de vinificación de los varietales Tempranillo T1 y T2 (FIGURA III-6 A y B), incluso durante el segundo trasiego, al cabo de 10 meses desde la fecha de vendimia. En el vino T3 (FIGURA III-6C), aunque no se detectase *Brettanomyces* en las etapas iniciales, su existencia fue confirmada al final de la fermentación maloláctica y durante el paso por bodega. En este último caso, el origen de las levaduras *Brettanomyces* fue el ambiente de bodega y esa población desapareció al cabo de 10 meses de crianza.

Cuando contrastamos estos resultados que indican la persistencia de *Brettanomyces* particularmente en los vinos de la variedad Tempranillo con los datos analíticos de la TABLA III-4, algunos datos llaman la atención. Por un lado, los valores de pH bastante más altos que los observados en los varietales Graciano, explican la permanencia de *Brettanomyces* a lo largo de todo el proceso ya que en estos casos, el SO₂ libre no tendrá la misma eficacia para controlar su crecimiento. La acción antimicrobiana del dióxido de azufre está íntimamente asociada al pH del vino, como se puede

contrastar con los resultados de concentraciones mínimas inhibitorias presentados en el apartado 2.1 de Resultados y Discusión, donde se muestra que la CMI₅₀ a pH 4,0 es de 190 mg/L y a pH 3,5 es de 48 mg/L, y donde será específicamente discutido.

Por otro lado, también se puede observar en la TABLA III-4 que el índice de polifenoles totales (IPT) de G1 y G2 es considerablemente más elevado que en los casos de Tempranillo. Esta característica distintiva también puede haber jugado un papel inhibitorio frente a *Brettanomyces* en estos vinos, ya que actualmente hay indicios de que determinados compuestos fenólicos, como ciertos ácidos hidroxicinámicos (Harris et al. 2020) parecen afectar de alguna manera al equilibrio fisiológico celular al aumentar la permeabilidad de la membrana plasmática de algunas levaduras (Santos et al. 2012). De hecho hay propuestas hoy en día de soluciones de taninos comerciales para el combate a *Brettanomyces*, y los efectos de estos compuestos serán discutidos más cuidadosamente en el apartado 2.2 de RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Aunque se sepa hoy en día que los aromas típicos de desviación aromática (fenólicos) puedan aparecer en cualquier vino tinto y en diferentes etapas de producción y envejecimiento (Silva et al. 2005), los resultados de los seguimientos llevados a cabo en dos tipos de vinos tintos estudiados parecen indicar que la presencia y éxito adaptativo de *Brettanomyces* también están relacionados con las variedades de uva empleadas y que factores como el pH y contenido en polifenoles específicos pueden ser cruciales en la supervivencia y proliferación de esa levadura.

2. Susceptibilidad de *Brettanomyces* a agentes antimicrobianos utilizados en Enología

En la TABLA III-5 se pueden observar los resultados de CMI y CMB individualmente para cada cepa de ambas especies. Por otro lado, la TABLA III-6 resume los resultados obtenidos para efectos inhibitorio (CMI₅₀ y CMI₉₀) y biocida (CMB₅₀ y CMB₉₀) de: (a) metabisulfito potásico, (b) taninos enológicos (c) dicarbonato de dimetilo (DMDC) y (d) chitosan, frente a las 16 cepas de *Brettanomyces bruxellensis* y 15 cepas de *Saccharomyces cerevisiae* (TABLA I-1 de MATERIALES Y MÉTODOS) en medio YPD líquido (pH 3,5), en ausencia y en presencia de 12,5 % etanol.

Tabla III-5. Valores de concentraciones mínimas inhibitoria (CMI) y biocida (CMB) de diferentes agentes antimicrobianos frente a *B. bruxellensis* y *S. cerevisiae*

Especie	Cepa	CMI								CMB							
		MBP (mg/L)		Taninos (mL/L)		Chitosan (mg/L)		DMDC (g/L)		MBP (mg/L)		Taninos (mL/L)		Chitosan (mg/L)		DMDC (g/L)	
		A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
<i>S. cerevisiae</i>	F33	0,780	0,048	> 4	0,06	> 250	125	0,312	0,005	0,780	0,190	> 4	1	> 250	> 250	1,25	1,25
	WAM	0,780	0,097	> 4	1	> 250	31,25	0,312	0,019	0,780	0,190	> 4	> 4	> 250	> 250	1,25	1,25
	QA23	0,780	0,390	> 4	0,5	> 250	31,25	0,156	0,039	0,780	0,390	> 4	4	> 250	250	0,625	0,625
	BRL97	0,780	0,390	2	0,5	> 250	31,25	0,312	0,010	0,780	0,390	> 4	> 4	> 250	250	1,25	1,25
	C208	0,390	0,097	> 4	0,5	> 250	62,50	0,078	0,005	0,390	0,097	> 4	2	> 250	125	0,312	0,312
	C209	0,097	0,012	> 4	0,008	> 250	5	0,078	0,002	0,190	0,048	> 4	> 4	> 250	125	0,312	0,156
	C201	0,048	0,006	0,5	0,016	31,25	1	0,156	0,005	0,097	0,024	> 4	> 4	250	250	1,25	0,625
	C199	0,097	n/g	0,062	n/g	31,25	> 250	0,039	0,002	0,097	n/g	0,5	n/g	125	125	0,156	0,01
	71B	0,097	0,048	> 4	0,5	> 250	62,50	0,078	0,005	0,097	0,048	> 4	> 4	> 250	250	0,312	0,625
	VRB	0,780	0,390	> 4	0,5	> 250	62,50	0,312	0,005	0,780	0,190	> 4	> 4	> 250	> 250	1,25	0,625
	CNL14a	0,780	0,097	> 4	0,250	> 250	31,25	0,312	0,010	0,780	0,190	> 4	0,5	> 250	250	1,25	0,625
	CNL15a	0,780	0,012	2	0,031	> 250	62,50	0,078	0,005	0,780	0,097	2	2	> 250	> 250	0,312	0,312
	CNL16a	0,780	0,048	> 4	0,5	> 250	62,50	0,156	0,010	0,780	0,190	> 4	1	> 250	> 250	0,312	0,625
	CNL21a	0,780	0,048	> 4	0,5	> 250	> 250	0,156	0,005	0,780	0,190	> 4	1	> 250	> 250	1,25	0,625
	CNL23a	0,780	0,048	> 4	0,031	> 250	31,25	0,312	0,010	0,780	0,190	> 4	1	> 250	250	1,25	1,25
<i>B. bruxellensis</i>	BY24	0,097	0,024	0,250	0,125	31,25	31,25	0,039	0,010	0,097	0,097	2	2	62,50	62,50	0,312	0,078
	BY48	0,097	0,024	0,250	0,031	31,25	31,25	0,039	0,005	0,097	0,024	4	0,5	62,50	62,50	0,312	0,156
	CP1	0,048	0,012	0,250	0,062	31,25	31,25	0,078	0,002	0,097	0,024	0,062	0,031	125	31,25	0,312	0,078
	CP16	0,048	0,024	0,125	0,125	31,25	31,25	0,019	0,002	0,097	0,024	2	0,250	62,50	62,50	0,156	0,078
	CP34	0,048	0,024	0,250	0,031	31,25	62,50	0,078	0,005	0,048	0,024	1	0,125	62,50	62,50	0,312	0,156
	NA36f	0,048	0,048	1	0,125	62,50	31,25	0,156	0,019	0,097	0,048	> 4	> 4	> 250	250	0,312	0,312
	PL126	0,048	0,024	1	0,125	62,50	31,25	0,156	0,078	0,048	0,048	> 4	> 4	> 250	> 250	0,625	0,312
	PL144	0,097	0,012	0,5	0,125	62,50	62,50	0,156	0,078	0,097	0,048	> 4	0,250	> 250	> 250	0,625	0,625
	PL155	0,780	0,048	0,250	0,031	31,25	31,25	0,078	0,010	0,780	0,048	> 4	> 4	62,50	62,50	0,312	0,156
	PL2	0,048	0,012	0,5	0,062	62,50	62,50	0,078	0,019	0,048	0,012	> 4	0,250	250	125	0,312	0,312
	PL45	0,097	0,048	0,125	0,016	31,25	4	0,156	0,078	0,097	0,048	> 4	n/g	> 250	31,25	0,625	0,625
	PL52	0,097	0,048	0,5	0,062	62,50	62,50	0,156	0,039	0,097	0,048	> 4	0,250	> 250	> 250	0,625	0,312
	PL80	0,048	0,048	2	0,250	125	62,50	0,078	0,019	0,048	0,048	> 4	2	> 250	250	0,625	0,312
	1009	0,024	0,012	0,5	0,008	125	31,25	0,078	0,039	0,048	0,024	> 4	0,125	> 250	> 250	0,625	0,156
	PL463	0,097	0,097	0,5	0,062	62,50	31,25	0,078	0,005	0,190	0,097	> 4	0,250	> 250	62,50	0,312	0,039
	BY3	0,048	0,048	0,250	0,125	62,50	31,25	0,078	0,010	0,097	0,048	0,5	0,250	62,50	31,25	0,312	0,156

(A) ausencia de etanol; (B) 12,5 % etanol; (s/c) sin crecimiento.

Tabla III-6. Valores de CMI₅₀, CMI₉₀, CMB₅₀ y CMB₉₀ de diferentes agentes antimicrobianos frente a *B. bruxellensis* y *S. cerevisiae*

Agente antimicrobiano	Rango	Microorganismo	CMI		CMB	
			CMI ₅₀	CMI ₉₀	CMB ₅₀	CMB ₉₀
Etanol	8 – 20% (v/v)	<i>S. cerevisiae</i>	>20%	>20%	>20%	>20%
		<i>B. bruxellensis</i>	>20%	>20%	>20%	>20%
MBP	6,25 – 0,003 g/L	<i>S. cerevisiae</i>	780 mg/L	780 mg/L	780 mg/L	780 mg/L
		<i>B. bruxellensis</i>	48 mg/L	96 mg/L	96 mg/L	96 mg/L
MBP + etanol ¹	6,25 – 0,003 g/L	<i>S. cerevisiae</i>	48 mg/L	390 mg/L	190 mg/L	390 mg/L
		<i>B. bruxellensis</i>	24 mg/L	48 mg/L	48 mg/L	48 mg/L
Taninos	4 – 0,002 mL/L	<i>S. cerevisiae</i>	>4 mL/L	>4 mL/L	>4 mL/L	>4 mL/L
		<i>B. bruxellensis</i>	0,5 mL/L	1 mL/L	>4 mL/L	>4 mL/L
Taninos + etanol ¹	4 – 0,002 mL/L	<i>S. cerevisiae</i>	0,5 mL/L	0,5 mL/L	4 mL/L	>4 mL/L
		<i>B. bruxellensis</i>	0,125 mL/L	0,125 mL/L	0,25 mL/L	>4 mL/L
Chitosan	250 – 0,12 mg/L	<i>S. cerevisiae</i>	>250 mg/L	>250 mg/L	>250 mg/L	>250 mg/L
		<i>B. bruxellensis</i>	62 mg/L	62 mg/L	250 mg/L	>250 mg/L
Chitosan + etanol ¹	250 – 0,12 mg/L	<i>S. cerevisiae</i>	62 mg/L	125 mg/L	250 mg/L	>250 mg/L
		<i>B. bruxellensis</i>	31 mg/L	62 mg/L	62 mg/L	>250 mg/L
DMDC	5 – 0,002 g/L	<i>S. cerevisiae</i>	156 mg/L	312 mg/L	625 mg/L	1250 mg/L
		<i>B. bruxellensis</i>	78 mg/L	156 mg/L	312 mg/L	625 mg/L
DMDC + etanol ¹	5 – 0,002 g/L	<i>S. cerevisiae</i>	5 mg/L	30 mg/L	625 mg/L	1250 mg/L
		<i>B. bruxellensis</i>	10 mg/L	60 mg/L	120 mg/L	625 mg/L

CMI: concentración mínima inhibitoria; CMB: concentración mínima biocida.

¹ Concentración fija de etanol a 12,5% (v/v).

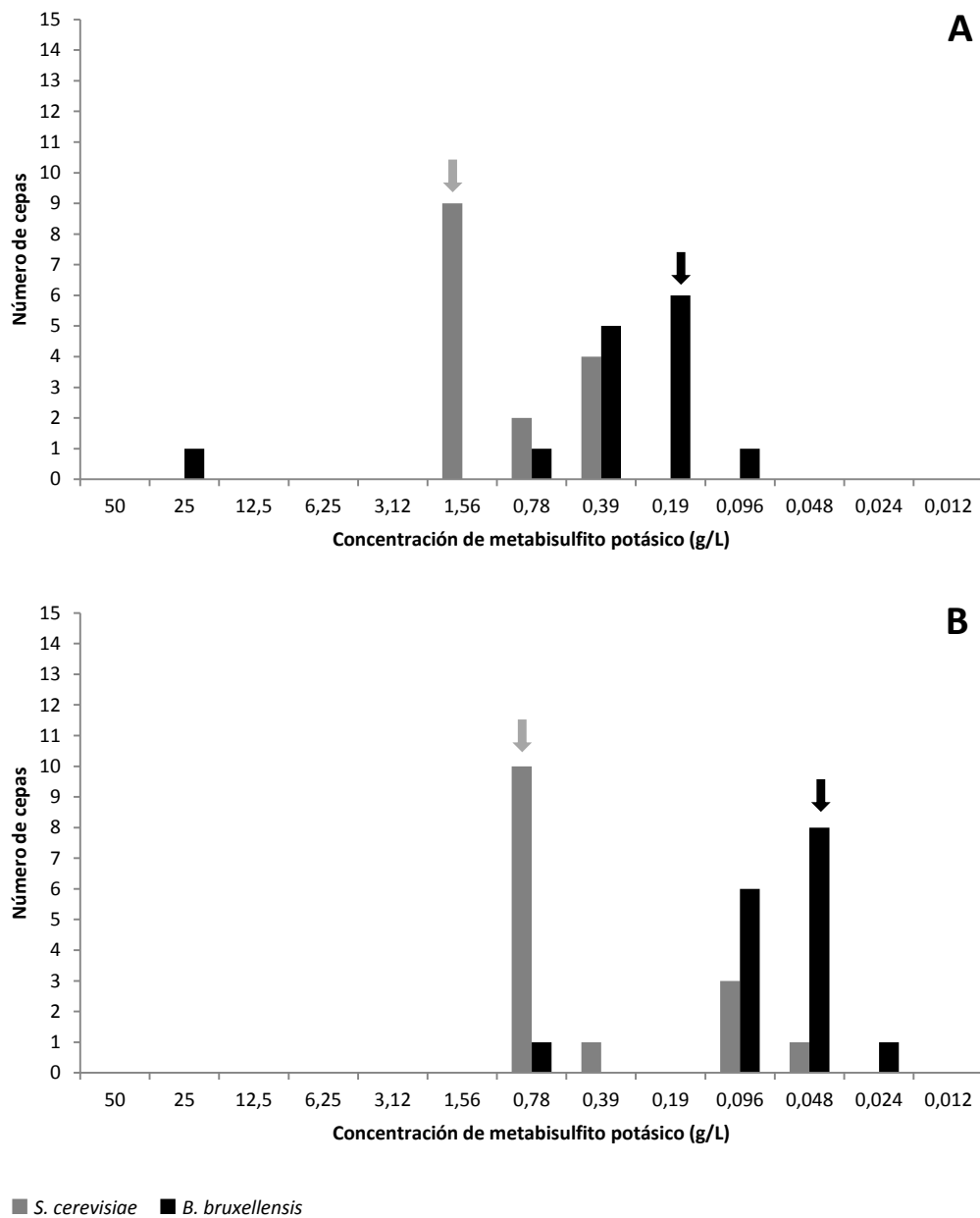
MBP: Metabisulfito potásico

DMDC: dicarbonato de dimetilo

2.1. Actividad antimicrobiana del metabisulfito potásico

En la FIGURA III-7 se presentan los valores de CMI obtenidos para metabisulfito potásico (MBP) determinados frente a *B. bruxellensis* y *S. cerevisiae*, respectivamente a pH 4,0 (FIGURA III-7A) y 3,5 (FIGURA III-7B).

Figura III-7. Concentraciones mínimas inhibitorias del metabisulfito potásico a pH 4,0 y 3,5 frente *S. cerevisiae* y *B. bruxellensis*

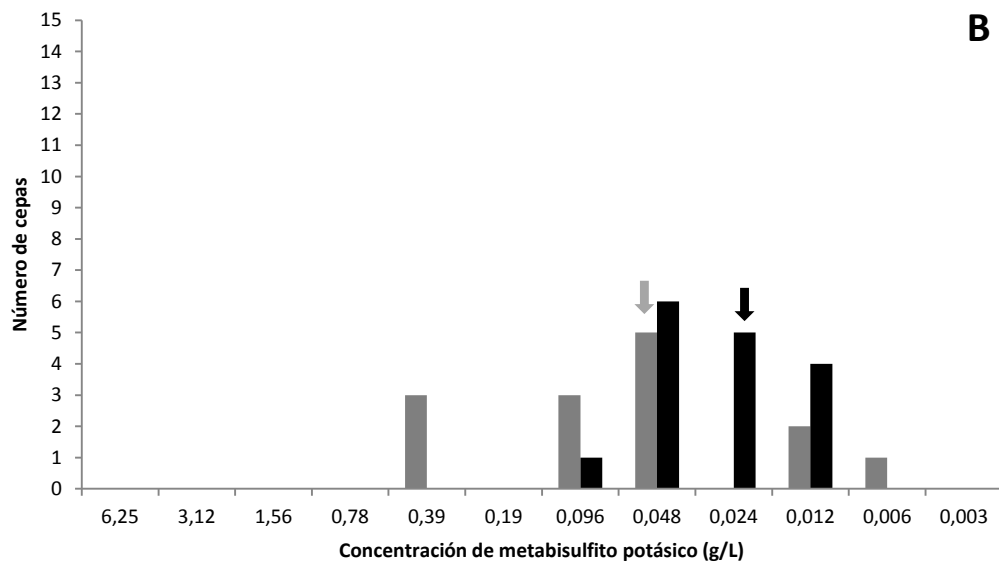
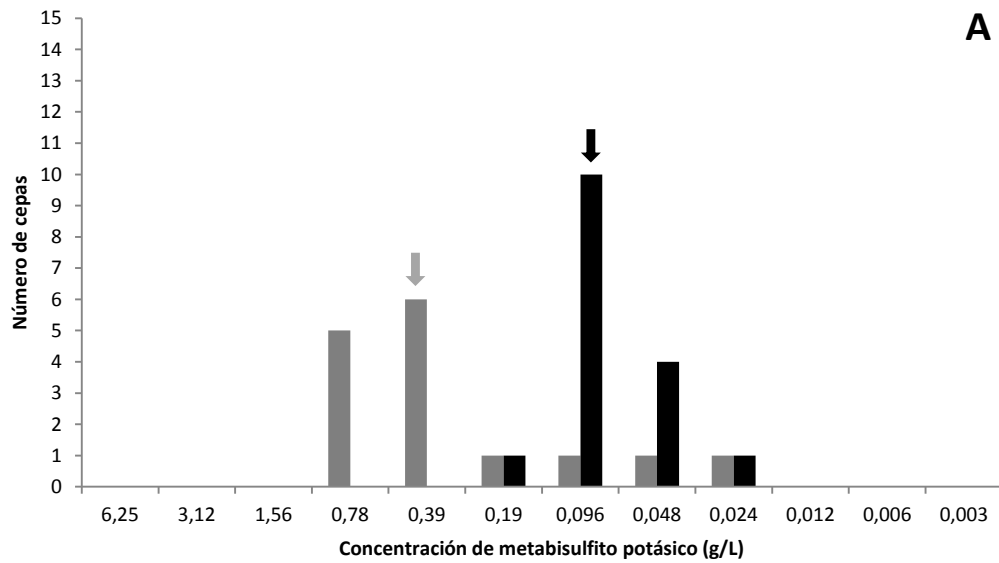


Las flechas indican las respectivas CMI₅₀ para *S. cerevisiae* (n = 15) y *B. bruxellensis* (n = 16).

Como se puede observar, la acción inhibitoria del MBP frente *B. bruxellensis* fue unas 10 veces más elevada a pH 3,5 que a pH 4,0. Este aumento de la acción antimicrobiana se relaciona íntimamente con el carácter ácido del metabisulfito, cuyo pK es de 1,81 (Usseglio-Tomasset y Bossia 1984), y que en solución libera mayores cantidades de SO₂ molecular cuanto más bajos sean los valores de pH. Los resultados encontrados aquí están en concordancia con aquellos obtenidos por otros autores, y que establecen concentraciones inhibitorias de MBP en un rango de 20 a 60 mg/L (equivalente a concentraciones de 0,25 a 0,67 de SO₂ molecular) en vino sintético (Du Toit et al. 2005; Agnolucci et al. 2010) y en medio de cultivo (Barata et al. 2008; Conterno et al. 2006).

A continuación, la FIGURA III-8 refleja los resultados de actividad inhibitoria del MBP en medio YPD líquido en presencia de etanol a 6 % y 12,5 % (v/v).

Figura III-8. Concentraciones mínimas inhibitorias del metabisulfito potásico en presencia de etanol 6 % y 12,5 % frente a *S. cerevisiae* y *B. bruxellensis*



■ *S. cerevisiae* ■ *B. bruxellensis*

Presencia de etanol 6 % (A) y 12,5 % (B) en el medio de cultivo (pH 3,5).

La Las flechas indican las respectivas CMI₅₀ para *S. cerevisiae* (n = 15) y *B. bruxellensis* (n = 16).

En las gráficas anteriores se puede constatar el aumento de la acción inhibitoria del MBP en presencia etanol a una concentración de 12,5 % (CMI₅₀ = 24 mg/L) cuando se compara con una concentración de 6 % (CMI₅₀ = 96 mg/L), o bien en ausencia de etanol (CMI₅₀ = 48 mg/L) en el medio. Por otro lado, se puede comprobar en la TABLA III-6 que la acción biocida del MBP en combinación con etanol a 12,5 % también fue más potente (CMB₉₀ = 48 mg/L) que en ausencia de etanol en el medio (CMB₉₀ =

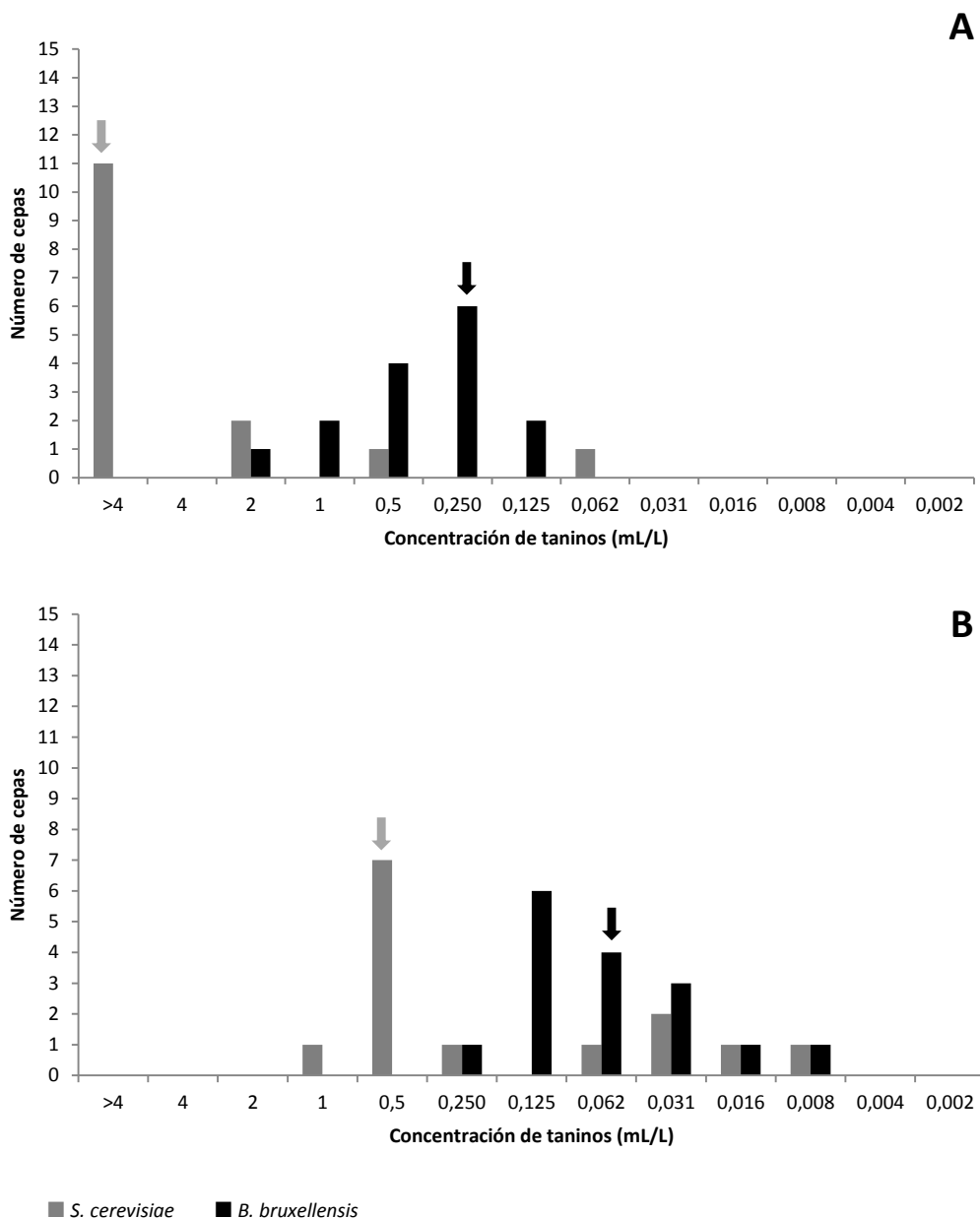
96 mg/L) o bien a una concentración de 6 % (CMB₉₀ = 190 mg/L) (resultados no presentados). Este efecto potenciador del etanol en la actividad inhibitoria del MBP también ha sido comprobado por otros autores para microorganismos sensibles, tales como las bacterias lácticas (Rojo-Bezares et al. 2007), las cuales se pueden considerar contaminantes de vinos cuando crecen indiscriminadamente. La acción sinérgica del MBP con el etanol es de suma importancia para las prácticas enológicas, ya que se puede obtener un efecto biocida con la aplicación de bajas concentraciones de MBP (48 a 96 mg/L) en un vino con un contenido en etanol de 12,5 %, que puede ser sometido perfectamente a los procesos de crianza y almacenamiento con ese agente preservativo frente a *Brettanomyces*.

Las cepas de *S. cerevisiae*, por otro lado, se mostraron mucho más resistentes a los efectos del MBP en comparación con *Brettanomyces*, y fueron capaces de tolerar altas concentraciones del compuesto en ausencia de etanol (CMI₅₀ y CMB₉₀ = 780 mg/L), como se puede ver en la TABLA III-6. Sin embargo, la resistencia al MBP por estas cepas disminuyó drásticamente en presencia de 12,5 % etanol en el medio (CMI₅₀ = 48 mg/L, CMB₉₀ = 390 mg/L). De cualquier modo, es importante subrayar también que esta especie de levadura también es capaz de producir ciertas cantidades de SO₂, en concentraciones de 10 a 40 mg/L, como resultado de su actividad fermentativa (Romano y Suzzi 1993). Actualmente, las normas de la Organización Internacional de la Viña y del Vino (OIV), establece límites máximos de 150 a 200 mg/L de SO₂ total, respectivamente para vinos tintos y blancos, concentraciones de tratamiento que según nuestros resultados son capaces no solamente de inhibir el crecimiento de *Brettanomyces*, sino que son suficientes para ejercer una acción biocida sobre las células. Sin embargo, como se ha discutido anteriormente, hay que tener en cuenta que esta eficiencia en los tratamientos con MBP es extremadamente dependiente de un carácter ácido del pH de los vinos.

2.2. Actividad antimicrobiana de taninos enológicos

La solución comercial de taninos enológicos TaniStop, la cual se emplea, entre otras finalidades, para el control de *Brettanomyces* en vinos tintos, se ensayó en el rango de concentraciones de 4 a 0,002 mL/L que incluye la concentración recomendada por el productor. El análisis del índice de polifenoles totales (IPT) medido por el método de Iland et al. (1993) de esta solución comercial resultó ser de 29,2, valor equivalente a aproximadamente 244 mg/L de ácido tánico (Mataix y Luque de Castro 2001). A continuación se presentan los resultados de CMI obtenidos para esta solución de taninos enológicos (mL/L) en ausencia y en presencia de 12,5 % etanol en el medio (FIGURA III-9). En la TABLA III-6 se reflejan igualmente los valores de CMI₅₀ y CMI₉₀, así como los valores de CMB₅₀ y CMB₉₀ obtenidos.

Figura III-9. Concentraciones mínimas inhibitorias de solución de taninos enológicos en ausencia y en presencia de etanol 12,5 %, frente a *S. cerevisiae* y *B. bruxellensis*



Taninos enológicos en ausencia de etanol (A) y en presencia de 12,5 % etanol (B) en el medio de cultivo (pH 3,5). Las flechas indican las respectivas CMI₅₀ para *S. cerevisiae* (n = 15) y *B. bruxellensis* (n = 16).

Como se puede observar en las gráficas anteriores, la presencia de etanol a 12,5 % en el medio desempeñó un papel diferencial en la acción inhibitoria de los taninos frente a ambas especies de levaduras, aunque su efecto fue claramente más potente contra *Brettanomyces*. Igualmente, se puede constatar en la TABLA III-6 que las concentraciones necesarias para inhibir al 50 % y 90 % de las cepas de *Brettanomyces* disminuyó drásticamente de 0,5 y 1 mL/L, respectivamente, a 0,12 mL/L en presencia de

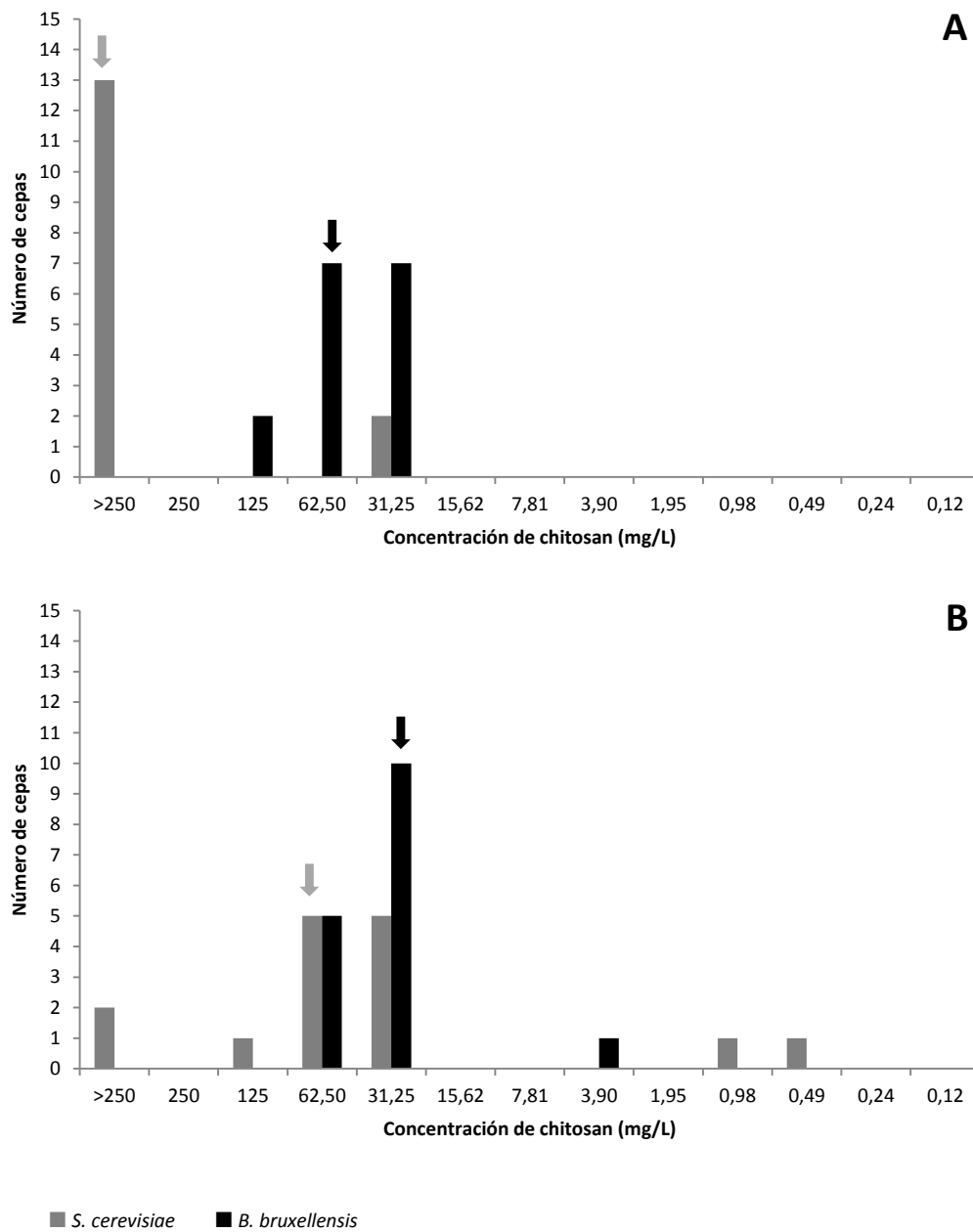
12,5 % etanol en el medio de cultivo. Además, los taninos también demostraron tener acción biocida frente al 50 % (CMB₅₀) de las cepas estudiadas a una concentración de 0,25 mL/L, pero el valor de CMB₉₀ se encontraba por encima de las concentraciones ensayadas, lo que de todos modos también estaría por encima de los límites permitidos por la legislación actual para el uso de esta solución de taninos enológicos contra *Brettanomyces* (0,4 mL/L).

Se sabe que los taninos tienen la capacidad de asociarse fuertemente a proteínas y glúcidos y, consecuentemente, de provocar precipitación de grandes agregados macromoleculares en el vino, asociación ésta que se estabiliza básicamente por interacciones hidrofóbicas y de puentes de hidrógeno (Ribéreau-Gayon et al. 2006). La acción antifúngica de los taninos parece estar relacionada con esa propiedad, y su efecto se ve altamente potenciado por la presencia de etanol, como se puede comprobar en la TABLA III-6, lo cual se puede explicar por el hecho de que el etanol tiene la propiedad de reducir la constante dieléctrica local del medio acuoso, afectando directamente a los enlaces de hidrógeno e induciendo la floculación de las células (Soares 2011).

2.3. Actividad antimicrobiana del quitosán

En la FIGURA III-10 se reflejan los resultados de CMI encontrados para el quitosán frente a cepas de *B. bruxellensis* y *S. cerevisiae*.

Figura III-10. Concentraciones mínimas inhibitorias de quitosán en ausencia y en presencia de etanol 12,5 %, frente a *S. cerevisiae* y *B. bruxellensis*



Chitosán en ausencia de etanol (A) y en presencia de 12,5 % etanol (B) en el medio de cultivo (pH 3,5). Las flechas indican las respectivas CMI₅₀ para *S. cerevisiae* (n = 15) y *B. bruxellensis* (n = 16).

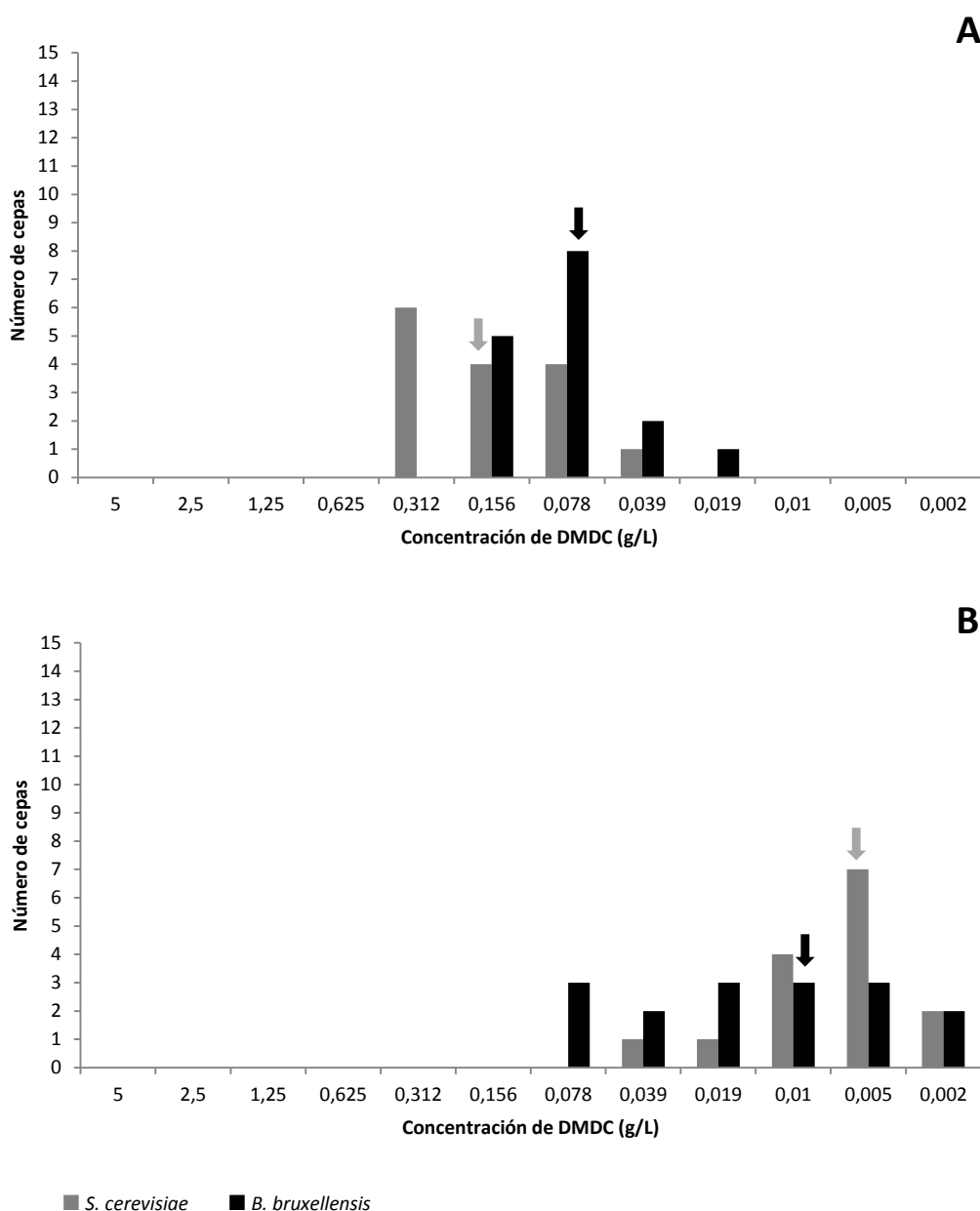
En el caso del quitosano, la actividad inhibitoria frente a las cepas de *Brettanomyces* no reveló diferencias significativas en ausencia y en presencia de 12,5 % etanol en el medio de cultivo a pH 3,5, observándose el mismo valor de CMI₉₀ (62,5 mg/L) en ambos casos, como se puede constatar en la TABLA III-6. Considerándose el efecto biocida sobre la totalidad de las cepas de *Brettanomyces* estudiadas, no se ha podido determinar la CMB₉₀ ya que se situaría por encima del rango de concentraciones ensayadas; sin embargo, la CMB₅₀ en presencia de 12,5 % etanol fue de 62,5 mg/L, indicando que esa concentración es suficiente para matar y evitar el crecimiento celular del 50% de las cepas analizadas.

En ese contexto, Gómez-Rivas et al. (2004) mencionaban que una concentración de 6 g/L de quitosano era necesaria para controlar el crecimiento de *Brettanomyces*, lo que estaría muy por encima de las concentraciones determinadas según nuestros resultados. Sin embargo, en ese estudio los autores emplearon el quitosano derivado de caparazones de cangrejos y es importante subrayar que actualmente para fines de aplicación en Enología, exclusivamente está permitido el quitosano de origen fúngico, como el que se ha empleado en nuestros experimentos. Además, estas diferencias importantes en las concentraciones inhibitorias también se explicarían debido al hecho de que según el origen de la quitina que se ha empleado para su obtención, ese biopolímero puede presentar pesos moleculares, niveles de desacetilación y carácter catiónico muy variados (Hernández-Lauzardo et al. 2008). La principal característica que confiere el potencial antimicrobiano de ese compuesto es su carácter catiónico, que será mayor cuanto más ácido el pH del medio y con un grado de desacetilación más elevado, así que cuanto mayor sea la densidad de cargas positivas generadas, más potente será su acción antimicrobiana (Kong et al. 2010). Por otro lado, nuestros resultados muestran que la presencia de etanol en el medio, en el caso de ese compuesto, no modifica significativamente la acción frente a células de *Brettanomyces*, lo que sería esperado ya que el etanol no tiene capacidad de modificar la estructura de cargas eléctricas del quitosano.

2.4. Actividad antimicrobiana del dicarbonato de dimetilo (DMDC)

En la FIGURA III-11 se reflejan los resultados de CMI del dicarbonato de dimetilo a pH 3,5, en ausencia y en presencia de etanol a una concentración de 12,5 %, frente a cepas de *S. cerevisiae* y *B. bruxellensis*, y paralelamente, en la TABLA III-6 se pueden comprobar los valores de las concentraciones mínimas inhibitorias y biocidas.

Figura III-11. Concentraciones mínimas inhibitorias del DMDC en ausencia y en presencia de etanol 12,5 %, frente a *S. cerevisiae* y *B. bruxellensis*



DMDC en ausencia de etanol (A) y en presencia de 12,5 % etanol (B) en el medio de cultivo (pH 3,5). Las flechas indican las respectivas CMI₅₀ para *S. cerevisiae* (n = 15) y *B. bruxellensis* (n = 16).

El DMDC, comercializado como Velcorin, en las concentraciones ensayadas en este trabajo (5 – 0,002 g/L) mostró un potente efecto inhibitorio tanto sobre el crecimiento de *Brettanomyces* como de *S. cerevisiae* en las condiciones experimentales descritas anteriormente. El compuesto, en presencia de 12,5 % etanol, fue capaz de inhibir eficazmente el crecimiento de ambas especies de levaduras en concentraciones por debajo de las permitidas por ley (200 mg/L), pero además también presentó efecto biocida sobre la mitad de las cepas de *Brettanomyces* por debajo de ese valor ($CMB_{90} = 120$ mg/L), como se puede constatar en la TABLA III-6.

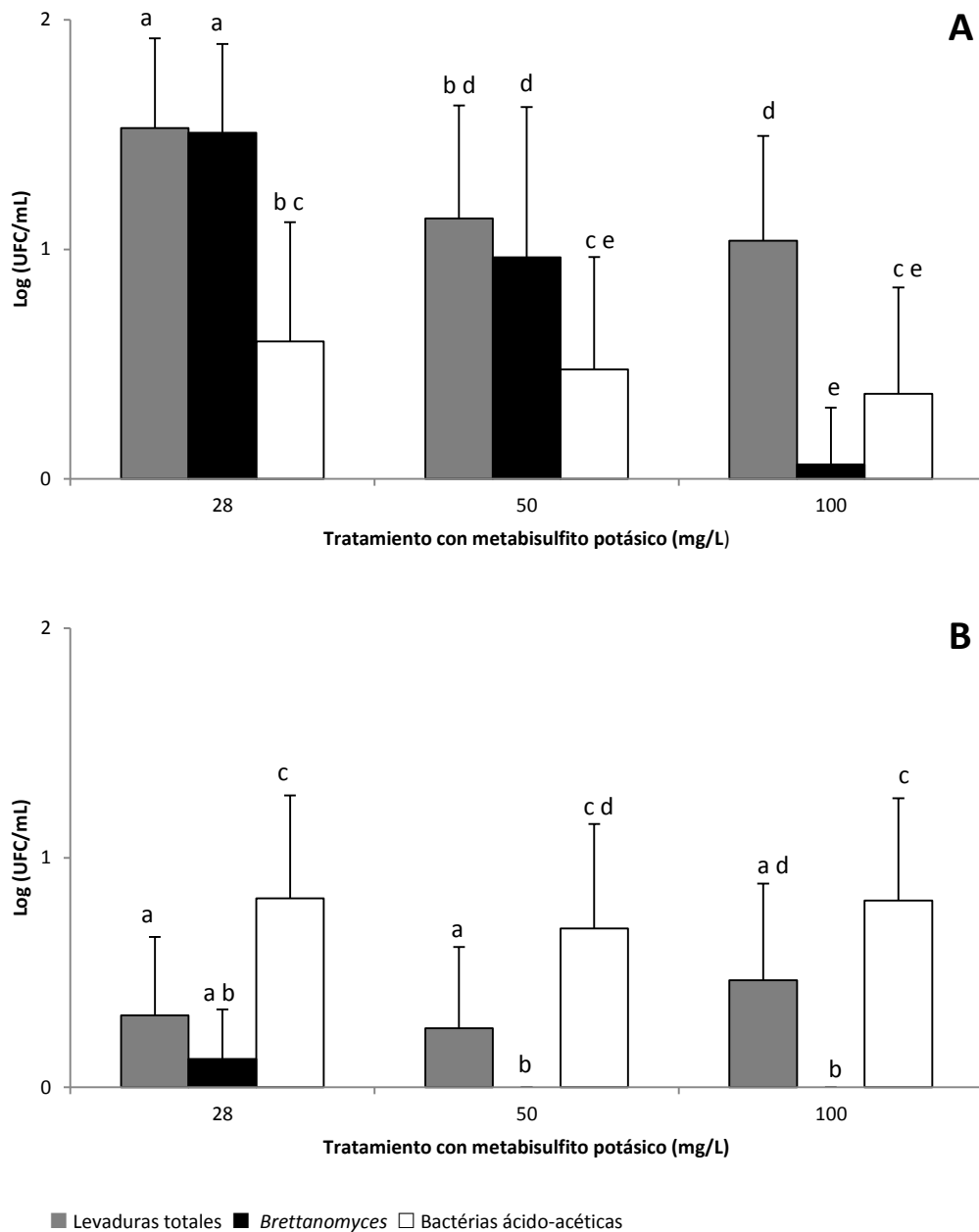
El principio de actuación del DMDC se da por penetración a nivel celular y posterior interacción con residuos de histidina ubicados en centros catalíticos de enzimas clave para la supervivencia de la célula (Hornsey 2007). Algunos estudios realizados anteriormente habían descrito valores de concentración inhibitoria del DMDC en un rango de 100 a 250 mg/L contra células de *Brettanomyces*, tanto en mostos de uva como en vinos suplementados con glucosa (Costa et al. 2008; Delfini et al 2002; Renouf et al. 2008), valores estos que concuerdan con nuestros resultados obtenidos para cepas en medio YPD líquido y en presencia de 12,5 % etanol.

Es importante destacar que también en este caso, como comprobado anteriormente en el caso del MBP y de la solución de taninos, el etanol juega un importante papel, actuando sinérgicamente y potenciando la acción inhibitoria del DMDC. En este caso el DMDC opera a nivel intracelular y el etanol actúa directamente en la estructura de la membrana plasmática, aumentando la permeabilidad y modificando los sistemas de transporte activo transmembrana (Ribéreau-Gayon et al. 2006).

2.5. Acción del metabisulfito potásico frente a *Brettanomyces* en vino

Tras la selección del MBP como agente antimicrobiano para el estudio en vinos tintos naturalmente contaminados por *Brettanomyces*, se presentan los resultados obtenidos para recuentos de las poblaciones de levaduras totales, *Brettanomyces* y bacterias ácido-acéticas (BAA) en las series de vinos analizados. El vino tinto elegido inicialmente, con una turbidez de 219 NTU, presentaba una población inicial de $1,6 \cdot 10^3$ UFC/mL de levaduras totales (recuentos en placas de YPD-agar), 800 UFC/mL de bacterias ácido acéticas (recuentos en placas de manitol-agar) y ninguna colonia de *Brettanomyces* detectada en placas del medio específico. A continuación se muestran las poblaciones microbianas al cabo de 4 y 22 meses de almacenamiento en botella, respectivamente, con concentraciones de 28; 50 y 100 mg/L (FIGURA III-12).

Figura III-12. Perfil microbiológico de muestras de vino con diferentes concentraciones de metabisulfito potásico al cabo de 4 y 22 meses de almacenamiento en botella



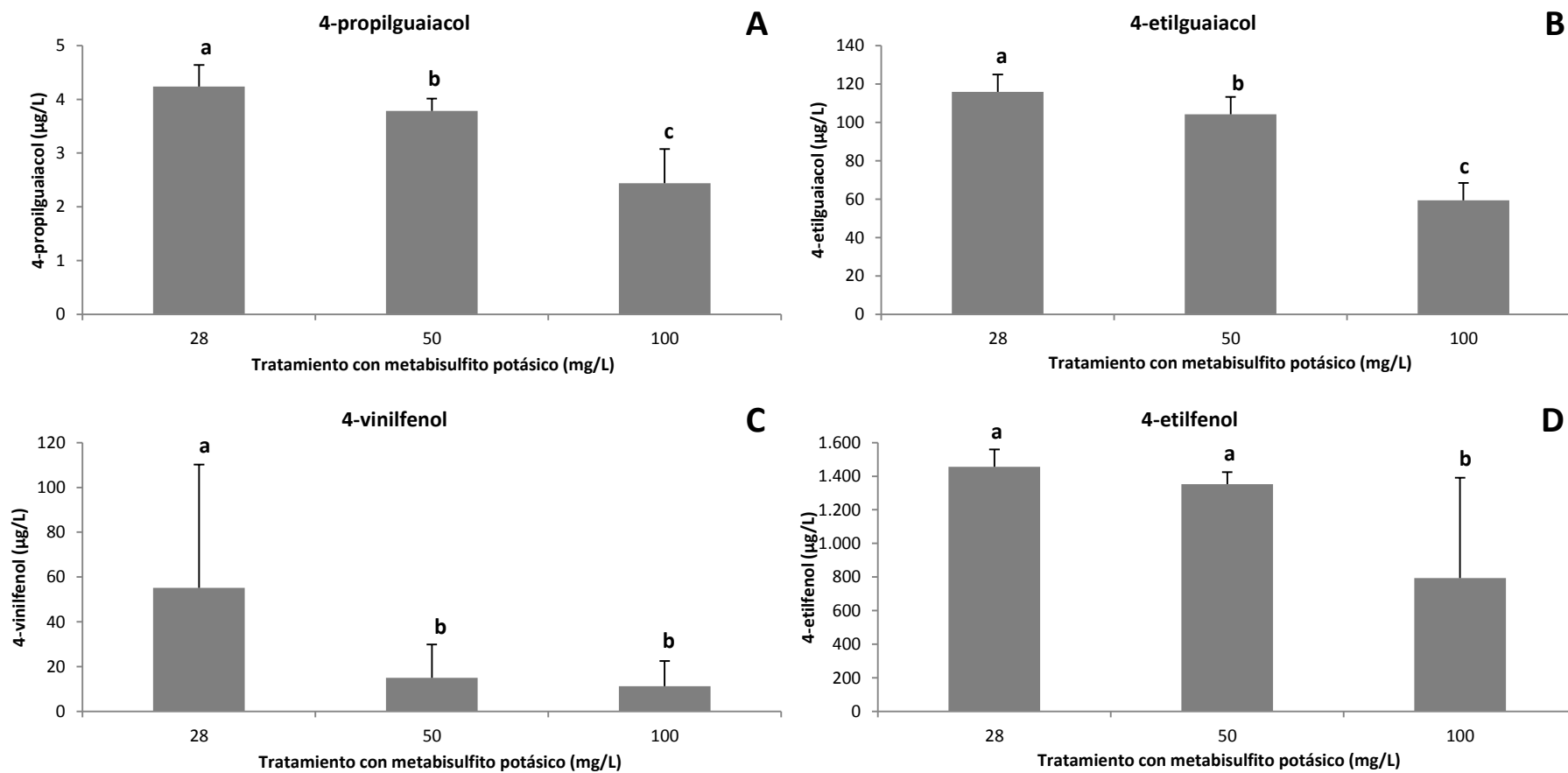
Promedio y desviación estándar de poblaciones microbianas en muestras de vino tinto al cabo de 4 meses (A) y 22 meses (B). Barras con diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

En ninguna de las muestras analizadas se detectaron poblaciones de bacterias ácido-lácticas (BAL), pero como se puede observar en las gráficas presentadas, poblaciones de BAA's de aproximadamente 7 UFC/mL permanecieron en el vino durante todo el periodo de almacenamiento y no se observaron diferencias significativas en estas poblaciones para los diferentes tratamientos de MBP estudiados. Sin

embargo, sí se detectaron diferencias estadísticamente significativas en las poblaciones de *Brettanomyces* entre los vinos tratados con 28, 50 y 100 mg/L de MBP después de 4 meses de almacenamiento (FIGURA III-12A). Por otro lado, al cabo de 22 meses de conservación y crianza de los vinos en botella, no se encontraron colonias de *Brettanomyces* en aquellas muestras tratadas con 50 y 100 mg/L de MBP, mientras que una población activa residual seguía existiendo en las muestras con 28 mg/L de MBP (FIGURA III-12B). Cuando se analizó la población de levaduras totales, se comprueba un descenso de 0,9 unidades logarítmicas de 4 a 22 meses. La población residual de levaduras tras todo el período de conservación presentaba células de *Brettanomyces* (3 UFC/mL) solamente en aquellas muestras con el contenido más bajo en MBP (28 mg/L), mientras que no se encontraron diferencias significativas entre las poblaciones residuales de levaduras totales entre los tres tratamientos de MBP, demostrándose así que *Brettanomyces* fue más sensible a la acción del antimicrobiano que las otras especies de levaduras vínicas. Esa mayor sensibilidad de *Brettanomyces* a la acción del MBP se confirma también con los resultados obtenidos para *S. cerevisiae* en los experimentos realizados en placas de micro-valoración (apartado 2.4 de MATERIALES Y MÉTODOS). En la TABLA III-6 se muestra que en presencia de etanol, una concentración de 48 mg/L de MBP era suficiente para inhibir el crecimiento (CMI₉₀) y causar la muerte (CMB₉₀) de todas las cepas de *Brettanomyces* estudiadas, mientras que el mismo efecto solamente se conseguía en *S. cerevisiae* a una concentración 8 veces superior (CMI₉₀ y CMB₉₀ de 390 mg/L), y en el caso de la especie *Trigonopsis cantarellii*, discutida en próximo capítulo, la CMB₉₀ para el MBP en presencia de etanol resultó ser 2 veces superior (96 mg/L; TABLA III-15) al compararla con *Brettanomyces*.

A continuación, se reflejan las concentraciones de fenoles volátiles encontradas en las respectivas muestras de vino al final del periodo de 22 meses de almacenamiento (FIGURA III-13).

Figura III-13. Resultados de análisis de fenoles volátiles de las muestras de vinos con diferentes tratamientos de metabisulfito potásico después de 22 meses de almacenamiento en botella



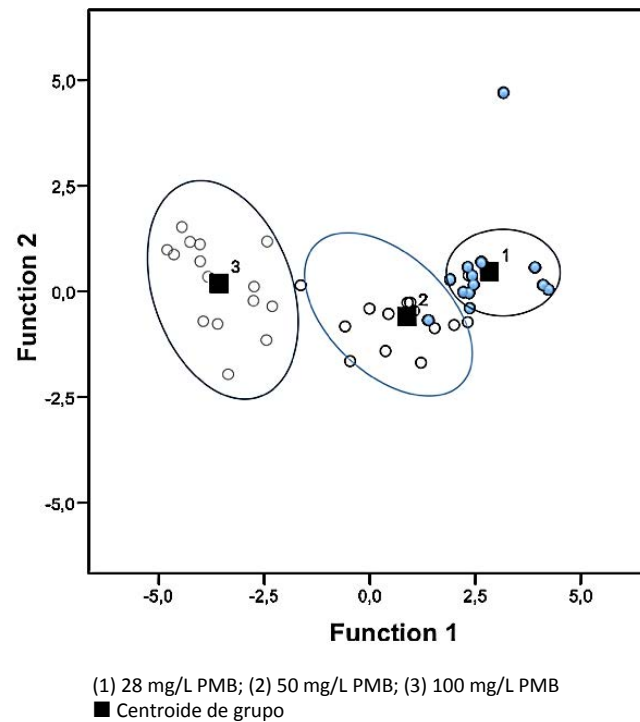
Valores de promedio y desviación estándar de las concentraciones de fenoles volátiles: (A) 4-propilguaiaicol, (B) 4-etilguaiaicol, (C) 4-vinilfenol y (D) 4-etilfenol. Barras con diferentes letras indican diferencias estadísticas significativas ($p < 0,05$).

Se observan concentraciones significativamente más bajas de 4-etilfenol (FIGURA III-13D) y 4-etilguaiaicol (FIGURA III-13B) en los vinos tratados con 100 mg/L de MBP que en los vinos tratados con concentraciones más bajas de este compuesto (50 y 28 mg/L). Además, las mayores concentraciones de 4-vinilfenol, que es el precursor directo del 4-etilfenol, fueron detectadas en las muestras que tenían menor concentración del agente antimicrobiano (28 mg/L), como se puede ver en la FIGURA III-13C.

Con respecto al 4-propilguaiaicol, también se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las medias obtenidas, y se observa que cuanto mayor era la concentración de MBP utilizado en las muestras, más bajas eran las concentraciones de ese compuesto volátil al cabo de los 22 meses de almacenamiento (FIGURA III-13A). Este fenol volátil ya había sido observado anteriormente en vinos tintos en proceso de crianza y, así como se demuestra en nuestros resultados, también se habían correlacionado sus concentraciones con el contenido en 4-etilfenol y 4-etilguaiaicol de los vinos (Aznar et al. 2003; Ferreira et al. 2006), de modo que en estos estudios los autores propusieron una relación de la presencia del 4-propilguaiaicol con un origen microbiológico, no obstante sin poder corroborar dicha hipótesis. Según Culleré et al. (2004), esta molécula también está relacionada con una desviación organoléptica en los vinos, pero más bien con un efecto aditivo a la presencia del 4-etilfenol y 4-etilguaiaicol. Es importante mencionar que determinadas especies de bacterias ácido-lácticas, como *Lactobacillus plantarum*, *L. brevis* y *Pediococcus pentosaceus* también habían sido vinculadas a la producción de vinilfenoles (Chatonnet et al. 1995), pero en los vinos estudiados en esta tesis no se detectaron células viables de bacterias ácido-lácticas, por lo que su supuesta contribución a la producción de estos compuestos alterantes queda totalmente desconsiderada.

A continuación se presenta en la FIGURA III-14 el resultado obtenido para las puntuaciones de las 45 muestras de vino en dos funciones canónicas discriminantes, agrupadas según los respectivos tratamientos con MBP [(1) 28mg/L; (2) 50 mg/L; (3) 100 mg/L] y las 7 variables (3 poblaciones microbianas y 4 fenoles volátiles).

Figura III-14. Resultado de análisis de función discriminante



Las componentes 1 y 2 explican, respectivamente, al 97,4 % y 2,6 % de los valores de variancia. Los valores de correlación más elevados de la componente 1 corresponden a las siguientes variables: concentración de 4-etilguaiacol (coeficiente 1,224), concentración de 4-propilguaiacol (coeficiente 1,116), concentración de 4-etilfenol (coeficiente - 1,919) y población de *Brettanomyces* a los 4 meses de almacenamiento (coeficiente 0,999). Todas estas variables presentaron igualmente la correlación absoluta más elevada con la componente 1, como se puede constatar en la TABLA III-7, y por lo contrario, la variable “población de bacterias acéticas” devolvió la correlación más baja (coeficiente 0,181).

Tabla III-7. Coeficientes de correlación de Pearson entre poblaciones microbianas y concentración de diferentes fenoles volátiles

		4-propilguaicol	4-etilguaicol	4-vinilfenol	4-etilfenol
4 meses	Levaduras totales	0,373*	0,270	0,274	0,250
	<i>Brettanomyces</i>	0,566**	0,436**	0,264	0,402**
	Bacterias acéticas	0,098	0,080	0,247	0,042
22 meses	Levaduras totales	-0,122	-0,099	0,019	-0,095
	<i>Brettanomyces</i>	0,293	0,226	0,151	0,185
	Bacterias acéticas	-0,008	-0,008	0,119	-0,033

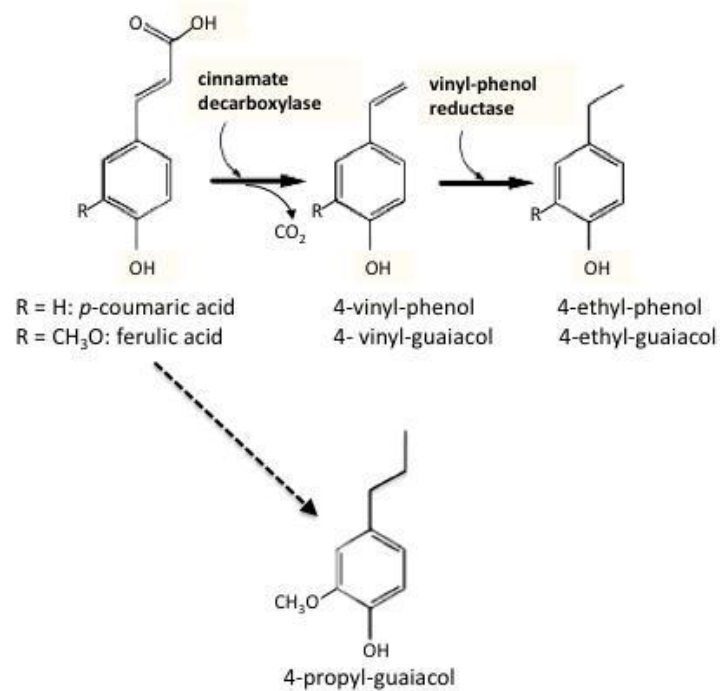
* Correlación significativa a 0,05

** Correlación significativa a 0,01

Los resultados encontrados muestran que las poblaciones de *Brettanomyces* al cabo de 4 meses de almacenamiento en botellas están inversamente correlacionadas con las respectivas concentraciones de MBP utilizadas en los tratamientos de los vinos al inicio del experimento, de modo que 100 mg/L de MBP total fue suficiente para evitar el crecimiento de *Brettanomyces*. Los niveles de 4-etilguaicol y 4-etilfenol, que representan el producto final mediado por la vinilfenol-reductasa (Tchobanov et al. 2008) de *Brettanomyces* (FIGURA III-13), presentaron la misma tendencia que la población de *Brettanomyces*, detectándose las concentraciones más bajas en aquellas muestras de vino tratadas con MBP a una concentración de 100 mg/L, y que paralelamente presentaban una población residual de esa levadura (0,5 UFC/mL) a los 4 meses y ningún recuento de células viables después de 22 meses de almacenamiento.

En lo que se refiere al 4-propilguaicol, sus concentraciones también siguieron la misma tendencia presentada por las poblaciones de *Brettanomyces* a los 4 meses de almacenamiento y se encuentran inversamente correlacionadas con las concentraciones de tratamiento con MBP. Este resultado apoya la hipótesis anterior de que ese compuesto volátil puede ser generado por *Brettanomyces* mediante la mencionada actividad enzimática sobre una molécula precursora disponible en la misma madera de las barricas, como el ácido p-cumárico, la cual podría generar el 4-propilguaicol por dos etapas de reducción sucesivas (FIGURA III-15). Sin embargo, la necesidad de estudios más profundizados se hace necesaria para identificar y caracterizar esa supuesta actividad involucrada en dicho proceso.

Figura III-15. Formación del 4-propilguaiacol



En suma, desde un punto de vista enológico, es importante notar algunos aspectos relevantes como, por un lado, el hecho de que una aplicación de concentraciones adecuadas de MBP puede controlar eficientemente a las poblaciones de *Brettanomyces* en el vino. Por otra parte la producción de fenoles volátiles parece darse durante los primeros meses de almacenamiento y, finalmente, parece ser que las poblaciones de células viables de *Brettanomyces* solamente se encuentran en aquellos vinos desprotegidos y con concentraciones de MBP por debajo de 100 mg/L previamente al almacenamiento.

3. Detección de levaduras no-*Saccharomyces* en bodega y caracterización de la levadura vínica *Trigonopsis cantarellii*

3.1. Detección de levaduras no-*Saccharomyces* en ambiente de bodega

Un total de 40 muestras enológicas que incluían: 8 muestras de agua de lavado de depósitos de madera, 3 muestras de aire y 29 muestras de vino tinto fueron recogidas en el periodo 2008 – 2011. Todas las muestras procedían de bodegas de la D.O.Ca. Rioja y D.O. Ribera del Duero y fueron analizadas por microbiología clásica en medio selectivo para *Brettanomyces*. Por otra parte, las muestras de vino tinto de la variedad Tempranillo, todas en proceso de envejecimiento en barricas y sospechosas de contaminación por análisis sensorial e indicios de cierta desviación aromática, fueron procesadas y se realizó la extracción del DNA total (como descrito en los apartados 1.3 y 1.4 de MATERIALES Y MÉTODOS). Posteriormente, las muestras fueron analizadas también por PCR cuantitativa (qPCR) específica para *Brettanomyces*, tal y como se describe en el apartado 1.6 de MATERIALES Y MÉTODOS.

Los análisis de microbiología clásica en medio de cultivo específico permitieron la obtención de aislados y la posterior identificación de otras siete especies de levaduras no-*Saccharomyces* además de *B. bruxellensis*, tal y como se describe en el apartado 3.2.1 de MATERIALES Y MÉTODOS. En la TABLA III-8 se muestran los resultados de los cultivos y recuentos de levaduras en cada una de las muestras estudiadas, el número de aislados identificados a nivel de especie mediante técnicas de análisis del DNA, y el resultado de estos análisis taxómicos.

Tabla III-8. Resultados de los análisis microbiológicos de las muestras enológicas estudiadas

Muestra	Recuentos (UFC/mL)		Aislados estudiados	Especies identificadas	
	Levaduras totales	En medio específico			
PEV45	4,4E+05	4	1	<i>Pichia holstii</i> PEV45c	
PEV10	3,7E+05	4	2	<i>T. cantarellii</i> PEV10a; <i>B. bruxellensis</i> PEV10c	
PA42	6,2E+04	1,7E+03	1	<i>T. cantarellii</i> PA42a	
PA23	6,2E+03	7,0E+02	1	<i>T. cantarellii</i> PA23a	
PA20	1,1E+05	2,1E+02	1	<i>T. cantarellii</i> PA20a	
PA14	3,4E+05	1,0E+03	3	<i>T. cantarellii</i> PA14c, PA14d, PA14f	
PA11	4,8E+05	8,0E+02	1	<i>T. cantarellii</i> PA11d	
AA29	7,5E+05	7	2	<i>B. bruxellensis</i> PL65; <i>T. cantarellii</i> PL66	
NA8	3,3E+05	11	4	<i>B. bruxellensis</i> PL77, PL78, PL79, PL80	
NA26	6,5E+04	2	1	<i>B. bruxellensis</i> PL83	
PA18	2,3E+04	2,2E+02	1	<i>T. cantarellii</i> PL85	
PEV1	5,7E+02	9	1	<i>T. cantarellii</i> PL103	
PEV2	10	1	1	<i>T. cantarellii</i> PL109	
PA19	1,8E+03	15	1	<i>T. cantarellii</i> PL342	
PA24	0	1,7E+03	1	<i>T. cantarellii</i> PL91	
PCA22	5,6E+02	1,9E+03	1	<i>T. cantarellii</i> PL186	
PA34	4,0E+03	2,2E+03	2	<i>T. cantarellii</i> PL198, PL203	
PCA8	9,5E+02	12	2	<i>T. cantarellii</i> PL235, PL237	
PCA24	2,0E+03	12	2	<i>B. bruxellensis</i> PL249; <i>T. cantarellii</i> PL251	
PCA26	2	2,0E+02	1	<i>T. cantarellii</i> PL253	
PCA26.2	2	8,0E+02	2	<i>T. cantarellii</i> PL561, PL562	
PCA27	12	6,5E+03	1	<i>T. cantarellii</i> PL259	
PCA2	3,2E+02	11	6	<i>A. schoenii</i> PL305, PL306; <i>T. variabilis</i> PL307, PL308, PL309, PL310	
PCA9	4,1E+03	1,2E+02	5	<i>T. cantarellii</i> PL311, PL312; <i>B. bruxellensis</i> PL313, PL314, PL316	
PA18	1,0E+03	2,5E+02	1	<i>T. cantarellii</i> PL336	
PA22	2,0E+03	6,2E+02	1	<i>T. cantarellii</i> PL347	
PCA16	2,8E+03	4,3E+03	10	<i>P. mandshurica</i> PL551, PL552, PL553; <i>T. cantarellii</i> PL554, PL555, PL556, PL557, PL558, PL559, PL560	
PCA3	1,0E+00	1	1	<i>T. cantarellii</i> PL571	
PCA19	2,8E+03	9,1E+02	1	<i>T. cantarellii</i> PL582	
Agua de lavado	TN1	1,0E+03	3,5	2	<i>C. ishiwadae</i> CP19, CP23
	TN2.1	6,5E+02	5	1	<i>T. cantarellii</i> TN2.1d
	TN2.2	1,2E+03	3	1	<i>T. cantarellii</i> TN2.2c
	TN3.1	3,2E+03	52	5	<i>C. ishiwadae</i> TN3.1a; <i>B. bruxellensis</i> TN3.1c, TN3.1d, TN3.1e, TN3.1f
	TN3.2	23E+03	357	1	<i>C. ishiwadae</i> TN2.2c
	TN4f	3,6E+02	20	1	<i>T. cantarellii</i> TN4f.c
	TN6f	3	1	1	<i>T. cantarellii</i> TN6f.a
	TN8.2	0	7	3	<i>B. bruxellensis</i> TN8.2a; <i>C. ishiwadae</i> TN8.2b, TN8.2d
Aire	EM	n/a	3	1	<i>M. guilliermondii</i> CPA4
	NT	n/a	10	1	<i>T. cantarellii</i> CPA3
	EL	n/a	2	2	<i>C. ishiwadae</i> CPA1, CPA2

(n/a) no analizado

Como se puede observar en esta tabla, la especie más recurrente fue la levadura *Trigonopsis cantarellii*, que además se detectó en los tres tipos de muestras estudiadas: vino, agua de lavado de depósitos de madera y aire.

En la TABLA III-9 se clasifican los aislados identificados taxonómicamente de acuerdo con su origen, la especie, familia y orden a la que pertenecen. Todos los aislados encontrados (77 aislados totales) resultaron ser del orden de Saccharomycetales, agrupándose en 4 familias (Pichiaceae, Saccharomycetaceae, Debaryomycetaceae y Saccharomycopsidaceae) y el género *Trigonopsis* que figura como *incertae sedis* actualmente. Este último grupo fue el más numeroso en el muestreo realizado (46 aislados de los 77 totales estudiados en las 40 muestras), y dentro de este género, sobresale la especie *T. cantarellii* que constituyó más de la mitad de los aislados encontrados (54,5 % del total). Por otro lado, en las muestras de vino, en los casos en que se confirmó la presencia de *Brettanomyces* (en medio específico o por qPCR), la única especie no-*Saccharomyces* que también se detectaba conjuntamente en la muestra era *T. cantarellii*.

Tabla III-9. Especies de levaduras identificadas en las muestras enológicas por cultivo en medio específico

Especie ¹	Muestra	Nº de muestras	Aislados estudiados	Clado ²	Familia	Orden
<i>Brettanomyces bruxellensis</i>	vino	6	11	<i>Dekkera</i>	Pichiaceae	Saccharomycetales
	agua	2	5			
<i>Pichia mandshurica</i>	vino	1	3	<i>Pichia</i>	Pichiaceae	Saccharomycetales
<i>Pichia holstii</i>	vino	1	1	<i>Nakazawaea</i>	Saccharomycetaceae	Saccharomycetales
<i>Candida ishiwadae</i>	agua	4	6	<i>Nakazawaea</i>	Saccharomycetaceae	Saccharomycetales
	aire	1	2			
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	aire	1	1		Debaryomycetaceae	Saccharomycetales
<i>Trigonopsis cantarellii</i>	vino	25	37	<i>Trigonopsis</i>	<i>incertae sedis</i>	Saccharomycetales
	agua	4	4			
	aire	1	1			
<i>Trigonopsis variabilis</i>	vino	1	4	<i>Trigonopsis</i>	<i>incertae sedis</i>	Saccharomycetales
<i>Arthroascuschoenii</i>	vino	1	2		Saccharomycopsidaceae	Saccharomycetales
TOTAL		40	77			

¹ Nombre de especie en uso según las recomendaciones de MycoBank (<http://www.mycobank.org>)

² Clasificación de clados según Kurtzman (2011)

La TABLA III-10 muestra los resultados de los análisis químicos de las muestras de vino (29 en total) y se indica en cuáles de ellas se diagnosticó la presencia de *T. cantarellii* y/o de *Brettanomyces*.

Tabla III-10. Análisis microbiológicos y químicos de los vinos tintos estudiados

Muestra	<i>Brettanomyces</i> ¹	<i>T. cantarellii</i> ²	Turbidez (NTU)	SO ₂ L (mg/L)	pH	Av (g/L)	At (g/L)	Grado alcohólico % (v/v)
NA8	+		127	≈ 0	3,73	0,37	6,50	n/d
NA26	+		486	≈ 0	3,88	0,19	5,40	n/d
PEV10	+	+	140	19	3,64	0,26	7,3	12,7
AA29	+	+	315	≈ 0	3,55	0,32	6,75	13,20
PA18	+	+	94,5	40	3,92	0,41	4,95	13,6
PEV1	+	+	228	34,4	3,84	0,39	4,57	13,5
PEV2	+	+	837	37,6	3,84	0,40	4,28	13,50
PA19	+	+	34	34,4	3,92	0,30	5,05	13,6
PA24	+	+	389	28	3,74	0,37	5,25	13,30
PCA22	+	+	8,91	32,2	3,72	0,62	4,95	13,00
PA34	+	+	92,2	30,4	3,77	0,42	4,87	13,30
PCA8	+	+	1,39	30,4	3,69	0,56	5,10	12,80
PCA24	+	+	14,2	34,4	3,75	0,53	3,75	12,75
PCA26	+	+	7	34,4	3,88	0,73	4,65	13,45
PCA27	+	+	3	31,2	3,68	0,75	5,10	13,5
PCA9	+	+	24,8	35,2	3,68	0,57	5,00	12,8
PA18	+	+	73,2	41,6	3,92	0,50	4,95	13,6
PA42		+	115	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d
PA23		+	180	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d
PA20		+	566	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d
PA14		+	234	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d
PA11		+	262	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d
PCA26.2		+	7	34,4	3,88	0,73	4,65	n/d
PA22		+	113	33,6	3,90	0,54	5,03	13,80
PCA16		+	67,5	24,8	3,64	0,55	5,00	13,20
PCA3		+	8,48	31,2	3,8	0,47	4,9	n/d
PCA19		+	6,71	36,8	3,69	0,58	5,00	n/d
PEV45			180	21	3,78	0,21	6,5	13,1
PCA2			17,1	30,4	3,85	0,53	4,80	12,90

¹ (+) Detección de la presencia de *Brettanomyces* por medio selectivo y/o PCR cuantitativa específica.

² (+) Cultivo en medio selectivo e identificación de *T. cantarellii* por secuenciación.

(n/d) no disponible; (SO₂L) dióxido de azufre libre; (Av) acidez volátil; (At) acidez total.

En el 34,5 % de las muestras de vino no se detectó la presencia de *Brettanomyces* viables y también el resultado fue negativo para qPCR específica, pero se encontraron células viables no-*Saccharomyces* identificadas como *T. cantarellii*. En 51,7 % de las muestras de vino la presencia de *Brettanomyces* sí fue diagnosticada y *T. cantarellii* también se encontraba presente en la misma

muestra. De este tipo de coexistencia entre *Brettanomyces* y *Trigonopsis* existe un registro muy antiguo del aislamiento de otra especie de ese mismo género, *T. variabilis*, conjuntamente con *B. bruxellensis* en medio selectivo por Beech y Carr (1955) a partir de mosto de manzana y sidra; en ese caso las levaduras fueron descritas como resistentes a una combinación de 50 mg/L de actidiona (cicloheximida) y 500 mg/L de ácido ascórbico. Por otro lado, cabe señalar que solamente dos de las muestras de vino (PEV45 y PCA2) no presentaban ninguna de las dos especies, *B. bruxellensis* o *T. cantarellii*, y la población de levaduras no-*Saccharomyces* resultaron ser de las especies *Pichia holstii*, *Trigonopsis variabilis* y *Arthroascus schoenii*, tal y como se ve en la TABLA III-6.

De estas tres especies de levaduras, se encuentran referencias en la literatura de su aislamiento en muestras de uvas o de mosto y vino en el caso de las especies *T. variabilis* y *A. schoenii* [Naumov et al. (2003); Zott et al. (2008); Schachner (1929); Kurtzman y Fell (1998)], mientras que levaduras de la especie *P. holstii* sólo se encuentran referenciadas en muestras de olivas, pasta de aceituna, orujos de oliva o alpechín [Romo-Sánchez et al. (2010); Sinigaglia et al. (2012)]; por tanto este trabajo describe por primera vez levaduras de la especie *Pichia holstii* en muestras de vinos con un alto contenido en etanol que presentan unas condiciones altamente estresantes para el crecimiento microbiano.

Como se observa en la TABLA III-10, tanto el contenido en alcohol de los vinos analizados era elevado (valores comprendidos entre 12,7 y 13,8 % v/v) como los valores de pH (comprendidos entre 3,55 y 3,92), valores que sin embargo se encuentran dentro de los rangos habituales en los vinos que actualmente se están obteniendo y que reflejan la tendencia climática actual. Prueba de ello es que el aumento de las temperaturas medias durante el periodo de crecimiento de la uva (abril - octubre) en la región vitícola del noreste de España en el periodo 1952-2006 fue de 1,0 a 2,2 °C, lo que ha conllevado un aumento del pH y del contenido en azúcares de las uvas y, consecuentemente, el aumento del grado alcohólico de los vinos elaborados (Ramos et al. 2008). Siguiendo esta tendencia, también en vinos de regiones vitivinícolas de otros países se registran últimamente aumentos en el contenido alcohólico, como ejemplo, en los vinos del Valle de Napa, en Estados Unidos, en los cuales se ha registrado un aumento de su grado alcohólico medio de 12,2 % en 1971 a 14,8 % en 2001, y en Australia, de 12,3 % en 1984 a 13,9 % en 2004 (Jones 2007). En el caso de las muestras estudiadas en esta tesis, todas provenían de vinos que habían finalizado la fermentación alcohólica, los azúcares se habían transformado en

etanol y eran secos (< 0,2 g/L azúcares reductores). Resumiendo, se evidencia la alta resistencia y buena adaptación al medio alcohólico de las levaduras no-*Saccharomyces* que se identificaron en estos vinos de grado alcohólico muy elevado (> 12,6%) y prácticamente carentes de azúcares; levaduras que se encontraban metabólicamente activas como células viables y cultivables. El análisis estadístico de los datos de análisis químicos de los vinos presentados en la TABLA III-10 no mostró diferencias significativas entre los vinos en que *T. cantarellii* se detectó sola y en los que se detectó coexistencia de *T. cantarellii* con *Brettanomyces*, o los vinos donde se encontraban levaduras de las otras especies.

Tal y como ya se ha referido en la introducción de esta tesis, es bien conocida la plasticidad y persistencia de levaduras *Brettanomyces* en el vino tinto en proceso de envejecimiento en barricas y las innumerables referencias como potente agente alterante de los vinos, sin embargo nunca se había registrado la presencia de *T. cantarellii* sola o co-existiendo con *Brettanomyces* en condiciones de crianza prolongada de vinos, ni tampoco se encontraba registrado el aislamiento de dicha levadura de muestras de aire o agua de lavado de depósitos de madera; por esta razón se decidió profundizar en el estudio de todos los aislados obtenidos de esta especie *T. cantarellii*.

Con respecto a los aislados encontrados en las muestras de agua de lavado de depósitos de madera y del aire de bodega, y que se identificaron como *C. ishiwadae* (muestras TN1, TN3.1, TN8.2 y EL) y como *M. guilliermondii* (muestra EM), estudios previos de otros autores ya habían identificado estas dos especies de levaduras en el ambiente de bodega y en vinos. Los seis aislados de la especie *C. ishiwadae* identificados en nuestras muestras provenían de una misma bodega pero de aguas de lavado de distintos depósitos (tomadas en febrero/2008 y abril/2009) y del aire muestreado en una nave de elaboración (enero/2010).

3.2. Potencial acidogénico y de producción de aromas alterantes de levaduras no-*Saccharomyces*

En la TABLA III-11 se muestran los resultados de los análisis de acidogénesis y potencial generador de aromas de alteración por aislados de las siete especies de levaduras no-*Brettanomyces* y no-*Saccharomyces* identificadas en esta tesis: *Pichia mandshurica*, *Pichia holstii*, *Candida ishiwadae*, *Meyerozyma guilliermondii*, *Trigonopsis cantarelli*, *Trigonopsis variabilis* y *Arthroascus schoenii*. En esta tabla se puede observar que respecto a la acidogénesis todos los aislados identificados de las especies *A. schoenii*, *C. ishiwadae*, *M. guilliermondii* y *T. variabilis* resultaron ser generadores de acidez, y de estos 15 aislados, 9 (de las especies *C. ishiwadae* y *M. guilliermondii*) también generaron aromas alterantes del vino con descriptores como “químico”, “disolvente”, “suciedad” y “rancio” típicos de los compuestos etil y vinil-fenólicos asociados al “carácter-Brett”. Estos resultados concuerdan con los registrados en la bibliografía para las especies *C. ishiwadae* (Guzzon et al., 2011a) y *M. guilliermondii* (Barata et al. 2008c; Martorell et al. 2006), que ya habían sido detectadas en muestras enológicas y caracterizadas como generadoras de etilfenoles. Esta misma característica también había sido observada en cepas de *P. mandshurica* (Sáez et al. 2011) e incluso en *T. cantarellii* (Dias et al. 2003). Pero sin embargo, esta es la primera vez que se describe la generación de aromas alterantes asociada al “carácter-Brett” por cepas enológicas de la especie *P. holstii*.

Con respecto a la capacidad acidogénica de las cepas de *T. cantarellii* estudiadas en este trabajo, se seleccionó una cepa representativa de cada muestra de vino, agua de lavado o aire y estas cepas se cultivaron en el medio sólido específico, comprobándose que de un total de 25 cepas analizadas, 12 (48 %) presentaron metabolismo acidógeno (indicado por el viraje de color del medio sintético) como se puede observar en la TABLA III-11.

Tabla III-11. Resultados de acidogénesis y generación de olor alterante en medios sintéticos

Especie	Cepa	Medio sólido específico		Medio líquido <i>Sniff-Brett</i>	
		Actividad acidógena ¹	Generación de olor	Crecimiento ²	Generación de olor ³
<i>T. cantarellii</i>	PA14c	+	-	+	+/-
	PA20a	+	-	+	+/-
	PA23a	+	-	+	+/-
	PA11d	-	-	+	-
	PA42a	+	-	+	+/-
	PEV10a	-	-	+	+/-
	PL66	-	-	+	+/-
	PL85	+	-	+	+/-
	PL91	+	-	+	-
	PL103	+	-	+	+/-
	PL109	+	-	+	+
	PL186	-	-	+	+
	PL198	+	-	+	+/-
	PL235	-	-	+	-
	PL251	+	-	+	+/-
	PL253	-	-	+	+/-
	PL259	-	-	+	-
	PL311	-	-	+	+/-
	PL336	-	-	+	+/-
	PL554	-	-	+	+/-
	PL571	+	-	+	-
	PL342	-	-	+	-
	PL347	-	-	+	+/-
	PL582	-	-	+	-
	CPA3	+	-	+	+
<i>A. schoenii</i>	PL305	+	+	+	-
	PL306	+	+	+	-
<i>T. variabilis</i>	PL307	+	-	+	-
	PL308	+	-	+	-
	PL309	+	-	+	-
	PL310	+	-	+	-
<i>C. ishiwadae</i>	TN3.1a	+	+	+	+
	TN3.2b	+	+	+	+
	TN8.2b	+	+	+	+
	TN8.2d	+	+	+	+
	CPA1	+	+	+	+
	CPA2	+	+	+	+
	CP19	+	+	+	+
	CP23	+	+	+	+
<i>P. mandshurica</i>	PL551	-	-	+	-
	PL552	-	-	+	-
	PL553	-	-	+	+/-
<i>P. holstii</i>	PEV45c	-	-	+	+
<i>M. guilliermondii</i>	CPA4	+	+	+	+
<i>B. bruxellensis</i>	PL80	+	+	+	+

¹ Un resultado positivo (+) indica viraje hacia amarillo del medio específico.² Un resultado positivo (+) indica detección de turbidez debido a la multiplicación celular.³ Un resultado positivo (+) indica generación de aroma similar a "carácter-Brett"; un resultado negativo (-) indica ausencia de desviación aromática; un resultado dudoso (+/-) indica generación de aroma alterante distinto al "carácter-Brett".

La producción de concentraciones importantes de ácido acético por especies de los géneros *Brettanomyces* y *Dekkera* es bastante conocida, y de hecho constituye uno de los factores que las caracterizan como levaduras alterantes del vino (Fleet 1993; Fugelsang y Edwards 2007), como ya se ha comprobado, por ejemplo, en el caso de vinos tipo Jerez (Ibeas et al. 1996). En *Brettanomyces*, se ha constatado una relación directa entre la disponibilidad de oxígeno y la generación de ácido acético, especialmente en las etapas de crianza en barricas, donde los niveles de oxígeno disponibles están correlacionados positivamente con su crecimiento y con un aumento en la producción de ese compuesto (Ciani y Ferraro 1997). El conocido “carácter-Brett” en los vinos, además de los típicos compuestos derivados de la actividad de la cinamato-descarboxilasa y vinilfenol-reductasa en *Brettanomyces*, también se acompaña por la formación de ácido acético u otros ácidos carboxílicos (Licker et al. 1998; Romano et al. 2008). El ácido acético y especialmente sus ésteres provocan el surgimiento del olor avinagrado en los vinos, y la generación de ácido isovalérico puede estar asociada a aromas rancios. Por lo tanto, según nuestros resultados, la capacidad de generar ácidos en medio sintético demostrada por las cepas de las especies *T. cantarellii*, *A. schoenii*, *T. variabilis*, *C. ishiwadae* y *M. guilliermondii*, es un importante factor de riesgo para la calidad organoléptica de los vinos en proceso de almacenamiento o crianza, y es por tanto necesario un manejo responsable en las prácticas enológicas y un correcto control microbiológico.

Con respecto a la capacidad de las cepas *T. cantarellii* de generar aromas alterantes asociados al “carácter-Brett”, en la TABLA III-11 se puede comprobar que tres de las 25 cepas estudiadas de esta especie generaron esos olores de alteración en el medio líquido sintético. Dos de esas cepas habían sido aisladas de vinos, y la tercera se aisló del muestreo del aire de bodega en la nave de barricas pero es importante señalar que otras 15 cepas de esta especie generaron olores intensos, distintos del denominado “carácter-Brett”, pero que alterarían las cualidades organolépticas de cualquier vino, y a esta característica hay que sumar el efecto acidogénico que presentaron gran parte de las cepas *T. cantarelli* que se ha señalado anteriormente.

En este punto hay que mencionar que se había propuesto la utilización de cepas de la especie *T. cantarellii* en procesos de inoculación mixta o secuencial con *S. cerevisiae* con resultados organolépticos positivos para vinos tintos de la variedad Syrah, especialmente con la idea de aumentar su contenido en

glicerol (Toro y Vázquez 2002). En otro trabajo llevado a cabo en vinificaciones de vinos tintos por Renouf et al. (2006), encontraron poblaciones de levaduras de esta especie y demostraron que, a diferencia de elaboraciones tradicionales, cuando empleaban procedimientos previos de maceración en frío, la población de *T. cantarellii* llegaba a ser considerablemente superior al final de la fermentación maloláctica. Sin embargo, nuestros resultados indican que este microorganismo podría representar un potencial factor de riesgo a la integridad organoléptica de los vinos, y esto se corrobora por otro trabajo de Dias et al. (2003) en el que demostraron que algunas cepas de esta especie sí son capaces de producir 4-etilfenol a partir de ácido p-cumárico, aunque en concentraciones bajas (< 0,3 mg/L). Estos autores estudiaron dos cepas *T. cantarellii* que además de ser capaces de convertir ácido p-cumárico en 4-vinilfenol – característica común también en otros microorganismos (Chatonnet et al. 1995) – también poseían actividad vinilfenol-reductasa necesaria para la formación de los etil-derivados (Oelofse et al. 2008).

3.3. Comparación molecular intra-específica de levaduras no-*Saccharomyces*

A partir de los resultados de secuenciación de los productos de PCR del gen del RNAr 26S, tal y como se ha descrito en el apartado de **MATERIALES Y MÉTODOS**, en las **FIGURAS III-16 a III-17** se presentan los resultados de los alineamientos intra-específicos de todos los aislados estudiados. Además, se presenta también el respectivo dendrograma resultante del análisis de agrupamiento por UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean), utilizando la secuencia del mismo gen disponible en GenBank de *S. cerevisiae* Y-12632 como referencial externo.

Figura III-16. Alineamiento de las secuencias de los amplicones del gen del rRNA 26S y dendrograma (UPGMA) para los aislados de *Candida ishiwadae*

CP19	TTCGAGTTGTAATTTGAAGAAGGTATCTTTGGAGTTGGCCCCTGTCTATGTTCCCTGGAA	60
CP23	TTCGAGTTGTAATTTGAAGAAGGTATCTTTGGAGTTGGCCCCTGTCTATGTTCCCTGGAA	60
TN8 . 2d	TTCGAGTTGTAATTTGAAGAAGGTATCTTTGGAGTTGGCCCCTGTCTATGTTCCCTGGAA	60
TN8 . 2b	TTCGAGTTGTAATTTGAAGAAGGTATCTTTGGAGTTGGCCCCTGTCTATGTTCCCTGGAA	60
TN3 . 2b	TTCGAGTTGTAATTTGAAGAAGGTATCTTTGGAGTTGGCCCCTGTCTATGTTCCCTGGAA	60
TN3 . 1a	TTCGAGTTGTAATTTGAAGAAGGTATCTTTGGAGTTGGCCCCTGTCTATGTTCCCTGGAA	60
CPA1	TTCGAGTTGTAATTTGAAGAAGGTATCTTTGGAGTTGGCCCCTGTCTATGTTCCCTGGAA	60
CPA2	TTCGAGTTGTAATTTGAAGAAGGTATCTTTGGAGTTGGCCCCTGTCTATGTTCCCTGGAA	60

CP19	CAGGACGTCACAGAGGGTGAGAATCCCGTGCGATGGGGAGACCAATTCTATGTAAAGTTC	120
CP23	CAGGACGTCACAGAGGGTGAGAATCCCGTGCGATGGGGAGACCAATTCTATGTAAAGTTC	120
TN8 . 2d	CAGGACGTCACAGAGGGTGAGAATCCCGTGCGATGGGGAGACCAATTCTATGTAAAGTTC	120
TN8 . 2b	CAGGACGTCACAGAGGGTGAGAATCCCGTGCGATGGGGAGACCAATTCTATGTAAAGTTC	120
TN3 . 2b	CAGGACGTCACAGAGGGTGAGAATCCCGTGCGATGGGGAGACCAATTCTATGTAAAGTTC	120
TN3 . 1a	CAGGACGTCACAGAGGGTGAGAATCCCGTGCGATGGGGAGACCAATTCTATGTAAAGTTC	120
CPA1	CAGGACGTCACAGAGGGTGA-AATCCCGTGCGATGGGGAGACCAATTCTATGTAAAGTTC	119
CPA2	CAGGACGTCACAGAGGGTGA-AATCCCGTGCG-CGGGGAGACCAATTCTATGTAAAGTTC	118

CP19	CTTCGAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCATCTAAA	180
CP23	CTTCGAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCATCTAAA	180
TN8 . 2d	CTTCGAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCATCTAAA	180
TN8 . 2b	CTTCGAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCATCTAAA	180
TN3 . 2b	CTTCGAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCATCTAAA	180
TN3 . 1a	CTTCGAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCATCTAAA	180
CPA1	CTTCGAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCATCTAAA	179
CPA2	CTTCGAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCATCTAAA	178

CP19	GCTAAATATTTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGAAC	240
CP23	GCTAAATATTTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGAAC	240
TN8 . 2d	GCTAAATATTTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGAAC	240
TN8 . 2b	GCTAAATATTTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGAAC	240
TN3 . 2b	GCTAAATATTTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGAAC	240
TN3 . 1a	GCTAAATATTTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGAAC	240
CPA1	GCTAAATATTTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGAAC	239
CPA2	GCTAAATATTTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGAAC	238

CP19	TTTGAAGAGAGAGTGAAGAAAGTACGTGAAATTTGTTGAAAGGGAAGGACTTTTGATCAGAC	300
CP23	TTTGAAGAGAGAGTGAAGAAAGTACGTGAAATTTGTTGAAAGGGAAGGACTTTTGATCAGAC	300
TN8 . 2d	TTTGAAGAGAGAGTGAAGAAAGTACGTGAAATTTGTTGAAAGGGAAGGACTTTTGATCAGAC	300
TN8 . 2b	TTTGAAGAGAGAGTGAAGAAAGTACGTGAAATTTGTTGAAAGGGAAGGACTTTTGATCAGAC	300
TN3 . 2b	TTTGAAGAGAGAGTGAAGAAAGTACGTGAAATTTGTTGAAAGGGAAGGACTTTTGATCAGAC	300
TN3 . 1a	TTTGAAGAGAGAGTGAAGAAAGTACGTGAAATTTGTTGAAAGGGAAGGACTTTTGATCAGAC	300
CPA1	TTTGAAGAGAGAGTGAAGAAAGTACGTGAAATTTGTTGAAAGGGAAGGACTTTTGATCAGAC	299
CPA2	TTTGAAGAGAGAGTGAAGAAAGTACGTGAAATTTGTTGAAAGGGAAGGACTTTTGATCAGAC	298

CP19	TTGGTGTTTAGTACTCTCTACTCCTTGTGGGTGGGGCTCTTGCTTTATACTGGGCCAGCA	360
CP23	TTGGTGTTTAGTACTCTCTACTCCTTGTGGGTGGGGCTCTTGCTTTATACTGGGCCAGCA	360
TN8 . 2d	TTGGTGTTTAGTACTCTCTACTCCTTGTGGGTGGGGCTCTTGCTTTATACTGGGCCAGCA	360
TN8 . 2b	TTGGTGTTTAGTACTCTCTACTCCTTGTGGGTGGGGCTCTTGCTTTATACTGGGCCAGCA	360
TN3 . 2b	TTGGTGTTTAGTACTCTCTACTCCTTGTGGGTGGGGCTCTTGCTTTATACTGGGCCAGCA	360
TN3 . 1a	TTGGTGTTTAGTACTCTCTACTCCTTGTGGGTGGGGCTCTTGCTTTATACTGGGCCAGCA	360
CPA1	TTGGTGTTTAGTACTCTCTACTCCTTGTGGGTGGGGCTCTTGCTTTATACTGGGCCAGCA	359
CPA2	TTGGTGTTTAGTACTCTCTACTCCTTGTGGGTGGGGCTCTTGCTTTATACTGGGCCAGCA	358

CP19	TCGGTTTGGGTGGCAGGATAATGGCATTGGAATGTGGCTTCATTCTGGAGTGTATATAGC	420
CP23	TCGGTTTGGGTGGCAGGATAATGGCATTGGAATGTGGCTTCATTCTGGAGTGTATATAGC	420
TN8 . 2d	TCGGTTTGGGTGGCAGGATAATGGCATTGGAATGTGGCTTCATTCTGGAGTGTATATAGC	420
TN8 . 2b	TCGGTTTGGGTGGCAGGATAATGGCATTGGAATGTGGCTTCATTCTGGAGTGTATATAGC	420
TN3 . 2b	TCGGTTTGGGTGGCAGGATAATGGCATTGGAATGTGGCTTCATTCTGGAGTGTATATAGC	420
TN3 . 1a	TCGGTTTGGGTGGCAGGATAATGGCATTGGAATGTGGCTTCATTCTGGAGTGTATATAGC	420
CPA1	TCGGTTTGGGTGGCAGGATAATGGCATTGGAATGTGGCTTCATTCTGGAGTGTATATAGC	419
CPA2	TCGGTTTGGGTGGCAGGATAATGGCATTGGAATGTGGCTTCATTCTGGAGTGTATATAGC	418

CP19	CTTTGTTGATACTGCCTATCTAGACCGAGGACTGCGTCTTTTGACTAGGATGCTGGCGTA	480
CP23	CTTTGTTGATACTGCCTATCTAGACCGAGGACTGCGTCTTTTGACTAGGATGCTGGCGTA	480
TN8 . 2d	CTTTGTTGATACTGCCTATCTAGACCGAGGACTGCGTCTTTTGACTAGGATGCTGGCGTA	480

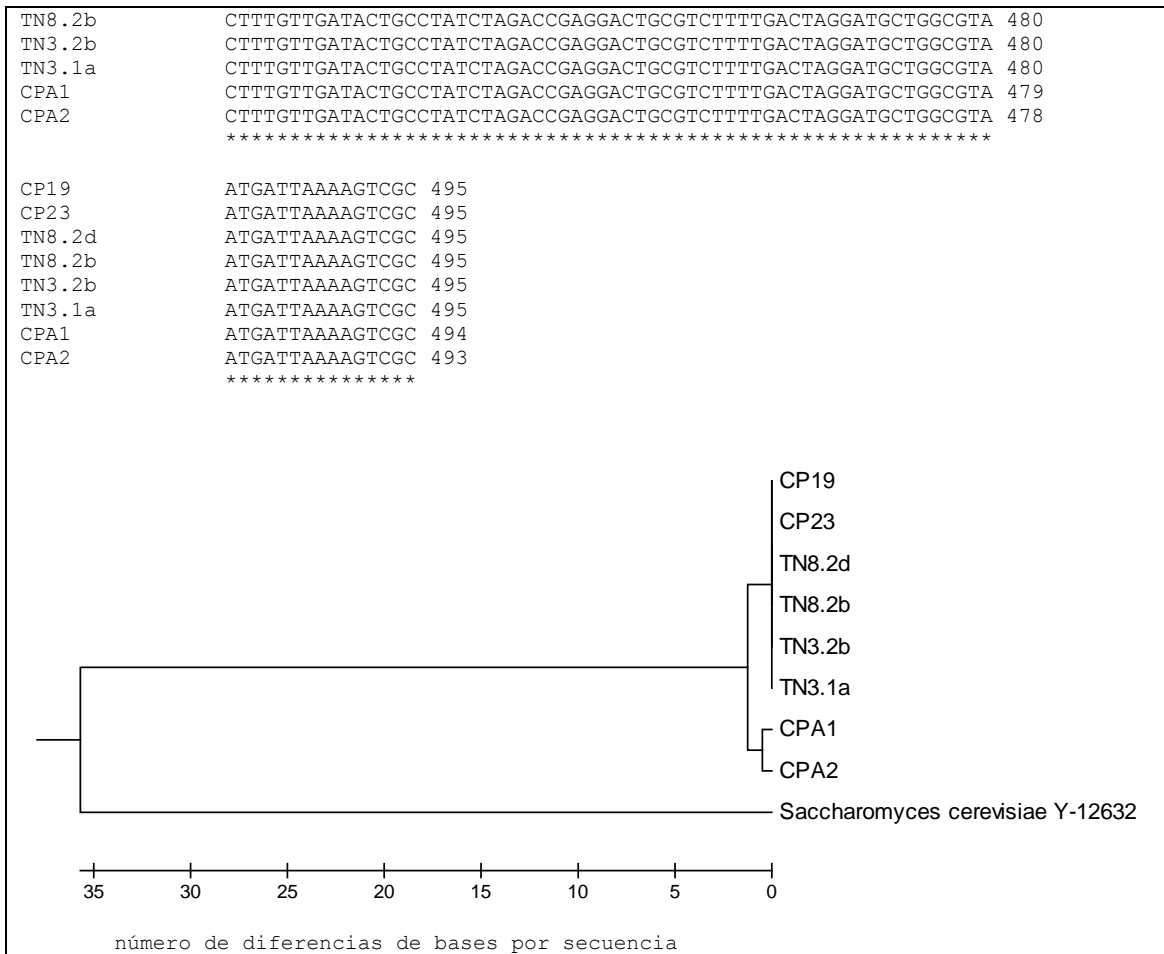


Figura III-17. Alineamiento de las secuencias de los amplicones del gen del RNAr 26S y dendrograma (UPGMA) para los aislados de *Pichia mandshurica*

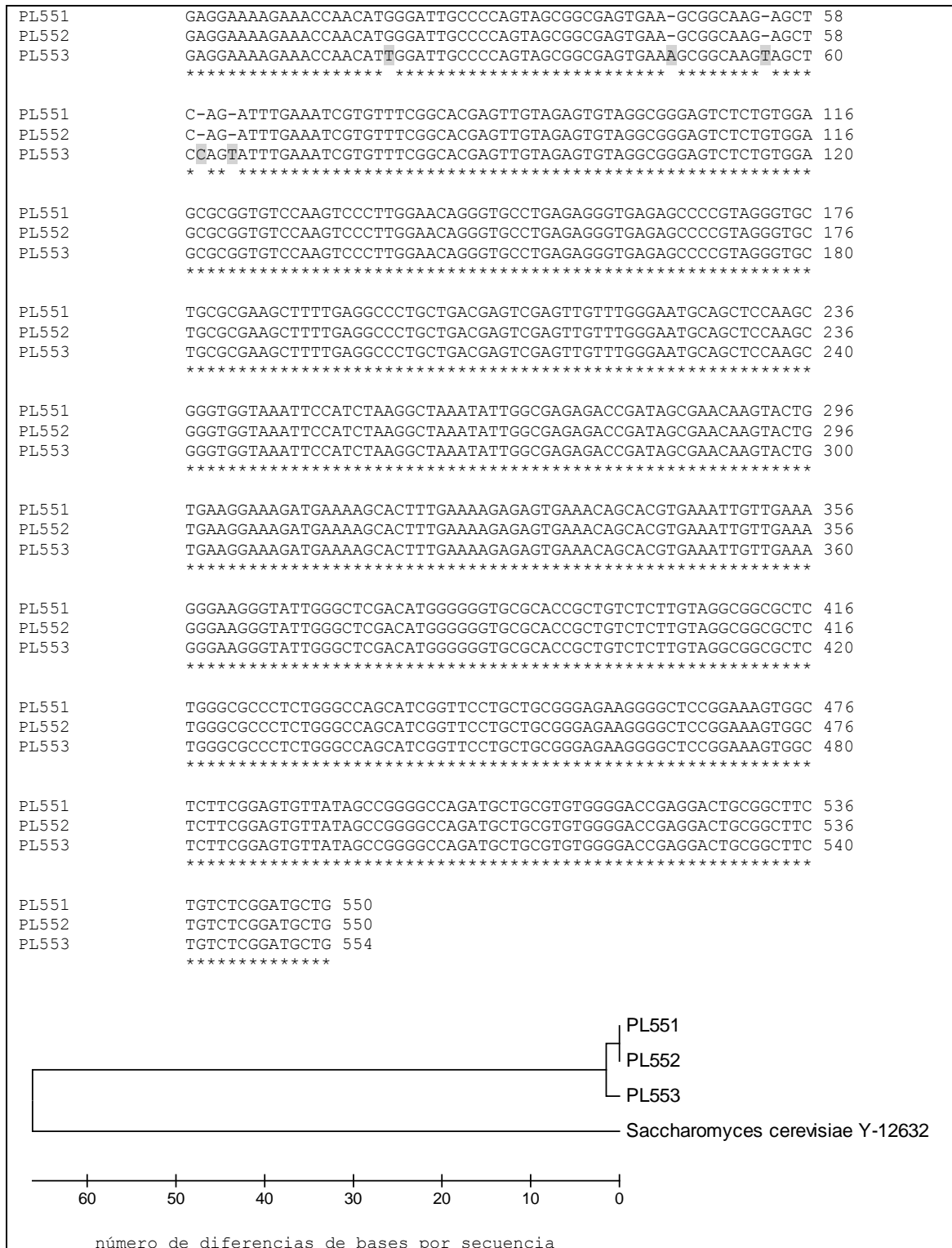


Figura III-18. Alineamiento de las secuencias de los amplicones del gen del rRNA 26S y dendrograma (UPGMA) para los aislados de *Trigonopsis variabilis*

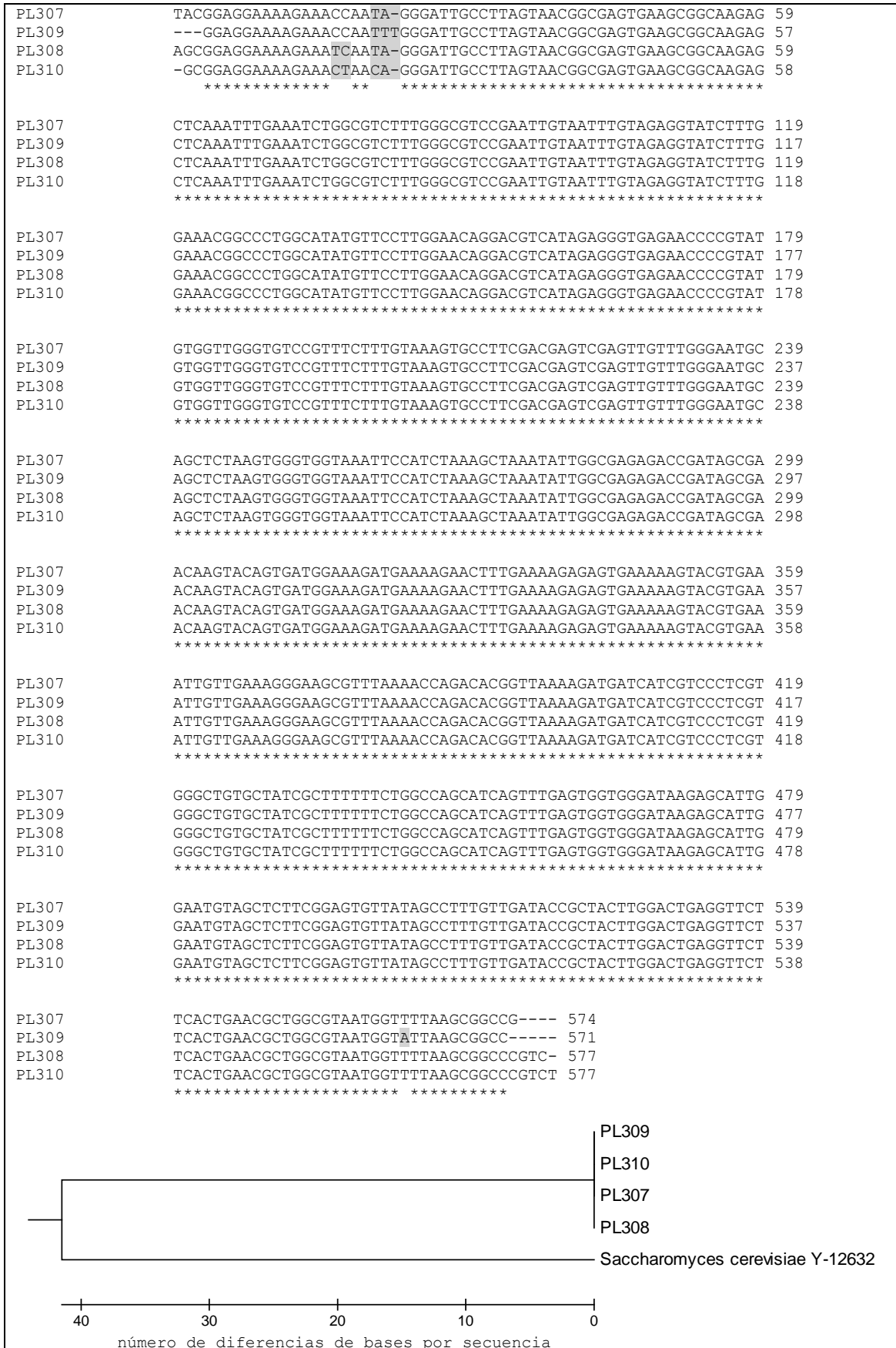
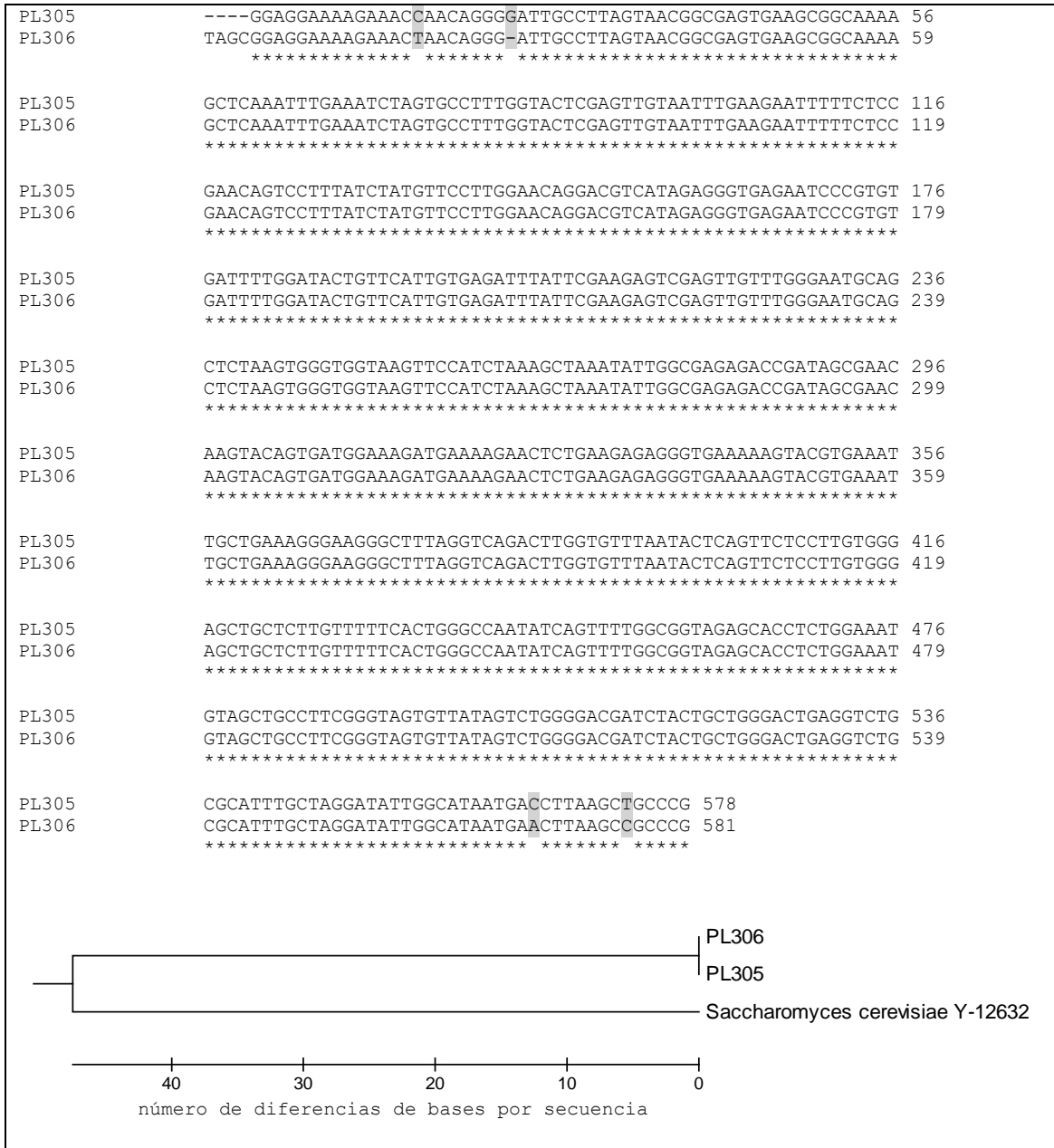


Figura III-19. Alineamiento de las secuencias de los amplicones del gen del rRNA 26S y dendrograma (UPGMA) para los aislados de *Arthroascus schoenii*



En la FIGURA III-16 se muestran alineadas las secuencias de los 8 aislados *C. ishiwadae* y se observa que 6 de estos aislados (CP19, CP23, TN8.2b, TN8.2d, TN3.1a y TN3.2b) presentaron la misma secuencia consenso, mientras que los dos aislados del aire (CPA1 y CPA2) presentaron dos mutaciones (posiciones 70 y 73 de la FIGURA III-16), una delección (posición 81), además de una delección seguida de una mutación en CPA2, respectivamente en las posiciones 93 y 94, con respecto a los otros aislados, lo cual indica que se trataban de dos cepas distintas que se encontraban en la bodega en el periodo de enero de 2009.

Los tres aislados de la especie *Pichia mandshurica* identificados en esta tesis provenían de una misma muestra de vino, y como se muestra en la FIGURA III-17, el alineamiento de las secuencias de los amplicones correspondientes mostraron diferencias de 5 cambios de bases en la secuencia de PL553 con respecto a PL551 y PL552, lo cual indica que al menos se trataban de dos clones distintos de la misma especie y que coexistían en la misma muestra de vino (muestra de vino PCA16 de la TABLA III-8) en una población mixta que además contenía levaduras de la especie *T. cantarellii*.

La muestra de vino PCA2 presentó una población mixta muy variada que incluía levaduras *Saccharomyces* de crecimiento rápido y levaduras de las especies *T. variabilis* y *A. schoenii*. En la FIGURA III-18 y en la FIGURA III-19 se reflejan los alineamientos y dendrogramas obtenidos respectivamente para *T. variabilis* y *A. schoenii*. En ambos casos los aislados presentaban una diferencia de 4 cambios de bases entre las secuencias de los aislados de la misma especie. En el caso de los 4 aislados *T. variabilis*, como puede verse en la FIGURA III-18, todos ellos difieren entre sí en 1-4 cambios de bases, por lo que corresponderían a 4 clones distintos de la misma especie que coexistían en el mismo vino. Los 2 aislados *A. schoenii* también difieren entre si en 4 cambios de bases, por lo que corresponderían a dos clones distintos que se encontraban coexistiendo en la población mixta de levaduras en el vino, que alcanzaba unos recuentos totales de $3,2 \cdot 10^2$ UFC/mL (TABLA III-8).

3.4. Caracterización genotípica y fenotípica de la levadura *T. cantarellii*

Tras el análisis microbiológico, reflejado anteriormente en la TABLA III-8, y reaislamiento de colonias, se llevó a cabo la identificación a nivel molecular de los aislados, y la comparación de las secuencias obtenidas de la especie *Trigonopsis cantarellii* permitió poner a punto un método específico para la identificación por PCR de esta especie de levaduras.

3.4.1. PCR convencional específica para identificación de la levadura vínica

Trigonopsis cantarellii

Los resultados obtenidos a partir de la secuenciación del producto de PCR del gen del RNAr 26S fueron analizados y se seleccionaron 24 secuencias para el diseño de primers específicos. Los primers se eligieron de un tamaño de 20 bases cada uno; a continuación se presentan sus secuencias y los nombres asignados:

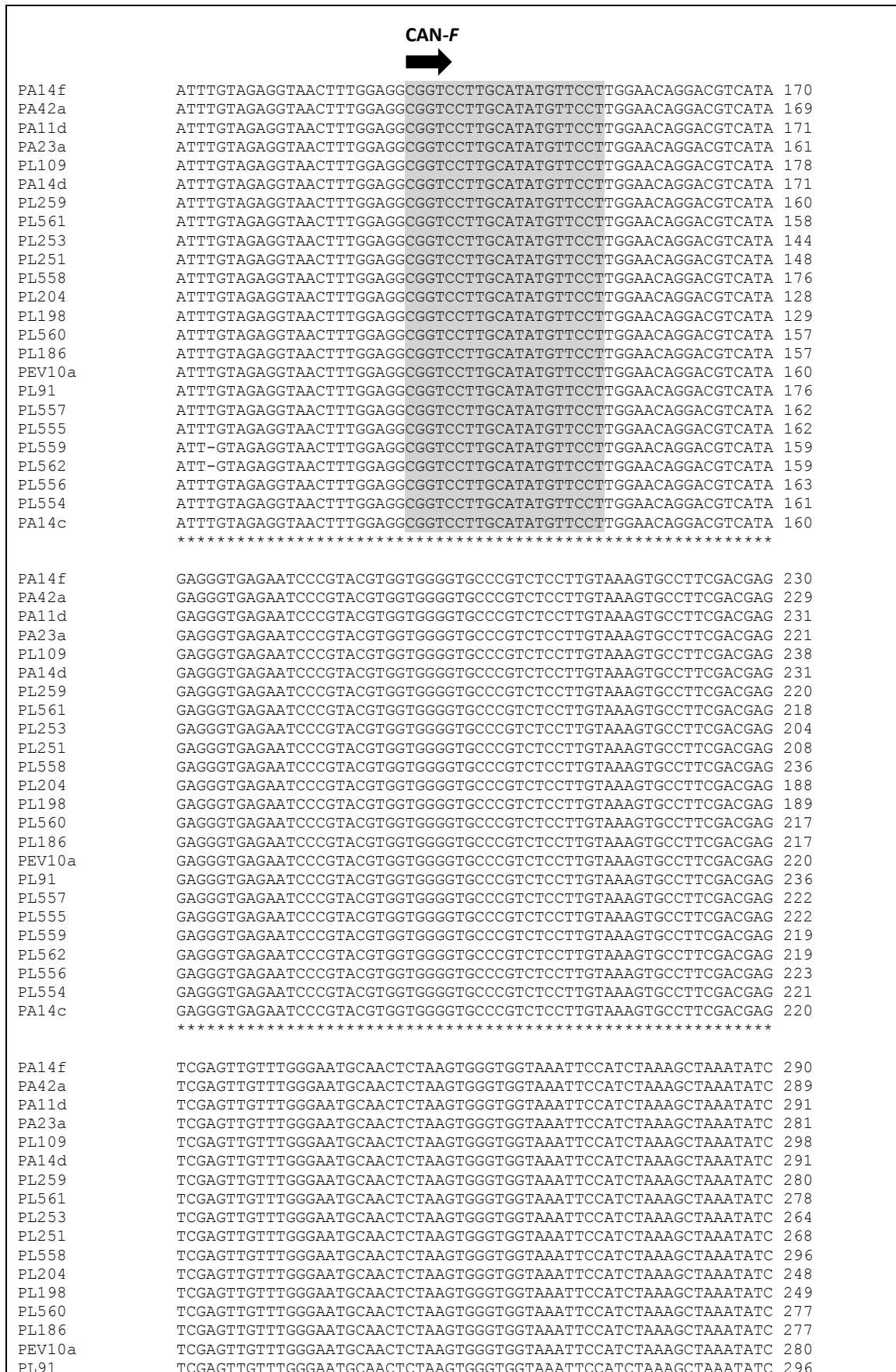
Secuencia forward (CAN-F): 5'-CGG TCC TTG CAT ATG TTC CT-3' (T_m = 60,0 °C)

Secuencia reverse (CAN-92): 5'-GGT AGC TGA TCA CCG AAA GC-3' (T_m = 59,8 °C)

La FIGURA III-20 ilustra el alineamiento de las secuencias de los amplicones de los 24 aislados de la especie *T. cantarellii* seleccionadas así como la localización de CAN-F y CAN-92 en el fragmento de 290 pares de bases. Tras probar diferentes temperaturas de hibridación, se adoptó el siguiente protocolo de amplificación para la identificación específica de *T. cantarellii*:


desnaturalización inicial a 95 °C (5 minutos)	35 ciclos
desnaturalización a 95 °C (1 minuto)	
hibridación a 67,5 °C (1 minuto)	
extensión a 72 °C (45 segundos)	
extensión final a 72 °C (5 minutos)	

Figura III-20. Alineamiento de secuencias de los amplicones del gen del RNAr 26S de aislados de *T. cantarellii* y localización de los primers CAN-F/CAN-92



PL557	TCGAGTTGTTTGGGAATGCAACTCTAAGTGGGTGGTAAATTCATCTAAAGCTAAATATC	282
PL555	TCGAGTTGTTTGGGAATGCAACTCTAAGTGGGTGGTAAATTCATCTAAAGCTAAATATC	282
PL559	TCGAGTTGTTTGGGAATGCAACTCTAAGTGGGTGGTAAATTCATCTAAAGCTAAATATC	279
PL562	TCGAGTTGTTTGGGAATGCAACTCTAAGTGGGTGGTAAATTCATCTAAAGCTAAATATC	279
PL556	TCGAGTTGTTTGGGAATGCAACTCTAAGTGGGTGGTAAATTCATCTAAAGCTAAATATC	283
PL554	TCGAGTTGTTTGGGAATGCAACTCTAAGTGGGTGGTAAATTCATCTAAAGCTAAATATC	281
PA14c	TCGAGTTGTTTGGGAATGCAACTCTAAGTGGGTGGTAAATTCATCTAAAGCTAAATATC *****	280
PA14f	AGCGAGAGACCCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGAACTTTGAAAAGA	350
PA42a	AGCGAGAGACCCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGAACTTTGAAAAGA	349
PA11d	AGCGAGAGACCCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGAACTTTGAAAAGA	351
PA23a	AGCGAGAGACCCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGAACTTTGAAAAGA	341
PL109	AGCGAGAGACCCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGAACTTTGAAAAGA	358
PA14d	AGCGAGAGACCCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGAACTTTGAAAAGA	351
PL259	AGCGAGAGACCCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGAACTTTGAAAAGA	340
PL561	AGCGAGAGACCCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGAACTTTGAAAAGA	338
PL253	AGCGAGAGACCCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGAACTTTGAAAAGA	324
PL251	AGCGAGAGACCCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGAACTTTGAAAAGA	328
PL558	AGCGAGAGACCCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGAACTTTGAAAAGA	356
PL204	AGCGAGAGACCCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGAACTTTGAAAAGA	308
PL198	AGCGAGAGACCCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGAACTTTGAAAAGA	309
PL560	AGCGAGAGACCCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGAACTTTGAAAAGA	337
PL186	AGCGAGAGACCCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGAACTTTGAAAAGA	337
PEV10a	AGCGAGAGACCCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGAACTTTGAAAAGA	340
PL91	AGCGAGAGACCCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGAACTTTGAAAAGA	356
PL557	AGCGAGAGACCCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGAACTTTGAAAAGA	342
PL555	AGCGAGAGACCCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGAACTTTGAAAAGA	342
PL559	AGCGAGAGACCCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGAACTTTGAAAAGA	339
PL562	AGCGAGAGACCCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGAACTTTGAAAAGA	339
PL556	AGCGAGAGACCCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGAACTTTGAAAAGA	343
PL554	AGCGAGAGACCCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGAACTTTGAAAAGA	341
PA14c	AGCGAGAGACCCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGAACTTTGAAAAGA *****	340
PA14f	GAGTGAAACAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGCCTTTGAGATCAGACATGGCTTTCG	410
PA42a	GAGTGAAACAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGCCTTTGAGATCAGACATGGCTTTCG	409
PA11d	GAGTGAAACAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGCCTTTGAGATCAGACATGGCTTTCG	411
PA23a	GAGTGAAACAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGCCTTTGAGATCAGACATGGCTTTCG	401
PL109	GAGTGAAACAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGCCTTTGAGATCAGACATGGCTTTCG	418
PA14d	GAGTGAAACAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGCCTTTGAGATCAGACATGGCTTTCG	411
PL259	GAGTGAAACAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGCCTTTGAGATCAGACATGGCTTTCG	400
PL561	GAGTGAAACAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGCCTTTGAGATCAGACATGGCTTTCG	398
PL253	GAGTGAAACAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGCCTTTGAGATCAGACATGGCTTTCG	384
PL251	GAGTGAAACAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGCCTTTGAGATCAGACATGGCTTTCG	388
PL558	GAGTGAAACAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGCCTTTGAGATCAGACATGGCTTTCG	416
PL204	GAGTGAAACAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGCCTTTGAGATCAGACATGGCTTTCG	368
PL198	GAGTGAAACAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGCCTTTGAGATCAGACATGGCTTTCG	369
PL560	GAGTGAAACAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGCCTTTGAGATCAGACATGGCTTTCG	397
PL186	GAGTGAAACAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGCCTTTGAGATCAGACATGGCTTTCG	397
PEV10a	GAGTGAAACAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGCCTTTGAGATCAGACATGGCTTTCG	400
PL91	GAGTGAAACAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGCCTTTGAGATCAGACATGGCTTTCG	416
PL557	GAGTGAAACAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGCCTTTGAGATCAGACATGGCTTTCG	402
PL555	GAGTGAAACAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGCCTTTGAGATCAGACATGGCTTTCG	402
PL559	GAGTGAAACAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGCCTTTGAGATCAGACATGGCTTTCG	399
PL562	GAGTGAAACAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGCCTTTGAGATCAGACATGGCTTTCG	399
PL556	GAGTGAAACAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGCCTTTGAGATCAGACATGGCTTTCG	403
PL554	GAGTGAAACAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGCCTTTGAGATCAGACATGGCTTTCG	401
PA14c	GAGTGAAACAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGCCTTTGAGATCAGACATGGCTTTCG *****	400
PA14f	GTGATCAGTACCCTTCGTGGGTGGTGCACCTCGCCGTTGGCTGGGCCAACATCGGTTCCG	470
PA42a	GTGATCAGTACCCTTCGTGGGTGGTGCACCTCGCCGTTGGCTGGGCCAACATCGGTTCCG	469
PA11d	GTGATCAGTACCCTTCGTGGGTGGTGCACCTCGCCGTTGGCTGGGCCAACATCGGTTCCG	471
PA23a	GTGATCAGTACCCTTCGTGGGTGGTGCACCTCGCCGTTGGCTGGGCCAACATCGGTTCCG	461
PL109	GTGATCAGTACCCTTCGTGGGTGGTGCACCTCGCCGTTGGCTGGGCCAACATCGGTTCCG	478
PA14d	GTGATCAGTACCCTTCGTGGGTGGTGCACCTCGCCGTTGGCTGGGCCAACATCGGTTCCG	471
PL259	GTGATCAGTACCCTTCGTGGGTGGTGCACCTCGCCGTTGGCTGGGCCAACATCGGTTCCG	460
PL561	GTGATCAGTACCCTTCGTGGGTGGTGCACCTCGCCGTTGGCTGGGCCAACATCGGTTCCG	458
PL253	GTGATCAGTACCCTTCGTGGGTGGTGCACCTCGCCGTTGGCTGGGCCAACATCGGTTCCG	444
PL251	GTGATCAGTACCCTTCGTGGGTGGTGCACCTCGCCGTTGGCTGGGCCAACATCGGTTCCG	448
PL558	GTGATCAGTACCCTTCGTGGGTGGTGCACCTCGCCGTTGGCTGGGCCAACATCGGTTCCG	476
PL204	GTGATCAGTACCCTTCGTGGGTGGTGCACCTCGCCGTTGGCTGGGCCAACATCGGTTCCG	428
PL198	GTGATCAGTACCCTTCGTGGGTGGTGCACCTCGCCGTTGGCTGGGCCAACATCGGTTCCG	429
PL560	GTGATCAGTACCCTTCGTGGGTGGTGCACCTCGCCGTTGGCTGGGCCAACATCGGTTCCG	457
PL186	GTGATCAGTACCCTTCGTGGGTGGTGCACCTCGCCGTTGGCTGGGCCAACATCGGTTCCG	457
PEV10a	GTGATCAGTACCCTTCGTGGGTGGTGCACCTCGCCGTTGGCTGGGCCAACATCGGTTCCG	460

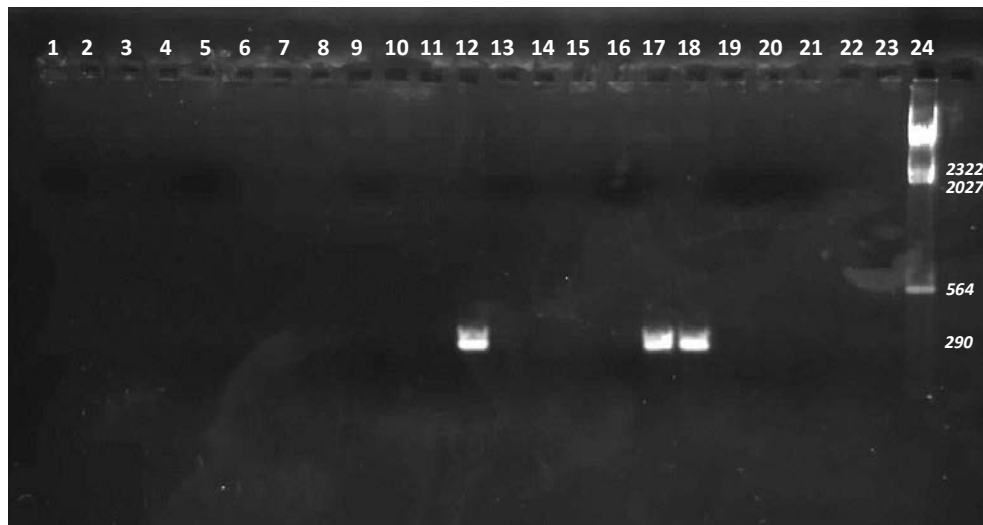
PL91	GTGATCAGCTACCCTTCGTGGGTGGTGCCTCGCCGTTGGCTGGGCCAACATCGGTTCCG	476
PL557	GTGATCAGCTACCCTTCGTGGGTGGTGCCTCGCCGTTGGCTGGGCCAACATCGGTTCCG	462
PL555	GTGATCAGCTACCCTTCGTGGGTGGTGCCTCGCCGTTGGCTGGGCCAACATCGGTTCCG	462
PL559	GTGATCAGCTACCCTTCGTGGGTGGTGCCTCGCCGTTGGCTGGGCCAACATCGGTTCCG	459
PL562	GTGATCAGCTACCCTTCGTGGGTGGTGCCTCGCCGTTGGCTGGGCCAACATCGGTTCCG	459
PL556	GTGATCAGCTACCCTTCGTGGGTGGTGCCTCGCCGTTGGCTGGGCCAACATCGGTTCCG	463
PL554	GTGATCAGCTACCCTTCGTGGGTGGTGCCTCGCCGTTGGCTGGGCCAACATCGGTTCCG	461
PA14c	GTGATCAGCTACCCTTCGTGGGTGGTGCCTCGCCGTTGGCTGGGCCAACATCGGTTCCG	460


CAN-92

La especificidad de la reacción de PCR fue contrastada frente a 15 especies distintas de levaduras vínicas y 16 aislados previamente identificados como *T. cantarellii* en este trabajo. La **FIGURA III-21** muestra el resultado en gel de agarosa de los productos obtenidos en la reacción frente a 15 especies de levaduras vínicas (**TABLA II-2**). En ninguno de los casos hubo producción de banda de amplificación, mientras que los controles positivos presentaron bandas bien definidas con 290 pares de bases. Para comprobar la especificidad de la PCR específica, se ha llevado a cabo también una comparación con la especie más próxima filogenéticamente de *T. cantarellii* (Kurtzman 2007), la levadura *T. variabilis*, utilizándose 4 cepas aisladas en este trabajo y una cepa-tipo de referencia. Como se puede ver en la **Figura III-22**, en todas las cepas de *T. variabilis* no se detectaron bandas de amplificación.

En la **FIGURA III-21** se presenta el resultado en gel de agarosa de los productos obtenidos en la reacción frente a 16 aislados de *T. cantarellii* recogidos en la **TABLA II-2**.

Figura III-21. Fotografía del gel de agarosa y bromuro de etidio con las amplificaciones obtenidas mediante PCR convencional específica para *T. cantarellii* de cepas de levaduras vínicas



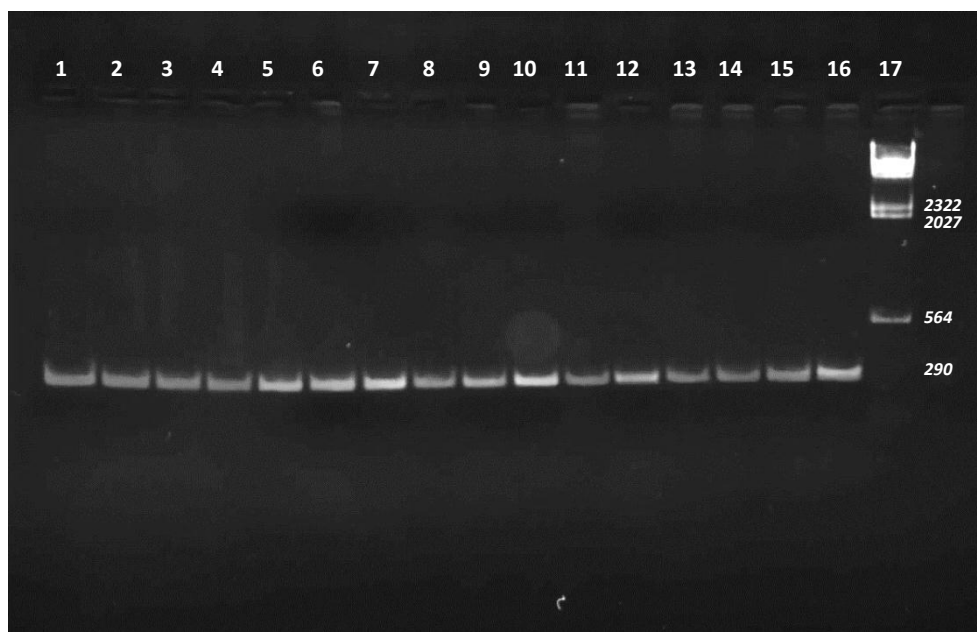
(1) *Saccharomyces bayanus* CECT-11035, (2) *Saccharomyces ellipsoideus* CECT1887, (3) *Saccharomyces cerevisiae* CECT-1678, (4) *Meyerozyma guilliermondii* CPA-4, (5) *Nakazawaea holstii* PEV45c, (6) *Pichia mandshurica* PL551, (7) *Hanseniaspora uvarum* CECT-12946, (8) *Candida ishiwadae* CP23, (9) *Wickerhamomyces anomalus* CECT-12765, (10) *Metschnikowia pulcherrima* CECT-12825, (11) *Kluyveromyces dobzhanskii* CECT-1952, (13) *Schizosaccharomyces pombe* C198, (14) *Zygoascus hellenicus* CECT-11163, (15) *Zygosaccharomyces veronae* CECT-1679, (16) *Pichia membranifacies* CECT-1115, (12, 17, 18) controles positivos *T. cantarellii*, (19) *B. bruxellensis* BY24, (20) *B. bruxellensis* CECT-1009, (21 – 23) controles negativos, (24) marcador λ -Hind III.

Figura III-22. Fotografía del gel de agarosa y bromuro de etidio con las amplificaciones obtenidas mediante PCR convencional específica para *T. cantarellii* de cepas de *T. variabilis*



(1) *T. variabilis* PL307, (2) *T. variabilis* PL308, (3) *T. variabilis* PL309, (4) *T. variabilis* PL310, (5) *T. variabilis* CECT-1933, (6 - 7) controles positivos *T. cantarellii*, (8 - 10) controles negativos, (11) marcador λ -Hind III.

Figura III-23. Fotografía del gel de agarosa y bromuro de etidio con las amplificaciones obtenidas mediante PCR convencional específica para *T. cantarellii*



(1 – 16) Cepas de *T. cantarellii*, (17) marcador λ -Hind III.

Muchos de los métodos tradicionales propuestos para detección de levaduras relacionadas con los procesos de producción del vino se basan en el cultivo en medios sólidos selectivos y son los más comúnmente utilizados en bodegas. Como ya se ha visto en el apartado 1.3 (RESULTADOS Y DISCUSIÓN, CAPÍTULO 1) el método de cultivo es dependiente de las características fisiológicas de los microorganismos y de su capacidad en crecer en esas condiciones, y en nuestro caso (TABLA III-2) aparecieron hasta un 31,8 % de falsos negativos y 4,9 % de falsos positivos. Otro punto que puede llevar a conclusiones equívocas, especialmente en el caso de las levaduras contaminantes *Brettanomyces* y *T. cantarellii* es que presentan un crecimiento lento y la estimación de su presencia puede verse subestimada si no se respetan los días de incubación necesarios para realizar los recuentos de colonias. Por esta razón, la puesta a punto de este método rápido de detección por PCR permite por un lado la clasificación taxonómica rápida y eficaz de aislados de la especie *T. cantarellii*, y por otro lado, el diagnóstico de la presencia de esta levadura que podría ser potencialmente alterante de los vinos como se ha visto en un apartado anterior.

Previamente a este estudio, Renouf et al. (2006) propusieron un perfil de identificación por PCR-DGGE basado en el protocolo de Cocolin et al. (2000) y que, entre otras especies de levaduras, también

incluía *T. cantarellii*. Sin embargo, el método de análisis por PCR diseñado en este trabajo permite la identificación específica rápida de *T. cantarellii*, conlleva un número menor de etapas de análisis ya que se evita la electroforesis, y constituye una herramienta muy útil para la detección e identificación de esa levadura.

3.4.2. Caracterización de aislados de la especie *Trigonopsis cantarellii*

El alineamiento de las secuencias obtenidas para los 41 aislados de *Trigonopsis cantarellii* estudiados se muestran en la FIGURA III-24, en la cual es posible distinguir diferencias, aunque es importante subrayar que el estudio de una única secuencia génica no nos permite determinar definitivamente el número de clones distintos dentro de la misma especie.

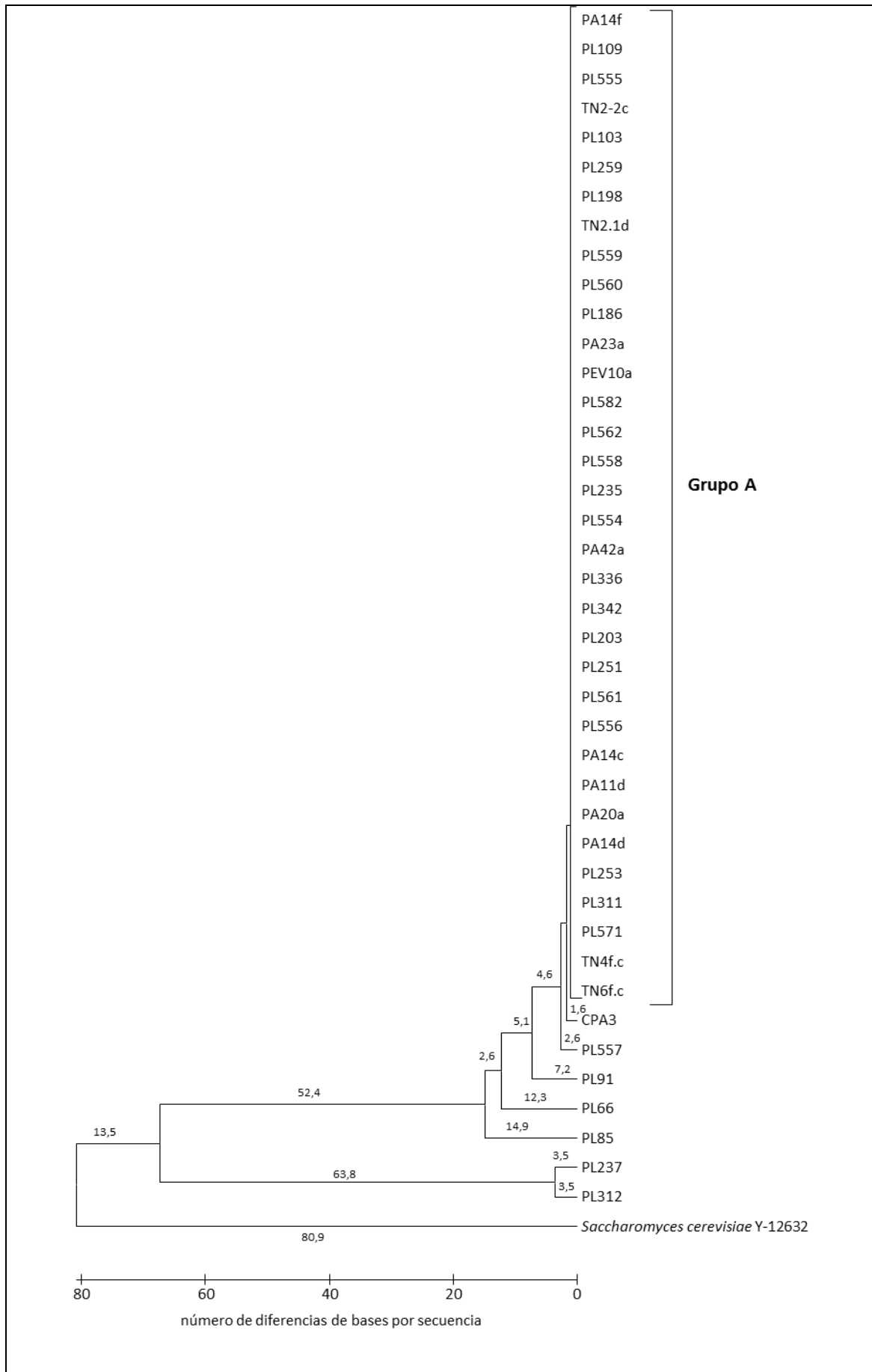
Figura III-24. Alineamiento de las secuencias del amplicón del gen del RNAr 26S y dendrograma (UPGMA) para los aislados de *Trigonopsis cantarellii*.

PA14d	TTG-----GGAATGCAACTCT--AAGTGGGTGGTA	268
PL235	TTG-----GGAATGCAACTCT--AAGTGGGTGGTA	231
TN2.1d	TTG-----GGAATGCAACTCT--AAGTGGGTGGTA	261
PL571	TTG-----ATGTCTCT--GCCTGCGTGGTA	241
TN6f.c	-----	
PL311	CTG-----ACCACTCA--GACTGGGTGGTA	192
PA14c	TTGTAAGTGCCTTCGACGAGTCGAGTTGTTGGGAATGCAACTCT--AAGTGGGTGGTA	797
PL203	TTG-----GGAATGCAACTCT--AAGTGGGTGGTA	225
PA42a	TTG-----GGAATGCAACTCT--AAGTGGGTGGTA	266
PA14f	TTG-----GGAATGCAACTCT--AAGTGGGTGGTA	267
PA11d	TTG-----GGAATGCAACTCT--AAGTGGGTGGTA	268
PA23a	TTG-----GGAATGCAACTCT--AAGTGGGTGGTA	258
PL253	TTG-----GGAATGCAACTCT--AAGTGGGTGGTA	241
PA20a	TTG-----GGAATGCAACTCT--AAGTGGGTGGTA	240
PL560	TTG-----GGAATGCAACTCT--AAGTGGGTGGTA	254
PL198	TTG-----GGAATGCAACTCT--AAGTGGGTGGTA	226
PL558	TTG-----GGAATGCAACTCT--AAGTGGGTGGTA	273
PL347	TTG-----GGAATGCAACTCT--AAGTGGGTGGTA	209
PL336	TTG-----GGAATGCAACTCT--AAGTGGGTGGTA	253
PL555	TTG-----GGAATGCAACTCT--AAGTGGGTGGTA	259
PL186	TTG-----GGAATGCAACTCT--AAGTGGGTGGTA	254
TN2-2c	TTG-----GGAATGCAACTCT--AAGTGGGTGGTA	255
PL561	TTG-----GGAATGCAACTCT--AAGTGGGTGGTA	255
PL342	TTG-----GGAATGCAACTCT--AAGTGGGTGGTA	256
PL582	TTG-----GGAATGCAACTCT--AAGTGGGTGGTA	252
PL251	TTG-----GGAATGCAACTCT--AAGTGGGTGGTA	245
PEV10a	TTG-----GGAATGCAACTCT--AAGTGGGTGGTA	257
PL559	TTG-----GGAATGCAACTCT--AAGTGGGTGGTA	256
TN4f.c	TTG-----GGAATGCAACTCT--AAGTGGGTGGTA	271
PL259	TTG-----GGAATGCAACTCT--AAGTGGGTGGTA	257
PL562	TTG-----GGAATGCAACTCT--AAGTGGGTGGTA	256
PL556	TTG-----GGAATGCAACTCT--AAGTGGGTGGTA	260
PL557	TTG-----GGAATGCAACTCT--AAGTGGGTGGTA	259
CPA3	TTG-----GGAATGCAACTCT--AAGTGGGTGGTA	170
PL554	TTG-----GGAATGCAACTCT--AAGTGGGTGGTA	258
PL91	TTG-----GGAATGCAACTCT--AAGTGGGTGGTA	273

PL66	TTG-----GGAATGCAACTCT--AAGTGGGTGGTA	271
PL109	TTG-----GGAATGCAACTCT--AAGTGGGTGGTA	275
PL85	TTG-----GGAATGCAACTCT--AAGTGGGTGGTA	277
PL237	TTC-----AACAAATTC--ACGTACTGTTTC	240
PL312	TTA-----TACGATTTTGTATTGCATACCC	223
PA14d	AATTCCATCTAAAGCTAAATATCAGCGAGAGACCGATAGCG-AACAAGTACAGTGTGGA	327
PL235	AATTCCATCTAAAGCTAAATATCAGCGAGAGACCGATAGCG-AACAAGTACAGTGTGGA	290
TN2.1d	AATTCCATCTAAAGCTAAATATCAGCGAGAGACCGATAGCG-AACAAGTACAGTGTGGA	320
PL571	AAATCCCTATACTTGTAACTATCACCAGAGACCGATAGCG-AACAAGTACAGTGTGGA	300
TN6f.c	-----CACCAAGAGACCGATAGCG-AACAAGTACAGTGTGGA	37
PL311	AAATCCATATAAATGTAAATATCAGCGAGAGACCGATAGCG-AACAAGTACAGTGTGGA	251
PA14c	AATTCCATCTAAAGCTAAATATCAGCGAGAGACCGATAGCG-AACAAGTACAGTGTGGA	856
PL203	AATTCCATCTAAAGCTAAATATCAGCGAGAGACCGATAGCG-AACAAGTACAGTGTGGA	284
PA42a	AATTCCATCTAAAGCTAAATATCAGCGAGAGACCGATAGCG-AACAAGTACAGTGTGGA	325
PA14f	AATTCCATCTAAAGCTAAATATCAGCGAGAGACCGATAGCG-AACAAGTACAGTGTGGA	326
PA11d	AATTCCATCTAAAGCTAAATATCAGCGAGAGACCGATAGCG-AACAAGTACAGTGTGGA	327
PA23a	AATTCCATCTAAAGCTAAATATCAGCGAGAGACCGATAGCG-AACAAGTACAGTGTGGA	317
PL253	AATTCCATCTAAAGCTAAATATCAGCGAGAGACCGATAGCG-AACAAGTACAGTGTGGA	300
PA20a	AATTCCATCTAAAGCTAAATATCAGCGAGAGACCGATAGCG-AACAAGTACAGTGTGGA	299
PL560	AATTCCATCTAAAGCTAAATATCAGCGAGAGACCGATAGCG-AACAAGTACAGTGTGGA	313
PL198	AATTCATCTAAAGCTAAATATCAGCGAGAGACCGATAGCG-AACAAGTACAGTGTGGA	285
PL558	AATTCCATCTAAAGCTAAATATCAGCGAGAGACCGATAGCG-AACAAGTACAGTGTGGA	332
PL347	AATTCCATCTAAAGCTAAATATCAGCGAGAGACCGATAGCG-AACAAGTACAGTGTGGA	268
PL336	AATTCCATCTAAAGCTAAATATCAGCGAGAGACCGATAGCG-AACAAGTACAGTGTGGA	312
PL555	AATTCATCTAAAGCTAAATATCAGCGAGAGACCGATAGCG-AACAAGTACAGTGTGGA	318
PL186	AATTCCATCTAAAGCTAAATATCAGCGAGAGACCGATAGCG-AACAAGTACAGTGTGGA	313
TN2-2c	AATTCCATCTAAAGCTAAATATCAGCGAGAGACCGATAGCG-AACAAGTACAGTGTGGA	314
PL561	AATTCCATCTAAAGCTAAATATCAGCGAGAGACCGATAGCG-AACAAGTACAGTGTGGA	314
PL342	AATTCATCTAAAGCTAAATATCAGCGAGAGACCGATAGCG-AACAAGTACAGTGTGGA	315
PL582	AATTCCATCTAAAGCTAAATATCAGCGAGAGACCGATAGCG-AACAAGTACAGTGTGGA	311
PL251	AATTCCATCTAAAGCTAAATATCAGCGAGAGACCGATAGCG-AACAAGTACAGTGTGGA	304
PEV10a	AATTCCATCTAAAGCTAAATATCAGCGAGAGACCGATAGCG-AACAAGTACAGTGTGGA	316
PL559	AATTCCATCTAAAGCTAAATATCAGCGAGAGACCGATAGCG-AACAAGTACAGTGTGGA	315
TN4f.c	AATTCATCTAAAGCTAAATATCACCAGAGACCGATAGCG-AACAAGTACAGTGTGGA	330
PL259	AATTCCATCTAAAGCTAAATATCAGCGAGAGACCGATAGCG-AACAAGTACAGTGTGGA	316
PL562	AATTCCATCTAAAGCTAAATATCAGCGAGAGACCGATAGCG-AACAAGTACAGTGTGGA	315
PL556	AATTCCATCTAAAGCTAAATATCAGCGAGAGACCGATAGCG-AACAAGTACAGTGTGGA	319
PL557	AATTCCATCTAAAGCTAAATATCAGCGAGAGACCGATAGCG-AACAAGTACAGTGTGGA	318
CPA3	AATTCCATCTAAAGCTAAATATCAGCGAGAGACCGATAGCG-AACAAGTACAGTGTGGA	229
PL554	AATTCCATCTAAAGCTAAATATCAGCGAGAGACCGATAGCG-AACAAGTACAGTGTGGA	317
PL91	AATTCCATCTAAAGCTAAATATCAGCGAGAGACCGATAGCG-AACAAGTACAGTGTGGA	332
PL66	AATTCATCTAAAGCTAAATATCACCAGAGACCGATAGCG-AACAAGTACAGTGTGGA	330
PL109	AATTCCATCTAAAGCTAAATATCAGCGAGAGACCGATAGCG-AACAAGTACAGTGTGGA	334
PL85	AATTCCATCTAAAGCTAAATATCAGCGAGAGACCGATAGCG-AACAAGTACAGTGTGGA	336
PL237	ACTCTCTTTTCAAAGT---TCTTTTCATCTTTCCATCACGTGTA-CTTGTTCGCTATCGGT	296
PL312	AACC-CGGCCCAACT---TTTCCCAGCTTACCAGATATGCAACTTGTTCGCTATCGGT	279
	* ** * * * * * * * * *	
PA14d	AA---GATGAAAAG-AAC TTTGAAAAGAGAGTGAACAGTACGTGAAATTG--TTGAAAAG	381
PL235	AA---GATGAAAAG-AAC TTTGAAAAGAGAGTGAACAGTACGTGAAATTG--TTGAAAAG	344
TN2.1d	AA---GATGAAAAG-AAC TTTGAAAAGAGAGTGAACAGTACGTGAAATTG--TTGAAAAG	374
PL571	AA---GATGAAAAG-AAC TTTGAAAAGAGAGTGAACAGTACGTGAAATTG--TTGAAAAG	354
TN6f.c	AA---GATGAAAAG-AAC TTTGAAAAGAGAGTGAACAGTACGTGAAATTG--TTGAAAAG	91
PL311	AA---GATGAAAAG-AAC TTTGAAAAGAGAGTGAACAGTACGTGAAATTG--TTGAAAAG	305
PA14c	AA---GATGAAAAG-AAC TTTGAAAAGAGAGTGAACAGTACGTGAAATTG--TTGAAAAG	910
PL203	AA---GATGAAAAG-AAC TTTGAAAAGAGAGTGAACAGTACGTGAAATTG--TTGAAAAG	338
PA42a	AA---GATGAAAAG-AAC TTTGAAAAGAGAGTGAACAGTACGTGAAATTG--TTGAAAAG	379
PA14f	AA---GATGAAAAG-AAC TTTGAAAAGAGAGTGAACAGTACGTGAAATTG--TTGAAAAG	380
PA11d	AA---GATGAAAAG-AAC TTTGAAAAGAGAGTGAACAGTACGTGAAATTG--TTGAAAAG	381
PA23a	AA---GATGAAAAG-AAC TTTGAAAAGAGAGTGAACAGTACGTGAAATTG--TTGAAAAG	371
PL253	AA---GATGAAAAG-AAC TTTGAAAAGAGAGTGAACAGTACGTGAAATTG--TTGAAAAG	354
PA20a	AA---GATGAAAAG-AAC TTTGAAAAGAGAGTGAACAGTACGTGAAATTG--TTGAAAAG	353
PL560	AA---GATGAAAAG-AAC TTTGAAAAGAGAGTGAACAGTACGTGAAATTG--TTGAAAAG	367
PL198	AA---GATGAAAAG-AAC TTTGAAAAGAGAGTGAACAGTACGTGAAATTG--TTGAAAAG	339
PL558	AA---GATGAAAAG-AAC TTTGAAAAGAGAGTGAACAGTACGTGAAATTG--TTGAAAAG	386
PL347	AA---GATGAAAAG-AAC TTTGAAAAGAGAGTGAACAGTACGTGAAATTG--TTGAAAAG	322
PL336	AA---GATGAAAAG-AAC TTTGAAAAGAGAGTGAACAGTACGTGAAATTG--TTGAAAAG	366
PL555	AA---GATGAAAAG-AAC TTTGAAAAGAGAGTGAACAGTACGTGAAATTG--TTGAAAAG	372
PL186	AA---GATGAAAAG-AAC TTTGAAAAGAGAGTGAACAGTACGTGAAATTG--TTGAAAAG	367
TN2-2c	AA---GATGAAAAG-AAC TTTGAAAAGAGAGTGAACAGTACGTGAAATTG--TTGAAAAG	368
PL561	AA---GATGAAAAG-AAC TTTGAAAAGAGAGTGAACAGTACGTGAAATTG--TTGAAAAG	368
PL342	AA---GATGAAAAG-AAC TTTGAAAAGAGAGTGAACAGTACGTGAAATTG--TTGAAAAG	369
PL582	AA---GATGAAAAG-AAC TTTGAAAAGAGAGTGAACAGTACGTGAAATTG--TTGAAAAG	365
PL251	AA---GATGAAAAG-AAC TTTGAAAAGAGAGTGAACAGTACGTGAAATTG--TTGAAAAG	358
PEV10a	AA---GATGAAAAG-AAC TTTGAAAAGAGAGTGAACAGTACGTGAAATTG--TTGAAAAG	370

PL559	AA---GATGAAAAG-AACTTTGAAAAGAGAGTGAAACAGTACGTGAAATTG--TTGAAAAG	369
TN4f.c	AA---GATGAAAAG-AACTTTGAAAAGAGAGTGAAACAGTACGTGAAATTG--TTGAAAAG	384
PL259	AA---GATGAAAAG-AACTTTGAAAAGAGAGTGAAACAGTACGTGAAATTG--TTGAAAAG	370
PL562	AA---GATGAAAAG-AACTTTGAAAAGAGAGTGAAACAGTACGTGAAATTG--TTGAAAAG	369
PL556	AA---GATGAAAAG-AACTTTGAAAAGAGAGTGAAACAGTACGTGAAATTG--TTGAAAAG	373
PL557	AA---GATGAAAAG-AACTTTGAAAAGAGAGTGAAACAGTACGTGAAATTG--TTGAAAAG	372
CPA3	AA---GATGAAAAG-AACTTTGAAAAGAGAGTGAAAAGTACGTGAAATTG--TTGAAAAG	283
PL554	AA---GATGAAAAG-AACTTTGAAAAGAGAGTGAAACAGTACGTGAAATTG--TTGAAAAG	371
PL91	AA---GATGAAAAG-AACTTTGAAAAGAGAGTGAAACAGTACGTGAAATTG--TTGAAAAG	386
PL66	AA---GATGAAAAG-AACTTTGAAAAGAGAGTGAAACAGTACGTGAAATTG--TTGAAAAG	384
PL109	AA---GATGAAAAG-AACTTTGAAAAGAGAGTGAAACAGTACGTGAAATTG--TTGAAAAG	388
PL85	AA---GATGAAAAG-AACTTTGAAAAGAGAGTGAAACAGTACGTGAAATTG--TTGAAAAG	390
PL237	CTCTCGCTGATATTTAGCTTTAGATGGAATTTACCACC-CACTTAGAGTTGCATTCCCAA	355
PL312	CTCTCGCTGATATTTAGCTTTAGATGGAATTTACCACC-CACTTAGAGTTGCATTCCCAA	338
	* * * * *	
PA14d	GGAAGCCTTTGAG--ATCAGACATGGCTTTC--GGTGATCAGCTACCCTTCGTGGGTGGT	437
PL235	GGAAGCCTTTGAG--ATCAGACATGGCTTTC--GGTGATCAGCTACCCTTCGTGGGTGGT	400
TN2.1d	GGAAGCCTTTGAG--ATCAGACATGGCTTTC--GGTGATCAGCTACCCTTCGTGGGTGGT	430
PL571	GGAAGCCTTTGAG--ATCAGACATGGCTTTC--GGTGATCAGCTACCCTTCGTGGGTGGT	410
TN6f.c	GGAAGCCTTTGAG--ATCAGACATGGCTTTC--GGTGATCAGCTACCCTTCGTGGGTGGT	147
PL311	GGAAGCCTTTGAG--ATCAGACATGGCTTTC--GGTGATCAGCTACCCTTCGTGGGTGGT	361
PA14c	GGAAGCCTTTGAG--ATCAGACATGGCTTTC--GGTGATCAGCTACCCTTCGTGGGTGGT	966
PL203	GGAAGCCTTTGAG--ATCAGACATGGCTTTC--GGTGATCAGCTACCCTTCGTGGGTGGT	394
PA42a	GGAAGCCTTTGAG--ATCAGACATGGCTTTC--GGTGATCAGCTACCCTTCGTGGGTGGT	435
PA14f	GGAAGCCTTTGAG--ATCAGACATGGCTTTC--GGTGATCAGCTACCCTTCGTGGGTGGT	436
PA11d	GGAAGCCTTTGAG--ATCAGACATGGCTTTC--GGTGATCAGCTACCCTTCGTGGGTGGT	437
PA23a	GGAAGCCTTTGAG--ATCAGACATGGCTTTC--GGTGATCAGCTACCCTTCGTGGGTGGT	427
PL253	GGAAGCCTTTGAG--ATCAGACATGGCTTTC--GGTGATCAGCTACCCTTCGTGGGTGGT	410
PA20a	GGAAGCCTTTGAG--ATCAGACATGGCTTTC--GGTGATCAGCTACCCTTCGTGGGTGGT	409
PL560	GGAAGCCTTTGAG--ATCAGACATGGCTTTC--GGTGATCAGCTACCCTTCGTGGGTGGT	423
PL198	GGAAGCCTTTGAG--ATCAGACATGGCTTTC--GGTGATCAGCTACCCTTCGTGGGTGGT	395
PL558	GGAAGCCTTTGAG--ATCAGACATGGCTTTC--GGTGATCAGCTACCCTTCGTGGGTGGT	442
PL347	GGAAGCCTTTGAG--ATCAGACATGGCTTTC--GGTGATCAGCTACCCTTCGTGGGTGGT	378
PL336	GGAAGCCTTTGAG--ATCAGACATGGCTTTC--GGTGATCAGCTACCCTTCGTGGGTGGT	422
PL555	GGAAGCCTTTGAG--ATCAGACATGGCTTTC--GGTGATCAGCTACCCTTCGTGGGTGGT	428
PL186	GGAAGCCTTTGAG--ATCAGACATGGCTTTC--GGTGATCAGCTACCCTTCGTGGGTGGT	423
TN2-2c	GGAAGCCTTTGAG--ATCAGACATGGCTTTC--GGTGATCAGCTACCCTTCGTGGGTGGT	424
PL561	GGAAGCCTTTGAG--ATCAGACATGGCTTTC--GGTGATCAGCTACCCTTCGTGGGTGGT	424
PL342	GGAAGCCTTTGAG--ATCAGACATGGCTTTC--GGTGATCAGCTACCCTTCGTGGGTGGT	425
PL582	GGAAGCCTTTGAG--ATCAGACATGGCTTTC--GGTGATCAGCTACCCTTCGTGGGTGGT	421
PL251	GGAAGCCTTTGAG--ATCAGACATGGCTTTC--GGTGATCAGCTACCCTTCGTGGGTGGT	414
PEV10a	GGAAGCCTTTGAG--ATCAGACATGGCTTTC--GGTGATCAGCTACCCTTCGTGGGTGGT	426
PL559	GGAAGCCTTTGAG--ATCAGACATGGCTTTC--GGTGATCAGCTACCCTTCGTGGGTGGT	425
TN4f.c	GGAAGCCTTTGAG--ATCAGACATGGCTTTC--GGTGATCAGCTACCCTTCGTGGGTGGT	440
PL259	GGAAGCCTTTGAG--ATCAGACATGGCTTTC--GGTGATCAGCTACCCTTCGTGGGTGGT	426
PL562	GGAAGCCTTTGAG--ATCAGACATGGCTTTC--GGTGATCAGCTACCCTTCGTGGGTGGT	425
PL556	GGAAGCCTTTGAG--ATCAGACATGGCTTTC--GGTGATCAGCTACCCTTCGTGGGTGGT	429
PL557	GGAAGCCTTTGAG--ATCAGACATGGCTTTC--GGTGATCAGCTACCCTTCGTGGGTGGT	428
CPA3	GGAAGCCTTTGAG--ATCAGACATGGCTTTC--GGTGATCAGCTATCCTTC-TGGGTGGT	338
PL554	GGAAGCCTTTGAG--ATCAGACATGGCTTTC--GGTGATCAGCTACCCTTCGTGGGTGGT	427
PL91	GGAAGCCTTTGAG--ATCAGACATGGCTTTC--GGTGATCAGCTACCCTTCGTGGGTGGT	442
PL66	GGAAGCCTTTGAT--ATCATAATATGGCTTTC--GGCGATCAACTACCCATCGTG-----	434
PL109	GGAAGCCTTTGAG--ATCAGACATGGCTTTC--GGTGATCAGCTACCCTTCGTGGGTGGT	444
PL85	GGAAGCCTTTGAG--ATCAGACATGGCTTTC--GGTGATCAGCTACCCTTCGTGGGTGGT	446
PL237	ACAA---CTCGACTCGTCAAGGCACCTTTACAAGGAGACGGGCACCCACCACGTACGGG	412
PL312	ACAA---CTCGACTCGTCAAGGCACCTTTACAAGGAGACGGGCACCCACCACGTACGGG	395
	** * * * *	
PA14d	GCACTCGCCGTTGGCTGGGCCAACATCGGTTCCGGATGGTGGGATAAAA-AGC-ATTGG--A	493
PL235	GCACTCGCCGTTGGCTGGGCCAACATCGGTTCCGGATGGTGGGATAAAA-AGC-ATTGG--A	456
TN2.1d	GCACTCGCCGTTGGCTGGGCCAACATCGGTTCCGGATGGTGGGATAAAA-AGC-ATTGG--A	486
PL571	GCACTCGCAGTTGGCTGGGCCAACATCGGTTCCGGATGGTGGGATAAAA-AGC-ATTGG--A	466
TN6f.c	GCACTCGCCGTTGGCTGGGCCAACATCGGTTCCGGATGGTGGGATAAAA-AGC-ATTGG--A	203
PL311	GCACTCGCCGTTGGCTGGGCCAACATCGGTTCCGGATGGTGGGATAAAA-AGC-ATTGG--A	417
PA14c	GCACTCGCCGTTGGCTGGGCCAACATCGGTTCCGGATGGTGGGATAAAA-AGC-ATTGG--A	1022
PL203	GCACTCGCCGTTGGCTGGGCCAACATCGGTTCCGGATGGTGGGATAAAA-AGC-ATTGG--A	450
PA42a	GCACTCGCCGTTGGCTGGGCCAACATCGGTTCCGGATGGTGGGATAAAA-AGC-ATTGG--A	491
PA14f	GCACTCGCCGTTGGCTGGGCCAACATCGGTTCCGGATGGTGGGATAAAA-AGC-ATTGG--A	492
PA11d	GCACTCGCCGTTGGCTGGGCCAACATCGGTTCCGGATGGTGGGATAAAA-AGC-ATTGG--A	493
PA23a	GCACTCGCCGTTGGCTGGGCCAACATCGGTTCCGGATGGTGGGATAAAA-AGC-ATTGG--A	483
PL253	GCACTCGCCGTTGGCTGGGCCAACATCGGTTCCGGATGGTGGGATAAAA-AGC-ATTGG--A	466
PA20a	GCACTCGCCGTTGGCTGGGCCAACATCGGTTCCGGATGGTGGGATAAAA-AGC-ATTGG--A	465
PL560	GCACTCGCCGTTGGCTGGGCCAACATCGGTTCCGGATGGTGGGATAAAA-AGC-ATTGG--A	479
PL198	GCACTCGCCGTTGGCTGGGCCAACATCGGTTCCGGATGGTGGGATAAAA-AGC-ATTGG--A	451
PL558	GCACTCGCCGTTGGCTGGGCCAACATCGGTTCCGGATGGTGGGATAAAA-AGC-ATTGG--A	498
PL347	GCACTCGCCGTTGGCTGGGCCAACATCGGTTCCGGATGGTGGGATAAAA-AGC-ATTGG--A	434

PL336	GCACTCGCCGTTGGCTGGGCCAACATCGGTTCCGGATGGTGGGATAAA-AGC-ATTGG--A	478
PL555	GCACTCGCCGTTGGCTGGGCCAACATCGGTTCCGGATGGTGGGATAAA-AGC-ATTGG--A	484
PL186	GCACTCGCCGTTGGCTGGGCCAACATCGGTTCCGGATGGTGGGATAAA-AGC-ATTGG--A	479
TN2-2c	GCACTCGCCGTTGGCTGGGCCAACATCGGTTCCGGATGGTGGGATAAA-AGC-ATTGG--A	480
PL561	GCACTCGCCGTTGGCTGGGCCAACATCGGTTCCGGATGGTGGGATAAA-AGC-ATTGG--A	480
PL342	GCACTCGCCGTTGGCTGGGCCAACATCGGTTCCGGATGGTGGGATAAA-AGC-ATTGG--A	481
PL582	GCACTCGCCGTTGGCTGGGCCAACATCGGTTCCGGATGGTGGGATAAA-AGC-ATTGG--A	477
PL251	GCACTCGCCGTTGGCTGGGCCAACATCGGTTCCGGATGGTGGGATAAA-AGC-ATTGG--A	470
PEV10a	GCACTCGCCGTTGGCTGGGCCAACATCGGTTCCGGATGGTGGGATAAA-AGC-ATTGG--A	482
PL559	GCACTCGCCGTTGGCTGGGCCAACATCGGTTCCGGATGGTGGGATAAA-AGC-ATTGG--A	481
TN4f.c	GCACTCGCCGTTGGCTGGGCCAACATCGGTTCCGGATGGTGGGATAAA-AGC-ATTGG--A	496
PL259	GCACTCGCCGTTGGCTGGGCCAACATCGGTTCCGGATGGTGGGATAAA-AGC-ATTGG--A	482
PL562	GCACTCGCCGTTGGCTGGGCCAACATCGGTTCCGGATGGTGGGATAAA-AGC-ATTGG--A	481
PL556	GCACTCGCCGTTGGCTGGGCCAACATCGGTTCCGGATGGTGGGATAAA-AGC-ATTGG--A	485
PL557	GCACTCGCCGTTGGCTGGGCCAACATCGGTTCCGGATGGTGGGATAAA-AGC-ATTGG--A	486
CPA3	GCACTCGCCGTTGGCTGGGCCAACATCGGTTCCGGATGGTGGGATAAA-AGC-ATTGG--A	394
PL554	GCACTCGCCGTTGGCTGGGCCAACATCGGTTCCGGATGGTGGGATAAA-AGC-ATTGG--A	483
PL91	GCACTCGCCGTTGGCTGGGCCAACATCGGTTCCGGATGGAGGGATACACAGC-ATTGCACA	501
PL66	---TTCGCAGCACGCCATGACGGC--CTGTCCAA-----GGA-----A	468
PL109	GCACTCGCCGTTGGCTGGGCCAACATCGGTTCCGGATGGTGGGATAAA-AGC-ATTGG--A	500
PL85	GCACTCGCCGTTGGCTGGGCCAACATCGGTTCCGGATGGAGGGATACA-AGC-ATTGC--A	502
PL237	ATTCTCACCT---CTATGACGTC--CTGTCCAA-----GGAACATA-----TGC--A	454
PL312	ATTCTCACCT---CTATGACGTC--CTGTCCAA-----GGAACATA-----TGC--A	437
	** * * * * * * * * *	



Como se ve en el dendrograma de la FIGURA III-24, primeramente se puede diferenciar un grupo muy homogéneo (grupo A) que está compuesto de un total de 31 aislados provenientes de vinos tintos en proceso de crianza de la D.O. Ribera del Duero, 4 aislados de muestras de agua de lavado y una muestra de aire de bodega de la D.O. Ca. Rioja muestreados a lo largo de los 4 años del estudio, y que se diferencian de 0 a 1 base nucleotídica en la secuencia de sus respectivos amplicones. Los aislados PL237 y PL312 se diferencian entre si en 3,5 bases, pero se encuentran distanciados en el dendrograma del resto de aislados, diferenciándose en 63,8 bases, y presentando un contenido bastante superior en citosina e inferior en guanina que el resto de secuencias. Estos dos aislados provenían de dos vinos de la D.O. Ribera del Duero del año 2010 cuyas características físico-químicas no presentaban diferencias significativas con los otros vinos. Las distancias (en número de modificaciones de bases por secuencias) de los demás aislados se pueden comprobar en la parte superior de sus respectivos brazos en el dendrograma de la FIGURA III-24.

3.4.3. Crecimiento de *T. cantarellii* con diferentes concentraciones de etanol en el medio de cultivo líquido

Para comprobar la capacidad de adaptación de *T. cantarellii* a diferentes concentraciones de etanol y valores de pH en medio YPD líquido, y llevar a cabo una comparación con *B. bruxellensis*, se realizaron ensayos por duplicado con las cepas enológicas *B. bruxellensis* PL463 y BY24, *T. cantarellii* PL85 y PA23a. La FIGURA III-25 ilustra las curvas de crecimiento (absorbancia 600 nm) de *T. cantarellii* (FIGURA III-25A) y *B. bruxellensis* (FIGURA III-25B) en medio YPD líquido en ausencia y en presencia de etanol a 5 %; 10 %; 15% y 20 % (v/v). Los recuentos de células viables fueron realizados al inicio y al final del ensayo y aparecen reflejados en la TABLA III-12.

Figura III-25. Curvas de crecimiento de *T. cantarellii* y *B. bruxellensis* con diferentes concentraciones de etanol

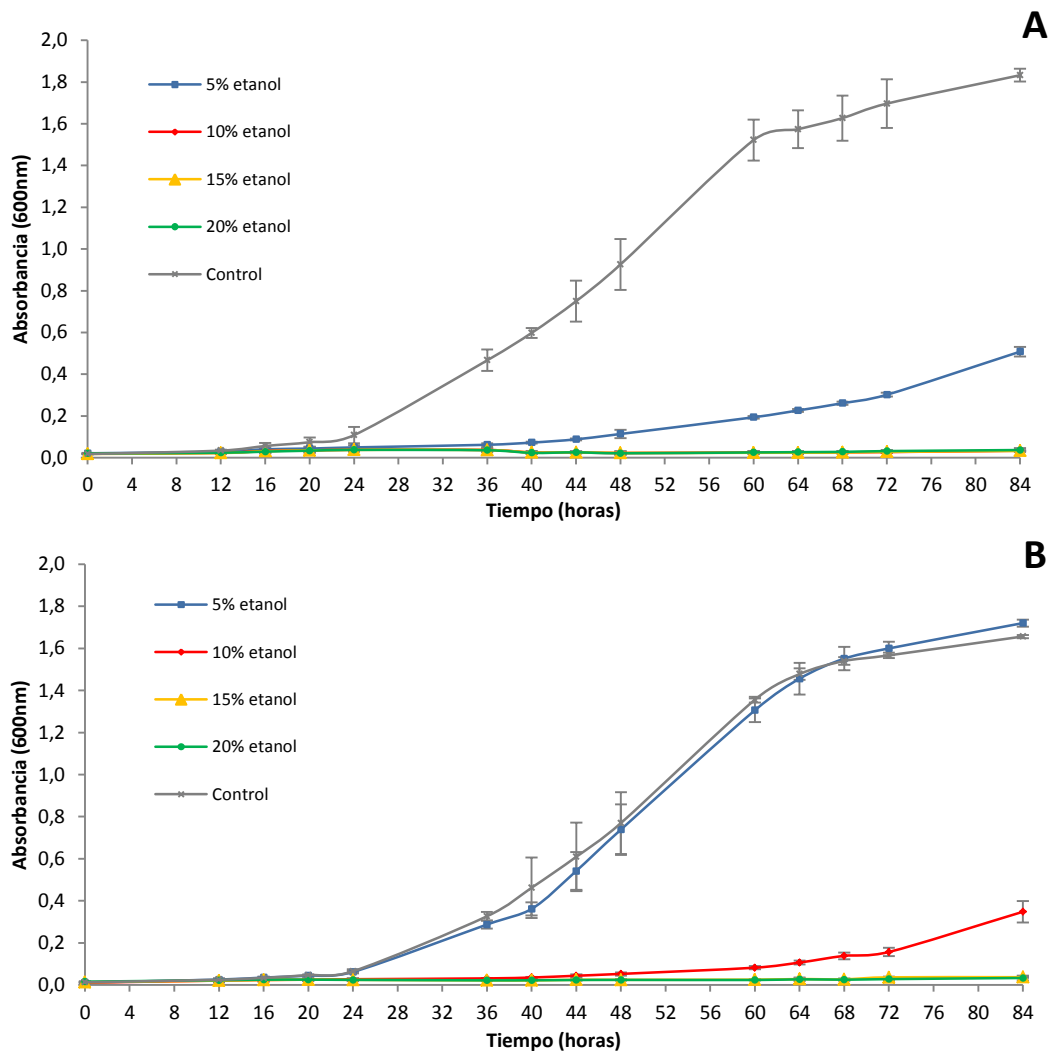


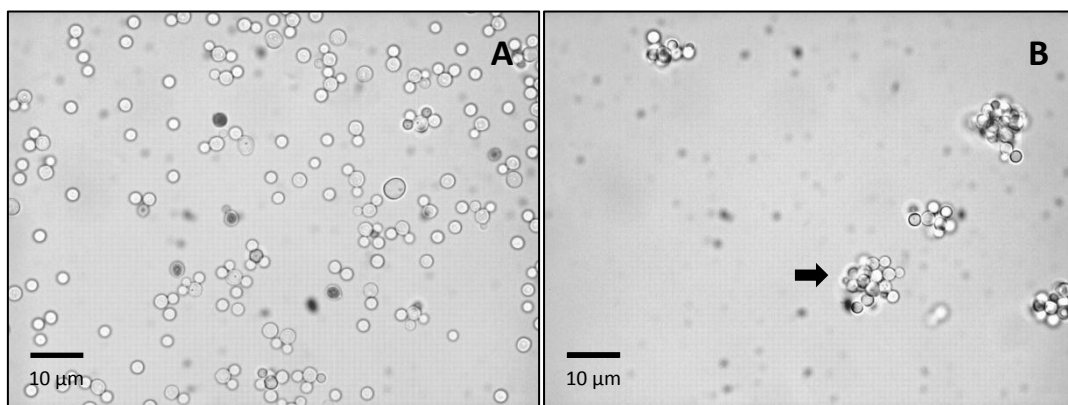
Tabla III-12. Recuentos de poblaciones iniciales y máximas alcanzadas con diferentes concentraciones de etanol

	Tiempo (horas)	Recuentos (UFC/mL)				
		Concentración de etanol % (v/v)				
		0	5	10	15	20
<i>T. cantarellii</i>	0	5,4E+05	5,4E+05	4,9E+05	5,1E+05	5,2E+05
	84	2,7E+08	5,8E+06	8,7E+05	4,7E+05	1,7E+03
<i>B. bruxellensis</i>	0	4,7E+05	4,7E+05	4,6E+05	4,7E+05	4,8E+05
	84	1,4E+08	1,2E+08	4,3E+06	4,8E+05	4,8E+05

Recuentos en unidades formadoras de colonia/mL (UFC/mL)

T. cantarelli y *B. bruxellensis* demostraron tasas de crecimiento similares en ausencia de etanol, presentando el inicio de la fase exponencial a las 24 horas de incubación, y llegando a una población de 10^8 UFC/mL al cabo de 84 horas. En presencia de 5 % etanol, *T. cantarelli* fue capaz de desarrollarse en el medio, multiplicándose su población 10 veces al cabo de las 84 horas de duración del ensayo. *B. bruxellensis*, sin embargo mostró una mejor adaptación al medio alcohólico y alcanzó poblaciones de 10^8 UFC/mL. En este punto es importante señalar que *T. cantarelli*, además de ralentizar su multiplicación celular en presencia de 5% etanol, al cabo de 84 horas de incubación en este medio prácticamente la totalidad de las células se encontraban activas y se observaba una inducción generalizada de gemación lateral múltiple intensa en las células de esta levadura, tal y como se muestra en la FIGURA III-26.

Figura III-26. Fotografías de microscopía óptica de *T. cantarelli* en ausencia y en presencia de etanol



Células de *T. cantarelli* en medio YPD líquido, al cabo de 84 horas, en ausencia de etanol (A) y en presencia de 5% etanol (B). La flecha indica fenómeno de gemación lateral múltiple intensa. Aumento: 1000x.

Indudablemente el agrupamiento de las células en racimos ofrece una menor superficie de contacto con el medio alcoholizado, y consecuentemente, supone una defensa contra el agente causante del estrés que es el etanol. La respuesta al estrés por etanol ha sido estudiada en la levadura modelo *S. cerevisiae* y se conocen numerosas respuestas celulares de esta levadura para contrarrestar los daños provocados por el etanol presente en el medio (Ding et al. 2009). En primer lugar, el etanol se asocia a la membrana plasmática y aumenta la fluidez de la misma, destruyendo su estructura normal y provocando una permeabilización. Como respuesta, las células modifican la composición de sus

membranas para contrarrestar la fluidificación y para estabilizar su estructura. Se sabe que los niveles de ácidos grasos mono-insaturados y de ergosterol aumentan en respuesta al etanol, y que la acumulación de ciertos aminoácidos (isoleucina, metionina, fenilalanina y prolina), de trehalosa y de inositol aumentan la tolerancia al etanol en estas levaduras (Ding et al. 2009). Las células activan la expresión de su ATPasa de membrana, la cual comienza a bombear protones y contrarrestar la entrada de los mismos por la permeabilización ejercida por el etanol. En segundo lugar, las levaduras activan la expresión de proteínas que estabilizan o reparan otras proteínas desnaturalizadas, especialmente las HSPs (heat shock proteins), y expresan una plétora de genes relacionados con el estrés, entre los que cabe señalar el gen VPS34, relacionado con el metabolismo de fosfolípidos, organización de vacuolas, autofagia y transmisión de señales (Backer 2008), el factor de transcripción MSN4 (Watanabe et al. 2011), y el gen de la quinasa SNF 1, reguladora del metabolismo de carbohidratos (Usaite et al. 2009). Todo el mecanismo de transcripción se reprograma en la célula y se mejora la tolerancia al etanol. Un trabajo realizado por Nardi et al. (2010) la respuesta al estrés y la adaptación al etanol por parte de *Brettanomyces* que se genera durante la fermentación, demuestra que también estas levaduras sobreexpresan el gen de la ATPasa y el gen VPS34 en una primera etapa de la fermentación; los genes MSN4, HSP, SNF-1 y el gen NTH1 (codificante de una trehalasa; Mahmud et al. 2010) se sobreexpresan más tardíamente y con retardo en comparación con *S. cerevisiae*, demostrando que las levaduras no expresan de igual manera sus mecanismos de defensa y adaptación al medio alcohólico.

Respecto a *T. cantarellii*, no existen trabajos en la literatura que hagan referencia a su respuesta adaptativa al etanol, y los agregados celulares que se observan en nuestros experimentos sugieren que en las células de *T. cantarellii* se altera la estructura de la membrana y la consecuente escisión de las células en gemación, o bien cabría la hipótesis de la presencia de algún tipo de polisacárido que provoca la agregación celular, ofreciendo de este modo una menor superficie de contacto con el medio alcoholizado externo.

A concentraciones de 10 % y 15 % etanol, el crecimiento de *T. cantarellii* fue nulo pero las células permanecían viables. Por otro lado, cuando en el medio había un 20 % de etanol, la población de células vivas de *T. cantarellii* fue 100 veces menor que la población inicial. *B. bruxellensis* se mostró bastante

más resistente a las elevadas concentraciones de etanol en el medio, presentando crecimiento positivo a una concentración de 10 % y manteniendo la población inicial activa al cabo de 84 horas de incubación cuando esa concentración era de 15 % y 20 %.

Sin dudas el etanol es uno de los principales factores de estrés para los microorganismos en el vino, que dificulta su crecimiento y viabilidad, y las levaduras de la especie *S. cerevisiae* son ejemplo de una perfecta adaptación a la presencia de etanol durante el proceso de vinificación. Por lo contrario, así como ocurre con gran parte de la microflora indígena de las uvas y los mostos, en nuestros ensayos de laboratorio *T. cantarellii* mostró ser muy sensible a la creciente concentración de etanol en el medio en las condiciones ensayadas, si bien las cepas estudiadas habían sido incubadas sucesivas veces (reaislamiento y cultivo en placa de 3 a 5 pases previos) en medios sintéticos de laboratorio (sin etanol) y durante este proceso cabe la posibilidad de que perdieran parte de sus características de adaptación al vino de donde se obtuvieron (grado alcohólico de 13,8 %). También es importante subrayar que los cultivos en el laboratorio se realizan a temperaturas de 25 °C a 30 °C y que a mayor temperatura, la acción inhibitoria del etanol se incrementa, conlleva una disminución en asimilación de nitrógeno y modifica los sistemas de transporte activo de membrana (Ribéreau-Gayon et al. 2006). La tolerancia al etanol por levaduras no-*Saccharomyces* del vino es mucho más pronunciada a bajas temperaturas, siendo la temperatura habitual en bodega de unos 13 a 16 °C, y permitiendo que su contribución a todo el proceso de vinificación y calidad final del producto sea mucho más acentuada (Gao y Fleet 1988).

En condiciones reales de vinificación hay trabajos en los que los autores observan que el creciente contenido en etanol juega un papel importante en la proliferación de *T. cantarellii*. Un ejemplo de ello es el trabajo de Barata et al. (2012) en el que se constató que durante una vinificación la población de esa levadura al final de la fermentación maloláctica llegó a ser unas 75 veces inferior a la que se encontraba al final de la fermentación alcohólica. De todos modos, aunque se observe una reducción importante en número, podemos observar en nuestros resultados que esta levadura es capaz de mantenerse viable con 15 % de etanol en el medio y en condiciones enológicas en muestras de vinos con un contenido en etanol de 12,7 % – 13,8 % (TABLA III-10). De forma similar otros trabajos publicados también detectaron esa levadura al final de la fermentación maloláctica en vinos con un contenido de 10,8 % (v/v) etanol (Renouf et al. 2006), y como se observa en ese mismo estudio, factores de

elaboración como maceración en frío y no utilización de inóculos comerciales podrían jugar un papel crucial para una mayor proliferación de *T. cantarellii*.

3.4.4. Crecimiento de *T. cantarellii* a diferentes valores de pH

En otro contexto, también se ha comprobado si diferencias en el pH del medio pueden llegar a limitar o estimular el crecimiento de *T. cantarellii*. En la FIGURA III-27 se muestran las curvas de crecimiento de *T. cantarellii* y *B. bruxellensis* a diferentes valores de pH en medio líquido y en la TABLA III-13 se presentan los respectivos recuentos al inicio y al final de los ensayos.

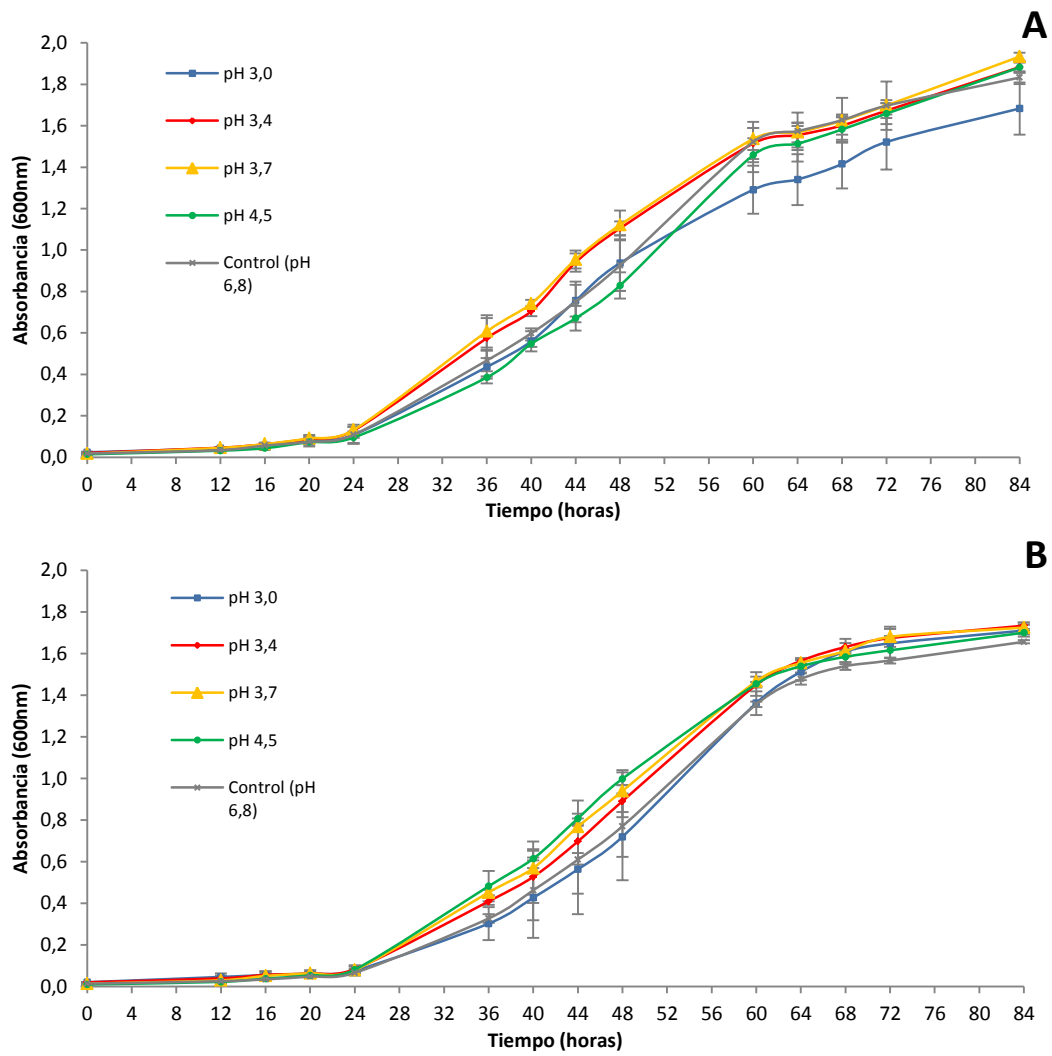
Figura III-27. Curvas de crecimiento de *T. cantarellii* y *B. bruxellensis* con diferentes valores de pH

Tabla III-13. Recuento de poblaciones iniciales y máximas alcanzadas a diferentes valores de pH

	Tiempo (horas)	Recuentos (UFC/mL)				
		6,8	4,5	3,7	3,4	3,0
<i>T. cantarellii</i>	0	5,4E+05	4,9E+05	5,2E+05	5,7E+05	5,6E+05
	84	2,7E+08	2,7E+08	2,4E+08	2,4E+08	9,1E+07
<i>B. bruxellensis</i>	0	4,7E+05	4,4E+05	4,6E+05	4,9E+05	4,9E+05
	84	1,4E+08	1,7E+08	1,6E+08	1,7E+08	1,6E+08

Recuentos en unidades formadoras de colonia/mL (UFC/mL)

Las cepas de *T. cantarellii* mostraron su crecimiento óptimo a $\text{pH} \geq 3,4$, mientras que a $\text{pH} 3,0$ se observa que la multiplicación celular se vio ligeramente afectada y no se alcanzó la población máxima ($2,7 \cdot 10^8$ UFC/mL) que alcanzó a pH s superiores. Respecto al inicio de la fase exponencial (24 horas de incubación) y estacionaria (entre 60 y 72 horas de incubación), no se notan diferencias significativas entre los valores de pH ensayados. *B. bruxellensis*, comparativamente, no mostró ser susceptible a las variaciones de pH ensayadas en ese estudio.

Es conocido que los microorganismos pueden responder de maneras diversas frente a alteraciones en los valores de pH del medio tanto en término de tasas de crecimiento como en lo que se refiere a la producción de metabolitos sensorialmente importantes, como es el caso de la levadura *Saccharomyces*, cuyos crecimiento y capacidad fermentativa disminuyen a valores de pH cercanos a 3,0 (Fugelsang y Edwards 2007). Sin embargo, según los resultados obtenidos en nuestros experimentos *T. cantarellii* resiste al pH ácido en medio líquido y demuestra incluso capacidad de seguir proliferando a $\text{pH} 3,0$. Asimismo, es importante subrayar que estudios realizados previamente con otras levaduras no-*Saccharomyces* (*Candida pulcherrima*, *C. stellata* y *C. colliculosa*) tampoco encontraron diferencias significativas en las tasas de crecimiento en rangos de pH de 3,0 a 4,0 (Charoenchai et al. 1998).

3.4.5. Susceptibilidad de *T. cantarellii* a agentes antimicrobianos utilizados en Enología

La TABLA III-14 recopila los resultados de concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) y biocidas (CMB) de (a) metabisulfito potásico, (b) taninos enológicos, (c) dicarbonato de dimetilo (DMDC) y (d) chitosan para cada cepa de *T. cantarellii*. Asimismo, La TABLA III-15 resume los resultados obtenidos para efectos inhibitorio (CMI₅₀ y CMI₉₀) y biocida (CMB₅₀ y CMB₉₀), frente a 16 cepas vínicas de *T. cantarellii* en medio YPD líquido a pH 3,5, en ausencia y en presencia de 12,5% etanol.

Tabla III-14. Valores de concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) y biocidas (CMB) de diferentes agentes antimicrobianos frente a *T. cantarellii*

Cepa	CMI								CMB							
	MBP (mg/L)		Taninos (mL/L)		Chitosan (mg/L)		DMDC (mg/L)		MBP (mg/L)		Taninos (mL/L)		Chitosan (mg/L)		DMDC (g/L)	
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
TN4f.c	48	24	0,125	0,062	> 250	> 250	250	4	390	24	2	2	> 250	> 250	2,50	2,50
TN2c	24	6	0,500	0,016	> 250	> 250	31	4	390	6	4	0,5	> 250	> 250	1,25	1,25
PA20a	190	6	0,500	0,016	> 250	> 250	250	16	390	6	0,06	0,03	> 250	> 250	2,50	1,25
PL103	390	12	0,500	0,031	> 250	> 250	62	4	390	12	2	0,25	> 250	> 250	1,25	1,25
PL198	190	12	0,500	0,016	> 250	> 250	8	16	390	12	1	0,125	> 250	> 250	1,25	1,25
PL259	96	24	0,250	0,031	> 250	> 250	250	62	390	24	> 2	> 2	> 250	> 250	2,50	2,50
PA23a	390	24	2	0,062	> 250	> 250	250	4	390	24	> 2	> 2	> 250	> 250	2,50	1,25
PA42a	190	12	4	0,062	> 250	> 250	125	4	390	12	> 2	0,25	> 250	> 250	2,50	2,50
PL336	190	12	0,250	0,062	> 250	> 250	31	8	190	12	> 2	> 2	> 250	> 250	2,50	2,50
PA14c	96	s/c	0,5	> 4	> 250	> 250	125	4	190	s/c	> 2	0,25	> 250	> 250	2,50	2,50
PL235	390	24	0,250	0,5	> 250	> 250	500	4	390	24	> 2	0,25	> 250	> 250	2,50	2,50
PL186	190	24	0,250	0,5	> 250	> 250	16	4	390	24	> 2	0,25	> 250	> 250	2,50	2,50
CPA3	390	12	0,031	0,016	> 250	> 250	8	4	390	12	> 2	2	> 250	> 250	1,25	1,25
PEV10a	390	24	0,5	0,125	> 250	> 250	250	8	390	24	> 2	0,125	> 250	> 250	2,50	2,50
PL312	390	12	0,25	0,016	> 250	> 250	8	8	390	12	> 2	0,25	> 250	> 250	2,50	2,50
PL85	390	12	> 4	0,062	> 250	> 250	250	4	390	12	0,5	0,25	> 250	> 250	2,50	1,25

(A) ausencia de etanol; (B) 12,5 % etanol
s/c: sin crecimiento

Tabla III-15. Valores de CMI₅₀, CMI₉₀, CMB₅₀ y CMB₉₀ de diferentes agentes antimicrobianos frente a *T. cantarellii*

Agente antimicrobiano	Rango	CMI		CMB	
		CMI ₅₀	CMI ₉₀	CMB ₅₀	CMB ₉₀
Etanol	8 – 20%	10%	>20%	>20%	>20%
MBP	6,25 – 0,003 g/L	190 mg/L	390 mg/L	390 mg/L	390 mg/L
MBP + etanol ¹	6,25 – 0,003 g/L	12 mg/L	24 mg/L	48 mg/L	96 mg/L
Taninos	4 – 0,002 mL/L	0,5 mL/L	4 mL/L	>4 mL/L	>4 mL/L
Taninos + etanol ¹	4 – 0,002 mL/L	0,062 mL/L	0,5 mL/L	0,25 mL/L	>4 mL/L
Chitosan	250 – 0,12 mg/L	>250 mg/L	>250 mg/L	>250 mg/L	>250 mg/L
Chitosan + etanol ¹	250 – 0,12 mg/L	>250 mg/L	>250 mg/L	>250 mg/L	>250 mg/L
DMDC	5 – 0,002 g/L	156 mg/L	625 mg/L	2,5 g/L	2,5 g/L
DMDC + etanol ¹	5 – 0,002 g/L	5 mg/L	19 mg/L	2,5 g/L	2,5 g/L

CMI: concentración mínima inhibitoria; CMB: concentración mínima biocida.

¹ Concentración fija de etanol a 12,5% (v/v).

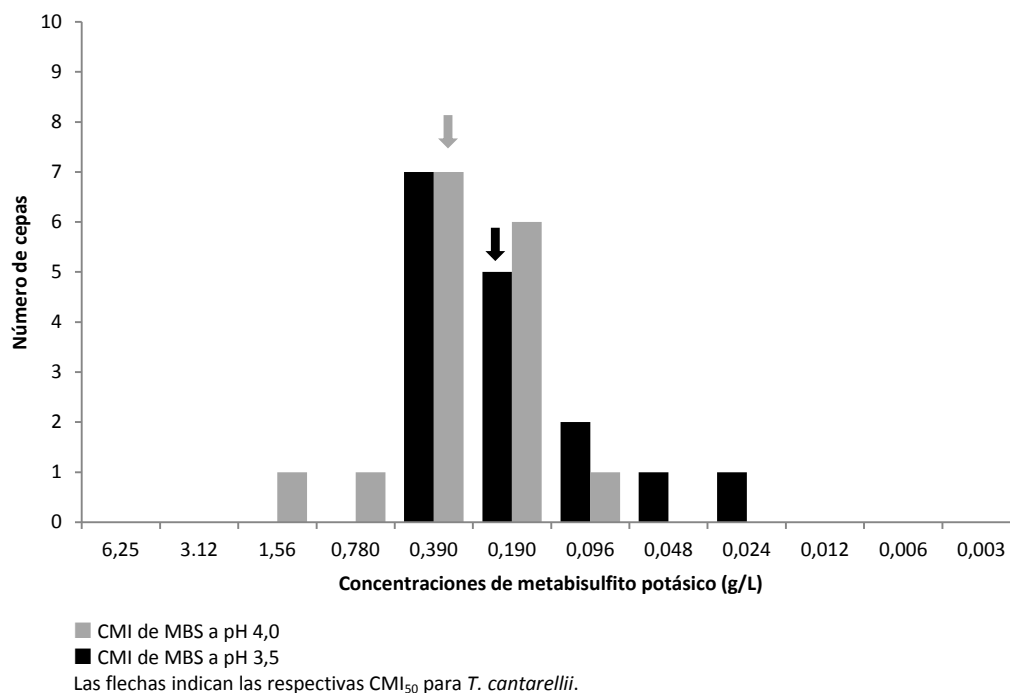
MBP: Metabisulfito potásico

DMDC: dicarbonato de dimetilo

a) Actividad antimicrobiana del metabisulfito potásico

En la FIGURA III-28 se indican los valores de CMI obtenidos para metabisulfito potásico (MBP) determinados, respectivamente, a pH 4,0 y 3,5.

Figura III-28. Concentraciones mínimas inhibitorias del metabisulfito potásico a pH 4,0 y 3,5 frente a cepas de *T. cantarellii*

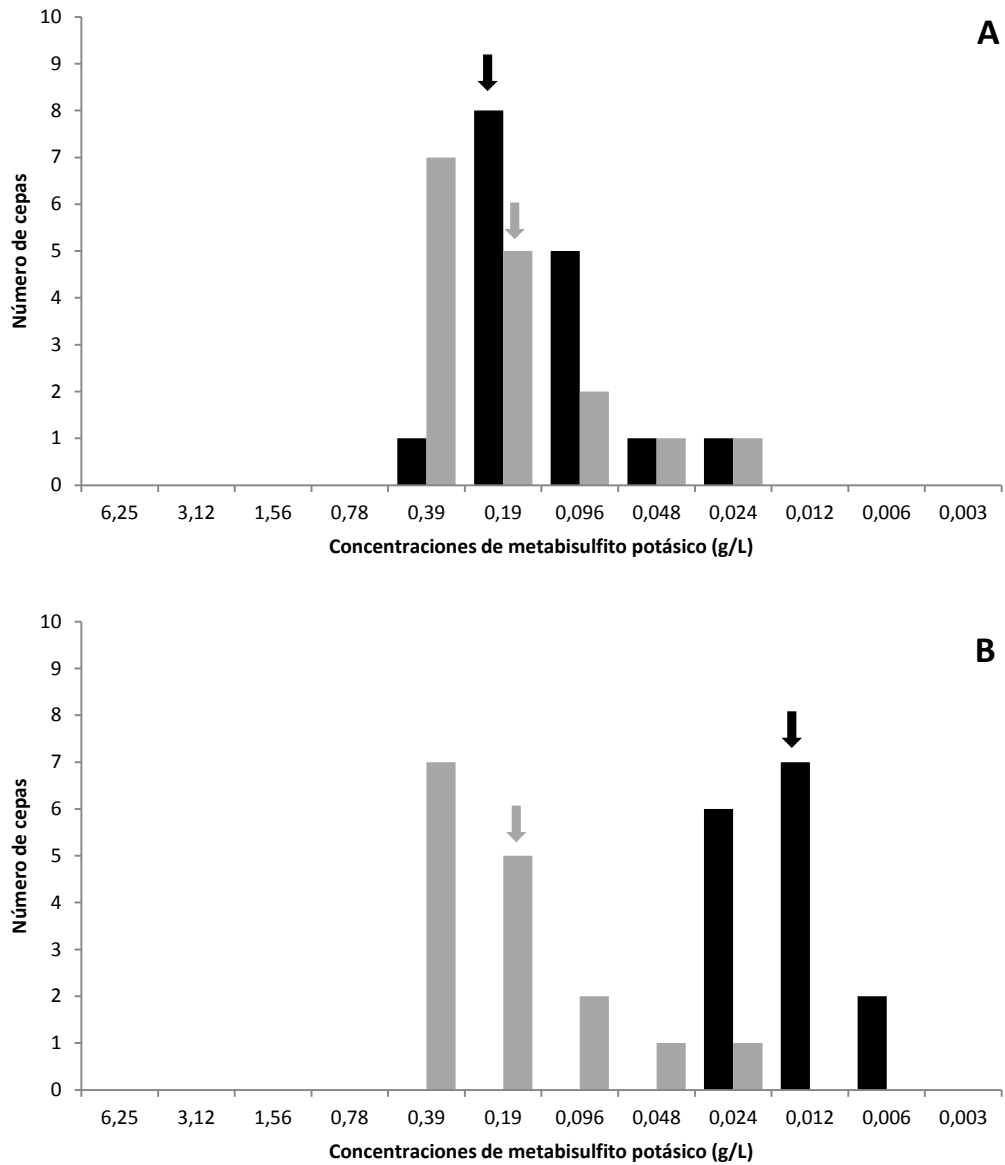


La capacidad inhibitoria del MBP frente a *T. cantarellii* es pH-dependiente y se puede observar que su efecto se potencia 2 veces a pH 3,5. Cuando se comparan otras especies de levaduras, como *S. cerevisiae* y *B. bruxellensis*, este efecto también es observado (TABLA III-6, CAPÍTULO 2). Comparando los valores de las CMI₅₀ y CMB₅₀ del MBP frente a *S. cerevisiae* y *B. bruxellensis* (TABLA III-6) se observa que *T. cantarellii* se muestra más resistente al MBP a pH 3,5 (CMI₅₀ = 190 mg/L) comparada con *B. bruxellensis* (CMI₅₀ = 48 mg/L). Cuando contrastamos estos resultados con los descritos por otros autores, comprobamos que *T. cantarellii* presenta una importante plasticidad para resistir a la acción del MBP, y así Barata et al. (2008a) en las mismas condiciones encontraron que los niveles máximos de este compuesto tolerado por *B. bruxellensis* y *B. anomalus* eran de 90 mg/L y para *S. cerevisiae* de 190 mg/L.

A concentraciones de 190 mg/L tan solamente se observaba inhibición del crecimiento de *T. cantarellii*, y efecto biocida era detectado a concentraciones no permitidas de MBP en aplicaciones enológicas (390 mg/L).

En medio de cultivo a pH 3,5 también se probaron concentraciones variables de MBP combinado con concentraciones fijas de etanol, respectivamente al 6 % (FIGURA III-29A) y 12,5 % (FIGURA III-29B). Cuando la concentración de etanol en el medio era de 6 % la susceptibilidad de las cepas al MBP era igual que en ausencia de etanol, con una $CMI_{50} = 190$ mg/L (FIGURA III-29A). Sin embargo, a una concentración de 12,5 %, se observa un efecto sinérgico entre los dos compuestos y hay un fuerte incremento de la sensibilidad en las cepas de *T. cantarellii* ($CMI_{50} = 12$ mg/L) (FIGURA III-29B). En el caso de *B. bruxellensis* el valor de la CMI_{50} con la misma concentración de etanol (6 %) era de 24 mg/L (FIGURA III-8, CAPÍTULO 2). Cuando la concentración en etanol es más elevada y equivalente a la encontrada en un vino (12,5%), ambas especies presentan un comportamiento similar y el 50% de las cepas mueren (CMB_{50}) a concentraciones de 48 mg/L de MBP.

Figura III-29. Concentraciones mínimas inhibitorias del metabisulfito potásico a diferentes concentraciones de etanol frente a cepas de *T. cantarellii*



■ CMI de taninos enológicos en ausencia de etanol
 ■ CMI de taninos enológicos combinados con (A) 6% y (B) 12,5% etanol
 Las flechas indican las respectivas CMI₅₀ para *T. cantarellii*.

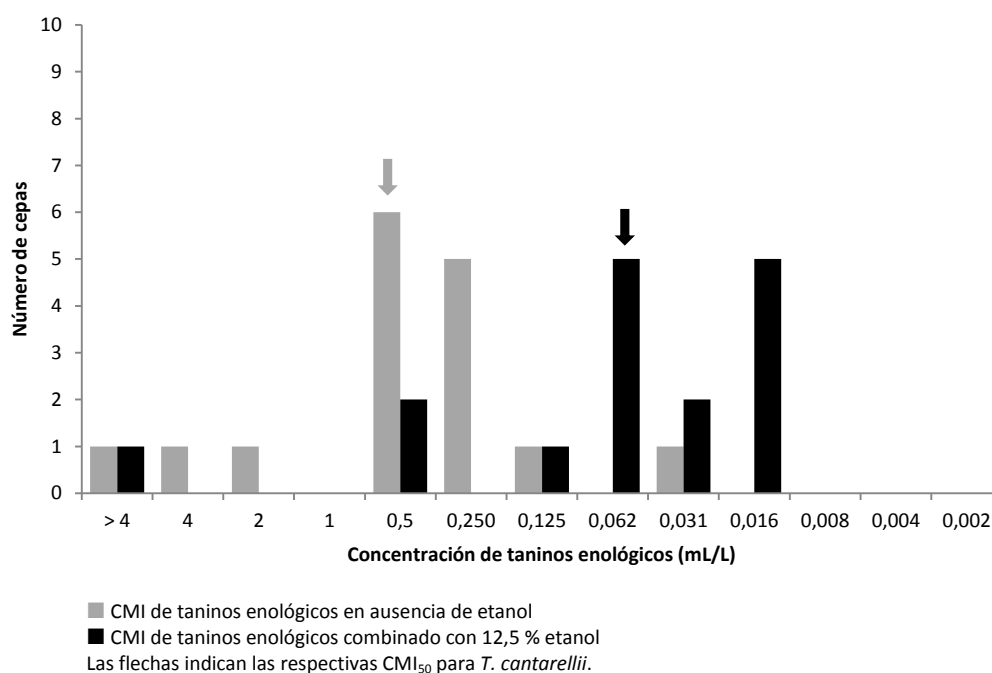
Estos resultados se pueden explicar por el hecho de que la presencia de etanol lleva a modificaciones importantes en la membrana celular, ejerciendo un efecto-detergente al intercalarse en las zonas hidrófobas y consecuentemente aumentando su polaridad y fluidez (Ribéreau-Gayon et al. 2006). Además, no es menos importante considerar que la temperatura a la que se llevaron a cabo los ensayos (25 °C) es considerablemente superior a la que normalmente se encuentra un vino almacenado o embotellado y que, en este caso, una temperatura ligeramente más elevada puede aumentar de modo consistente los efectos antisépticos naturales del etanol (Ribéreau-Gayon et al. 2006) sobre *T. cantarellii*.

En enología es ampliamente conocido el efecto del MBP como antiséptico, dificultando el desarrollo de toda clase de microorganismos, además de presentar acción antioxidante y de participar en la conservación de compuestos aromáticos del vino. Sin embargo, concentraciones excesivas de ese agente deben ser evitadas por cuestiones directas de salubridad humana y por los impactos aromáticos negativos, por lo que actualmente se intenta cada vez más reducir las dosis empleadas (Ribéreau-Gayon et al. 2006) y se buscan agentes antimicrobianos que puedan reemplazar parcialmente al MBP.

b) Actividad antimicrobiana de taninos enológicos

En la FIGURA III-30 se presentan los resultados de la actividad antimicrobiana encontrados para la solución comercial de taninos enológicos TaniStop (Dolmar).

Figura III-30. Concentraciones mínimas inhibitorias de taninos enológicos frente a cepas de *T. cantarellii* en ausencia y en presencia de 12,5 % etanol



En ausencia de etanol la acción fungistática de los taninos enológicos se muestra poco efectiva frente a *T. cantarellii* (CMI₅₀ = 0,5 mL/L, CMI₉₀ = 4 mL/L) si se considera que el límite permitido es de 0,4 mL/L. Asimismo, tampoco se observa muerte de las células en las concentraciones ensayadas (CMB_{50/90} ≥ 4 mL/L). Cuando se comparan los resultados con aquellos obtenidos para *B. bruxellensis*, el comportamiento observado fue similar, y frente a *S. cerevisiae*, el agente no presenta ningún efecto en las concentraciones ensayadas (TABLA III-6, CAPÍTULO 2).

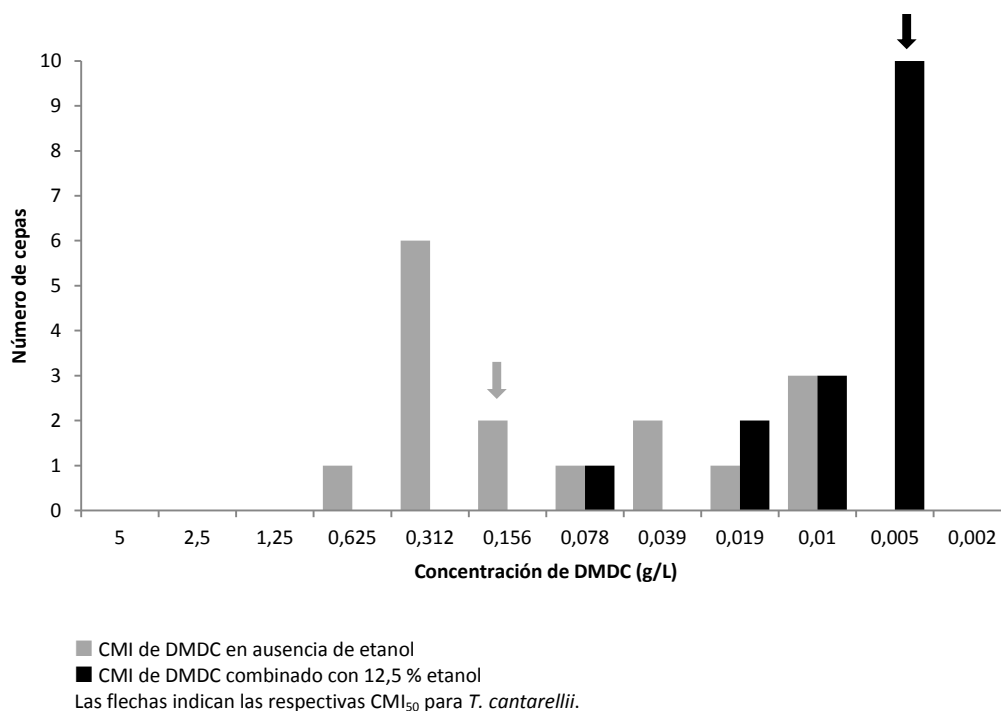
La presencia de etanol en el medio actúa sinérgicamente y como se observa en la TABLA III-15, hay un incremento de unas 8 veces sobre el efecto inhibitorio frente a las cepas ($CMI_{50} = 0,062$ mL/L, $CMI_{90} = 0,5$ mL/L). En este caso también se constata efecto fungicida sobre las células, y la mitad de las cepas ensayadas (CMB_{50}) se mostraron susceptibles a 0,25 mL/L del compuesto. Comparativamente, observamos que el efecto fungistático en estas condiciones sobre la totalidad de las cepas de *B. bruxellensis* era 4 veces mayor, y que la CMB_{50} encontrada frente a *B. bruxellensis* era también de 0,25 mL/L (TABLA III-6, CAPÍTULO 2). Frente a *S. cerevisiae* (TABLA III-6, CAPÍTULO 2), la solución de taninos no llegó a presentar efecto biocida sobre las células en las concentraciones ensayadas, concluyendo con ello que el comportamiento frente a los taninos enológicos tanto de *B. bruxellensis* como de *T. cantarellii* es semejante y muy distinto al de *S. cerevisiae*.

El efecto antimicrobiano de compuestos fenólicos parece estar relacionado principalmente con la capacidad que tienen de aumentar la permeabilidad de la membrana plasmática (Santos et al. 2012), afectando de ese modo al equilibrio fisiológico de la célula. Aunque haya escasas referencias sobre el efecto de compuestos fenólicos específicamente sobre las levaduras, la utilización de determinadas concentraciones de ácidos hidroxicinámicos, concretamente de ácido ferúlico, ya había sido propuesta frente a *Brettanomyces* (Harris et al. 2010). Según estos autores, los análisis de microscopía electrónica revelaron que el efecto inhibitorio parece estar relacionado principalmente a modificaciones estructurales causadas en las células y que, paralelamente, el etanol juega un papel sinérgico potenciador de su acción.

c) Actividad antimicrobiana del dicarbonato de dimetilo (DMDC)

Los resultados de actividad antimicrobiana del DMDC aparecen representados en la FIGURA III-31.

Figura III-31. Concentraciones mínimas inhibitorias del dicarbonato de dimetilo (DMDC) frente a cepas de *T. cantarellii* en ausencia y en presencia de 12,5 % etanol



El uso del DMDC, comercializado como Velcorin[®], está actualmente permitido a concentraciones de hasta 200 mg/L (REGLAMENTO CE 643/2006), y a esos niveles y en ausencia de etanol el compuesto fue capaz de inhibir a la mitad de las cepas de *T. cantarellii* estudiadas (CMI₅₀ = 156 mg/L). Para inhibir el 90 % de las cepas (CMI₉₀), fueron necesarias concentraciones de 625 mg/L y la pérdida de viabilidad celular se registra con 2,5 g/L (CMB_{50/90}).

Ya en presencia de 12,5% etanol se observa un efecto sinérgico entre los dos agentes: la mitad de las cepas analizadas (CMI₅₀) tuvieron su crecimiento inhibido con 2mg/L, y el 90 % de las cepas fueron inhibidas con 19 mg/L (CMI₉₀). En las concentraciones permitidas por ley, sin embargo, el DMDC sólo

presenta efecto inhibitorio sobre las cepas de *T. cantarellii* ya que solamente se observa efecto biocida de las células entre 2,50 y 1,25 g/L del compuesto, tanto en ausencia como en presencia de etanol.

Actualmente se sabe que el DMDC es más efectivo contra las levaduras que contra las bacterias del vino (Delfini et al. 2002) y que su acción se encuentra básicamente relacionada a su unión con residuos de histidina ubicados en los centros catalíticos de determinadas enzimas esenciales para el crecimiento y supervivencia celular (Hornsey 2007). Por ese motivo, diversos autores probaron su aplicación en condiciones experimentales para inhibición de varias especies de levaduras vínicas (Costa et al. 2008; Daudt y Ough 1980; Delfini et al. 2002; Divol et al. 2005; Renouf et al. 2008). Los datos presentados en la TABLA III-6 del apartado 2.4 de esta tesis para las levaduras *B. bruxellensis* y *S. cerevisiae*, muestran que el DMDC tiene efecto inhibitorio sobre el crecimiento de ambas especies, pero su acción es especialmente potente frente a *B. bruxellensis*, con efecto biocida a concentraciones de 120 mg/L, en presencia de etanol. Estos resultados coinciden con aquellos presentados previamente por otros autores en mostos de uva y vino (Costa et al. 2008; Delfini et al. 2002; Renouf et al. 2008). Esta es la primera vez que se presentan datos de la acción del DMDC sobre la levadura *T. cantarellii*. Si por un lado el crecimiento de esta especie se ve muy afectado por el compuesto en presencia de 12,5% etanol, por otro se observa acción biocida a concentraciones muy elevadas (> 2,5 g/L) y no permitidas para aplicación en prácticas enológicas.

La utilización del DMDC como agente antimicrobiano en vinos viene siendo discutida e investigada desde las últimas décadas, especialmente con la idea de poder disminuir los niveles de SO₂ empleados actualmente. De todos modos, aunque el DMDC se haya mostrado eficaz en la inhibición del crecimiento de levaduras vínicas como *B. bruxellensis*, *B. intermedius*, *S. cerevisiae*, *Kloeckera apiculata*, *Candida guilliermondii*, *Pichia membranifaciens*, *Zygosaccharomyces bailii*, *Zygoascus hellenicus* (Costa et al. 2008; Delfini et al. 2002; Renouf et al. 2006), su aplicación no está recomendada durante la vinificación o almacenamiento ya que se trata de un agente que se descompone al cabo de pocas horas (Ribéreau-Gayon et al. 2006).

d) Actividad antimicrobiana del Chitosan

En el caso del chitosan, a la concentración máxima permitida de 100 mg/L (REGLAMENTO CE 53/2011), las cepas de *T. cantarellii* en condiciones de laboratorio no se mostraron afectadas, tanto en ausencia como en presencia de etanol en el medio, presentando tasas de crecimiento similares a los controles sin agente antimicrobiano (datos no presentados). Estos resultados concuerdan con las recomendaciones enológicas de los proveedores de chitosan y de su característica de alta especificidad para combatir las contaminaciones de *Brettanomyces*.

Es importante tener en cuenta que el mecanismo de acción antimicrobiana del chitosan está íntimamente relacionado con su estructura policationica a $\text{pH} < 6,0$ (Roller y Covill 1999), de modo que cuanto mayor la densidad de cargas negativas en la pared celular proporcionada por la existencia de grupos-amino (proteínas, polisacáridos aniónicos, ácidos grasos y fosfolípidos), más intensa será la interacción electrostática establecida (Kong et al. 2010). Resultados presentados por otros autores sobre la acción del chitosan frente a levaduras ya han puesto en evidencia la acción selectiva que este compuesto puede presentar en cultivos mixtos, inhibiendo a *Brettanomyces* y no ejerciendo ningún efecto sobre el crecimiento de *S. cerevisiae* (Gómez-Rivas et al. 2004), de modo que la sensibilidad a este compuesto parece estar directamente relacionada con la constitución específica de estructuras aniónicas en la pared celular de *Brettanomyces*.

Conclusiones

A continuación se presentan las principales conclusiones de esta tesis:

1. El método de tratamiento previo aplicado a muestras de vinos tintos y de extracción del DNA diseñado en esta tesis permite obtener un DNA de calidad idónea para la aplicación de los métodos de PCR convencional y PRC cuantitativa (qPCR), evitando las graves interferencias que suponen las partículas sólidas, agregados macromoleculares y compuestos polifenólicos de la uva y del vino.
2. El método rápido de PCR cuantitativa aplicado a muestras de aguas de lavado y vinos tintos con turbidez (hasta 1000 NTU) permite detectar específicamente y en presencia de hasta $7,5 \cdot 10^5$ UFC/mL de levaduras de otras especies, células de *Brettanomyces/Dekkera* en concentraciones de hasta 16 – 25 células/mL, en un tiempo de 4 horas (muestras con poca turbidez) hasta un máximo de 18 horas necesario para este análisis.
3. El método clásico de cultivo microbiológico en un medio selectivo para la detección y cuantificación de células de *Brettanomyces/Dekkera* permitió detectar y cuantificar hasta 1 UFC/mL de células viables de *Brettanomyces/Dekkera*, presentando un 4,9 % de falsos positivos y un 31,8 % de análisis negativos de muestras que contenían células de *Brettanomyces/Dekkera* no viables o restos de DNA detectables por qPCR.
4. El método clásico de cultivo microbiológico en un medio selectivo para *Brettanomyces/Dekkera* permitió detectar y cuantificar células de estas levaduras en el aire de distintas zonas de bodega.
5. El estudio comparativo entre los métodos de PCR cuantitativa y el método clásico de cultivo microbiológico selectivo para *Brettanomyces/Dekkera* dio como resultado una correlación estadística calificada como buena, con un índice Kappa de 0,69 entre los resultados de ambos métodos.

6. De modo general, *Brettanomyces/Dekkera* y *Trigonopsis cantarellii* resultaron ser más susceptibles a los efectos inhibitorios y biocidas del dicarbonato de dimetilo y de los taninos enológicos que la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Por otro lado, *Brettanomyces/Dekkera* fue la especie más sensible a la acción del metabisulfito potásico y del quitosán.
7. La actividad antimicrobiana de los cuatro agentes enológicos estudiados se vio potenciada por la presencia de 12,5 % etanol en el medio líquido de crecimiento de las levaduras.
8. Los taninos enológicos, en concentraciones permitidas para aplicación en enología, mostraron actividad inhibitoria del crecimiento y biocida únicamente cuando actuaban en presencia de etanol en el medio y frente a levaduras *Brettanomyces/Dekkera* y *T. cantarellii* ($CMB_{50} = 0,25$ mL/L).
9. El quitosán en concentraciones de uso enológico y en presencia de etanol en el medio mostró actividad inhibitoria del crecimiento y biocida exclusivamente frente a *Brettanomyces/Dekkera*, presentando especificidad frente a estas levaduras ($CMB_{50} = 62$ mg/L).
10. El dicarbonato de dimetilo en concentraciones de uso enológico y en presencia de etanol en el medio, presentó actividad biocida únicamente frente a *Brettanomyces/Dekkera* ($CMB_{50} = 120$ mg/L).
11. El metabisulfito potásico resultó ser el agente antimicrobiano más potente, mostrando su máxima actividad frente a *Brettanomyces/Dekkera* ($CMB_{90} = 48$ mg/L en presencia de 12,5 % etanol), seguido de *T. cantarellii* ($CMB_{90} = 96$ mg/L en presencia de 12,5 % etanol), y no demostró acción biocida frente *S. cerevisiae* en el rango de concentraciones de uso permitido en enología.
12. La producción de los fenoles volátiles: 4-etilguaiaicol, 4-etilfenol, 4-vinilfenol y 4-propilguaiaicol en vinos tintos conservados durante 22 meses en botella y con distintas concentraciones de metabisulfito potásico (de 28 a 100 mg/L), se correlacionó directamente con las poblaciones de *Brettanomyces/Dekkera* presentes en los vinos, quedando totalmente excluida la posibilidad de producción de estos fenoles volátiles por la acción de bacterias lácticas.
13. El metabisulfito potásico en una concentración de 100 mg/L evitó el crecimiento de *Brettanomyces/Dekkera* y el aumento de los fenoles volátiles en los vinos estudiados.

14. Se identificaron levaduras no-*Brettanomyces* de las especies: *Arthroascus schoenii*, *Candida ishiwadae*, *Meyerozyma guilliermondii*, *Pichia holstii*, *Pichia mandshurica*, *Trigonopsis cantarellii* y *Trigonopsis variabilis* en muestras de vinos tintos en periodo de crianza en barrica, muestras de aguas de lavado de depósitos de madera y también de aire de bodega.
15. El 62 % de los aislados no-*Brettanomyces* estudiados de las especies anteriores, presentaron capacidad acidogénica, y el 67 % generaron aromas de alteración en los cultivos realizados en medio sintético líquido y sólido en condiciones de laboratorio.
16. La levadura más recurrente en los aislados estudiados, después de *Brettanomyces/Dekkera*, fue *T. cantarellii*, representando un 54,5 % de un total de 77 aislados identificados de muestras tomadas durante el periodo 2008 – 2011.
17. El método de PCR convencional para *T. cantarellii* puesto a punto en esta tesis permite la detección e identificación altamente específica de células de esta levadura en cualquier muestra enológica.
18. Levaduras de la especie *T. cantarellii* tienen la capacidad de crecer en vinos tintos secos (< 0,2 g/L de azúcares reductores) en proceso de crianza, con un alto contenido en etanol (hasta 13,8%) y son más resistentes a la acción del metabisulfito potásico que las levaduras *Brettanomyces/Dekkera*.
19. Las levaduras de la especie *T. cantarellii* se caracterizan por un crecimiento lento, con un porcentaje importante de las cepas (48 % de los aislados estudiados) presentando metabolismo acidogénico potencialmente alterante de los vinos, y generación de aromas de desviación organoléptica (72 % de los aislados estudiados) con un potencial alterante inferior al detectado habitualmente en levaduras *Brettanomyces/Dekkera*.

Below we introduce the main conclusions of this thesis:

1. The prior treatment applied to red wine samples and as well as the DNA extraction method designed in this thesis allowed obtaining a DNA of suitable quality for the application of conventional PCR and quantitative PRC (qPCR), avoiding the serious interferences which represent macromolecular aggregates of solid particles and natural polyphenolic compounds of grapes and wine.
2. The rapid method of quantitative PCR applied to samples of wash-water and turbid red wines (up to 1000 NTU) allowed specifically detecting *Brettanomyces/Dekkera* cells, even in the presence of up to $7.5 \cdot 10^5$ CFU/mL of other yeast species, in low concentrations down to 16 – 25 cells/mL, and it took a maximum of 4 hours (low turbidity samples) to 18 hours (high turbid samples) to the complete analyses.
3. The classical method of microbiological culture in selective medium allowed detecting and quantifying down to 1 CFU/mL of *Brettanomyces/Dekkera* viable cells, showing a 4.9 % of false positive results, and 31.8 % negative results in those samples containing nonviable *Brettanomyces/Dekkera* cells as well as DNA remains detectable by qPCR.
4. The classical method of microbiological culture in *Brettanomyces/Dekkera* selective medium allowed detecting and quantifying yeasts in the air from different areas in the winery.
5. The comparative study between quantitative PCR and classical microbiological culture methods showed a good rated statistical correlation, with a 0.69 Kappa's value between the results of both methods.
6. *Brettanomyces/Dekkera* and *Trigonopsis cantarellii* were more susceptible to the inhibitory and biocide effects of dimethyl-dicarbonate and enological tannins than *Saccharomyces cerevisiae*

- yeasts. On the other hand, *Brettanomyces/Dekkera* was the most sensitive one to the action of potassium metabisulphite and chitosan.
7. The antimicrobial activity of the four enological agents studied was shown to be enhanced by the presence of 12.5 % ethanol in the yeast broth.
 8. Enological tannins in concentrations permitted for enological use, showed growth inhibitory and biocide activity only in the presence of ethanol in the medium and against the yeasts *Brettanomyces/Dekkera* and *T. cantarellii* ($MBC_{50} = 0.25$ mL/L).
 9. Chitosan up to those concentrations permitted for enological use, and in the presence of ethanol in the medium showed growth inhibitory and biocide activity against *Brettanomyces/Dekkera*, showing specificity against these yeasts ($MBC_{50} = 62$ mg/L).
 10. Dimethyl-dicarbonate in the range of concentrations allowed in enology, and in the presence of ethanol in the medium, showed biocide activity only against *Brettanomyces/Dekkera* ($MBC_{50} = 120$ mg/L).
 11. Potassium metabisulphite proved to be the most potent antimicrobial agent, showing its maximum activity against *Brettanomyces/Dekkera* ($MBC_{90} = 48$ mg/L in the presence of 12.5 % ethanol), followed by *T. cantarellii* ($MBC_{90} = 96$ mg/L in the presence of 12.5 % ethanol), and did not show biocide action against *S. cerevisiae* in the concentration range allowed for use in winemaking.
 12. The production of volatile phenols (4-ethylguaiacol, 4-ethylphenol, 4-vinylphenol and 4-propylguaiacol) in those red wines stored in bottles for 22 months and with different concentrations of potassium metabisulphite (28 to 100 mg/L), directly correlated with *Brettanomyces/Dekkera* populations, being totally excluded the possibility of production of these volatile phenols by lactic acid bacteria.
 13. Potassium metabisulphite at 100 mg/L avoided growth of *Brettanomyces/Dekkera*, and production of volatile phenols in the studied wines.
 14. We identified *non-Brettanomyces* yeast species (*Arthroascus schoenii*, *Candida ishiwadae*, *Meyerozyma guilliermondii*, *Pichia holstii*, *Pichia mandshurica*, *Trigonopsis variabilis* and *Trigonopsis cantarellii*) in samples of red wines in barrels, samples of wash-water from wood tanks, and also in air of cellar environments.

15. A total of 62 % of the non-*Brettanomyces* isolates studied, presented acidogenic capacity, and 67 % were able to generate spoiling aromas when grown on solid and liquid synthetic medium under laboratory conditions.
16. The most frequently found yeast isolate, after *Brettanomyces/Dekkera*, was *T. Cantarellii*, representing 54.5 % of 77 isolates identified from samples taken during the period 2008 to 2011.
17. The conventional PCR method for *T. cantarellii* designed in this thesis allows highly specific detection and identification of this yeast in any sample.
18. The yeast *T. cantarellii* has the ability to grow in dry red wines (< 0.2 g/L reducing sugars) under aging processes and with a high ethanol content (up to 13.8 %), and is more resistant to the action of potassium metabisulphite than *Brettanomyces/Dekkera*.
19. The yeasts of the species *T. cantarellii* are characterized by slow growth, with a significant percentage of strains (48% of the studied isolates) presenting potentially spoiling acidogenic metabolism, and generation of organoleptic deviation aromas (72% of the isolates studied) lower than those usually detected for *Brettanomyces/Dekkera*.

Referencias Bibliográficas

- ABBOTT, D. A., HYNES, S. H., & INGLEDEW, W. M. 2005a. Growth rates of *Dekkera/Brettanomyces* yeasts hinder their ability to compete with *Saccharomyces cerevisiae* in batch corn mash fermentations. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 66, 641-647
- ABBOTT, D. A. & INGLEDEW, W. M. 2005b. The importance of aeration strategy in fuel alcohol fermentations contaminated with *Dekkera/Brettanomyces* yeasts. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 69, 16-21
- AGNOLUCCI, M., REA, F., SBRANA, C., CRISTANI, C., FRACASSETTI, D., TIRELLI, A., & NUTI, M. 2010. Sulphur dioxide affects culturability and volatile phenol production by *Brettanomyces/Dekkera bruxellensis*. *International Journal of Food Microbiology*, 143, (1-2) 76-80
- AGUILAR-USCANGA, M.G., DÉLIA, M.L., & STREHAIANO, P. 2003. *Brettanomyces bruxellensis*: effect of oxygen on growth and acetic acid production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 61, (2) 157-162
- AGUILAR-USCANGA, M.G., ESCUDERO-ABARCA, B.I., GOMEZ-RODRIGUEZ, J., & CORTES-GARCÍA, R. 2007. Carbon sources and their effect on growth, acetic acid and ethanol production by *Brettanomyces bruxellensis* in batch culture. *Journal of Food Process Engineering*, 30, 13-23
- AGUILERA, F., PEINADO, R.A., MILLÁN, C., ORTEGA, J.M., & MAURICIO, J.C. 2006. Relationship between ethanol tolerance, H⁺-ATPase activity and the lipid composition of the plasma membrane in different wine yeast strains. *International Journal of Food Microbiology*, 110, (1) 34-42
- ALGUACIL, M., FIDALGO, M., JIMÉNEZ, J., LOZANO, J. I., NEVA, M. A., & PERDIGONES, F. 1998. Detección de *Brettanomyces/Dekkera* en instalaciones de vendimia mediante PCR. *Alimentación, Equipos y Tecnología*, Octubre, (8) 81-85
- ALTSCHUL, S.F., MADDEN, T.L., SCHÄFFER, A.A., ZHANG, J., ZHANG, Z., MILLER, W., & LIPMAN, D.J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 25, (17) 3389-3402
- ANDORRÀ, I., ESTEVE-ZARZOSO, B., GUILLAMÓN, J.M., & MAS, A. 2010. Determination of viable wine yeast using DNA binding dyes and quantitative PCR. *International Journal of Food Microbiology*, 144, (2) 257-262
- AZNAR, M., LOPEZ, R., CACHO, J., & FERREIRA, V. 2003. Prediction of aged red wine aroma properties from aroma chemical composition. Partial least squares regression models. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 51, 2700-2707
- BACKER, J.M. 2008. The regulation and function of Class III PI3Ks: novel roles for Vps34. *Biochemical Journal*, 410, 1-17
- BARATA, A., CALDEIRA, J., BOTELHO, R., PAGLIARA, A., MALFEITO-FERREIRA, M., & LOUREIRO, V. 2008a. Survival patterns of *Dekkera bruxellensis* in wines and inhibitory effect of sulphur dioxide. *International Journal of Food Microbiology*, 121, 201-207
- BARATA, A., GONZÁLEZ, S., MALFEITO-FERREIRA, M., QUEROL, A., & LOUREIRO, V. 2008. Sour rot-damaged grapes are sources of wine spoilage yeasts. *FEMS Yeast Research*, 1-10

- BARATA, A., MALFEITO-FERREIRA, M., & LOUREIRO, V. 2012. Changes in sour rotten grape berry microbiota during ripening and wine fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 154, (3) 152-161
- BARATA, A., NOBRE, A., CORREIA, P., MALFEITO-FERREIRA, M., & LOUREIRO, V. 2006. Growth and 4-ethylphenol production by the yeast *Pichia guilliermondii* in grape juices. *American Journal of Enology and Viticulture*, 57, (2) 133-138
- BARATA, A., PAGLIARA, D., PICCININNO, T., TARANTINO, F., CIARDULLI, W., MALFEITO-FERREIRA, M., & LOUREIRO, V. 2008b. The effect of sugar concentration and temperature on growth and volatile phenol production by *Dekkera bruxellensis* in wine. *FEMS Yeast Research*, 8, (7) 1097-1102
- BEECH, F.W. & CARR, J.G. 1955. A survey of inhibitory compounds for the separation of yeasts and bacteria in apple juices and ciders. *Journal of General Microbiology*, 12, (1) 85-94
- BENITO, S., PALOMERO, F., MORATA, A., CALDERÓN, F., & SUÁREZ-LEPE, J.A. 2006. Detección de *Brettanomyces/Dekkera* en vinos tintos mediante el uso de medios selectivo-diferenciales. *Tecnología del Vino*, julio/agosto, 27-31
- BENITO, S., PALOMERO, F., MORATA, U.C., & SUÁREZ-LEPE, J.A. 2009. Minimization of ethylphenol precursors in red wines via the formation of pyroanthocianins by selected yeasts. *International Journal of Food Microbiology*, 132, 145-152
- BLACKBURN, C.W. 2006. *Food spoilage microorganisms*. Abington, Cambridge: Woodhead Publishing Ltd. 712 p.
- BLOMQUIST, J., EBERHARD, T., SCHNÜRER, J., & PASSOTH, V. 2010. Fermentation characteristics of *Dekkera bruxellensis* strains. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87, (4) 1487-1497
- BLOMQUIST, J., SOUTH, E., TIUKOVA, L., MOMENI, M.H., HANSSON, H., STAHLBERG, J., HORN, S.J., SCHNÜRER, J., & PASSOTH, V. 2011. Fermentation of lignocellulosic hydrolysate by the alternative industrial ethanol yeast *Dekkera bruxellensis*. *Letters in Applied Microbiology*, 53, (1) 73-78
- BORNET, A., & TEISSEDE, P. L. 2008. Chitosan, chitin-glucan and chitin effects on minerals (iron, lead, cadmium) and organic (ochratoxin A) contaminants in wines. *European Food Research & Technology*, 226, 681-689
- BOULTON, R.B., SINGLETON, V.L., BISSON, L.F., & KUNKEE, R.E. 1996. *Principles and practices of winemaking*. New York, United States, Chapman & Hall.
- BUSTIN, S. & NOLAN, T. 2004. Pitfalls of quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. *Journal of Biomolecular Techniques* 15, (3) 155-166.
- CARUSO, M., FIORE, C., CONTURSI, M., SAZANO, G., PAPARELLA, A., & ROMANO, P. 2002. Formation of biogenic amines as criteria for the selection of wine yeasts. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 18, 159-163.
- CHAROENCHAI, C., FLEET, G.H., & HENSCHKE, P.A. 1998. Effects of temperature, pH, and sugar concentration on the growth rates and cell biomass of wine yeasts. *American Journal of Enology and Viticulture*, 49, (3) 283-288
- CHATONNET, P., DUBOURDIE, D., BOIDRON, J.N., & PONS, M. 1992. The origin of ethylphenols in wines. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 60, (2) 165-178
- CHATONNET, P., DUBOURDIEU, D., & BOIDRON, J.N. 1995. The influence of *Brettanomyces/Dekkera* sp. yeasts and lactic acid bacteria on the ethylphenol content of red wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 46, (4) 463-468
- CIANI, M. & COMITINI, F. 2011. Non-*Saccharomyces* wine yeasts have a promising role in biotechnological approaches to winemaking. *Annals of Microbiology*, 61, (1) 25-32

- CIANI, M. & FERRARO, L. 1997. Role of oxygen on acetic acid production by *Brettanomyces/Dekkera* in winemaking. *Journal of Science Food and Agriculture*, 75, 489-495
- CIANI, M., MACCARELLI, F., & FATICHENTI, F. 2003. Growth and fermentation behaviour of *Brettanomyces/Dekkera* yeasts under different conditions of aerobiosis. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 19, 419-422
- COCOLIN, L., BISSON, L.F., & MILLS, D.A. 2000. Direct profiling of the yeast dynamics in wine fermentations. *FEMS Microbiology Letters*, 189, 81-87
- COCOLIN, L., RANTSIOU, K., IACUMIN, L., ZIRONI, R., & COMI, G. 2004. Molecular detection and identification of *Brettanomyces/Dekkera bruxellensis* and *Brettanomyces/Dekkera anomalous* in spoiled wines. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, (3) 1347-1355
- COHEN, J. 1960. A coefficient of agreement for nominal scales. *Educational and Psychological Measurement*, 20, (1) 37-46
- COMITINI, F. & CIANI, M. 2011. *Kluyveromyces wickerhamii* killer toxin: purification and activity towards *Brettanomyces/Dekkera* yeasts in grape must. *FEMS Microbiology Letters*, 316, (1) 77-82
- COMITINI, F., DE, J.I., PEPE, L., MANNAZZU, I., & CIANI, M. 2004. *Pichia anomala* and *Kluyveromyces wickerhamii* killer toxins as new tools against *Dekkera/Brettanomyces* spoilage yeasts. *FEMS Microbiology Letters*, 238, (1) 235-240
- CONTERNO, L., LUCY JOSEPH, C.M., ARVICK, T.J., HENICK-KLING, T., & BISSON, L.F. 2006. Genetic and physiological characterization of *Brettanomyces bruxellensis* strains isolated from wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 57, (2) 139-147
- COSTA, A., BARATA, A., MALFEITO-FERREIRA, M., & LOUREIRO, V. 2008. Evaluation of the inhibitory effect of dimethyl dicarbonate (DMDC) against wine microorganisms. *Food Microbiology*, 25, (2) 422-427
- COSTELLO, P.J. & HENSCHKE, P.A. 2002. Mousy off-flavor of wine: precursors and biosynthesis of the causative N-heterocycles 2-ethyltetrahydropyridine, 2-acetyltetrahydropyridine, and 2-acetyl-1-pyrroline by *Lactobacillus hilgardii* DSM 20176. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, (24) 7079-7087
- 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. *Journal of Applied Microbiology*, 108, (4) 1450-1458
- COUTO, J.A., BARBOSA, A., & HOGG, T. 2005a. A simple cultural method for the presumptive detection of the yeast *Brettanomyces/Dekkera* in wines. *Letters in Applied Microbiology*, 41, 505-510
- COUTO, J.A., NEVES, F., CAMPOS, F.M., & HOGG, T. 2005b. Thermal inactivation of the wine spoilage yeasts *Dekkera/Brettanomyces*. *International Journal of Food Microbiology*, 104, 337-344
- CULLERÉ, L., ESCUDERO, A., CACHO, J., & FERREIRA, V. 2004. Gas chromatography-olfactometry and chemical quantitative study of the aroma of six premium quality spanish aged red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, (6) 1653-1660
- DAUDT, C.E. & OUGH, C.S. 1980. Action of dimethyldicarbonate on various yeasts. *American Journal of Enology and Viticulture*, 31, (1) 21-23
- 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. *Journal of Applied Microbiology*, 97, 910-915

- DELFINI, C., GAIA, P., SCHELLINO, R., STRANO, M., PAGLIARA, A., & AMBRÒ, S. 2002. Fermentability of grape must after inhibition with dimethyl dicarbonate (DMDC). *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 50, 5605-5611
- DIAS, L., DIAS, S., SACHO, T., STENDER, H., Querol, A., MALFEITO-FERREIRA, M., & LOUREIRO, V. 2003. Identification of yeasts isolated from wine-related environments and capable of producing 4-ethylphenol. *Food Microbiology*, 20, 567-574
- DING, J., HUANG, X., ZHANG, L., ZHAO, N., YANG, D., & ZHANG, K. 2009. Tolerance and stress response to ethanol in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85, (2) 253-263
- DIVOL, B. & LONVAUD-FUNEL, A. 2005. Evidence for viable but nonculturable yeasts in botrytis-affected wine. *Journal of Applied Microbiology*, 99, (1) 85-93
- DU TOIT, M., 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. *Journal of Applied Microbiology*, 98, 862-871
- EDLIN, D.A.N., NARBAD, A., DICKINSON, J.R., & LLOYD, D. 1995. The biotransformation of simple phenolic compounds by *Brettanomyces anomalus*. *FEMS Microbiology Letters*, 125, (2-3) 311-315
- EGLI, C.M. & HENICK-KLING, T. 2001. Identification of *Brettanomyces/Dekkera* species based on polymorphism in the rRNA internal transcribed spacer region. *American Journal of Enology and Viticulture* 52, (3) 241-247
- ENRIQUE, M., MARCOS, J.F., YUSTE, M., MARTÍNEZ, M., VALLÉS, S., & MANZANARES, P. 2008. Inhibition of the wine spoilage yeast *Dekkera bruxellensis* by bovine lactoferrin-derived peptides. *International Journal of Food Microbiology*, 127, (3) 229-234
- FERREIRA, V., JARAUTA, I., & CACHO, J. 2006. Physicochemical model to interpret the kinetics of aroma extraction during wine aging in wood: Model limitations suggest the necessary existence of biochemical processes. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 54, 3047-3054
- FLEET, G.H. 1993. *Wine microbiology and biotechnology*. Chur, Switzerland, Harwood Academic Publishers.
- FLEET, G.H. 1999. Microorganisms in food ecosystems. *International Journal of Food Microbiology*, 50, (1-2) 101-117
- FLEET, G.H. 2003. Yeast interaction and wine flavour. *International Journal of Food Microbiology*, 86, 11-22
- FREER, S. N. 2002. Acetic acid production by *Dekkera/Brettanomyces* yeasts. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 18, 271-275.
- FREER, S.N., DIEN, B., & MATSUDA, S. 2003. Production of acetic acid by *Dekkera/Brettanomyces* yeasts under conditions of constant pH. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 19, (1) 101-105
- FUGELSANG, K.C. & EDWARDS, C.G. 2007. *Wine Microbiology: Practical applications and procedures*. New York, Springer.
- FUGELSANG, K.C. & ZOECKLEIN, B.W. 2003. Population dynamics and effects of *Brettanomyces bruxellensis* strains on Pinot noir (*Vitis vinifera* L.) wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 54, (4) 294-300
- FUGELSANG, P.K. 1998. *Brettanomyces*: Dr Jekyll ou Mr Hyde des vins? *Biofutur*, (182) 22-23

- GAO, C. & FLEET, G.H. 1988. The effects of temperature and pH on the ethanol tolerance of the wine yeasts, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida stellata* and *Kloeckera apiculata*. *Journal of Applied Microbiology*, 65, (5) 405-409
- GARIJO, P., SANTAMARÍA, P., LÓPEZ, R., SANZ, S., OLARTE, C., & GUTIÉRREZ, A.R. 2008. The occurrence of fungi, yeasts and bacteria in the air of Spanish winery during vintage. *International Journal of Food Microbiology*, 125, 141-145
- GERÓS, H., AZEVEDO, M.M., & CÁSSIO, F. 2000. Biochemical studies on the production of acetic acid by the yeast *Dekkera anomala*. *Food Technology and Biotechnology*, 38, (1) 59-62
- GÓMEZ-RIVAS, L., ESCUDERO-ABARCA, B.I., AGUILAR-USCANDA, M.G., HAYWARD-JONES, P.M., MENDOZA, P., & RAMÍREZ, M. 2004. Selective antimicrobial action of Chitosan against spoilage yeasts in mixed culture fermentations. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 31, 16-22
- GRBIN, P. R. & HENSCHKE, P. A. 2000. Mousy off-flavour production in grape juice and wine by *Dekkera* and *Brettanomyces* yeasts. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 6, 255-262.
- GUZZON, R., WIDMANN, G., MALACARNE, M., NARDIN, T., NICOLINI, G., & LARCHER, R. 2011a. Survey of the yeast population inside wine barrels and the effects of certain techniques in preventing microbiological spoilage. *European Food Research and Technology*, 233, (2) 285-291
- GUZZON, R., WIDMANN, G., MALACARNE, M., NARDIN, T., NICOLINI, G., & LARCHER, R. 2011. Survey of the yeast population inside wine barrels and the effects of certain techniques in preventing microbiological spoilage. *European Food Research and Technology*, 233, (2) 285-291
- GUZZON, R., WIDMANN, G., SETTANNI, L., MALACARNE, M., FRANCESCA, N., & LARCHER, R. 2011b. Evolution of yeast populations during different biodynamic winemaking processes. *South african journal for enology and viticulture*, 32, (2) 242-250
- HARRIS, V., FORD, C. M., JIRANEK, V., & GRBIN, P. R. 2008. *Dekkera* and *Brettanomyces* growth and utilisation of hydroxycinnamic acids in synthetic media. *Applied Microbial and Cell Physiology*, 78, 997-1006
- HARRIS, V., JIRANEK, V., FORD, C., & GRBIN, P. 2010. Inhibitory effect of hydroxycinnamic acids on *Dekkera* spp. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 86, (2) 721-729
- HAYASHI, N., ARAI, R., TADA, S., TAGUCHI, H., & OGAWA, Y. 2007. Detection and identification of *Brettanomyces/Dekkera* sp. yeasts with a loop-mediated isothermal amplification method. *Food Microbiology*, 24, 778-785
- HENICK-KLING, T., EGLI, C. M., LICKER, J. L., MITRAKUL, C., & ACREE, T. E. 2000. *Brettanomyces* in wine. In *Fifth International Symposium on Cool Climate Viticulture & Oenology*. Melbourne, Australia, pp. 16-20.
- HERESZTYN, T. 1986. Metabolism of volatile phenolic compounds from hydroxycinnamic acids by *Brettanomyces* yeast. *Archives of Microbiology*, 146, (1) 96-98
- HERNÁNDEZ-LAUZARDO, A.N., BAUTISTA-BAÑOS, S., VELÁZQUEZ-DEL VALLE, M.G., MÉNDEZ-MONTEALVO, M.G., SÁNCHEZ-RIVERA, M.M., & BELLO-PÉREZ, L.A. 2008. Antifungal effects of chitosan with different molecular weights on in vitro development of *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.:Fr.) Vuill. *Carbohydrate Polymers*, 73, (4) 541-547
- HORNSEY, I. 2007. *The Chemistry and Biology of winemaking*. Cambridge, The Royal Society of Chemistry, 457 p.
- IBEAS, J. I., LOZANO, I., PERDIGONES, F., & JIMÉNEZ, J. 1996. Detection of *Dekkera-Brettanomyces* strains in Sherry by a nested PCR method. *Applied and Environmental Microbiology* 62, (3) 998-1003
- ILAND, P., EWART, A., & SITTERS, J. 1993. *Techniques for chemical analysis and stability tests of grape*

- juice and wine*. Kitchener Press Pty. Ltd., Adelaide, Australia, pp. 16-42
- JARA, C., MATEO, E., GUILLAMÓN, J. M., TORIJA, M. J., & MAS, A. 2008. Analysis of several methods for the extraction of high quality DNA from acetic acid bacteria in wine and vinegar for characterization by PCR-based methods. *International Journal of Food Microbiology*, 128, 336-341
- JOLLY, N.P., AUGUSTYN, O.P.H., & PRETORIUS, I.S. 2003. The occurrence of Non-*Saccharomyces cerevisiae* yeast species over three vintages in four vineyards and grape musts from four production regions of the Western Cape, South Africa. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 24, (2) 35-42
- JONES, G.V. 2007. Climate change: observations, projections, and general implications for viticulture and wine production. *Economics Department Working Paper*, 7, (1) 15
- KONG, M., CHEN, X.G., XING, K., & PARK, H.J. 2010. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review. *International Journal of Food Microbiology*, 144, (1) 51-63
- KURTZMAN, C. 2007. New anamorphic yeast species: *Candida infanticola* sp. nov., *Candida polysorbophila*; sp. nov., *Candida transvaalensis* sp. nov. and *Trigonopsis californica* sp. nov. *Antonie van Leeuwenhoek*, 92, (2) 221-231
- KURTZMAN, C. 2011. Phylogeny of the ascomycetous yeasts and the renaming of *Pichia anomala* to *Wickerhamomyces anomalus*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 99, (1) 13-23
- KURTZMAN, C.P. & FELL, J.W. 1998. *The Yeasts: A Taxonomic Study*, 4 ed. Amsterdam, Elsevier B.V., 1055 p.
- KURTZMAN, C.P. & ROBNETT, C.J. 2007. Multigene phylogenetic analysis of the *Trichomonascus*, *Wickerhamiella* and *Zygoascus* yeast clades, and the proposal of *Sugiyamaella* gen. nov. and 14 new species combinations. *FEMS Yeast Research*, 7, (1) 141-151
- KURTZMAN, C.P., ROBNETT, C.J., & BASEHOAR-POWERS, E. 2008. Phylogenetic relationships among species of *Pichia*, *Issatchenkia* and *Williopsis* determined from multigene sequence analysis, and the proposal of *Barnettozyma* gen. nov., *Lindnera* gen. nov. and *Wickerhamomyces* gen. nov. *FEMS Yeast Research*, 8, (6) 939-954
- LICKER, J. L., ACREE, T. E., & HENICK-KLING, T. 1998. What is "Brett" (*Brettanomyces*) flavour? A preliminary investigation. *Chemistry of wine flavor*, 714, 96-115. A.L. ACS symposium series, Waterhouse & S.E. Ebeler eds.
- LONVAUD-FUNEL, A. & RENOUF, V. 2005. Incidence microbiologique de l'usage de barriques neuves et/ou de barrique usagées. *Revue Française d'Oenologie*, (211) 10-14
- LOPES, C.A., JOFRÉ, V., & SANGORRÍN, M.P. 2009. Spoilage yeasts in Patagonian winemaking: molecular and physiological features of *Pichia guilliermondii* indigenous isolates. *Canadian Journal of Microbiology*, 55, (741) 177-184
- LÓPEZ, R., AZNAR, M., CACHO, J., & FERREIRA, V. 2002. Determination of minor and trace volatile compounds in wine by solid-phase extraction and gas chromatography with mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A*, 966, (1-2) 167-177
- LOUREIRO, V. & MALFEITO-FERREIRA, M. 2003. Spoilage yeasts in the wine industry. *International Journal of Food Microbiology*, 86, 23-50
- LOUREIRO, V. & QUEROL, A. 1999. The prevalence and control of spoilage yeasts in foods and beverages. *Trends in Food Science and Technology*, 10, (11) 356-365
- LUSTRATO, G., VIGENTINI, I., DE LEONARDIS, A., ALFANO, G., TIRELLI, A., FOSCHINO, R., & RANALLI, G. 2010. Inactivation of wine spoilage yeasts *Dekkera bruxellensis* using low electric current treatment (LEC). *Journal of Applied Microbiology*, 109, (2) 594-604

- MAHMUD, S.A., HIRASAWA, T., & SHIMIZU, H. 2010. Differential importance of trehalose accumulation in *Saccharomyces cerevisiae* in response to various environmental stresses. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 109, (3) 262-266
- MALACRINÒ, P., ZAPPAROLI, G., TORRIANI, S., & DELLAGLIO, F. 2001. Rapid detection of viable yeasts and bacteria in wine by flow cytometry. *Journal of Microbiological Methods*, 45, (2) 127-134
- MALFEITO-FERREIRA, M., TARECO, M., & LOUREIRO, V. 1997. Fatty acid profiling: a feasible typing system to trace yeast contamination in wine bottling plants. *International Journal of Food Microbiology*, 38, (2-3) 143-155
- MANSFIELD, A.K., ZOECKLEIN, B.W., & WHITON, R.S. 2002. Quantification of glycosidase activity in selected strains of *Brettanomyces bruxellensis* and *Oenococcus oeni*. *American Journal of Enology and Viticulture*, 53, (4) 303-307
- MANZANARES, P., RAMÓN, D., & QUEROL, A. 1999. Screening of non-*Saccharomyces* wine yeasts for the production of b-D-xylosidase activity. *International Journal of Food Microbiology*, 46, (2) 105-112
- MANZANARES, P., ROJAS, V., GENOVÉS, S., & VÁZQUEZ, F. 2000. A preliminary search for anthocyanin-b-D-glucosidase activity in non-*Saccharomyces* wine yeasts. *International Journal of Food Science and Technology* 35, 95-103
- MARTENS, H., ISERENTANT, D., & VERACHTERT, H. 1997. Microbiological aspects of a mixed yeast-bacterial fermentation in the production of a special Belgian acid ale. *Journal of the Institute of Brewing*, 103, 85-91
- MARTORELL, P., BARATA, A., MALFEITO-FERREIRA, M., FERNANDEZ-ESPINAR, M.T., LOUREIRO, V., & QUEROL, A. 2006. Molecular typing of the yeast species *Dekkera bruxellensis* and *Pichia guilliermondii* recovered from wine related sources. *International Journal of Food Microbiology*, 106, (1) 79-84
- MATAIX, E. & LUQUE DE CASTRO, M.D. 2001. Simultaneous (or sequential) determination of the total polyphenol index (or I₂₈₀) and density in wines by flow injection. *Analyst*, 126, (2) 251-255
- MITRAKUL, C.M., HENICK-KLING, T., & EGLI, C.M. 1999. Discrimination of *Brettanomyces/Dekkera* yeast isolates from wine by using various DNA finger-printing methods. *Food Microbiology*, 16, (1) 3-14
- MORNEAU, A.D., ZUEHLKE, J.M., & EDWARDS, C.G. 2011. Comparison of media formulations used to selectively cultivate *Dekkera/Brettanomyces*. *Letters in Applied Microbiology*, 53, (4) 460-465
- MORRISSEY, W.F., DAVENPORT, B., QUEROL, A., & DOBSON, A.D.W. 2004. The role of indigenous yeasts in traditional Irish cider fermentations. *Journal of Applied Microbiology*, 97, (3) 647-655
- NARDI, T., REMIZE, F., & ALEXANDRE, H. 2010. Adaptation of yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Brettanomyces bruxellensis* to winemaking conditions: a comparative study of stress genes expression. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 88, (4) 925-937
- NARVHUS, J.A. & GADAGA, T.H. 2003. The role of interaction between yeasts and lactic acid bacteria in African fermented milks: a review. *International Journal of Food Microbiology*, 86, (1-2) 51-60
- NAUMOV, G.I., NAUMOVA, E.S., SMITH, M.T., & DE HOOG, G.S. 2003. Ribosomal DNA sequencing and reinstatement of the genus *Arthroascus* von Arx. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 49, (5) 267-270
- NAVASCUÉS, E. 2009. *Brettanomyces/Dekkera*: control y detección en bodegas. *Revista Enología*, 6, (1) 12-16
- NEI, M. & KUMAR, S. 2000. *Molecular Evolution and Phylogenetics*. New York, Oxford University Press, 333 p.

- OELOFSE, A., PRETORIUS, I. S., & DU TOIT, M. 2008. Significance of *Brettanomyces* and *Dekkera* during winemaking: a synoptic review. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 29, (2) 128-144
- OHARA, Y., NONOMURA, H., & YAMAZAKI, T. 1964. *Torulopsis vinacea* sp. nov., a new yeast isolated from grape musts. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 10, (1) 77-78
- PALACIOS, A., BORINAGA, I., & CASTILLO, D. 2012. Estudio comparativo sobre sistemas de desinfección de barricas alternativos al SO₂. *Revista Enólogos*. Disponible en: <http://www.revistaenologos.es/estudio-comparativo-sobre-sistemas-de-desinfecci%C3%B3n-investigacion-ciencia-17.html>
- PALACIOS, A., HATONNET, P., & GHEZZI, G. 2011. Higiene de los recipientes de madera para el envejecimiento del vino: importancia, principios y herramientas para hoy y mañana. *Semana Vitivinícola*, 3345, 1-5
- PHISTER, T. G. & MILLS, D. A. 2003. Real-time PCR assay for detection and enumeration of *Dekkera bruxellensis* in wine. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, (12) 7430-7434
- PRAKITCHAIWATTANA, C. J., FLEET, G. H., & HEARD, G. M. 2004. Application and evaluation of denaturing gradient gel electrophoresis to analyse the yeast ecology of wine grapes. *FEMS Yeast Research*, 4, (8) 865-877
- PRETORIUS, I.S. 2000. Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast*, 16, (8) 675-729
- PUÉRTOLAS, E., LÓPEZ, N., CONDÓN, S., RASO, J., & ÁLVAREZ, I. 2009. Pulsed electric fields inactivation of wine spoilage yeast and bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 130, (1) 49-55
- PUIG, A. & VILAVELLA, M. 2003. Stabilisation microbiologique et biochimique des vins par application de la technique de hautes pressions. *Bulletin de l'OIV*, 76, (869) 596-618
- QUEROL, A. & FLEET, G.H. 2006. *Yeast in food and beverage*. Berlin Heidelberg New York, Springer-Verlag.
- QUEROL, A., JIMÉNEZ, M., & HUERTA, T. 1990. Microbiological and enological parameters during fermentation of musts from poor and normal grape-harvests in the region of Alicante (Spain). *Journal of Food Science*, 55, (6) 1603-1606
- RAMOS, M.C., JONES, G.V., & MARTÍNEZ-CASASNOVAS, J.A. 2008. Structure and trends in climate parameters affecting winegrape production in northeast Spain. *Climate Research*, 38, (1) 1-15
- 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. *Microbiological Research*, 162, (2) 154-167
- 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. *Journal of Applied Microbiology*, 100, (6) 1208-1219
- RENOUF, V., STREHAIANO, P., & LONVAUD-FUNEL, A. 2008. Effectiveness of dimethyldicarbonate to prevent *Brettanomyces bruxellensis* growth in wine. *Food Control*, 19, (2) 208-216
- RIBÉRAU-GAYON, P., DUBOURDIE, D., DONÈCHE, B., & LONVAUD-FUNEL, A. 2006. *Handbook of Enology: the Microbiology of Wine and Vinifications*, 2 ed. Chichester, John Wiley & Sons.
- RICE, P., LONGDEN, I., & BLEASBY, A. 2000. The European Molecular Biology Open Software Suite. *Trends in Genetics*, 16, (6) 276-277

- RODRIGUES, F., CÔRTE-REAL, M., LEÃO, C., VAN DIJKEN, J.P., & PRONK, J.T. 2001a. Oxygen requirements of the food spoilage yeast *Zygosaccharomyces bailii* in synthetic and complex media. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, (5) 2123-2128
- RODRIGUES, N., GONÇALVES, G., PEREIRA DA SILVA, S., MALFEITO FERREIRA, M., & LOUREIRO, V. 2001b. Development and use of a new medium to detect yeasts of the genera *Dekkera/Brettanomyces*. *Journal of Applied Microbiology*, 90, 588-599
- ROJO-BEZARES, B., SÁENZ, Y., ZARAZAGA, M., TORRES, C., & RUIZ-LARREA, F. 2007. Antimicrobial activity of nisin against *Oenococcus oeni* and other wine bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 116, 32-36
- ROLLER, S. & COVILL, N. 1999. The antifungal properties of chitosan in laboratory media and apple juice. *International Journal of Food Microbiology*, 47, (1-2) 67-77
- ROMANO, A., PERELLO, M.C., DE REVEL, G., & LONVAUD-FUNEL, A. 2008. Growth and volatile compound production by *Brettanomyces/Dekkera bruxellensis* in red wine. *Journal of Applied Microbiology*, 104, (6) 1577-1585
- ROMANO, P., & SUZZI, G. 1993. Sulphur dioxide and wine microorganisms. In *Wine Microbiology and Biotechnology*, G. Fleet, ed. Chur, Harwood Academic Publishers, pp. 373-393 .
- ROMO-SÁNCHEZ, S., ALVES-BAFFI, M., ARÉVALO-VILLENA, M., ÚBEDA-IRANZO, J., & BRIONES-PÉREZ, A. 2010. Yeast biodiversity from oleic ecosystems: Study of their biotechnological properties. *Food Microbiology*, 27, (4) 487-492
- SAAVEDRA, D., GODOY, P., NARVÁEZ, C., ZEPEDA, S., URRUTIA, M., BREVIS, P., & REYES, E. 2005. *Brettanomyces*, un contaminante en nuestras viñas. *Ciencia & Trabajo*, 7, (17) 93-96
- SÁEZ, J.S., LOPES, C.A., KIRS, V.C., & SANGORRÍN, M.P. 2010. Enhanced volatile phenols in wine fermented with *Saccharomyces cerevisiae* and spoiled with *Pichia guilliermondii* and *Dekkera bruxellensis*. *Letters in Applied Microbiology*, 51, (2) 170-176
- SÁEZ, J.S., LOPES, C.A., KIRS, V.E., & SANGORRÍN, M. 2011. Production of volatile phenols by *Pichia manshurica* and *Pichia membranifaciens* isolated from spoiled wines and cellar environment in Patagonia. *Food Microbiology*, 28, (3) 503-509
- SAMBROOK, J. & RUSSELL, D.W. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3 ed. New York, Cold Spring Harbor.
- SANTOS, A., NAVASCUÉS, E., BRAVO, E., & MARQUINA, D. 2011. *Ustilago maydis* killer toxin as a new tool for the biocontrol of the wine spoilage yeast *Brettanomyces bruxellensis*. *International Journal of Food Microbiology*, 145, (1) 147-154
- SANTOS, A., SAN MAURO, M., BRAVO, E., & MARQUINA, D. 2009. PMKT2, a new killer toxin from *Pichia membranifaciens*, and its promising biotechnological properties for control of the spoilage yeast *Brettanomyces bruxellensis*. *Microbiology*, 155, (2) 624-634
- SANTOS, M., NUNES, C., SARAIVA, J., & COIMBRA, M. 2012. Chemical and physical methodologies for the replacement/reduction of sulfur dioxide use during winemaking: review of their potentialities and limitations. *European Food Research and Technology*, 234, (1) 1-12
- SCHACHNER, J. 1929. *Trigonopsis variabilis* nov. gen. et spec. *Zeitschrift für das gesamte Brauwesen*, 52, 137-142
- SERPAGGI, V., REMIZE, F., SEQUEIRA-LE GRAND, A., & ALEXANDRE, H. 2010. Specific identification and quantification of the spoilage microorganism *Brettanomyces* in wine by flow cytometry: A useful tool for winemakers. *Cytometry*, 77A, (6) 497-499

- SILVA, P., CARDOSO, H., & GERÓS, H. 2004. Studies on the wine spoilage capacity of *Brettanomyces/Dekkera* spp. *American Journal of Enology and Viticulture* 55, (1) 65-72.
- SINIGAGLIA, M., DI BENEDETTO, N., BEVILACQUA, A., CORBO, M., CAPECE, A., & ROMANO, P. 2010. Yeasts isolated from olive mill wastewaters from southern Italy: technological characterization and potential use for phenol removal. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87, (6) 2345-2354
- SMITH, M.T. & GRINSVEN, A.M. 1984. *Dekkera anomala* sp. nov., the teleomorph of *Brettanomyces anomalus*, recovered from spoiled soft drinks. *Antonie van Leeuwenhoek*, 50, (2) 143-148
- SNOWDON, E.M., BOWYER, M.C., GRBIN, P.R., & BOWYER, P.K. 2006. Mousy off-flavor: a review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, (18) 6465-6474
- SOARES, E.V. 2011. Flocculation in *Saccharomyces cerevisiae*: a review. *Journal of Applied Microbiology*, 110, (1) 1-18
- SPONHOLZ, W. R. 1993. Wine spoilage by microorganisms, In *Wine Microbiology and Biotechnology*, Chur, Harwood Academic Publishers, pp. 395-420.
- STENDER, H., KURTZMAN, C., HYLDIG-NIELSEN, J., SORENSEN, D., BROOMER, A., OLIVEIRA, K., PERRY-O'KEEFE, H., SAGE, A., YOUNG, B., & COULL, J. 2001. Identification of *Dekkera bruxellensis* (*Brettanomyces*) from wine by fluorescence in situ hybridization using peptide nucleic acid probes. *Applied and Environmental Microbiology* 67, (2) 938-941
- 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 Chemistry*, 102, (1) 10-21
- SUZUKI, M., SUH, S.O., SUGITA, T., & NAKASE, T. 1999. A phylogenetic study on galactose-containing *Candida* species based on 18S ribosomal DNA sequences. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 45, (5) 229-238
- TCHOBANOV, I., GAL, L., GUILLOUX-BENATIER, M., REMIZE, F., NARDI, T., GUZZO, J., SERPAGGI, V., & ALEXANDRE, H. 2008. Partial vinylphenol reductase purification and characterization from *Brettanomyces bruxellensis*. *FEMS Microbiology Letters*, 284, 213-217
- TEOH, A.L., HEARD, G., & COX, J. 2004. Yeast ecology of Kombucha fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 95, (2) 119-126
- 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. *International Journal of Food Microbiology*, 129, 237-243
- TORO, M. E. & VÁZQUEZ, F. 2002. Fermentation behaviour of controlled mixed and sequential cultures of *Candida cantarellii* and *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 18, 347-354
- TSUCHIYA, Y., OGAWA, M., & NAKAKITA, Y. 2005. *Primer and primer set for detecting and discriminating yeast, lactic acid bacterium and obligate anaerobe and detection/discrimination method using the same*, PCT/JP2005/005404 (patente).
- UBEDA, J.F. & BRIONES, A.I. 1999. Microbiological quality control of filtered and non-filtered wines. *Food Control*, 10, (1) 41-45
- USAITE, R., JEWETT, M.C., OLIVEIRA, A.P., YATES, J.R., OLSSON, L., & NIELSEN, J. 2009. Reconstruction of the yeast Snf1 kinase regulatory network reveals its role as a global energy regulator. *Molecular Systems Biology*, 5, (319) 1-12
- USSEGLIO-TOMASSET, L., & BOSIA, P.D. 1984. La prima costante di dissociazione dell'acido solforoso. *Vini d'Italia*, 5, 7-14

- WATANABE, D., WU, H., NOGUCHI, C., ZHOU, Y., AKAO, T., & SHIMOI, H. 2011. Enhancement of the initial rate of ethanol fermentation due to dysfunction of yeast stress response components Msn2p and/or Msn4p. *Applied and Environmental Microbiology*, 77, (3) 934-941
- WILSON, I.G. 1998. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, (10) 3741-3751
- WYMAN, C.E., SPINDLER, D.D., GROHMANN, K., & LASTICK, S.M. 1987. Simultaneous saccharification and fermentation of cellulose with the yeast *Brettanomyces clausenii*. *Biotechnology and Bioengineering Symp.*, 17, 221-238
- YAP, A. & BAGNALL, W. 2009. High Power ultrasonics: a new powerful tool for removing tartrate deposits and killing viable *Brettanomyces* cells in barrels. *Australian and New Zealand Wine Industry Journal*, 24, (5) 29-39
- YAP, A., SCHMID, F., JIRANEK, V., GRBIN, P.R., & BATES, D. 2008. Inactivation of *Brettanomyces/Dekkera* in wine barrels by high power ultrasound. *Australian and New Zealand Wine Industry Journal*, 23, (5) 32-40
- ZOTT, K., MIOT-SERTIER, C., CLAISSE, O., LONVAUD-FUNEL, A., & MASNEUF-POMAREDE, I. 2008. Dynamics and diversity of non-Saccharomyces yeasts during the early stages in winemaking. *International Journal of Food Microbiology*, 125, (2) 197-203

Anexos

American Journal of Enology and Viticulture

Comparison of specific real-time PCR and conventional culture for detection and enumeration of *Brettanomyces* in red wine --Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Full Title:	Comparison of specific real-time PCR and conventional culture for detection and enumeration of <i>Brettanomyces</i> in red wine
Short Title:	Comparative study of two <i>Brettanomyces</i> analysis methods
Article Type:	Research Note
Keywords:	<i>Brettanomyces</i> , <i>Dekkera</i> , real-time PCR, spoilage, wine
Corresponding Author:	Fernanda Ruiz-Larrea, Ph.D. University of La Rioja Logrono, La Rioja SPAIN
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	University of La Rioja
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Caure Portugal, Master D.
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Caure Portugal, Master D. Fernanda Ruiz-Larrea, Ph.D.
Order of Authors Secondary Information:	
Manuscript Region of Origin:	SPAIN
Abstract:	<p><i>Brettanomyces/Dekkera</i> is considered the main cause of microbial spoilage and organoleptic deviations of red-wines. This work compares sensitiveness and effectiveness of conventional microbiological culture and real-time PCR (Q-PCR) methods for <i>Brettanomyces/Dekkera</i> detection and quantification, and demonstrates a positive correlation between both methods. Moreover, an improved DNA extraction protocol enabled quantification of <i>Brettanomyces/Dekkera</i> cells by Q-PCR down to a value of 25 cells mL⁻¹ in low turbidity wines, and 16 cells mL⁻¹ in turbid wines in a total of 324 red-wine samples. It is also concluded that the conventional culture analysis is time-consuming but lower-cost than Q-PCR, and it is simple and efficient in quantifying viable <i>Brettanomyces/Dekkera</i> cells.</p>
Suggested Reviewers:	<p>Maret Du Toit, Prof. Prof in Oenology , University of Stellenbosch mdt@sun.ac.za She is a qualified Professor in Oenology at the University of of Stellenbosch and an expert of international reputation in microbiology and wine fermentations.</p> <p>Virgilio B Loureiro, Prof. Universidade Técnica de Lisboa vloureiro@isa.utl.pt Prof. Loureiro has published a high number of articles on <i>Brettanomyces</i> and is an expert in Oenology of international reputation.</p>
Opposed Reviewers:	



Prof. Fernanda Ruiz-Larrea,
University of La Rioja,
Instituto de Ciencias de la Vid y del Vino
ICVV (CSIC, UR, Gobierno de La Rioja)
Department of Food and Agriculture
Av. Madre de Dios 51,
26006 Logroño,
Spain.

Editor of the *American Journal of Enology and Viticulture* (AJEV)

22 March 2012

Dear Editor

We submit the manuscript entitled: "Comparison of specific real-time PCR and conventional culture for detection and enumeration of *Brettanomyces* in red wines" as a research note for your journal. We present data that we think will be of great value for both wine-makers and researchers that need quality DNA samples extracted from red wines to be further analysed by Molecular Biology methods. The method we report allows obtaining quality DNA samples from red wines with high turbidities and therefore, wine samples can be taken at any stage of the wine-making process. Moreover, the data provided and the conclusions of this research note allow wine-makers choosing the most appropriate analysis method to detect the spoiling yeast *Brettenomyces* in their wines.

Thank you very much for your attention and I hope I will receive news from you soon,
Yours sincerely,

Fernanda Ruiz-Larrea, Ph.D.

Comparison of specific real-time PCR and conventional culture for detection and enumeration of *Brettanomyces* in red-wines

Running title: Comparative study of two *Brettanomyces* analysis methods

Cauré Portugal and Fernanda Ruiz-Larrea

University of La Rioja, Instituto de Ciencias de la Vid y del Vino (CSIC-UR-CAR), Av.
Madre de Dios 51, 26006 Logroño, Spain.

***Corresponding author:** Fernanda Ruiz-Larrea

University of La Rioja, Instituto de Ciencias de la Vid y del Vino (CSIC-UR-CAR), Av.
Madre de Dios 51, 26006 Logroño, Spain.

E-mail: fernanda.ruiz@unirioja.es

Acknowledgments

We acknowledge the valuable help of Zenaida Hernández of the Department of Mathematics and Computing of the University of La Rioja to carry out the statistical analysis of data. This research was financially supported by grant CENIT-2008/1002 of the Spanish Ministry of Science and Innovation MICINN-CDTI. Cauré B Portugal was a contractual researcher supported by grant CENIT-2008/1002.

Abstract

Brettanomyces/Dekkera is considered the main cause of microbial spoilage and organoleptic deviations of red-wines. This work compares sensitiveness and effectiveness of conventional microbiological culture and real-time PCR (Q-PCR) methods for *Brettanomyces/Dekkera* detection and quantification, and demonstrates a positive correlation between both methods. Moreover, an improved DNA extraction protocol enabled quantification of *Brettanomyces/Dekkera* cells by Q-PCR down to a value of 25 cells mL⁻¹ in low turbidity wines, and 38 cells mL⁻¹ in turbid wines in a total of 324 red-wine samples. It is also concluded that the conventional culture analysis is time-consuming but lower-cost than Q-PCR, and it is simple and efficient in quantifying viable *Brettanomyces/Dekkera* cells.

Keywords: *Brettanomyces*, *Dekkera*, real-time PCR, spoilage, wine

24

Introduction

25 *Brettanomyces* is a genus of yeast implicated in wine spoilage and currently responsible
26 for increasingly severe quality problems in wine industry. *Brettanomyces* is referred to
27 the non-sporulated anamorphic yeast form, and *Dekkera* to the sporulated
28 ascosporeogenous state, and they are described in the literature as part of the microbiota
29 of many fermented products such as wine, beer, cider, kefir, etc. (Suárez et al. 2007)
30 Although these yeasts have been rarely reported in grapes (Renouf and Lonvaud-Funel
31 2007) or in fermenting musts (Renouf et al. 2006), they are commonly detected in red-
32 wine during aging in oak barrels, vats, pumps and on equipment that is difficult to
33 sterilize (Fugelsang 1998). Wines infected by this yeast develop off-flavors, the so-
34 called "Brett" character, which is described as animal, stable, horse sweat, mousy, burnt
35 plastic or wet wool (Licker et al. 1998), a problem often detected in association with
36 other wine faults, including oxidation and volatile acidity (Grbin and Henschke 2000).
37 The mousy taint is the result of pyridine synthesis by *Brettanomyces/Dekkera* from
38 lysine and ethanol, while the stable odors are caused by volatile phenols, mainly 4-
39 ethylguaiacol and 4-ethylphenol, secondary metabolites produced by
40 *Brettanomyces/Dekkera* from phenolic acids naturally present in wine (Coulon et al.
41 2010; Woolfit et al. 2007). Off-flavors start to be detected when active cells are present
42 in wine at concentrations above 10^3 cells mL⁻¹ and consequently, when volatile phenols
43 concentrations reach 425 µg L⁻¹ (Chatonnet et al. 1995). Control of these
44 microorganisms is difficult due to the number of adaptations they possess to survive in
45 the physiologically stressing environmental conditions of a finished wine, *i.e.*, a high
46 content of alcohol [up to 150 mL L⁻¹ (Regulation of the EU n° 110/2008)] residual or no
47 sugar availability, anaerobiosis and CO₂ pressure. Little amounts of oxygen have a
48 positive effect on the growth of *Brettanomyces/Dekkera* in a reducing environment, and

49 this may explain why the micro-oxygenation technique favours the growth of these
50 yeasts, and the naturally mild oxidizing conditions of aging in oak barrels can activate
51 metabolically viable residual *Brettanomyces/Dekkera* cells (Suárez et al. 2007).
52 Identification and quantification on time of this yeast are extremely important for
53 appropriate actions of wine makers to avoid organoleptic deviations of wine
54 characteristics.

55 Traditional methods for identification and enumeration of *Brettanomyces/Dekkera* in
56 wine are based on culturing in selective media, and typically, it takes one or two weeks
57 to perform. In this case, identification and selectivity are based on one or several of the
58 following characteristics: production of the "Brett" character due to the presence of
59 hydroxycinnamic acids in the culture medium; production of acetic acid, which is
60 detected by color change due to the presence of a pH indicator in the selective medium
61 or to calcium carbonate; presence of antibiotics that prevent the growth of numerically
62 superior yeasts (specially *Saccharomyces spp.*) and bacteria; presence of ethanol in the
63 growth medium as a selective carbon source for *Brettanomyces* (Snowdon et al. 2006).
64 Nevertheless, none of these culture media are totally selective, and false-positive and
65 false-negative results can occur. Molecular biology methods for rapid detection and
66 identification of *Brettanomyces/Dekkera* have been developed, and many are based on
67 PCR analysis of the DNA (Cocolin et al. 2004; Ibeas et al. 1996). They offer the
68 advantage of high specificity, fast results, and reliability; nevertheless, quantification is
69 not achieved by these classical PCR methods. Real-time or quantitative PCR (Q-PCR)
70 assays offer not only the possibility of detecting and identifying with high specificity
71 and reliability, but also permit quantification of target DNA and consequently, of yeast
72 population in wine (Delaherche et al. 2004; Hierro et al. 2006; Martorell et al. 2005;
73 Phister and Mills 2003; Phister et al. 2007; Salinas et al. 2009; Tessonnière et al. 2009;

74 Zott et al. 2010); nevertheless, it presents the handicap of requiring the absence of
75 inhibitors of the DNA polymerase in the analyzed sample, among which wine
76 polyphenols are notably included (Delaherche et al. 2004; Tessonière et al. 2009).

77 In this study, we investigated and evaluated different protocols for preparation of wine
78 samples and DNA extraction, and we successfully applied the optimized protocol to a
79 total of 324 red-wine samples with turbidities ranging from 0.1 to 723 NTUs that were
80 subsequently analyzed by Q-PCR. Red-wines were also submitted to the conventional
81 microbiological culture method on a selective medium to detect, identify and quantify
82 *Brettanomyces/Dekkera*. We assessed the quantification limits of both Q-PCR and
83 microbiological culture analyses and compared the obtained results to show a
84 correlation between both methodologies as well as the pros and cons of each one.

85

86

Materials and Methods

87 Yeast strains and culture conditions

88 *B. bruxellensis* BY24 and *Saccharomyces cerevisiae* LV5 strains of the collection of
89 oenological isolates of the Department of Food and Agriculture of the University of La
90 Rioja were used in this study. Yeasts were cultivated at 30 °C for 48 hours onto YPD-
91 agar plates [10 g L⁻¹ yeast extract (Oxoid, England), 20 g L⁻¹ peptone (Difco, England),
92 20 g L⁻¹ glucose (Panreac Química SA, Spain), 20 g L⁻¹ agar (Difco)] under aerobic
93 conditions. DBDM medium with some modifications was used as
94 *Brettanomyces/Dekkera* selective and identification medium (Rodrigues et al. 2001)
95 containing an off-odor indicator and a pH-color indicator that detects acetic acid
96 production (named as *Brettanomyces*-specific medium).

97

98 **Wine samples and microbiological analysis**

99 Red-wine of Tempranillo variety of the Appellation of Origin Rioja (Spain) was used
100 for comparison and finally developing an optimized protocol for DNA extraction and
101 Q-PCR analysis. Moreover, 324 samples of red-wines of Tempranillo variety of the
102 Spanish Appellations of Origin Rioja and Ribera del Duero, aged in oak barrels and
103 suspected of being spoiled by *Brettanomyces*, were analyzed by microbiological culture
104 on the *Brettanomyces*-specific medium and by Q-PCR analysis. These red-wines
105 presented turbidity values from 0.1 to 723 NTU. Wine samples were processed for
106 microbiological culture as follows: a 10 mL volume of the homogenized wine sample
107 was placed in a sterile tube, centrifuged at 3,000 g for 10 min. The supernatant was
108 discarded; the cell pellet was resuspended in 1 mL of sterile 0.15 M NaCl; 100 μ L of
109 this cell suspension was spread onto YPD-agar and *Brettanomyces*-specific medium
110 plates, and incubated at 30 °C for total yeasts and *Brettanomyces* counting respectively.
111 Colonies obtained on the *Brettanomyces*-specific medium were isolated and
112 reconfirmed as positive *Brettanomyces* by the specific classical PCR analysis described
113 below.

114

115 **Wine samples and washing procedures**

116 The following washing procedures were applied before yeast DNA extraction from
117 wine samples in order to perform subsequent PCR and Q-PCR analyses.

118 *Washing method A:* Low turbidity wines (≤ 50 NTU) were submitted to the following
119 washing procedure: 1 mL of the homogenized wine sample was placed into an
120 eppendorf tube and centrifuged at 13,600 g for 5 min in a Heraeus microfuge (Biofuge
121 Pico, Heraeus, Germany). Supernatants were discarded and pellets resuspended in 1 mL

122 of washing buffer (0.05 M Tris.Cl, 0.15M NaCl, 100 ml L⁻¹ ethanol). After briefly
123 vortexing, samples were centrifuged again and supernatants discarded. This washing
124 and centrifugation process was repeated once more, supernatants were discarded and
125 cell pellets were conserved for DNA extraction.

126 *Washing method B:* Wines with turbidity higher than 50 NTU were submitted to the
127 same procedures of washing method A, and when necessary one more washing step was
128 included to recover a colorless supernatant. Pellets were resuspended in 100 µL of
129 washing buffer and spread onto a sterile YPD-agar plate. The suspension was carefully
130 distributed onto the plate surface with a sterilized inoculation loop and incubated over-
131 night at 30 °C. This step was included to promote absorption of wine color particles into
132 the agar and to prevent DNA polymerase to be inhibited by wine tannins and pigments
133 during PCR analysis (Delaherche et al. 2004; Phister and Mills 2003; Tessonière et al.
134 2009; Jara et al. 2008). After incubation, yeast cells grown on the surface of the whole
135 plating area were recovered with an inoculation loop repeatedly and resuspended in 1
136 mL of washing buffer. Samples were centrifuged again in the microfuge at 13,600 g for
137 5 min, and pellets were submitted to DNA extraction.

138 Control wine samples were prepared to evaluate the different protocols for DNA
139 extraction and subsequent Q-PCR analysis. Serial dilutions of *B. bruxellensis* BY24
140 cells were suspended either in an amicrobically filtered red-wine (0.20 µm, Corning Inc,
141 Germany), or in 0.15 M sterile NaCl solution. The cell concentration range studied was
142 $4 \cdot 10^7 - 4 \text{ cells mL}^{-1}$, determined by optical density at 600 nm with a spectrophotometer
143 Ultrospec 2000 (Pharmacia Biotech, England), where 1 OD₆₀₀ corresponds
144 approximately to $2 \cdot 10^7 \text{ cells mL}^{-1}$ (Ausubel et al. 1992), and by colony counting on
145 YPD-agar plates. These control samples contained as well a fixed concentration of $2 \cdot 10^5$

146 cells mL⁻¹ of *S. cerevisiae* strain LV5 to resemble enological conditions and to quench
147 cell losses during DNA extraction procedures.

148

149 **DNA extraction methods**

150 Six different DNA extraction methods were tested:

151 **I.** Cell pellets were resuspended in 200 µL of InstaGene matrix (BioRad, USA) and
152 manipulated according to manufacturer's recommendations.

153 **II.** Cell pellets were resuspended in 200 µL of PrepMan Ultra reagent (Applied
154 Biosystems, USA), and treated according to manufacturer's recommendations.

155 **III.** Cell pellets were resuspended in 200 µL of lysis buffer (500mM pH 8.0 Tris,
156 100mM β-mercaptoethanol). A volume of 25 µL of fresh lyticase (3 mg mL⁻¹;
157 Sigma-Aldrich, USA) was added to each sample, and samples were incubated in a
158 water bath at 37 °C for 25 min; this step was repeated once more. Samples were
159 vigorously vortex stirred, boiled in water bath for 15 min, frozen and thawed, and
160 centrifuged at 3,400 g for 1 min in the microfuge. Supernatants were recovered and
161 transferred to DNeasy plant mini spin columns (Qiagen, Germany), and
162 manipulated according to manufacturer's recommendations.

163 **IV.** Cell pellets were resuspended in 200 µL of lysis buffer (500 mM pH 8.0 Tris, 100
164 mM β-mercaptoethanol). A volume of 25 µL of fresh lyticase (3 mg mL⁻¹; Sigma-
165 Aldrich) was added to each sample, and samples were incubated in a water bath at
166 37 °C for 25 min; this step was repeated once more to obtain cell lysates, and
167 finally boiled in water bath for 15 min. Samples were vigorously vortex stirred,
168 frozen and thawed, and centrifuged at 3,400 g for 1 min in the microfuge. After
169 centrifugation, 100 µL of the supernatant was recovered in a sterile tube, and

170 protein precipitation and DNA isolation were carried out according to Sambrook et
171 al. (1989) with some modifications, as follows: 200 μL of solution II (0.2 N NaOH,
172 0.01 g mL^{-1} sodium dodecyl sulfate) were added to the 100 μL sample, gently
173 mixed, and incubated in an ice bath for 15 min. 150 μL of solution III (3 M for
174 potassium ion, 5 M for acetate) were added, gently mixed and incubated in the ice
175 bath for 5 min. The sample was then centrifuged at 13,400 g for 5 min at 4 $^{\circ}\text{C}$
176 (5415R Centrifuge; Eppendorf, Germany), 900 μL of ethanol at 4 $^{\circ}\text{C}$ were added
177 and gently mixed. The sample was once more centrifuged and the supernatant was
178 gently eliminated with a micropipette. After drying, the pellet was resuspended in
179 50 μL of ultra-pure water.

180 **V.** Cell pellets were resuspended in 200 μL of the lysis buffer and submitted to the cell
181 lysis with fresh lyticase as described above. After incubations with lyticase samples
182 were vigorously vortex stirred, frozen and thawed, and centrifuged at 3,400 g for 1
183 min in the microfuge. The supernatants obtained after centrifugation were carefully
184 transferred to Amicon filters (0.5 mL, 100 K membrane; Millipore, Ireland) and
185 manipulated according to manufacturer's recommendations.

186 **VI.** Cell pellets were resuspended in 200 μL of the lysis buffer and submitted to the cell
187 lysis with fresh lyticase described in method IV. After incubations with lyticase,
188 samples were vigorously vortex stirred, frozen and thawed, and centrifuged at
189 3,400 g for 1 min in the microfuge. After centrifugation, 25 μL of
190 polyvinylpyrrolidone (PVPP) (PolyClar, Laffort, Spain) were added to the cell
191 lysate and the sample was kept under gentle agitation at 4 $^{\circ}\text{C}$ during 60 min. It was
192 then centrifuged at 13,400 g for 1 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ (5415R Centrifuge; Eppendorf), and
193 100 μL of the supernatant recovered in a sterile tube. Protein precipitation and

194 DNA isolation were carried out as previously described in method IV. Two
195 different concentrations of PVPP were assayed, 10 and 20 mg mL⁻¹.

196

197 **PCR analysis**

198 To confirm *Brettanomyces/Dekkera* identification of wine isolates recovered by
199 growing on the selective medium, the specific amplification of *Brettanomyces* by PCR
200 previously published by Cocolin and col. (2004) was used, with some modifications as
201 follows: PCR reactions were carried out in 50 µL final volumes containing 10 µL of
202 DNA template, 0.5 µM of the respective primers (DB90F and DB394R), 5 µL of
203 10xNH₄ reaction buffer (Bioline, United Kingdom), 3 µL of 50mM MgCl₂ solution
204 (Bioline), 0.05 mM of each deoxynucleotide (Deoxynucleotide Mix; Sigma, USA), and
205 1.5 U of Taq DNA polymerase (Bioline). PCR conditions were: initial denaturing at 95
206 °C for 5 min; followed by 40 cycles of denaturing at 95 °C for 1 min, annealing at 67 °C
207 for 45 s, and extension at 72 °C for 7 s.

208 PCR reaction based on the variable D1/D2 domain of 26S ribosomal subunit of
209 ascomycetous yeasts (Kurtzman and Robnett 1998) was subsequently used to check
210 DNA quality and to detect possible failures on DNA extraction protocol.

211 All reactions were performed with T3000 thermocycler (Biometra, Germany). PCR
212 products were analyzed by electrophoresis on 15 g L⁻¹ agarose gel (D1 low EEO;
213 Pronadisa, Spain) in Tris-borate-EDTA buffer (90 mM Tris-borate, 2 mM EDTA;
214 Panreac, Spain), stained with ethidium bromide (0.3 mg L⁻¹; BioRad, USA), and
215 visualized under a Chemi Genius UV-lighter (Syngene, United Kingdom) with the
216 GeneSnap v 6.01 software (Syngene).

217

218 **Real-time (or quantitative) PCR (Q-PCR) analysis**

219 The specific Q-PCR method to detect and quantify *Brettanomyces/Dekkera* previously
220 described by Phister and Mills (2003) was used. Reactions were performed in triplicates
221 using an iCycler-iQ thermocycler with iCycler-optical module (BioRad). Each 25 μ L
222 reaction mix contained 12.5 μ L of iQ-SYBR Green Supermix (Bio-Rad), 7.2 μ L of
223 ultra-pure water, 0.225 μ L of DBRUX-F primer (900 nM), 0.075 μ L of DBRUX-R
224 primer (300 nM), and 5 μ L of DNA sample. Q-PCR results were analyzed with iCycler-
225 iQ software 3.1.7050 (BioRad).

226

227 **Statistical analysis**

228 Comparison of quantification data obtained by Q-PCR and concomitantly by counting
229 on the specific medium was performed using bilateral Pearson's correlation with a 0.01
230 significance level. Analyses were performed using IBM-SPSS Statistics 19.0 software
231 for Windows (IBM-SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Comparison of results obtained by
232 culture on the specific medium and Q-PCR analysis was expressed as per cent
233 agreement between both methods and kappa statistics. The estimated kappa, which
234 excludes the chance-induced agreement, was interpreted as follows: values below 0.4
235 represent "poor" agreement, 0.4 - 0.6 represent "moderate" agreement, 0.6 - 0.8
236 represent "good" agreement, and greater than 0.8 represent "excellent" agreement.

237

238 **Results and Discussion**

239 **DNA extraction methods and PCR analysis**

240 Results of *Brettanomyces* specific PCR analysis performed with DNA samples obtained
241 from control wines containing 10-fold dilution series of *Brettanomyces* strain BY24

242 cells and submitted to the six different DNA extraction protocols described in Materials
243 and Methods section, are shown in **Table 1**. As shown in this table, no amplification
244 bands were obtained when the methods *I*, *II* and *III* were used to obtain DNA from
245 *Brettanomyces* cells. In these cases, negative results were obtained as well for
246 ascomycetous yeasts PCR (Kurtzman and Robnett 1998) (results not shown), indicating
247 that those methods did not work for DNA extraction in such a complex matrix as wine.
248 With method *IV*, *Brettanomyces*-specific bands were detected for every cell
249 concentration from 4×10^7 to 4×10^2 cells mL⁻¹. For both methods, *V* and *VI*,
250 *Brettanomyces*-specific bands could be detected for every cell concentration assayed
251 down to a limit of 40 cells mL⁻¹. The method *VI* of extraction was performed using 10
252 and 20 mg mL⁻¹ PVPP, and band amplifications by PCR were obtained only when 20
253 mg mL⁻¹ was used.

254

255 **DNA extraction methods and Q-PCR analysis**

256 Based on the results obtained for PCR analysis, DNA extraction methods *IV*, *V* and *VI*
257 for were tested for subsequent DNA detection and quantification by the Q-PCR
258 described in Materials and Methods. As it is known, in Q-PCR analysis the increase of
259 the recorded fluorescent signal is proportional to the amount of DNA synthesized
260 during each amplification cycle, and individual reactions are characterized by the cycle
261 fraction at which fluorescence first rises above a defined background fluorescence, or
262 the threshold cycle (Ct) (Bustin 2004). Specific melting temperature (T_m) was always
263 verified (**Figure 1**) and the threshold cycles for each triplicate were considered for
264 application on every standard curve. **Figure 2** illustrates the amplification curves
265 obtained by Q-PCR analysis of DNA extracted from an amicrobically filtered red-wine
266 containing 10-fold dilution series, from 4×10^6 to 4 cells mL⁻¹, of *Brettanomyces* BY24

267 control cells and following DNA extraction method V. **Figure 3.B** shows these Q-PCR
268 results expressed as Ct values versus *Brettanomyces* cell concentration in wine
269 (logarithm values), and the linear correlation coefficient resulting from the
270 corresponding analysis. The results obtained when this experiment was repeated
271 following DNA extraction methods IV and VI are shown in **Figures 3.A** and **3.C**
272 respectively. Although methods IV and VI worked for DNA extraction from cells in red-
273 wine and PCR polymerase inhibitors were apparently eliminated, in both cases the
274 target DNA was in a very low concentration and the data obtained did not return good
275 linear correlation factors. Both methods were not considered valid for detection and
276 quantification of *Brettanomyces/Dekkera*, above all because wine spoilage is considered
277 critical when the population of this yeast reaches levels of 10^3 cells mL⁻¹ (Chatonnet et
278 al. 1995; Lonvaud-Funel and Renouf 2005). The method V of DNA extraction (**Figure**
279 **3.B**) provided satisfactory results, showing minimal losses of genetic material as well as
280 no interfering inhibition in the Q-PCR analysis. Under these conditions, the linear
281 correlation was maintained in the concentration range from 40 to $4 \cdot 10^7$ cells mL⁻¹.

282 When this method V was used for analysis of high turbidity wines, results were quite
283 different and inhibition of Q-PCR reaction was frequent. Therefore, the washing method
284 B described in Materials and Methods section was applied when wines showed turbidity
285 higher than 50 NTU and subsequently, the method V for DNA extraction was
286 performed. **Figure 4.A** shows the results obtained from three independent experiments
287 performed with *Brettanomyces* BY24 control cells suspended in filtered red-wine
288 (turbidity-free), following cell washing method A and subsequent method V for DNA
289 extraction. **Figure 4.B** shows the results obtained when the experiments were performed
290 with *Brettanomyces* BY24 control cells suspended in the non-filtered red-wine
291 (turbidity = 73.6 NTU) following cell washing method B and subsequent method V for

292 DNA extraction. Results showed that both methods rendered good linear correlation
293 factors ($R^2 \geq 0.96$), as shown in **Figure 4**, detection limits were $4 - 4 \cdot 10^6$ cells mL⁻¹ and
294 quantification of *Brettanomyces* was possible down to a value of 25 cells mL⁻¹ for low
295 turbidity wines, and 38 cells mL⁻¹, for wines with turbidity higher than 50 NTU
296 submitted to the cell washing method *B*.

297 Previous works successfully applied Q-PCR for detection of *Brettanomyces/Dekkera* in
298 red-wines. Notwithstanding, the lowest limits of quantification that were reported were
299 around 10^4 cells mL⁻¹, and authors mainly attributed such an absence of sensitiveness to
300 the presence of inhibitors or also to interactions between phenolic compounds and cell
301 components (Delaherche et al. 2004) . Phister and Mills (2003) could quantify down to
302 10 cells mL⁻¹ when the obtained DNA sample was diluted 10-fold before Q-PCR
303 reaction, and moreover, assays were performed in previously filtered red-wine.
304 Tessonière et al. (2009) also proposed a method of DNA preparation using PVPP for
305 direct analysis by Q-PCR of naturally spoiled wines, obtaining limits of detection in the
306 range of 26 – 100 cells mL⁻¹ for red-wines, but reported failures on detection of target
307 DNA when wines had some turbidity. The major handicap for all these methods applied
308 to natural spoiled red-wines was the presence of solid particles in suspension, which
309 meant wine turbidity, and wine tannins and pigments that inhibit PCR; consequently,
310 the reported threshold detection limits were higher than the quantification limit of 16
311 cells mL⁻¹ that we report in this work for wines with high turbidity (> 50 NTU), which
312 allows detecting and quantifying *Brettanomyces/Dekkera* in all winemaking stages,
313 regardless of the turbidity of the sample. In this case, previous washing steps and
314 intermediated over-night incubation on plates allowed, respectively, removal of color
315 pigments and other particles, thereby eliminating inhibition on PCR reactions.

316

317 **Results obtained by Q-PCR and microbiological analysis by culture of wine**
318 **samples**

319 **Table 2** shows the results obtained for the 324 red-wine samples submitted to both
320 analyses: microbiological culture on the *Brettanomyces*-specific medium, and the Q-
321 PCR analysis described above. According to the analyses results, samples were grouped
322 into 5 classes:

323 1) Those showing both specific amplification signals by Q-PCR, and growth of
324 acidogenic colonies on the *Brettanomyces*-specific medium (21.0 % of total
325 samples). Analysis of these samples by Q-PCR rendered quantification results
326 either in the same range of magnitude as that CFU mL⁻¹ obtained by culture
327 analysis, or up to 10³ fold higher numbers (data not shown). These differences can
328 be explained by the fact that Q-PCR quantifies both viable and non-viable
329 *Brettanomyces* cells, which include dead cells and remaining DNA from broken
330 *Brettanomyces* cells in the wine sample, whereas the culture analysis on the specific
331 medium quantifies only viable, and therefore, metabolically active *Brettanomyces*
332 cells. Q-PCR analysis allowed estimating *Brettanomyces* populations, including
333 both viable and non-viable cells, down to 7 cells mL⁻¹, and the microbiological
334 culture analysis on the specific medium allowed quantifying even 1 CFU mL⁻¹ of
335 viable *Brettanomyces* cells. Statistical analysis of these data returned a positive
336 Pearson's correlation of 0.772 between both methods (p < 0.01).

337 2) Wine samples that were *Brettanomyces*-free according to both analyses. These
338 samples accounted for 34.6 % of the total analyzed wine samples. Among these
339 *Brettanomyces*-negative samples, 46 % showed very low non-*Brettanomyces* yeast
340 populations (from 0 to less than 10 CFU mL⁻¹) due to clarification procedures

341 performed by the winemaker during wine elaboration, and 54 % showed total yeast
342 populations between 10 and 10^6 UFC mL⁻¹ (data not shown).

343 The overall agreement between Q-PCR analysis and the microbiological culture
344 method was 86.8 %, with a “good” (0.6 – 0.8 interval) agreement range (kappa
345 value = 0.69), as shown in **Table 2**. It should be pointed out that this agreement
346 range was obtained for the analysis of the wide range of red-wine samples of this
347 study (turbidities from 0.1 to 723 NTU) that contained their own indigenous
348 microbial population, which included bacteria and yeast, most probably *S.*
349 *cerevisiae* strains remaining from the alcoholic fermentation.

350 3) Samples with false-negative results by Q-PCR and showing positive-colonies on
351 the *Brettanomyces*-specific medium, which were reconfirmed by specific PCR
352 analysis of the isolated strains from the *Brettanomyces*-specific medium. These
353 samples accounted for 7.7 % of the total ones, presenting populations from 1 to 10^4
354 CFU mL⁻¹ on the *Brettanomyces*-specific medium. Most of them (84 %) showed
355 very low total-yeast populations (< 100 CFU mL⁻¹) (data not shown), which could
356 be the reason why during the washing and/or DNA extraction stages, cells and
357 DNA for Q-PCR were lost and Q-PCR analysis rendered negative results.

358 4) Wine samples that presented a positive result by Q-PCR and negative results by cell
359 culture on the *Brettanomyces*-specific medium (31.8 % of total wine samples).
360 These results, similarly to group 1, can be explained by the fact that Q-PCR
361 quantifies both viable and non-viable *Brettanomyces* cells, and DNA present in the
362 wine sample. Non-viable *Brettanomyces* cells and DNA still persisting in the wine
363 samples indicate that *Brettanomyces* cells have existed in that wine at some stage of
364 the elaboration process, and can provide useful information for the wine maker,
365 who can thus assess whether a process of sanitation has been successfully applied.

366 5) This group includes samples that gave false-positive colonies on the
367 *Brettanomyces*-specific medium (4.9 %), and which after isolation and analysis by
368 specific PCR were not confirmed as *Brettanomyces*. False-negatives on specific or
369 semi-specific culture media always occur, and species such as *Candida*
370 *wickerhamii*, *Candida cantarellii*, *Debaryomyces hansenii*, *Debaryomyces*
371 *anomala*, *Kluyveromyces lactis* and *Pichia guilliermondii* have been reported on
372 DBDM medium (Dias et al. 2003), and many other authors also detected growth of
373 non-*Saccharomyces* yeasts in *Brettanomyces*-specific media (Morneau et al. 2011;
374 Renouf and Lonvaud-Funel 2007).

375 Since the time required for DNA extraction and Q-PCR analysis (approximately 5 h) is
376 shorter than the microbiological culture analysis on the specific medium, which can take
377 up to 2 weeks, Q-PCR analysis is of interest for wine makers. Moreover, the cell
378 washing and DNA extraction methods presented here allow analyzing red-wines with
379 high turbidity (up to 723 NTU), and therefore at early stages of their ageing period. This
380 quick method presents as well the characteristic of its high specificity, which prevents
381 false positives due to other yeast cells that can be growing in the same wine.
382 Nevertheless, it should be taken into account that quantification by Q-PCR includes
383 non-viable and DNA from broken *Brettanomyces* cells, which renders high numbers for
384 populations that might be inactive. It should be born in mind that during the preparatory
385 protocol of DNA extraction from wine, some losses could occur (in our study 7.7 % of
386 the analyzed samples), and false negative analyses can appear with this Q-PCR analysis;
387 however, this deficiency can be considered of minor importance if we regard as the
388 threshold limit for appearance of the typical unpleasant off-odor 10^3 CFU mL⁻¹ of
389 *Brettanomyces* population (Chatonnet et al. 1995; Lonvaud-Funel and Renouf 2005)
390 and consequently, this method is appealing for the winemaking industry. On the other

391 hand, the classical microbiological culture analysis on specific media counterbalances
392 its lack of rapidity by its low cost, simplicity, and efficacy in quantifying viable
393 *Brettanomyces* cells, as it can detect even 1 CFU mL⁻¹ of metabolically active cells that
394 will be finally the ones responsible for generating the off-odors that spoil wine.

395

396

Conclusions

397 The wine maker knows that *Brettanomyces* is not expected to change wine quality from
398 an unspoiled by a spoiled status in a period of days, but it will take longer, and he can
399 choose the best strategy to analyze and control potential *Brettanomyces* contamination
400 in his wines: either the fast and efficient Q-PCR method, which can be applied to wine
401 samples with high turbidity that have been submitted to the DNA extraction protocol
402 described in this article, or the classical microbiological culture method, which is lower
403 cost, requires less equipment and possesses the lowest threshold (1 CFU mL⁻¹) for
404 detecting viable *Brettanomyces* spoiling cells in wine.

405

406

Literature Cited

407 Ausubel, F., R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith, and K.
408 Struhl. 1992. Short protocols in Molecular Biology. John Wiley & Sons Inc., San
409 Francisco, United States.

410 Bustin, S.A. 2004. A - Z of quantitative PCR. International University Line, London,
411 United Kingdom.

412 Chatonnet, P., D. Dubordieu, and J.N. Boidron. 1995. The Influence of
413 *Brettanomyces/Dekkera* sp. yeasts and lactic acid bacteria on the ethylphenol content
414 of red wines. Am. J. Enol. Vitic. **46**:463-468.

- 415 Cocolin, L., K. Rantsiou, L. Iacumin, R. Zironi, and G. Comi. 2004. Molecular
416 detection and identification of *Brettanomyces/Dekkera bruxellensis* and
417 *Brettanomyces/Dekkera anomalus* in spoiled wines. Appl. Environm. Microbiol.
418 **70**:1347-1355.
- 419 Coulon, J., M.C. Perello, A. Lonvaud-Funel, G. De Revel, and V. Renouf. 2010.
420 *Brettanomyces bruxellensis* evolution and volatile phenols production in red wines
421 during storage in bottles. J. of Appl. Microbiol. **108**:1450-1458.
- 422 Delaherche, A., O. Claisse, and . A. Lonvaud-Funel. 2004. Detection and quantification
423 of *Brettanomyces bruxellensis* and 'ropy' *Pediococcus damnosus* strains in wine by
424 real-time polymerase chain reaction. J. Appl Microbiol. **97**:910-915.
- 425 Dias, L., S. Dias, T. Sancho, H. Stender, A. Querol, M. Malfeito-Ferreira, and V.
426 Loureiro. 2003. Identification of yeasts isolated from wine-related environments and
427 capabe of producing 4-ethylphenol. Food Microbiol. **20**:567-574.
- 428 Fugelsang, P.K. 1998. *Brettanomyces*: Dr Jekyll ou Mr Hyde des vins? Biofutur.
429 182:22-23.
- 430 Grbin, P.R. and P.A. Henschke. 2000. Mousy off-flavour production in grape juice and
431 wine by *Dekkera* and *Brettanomyces* yeasts. Aust. J. Grape Wine Res. **6**:255-262.
- 432 Hierro, N., B. Esteve-Zarzozo, A. González, A. Mas, and J.M. Guillamón. 2006. Real-
433 time quantitative PCR (QPCR) and reverse transcription-QPCR for detection and
434 enumeration of total yeasts in wine. Appl. Environ. Microbiol. **72**:7148-7155.
- 435 Ibeas, J.I., Lozano, I., Perdignes, F., and Jiménez, J. (1996) Detection of *Dekkera*-
436 *Brettanomyces* strains in Sherry by a nested PCR method. Appl. Environ. Microbiol.
437 **62**:998-1003.
- 438 Jara, C., E. Mateo, J.M. Guillamón, M.J. Torija, and A. Mas. 2008. Analysis of several
439 methods for the extraction of high quality DNA from acetic acid bacteria in wine and

- 440 vinegar for characterization by PCR-based methods. *Int. J. Food Microbiol.* **128**:336-
441 341.
- 442 Kurtzman, C. and D.J. Robnett. 1998. Identification and phylogeny of ascomycetous
443 yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences.
444 *Antonie van Leeuwenhoek* **73**:331-371.
- 445 Licker, J.L., T.E. Acree, and T. Henick-Kling. 1998. What is "Brett" (*Brettanomyces*)
446 flavor? A preliminary investigation. In: *Chemistry of Wine Flavor*. A.L. Waterhouse,
447 and S.E. Ebeler (eds.), pp. 96-115. American Chemical Soc., California, United States.
- 448 Lovaud-Funel, A. and V. Renouf. 2005. Incidence microbiologique de l'usage de
449 barriques neuves et/ou de barrique usagées. *Revue Française d'Oenologie* **211**: 10-
450 14.
- 451 Martorell, P., A. Querol, and M.T. Fernández-Espinar. 2005. Rapid identification and
452 enumeration of *Saccharomyces cerevisiae* cells in wine by real-time PCR. *Appl.*
453 *Environ. Microbiol.* **71**:6823-6830.
- 454 Morneau, A.D., J.M. Zuehlke, and C.G. Edwards. 2011. Comparison of media
455 formulations used to selectively cultivate *Dekkera/Brettanomyces*. *Lett. Appl.*
456 *Microbiol.* **53**:460-465.
- 457 Phister, T.G., and D. A. Mills. 2003. Real-time PCR assay for detection and
458 enumeration of *Dekkera bruxellensis* in wine. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:7430-
459 7434.
- 460 Phister, T.G., H. Rawsthorne, C.M.L. Joseph, and D.A. Mills. 2007. Real-time PCR
461 assay for detection and enumeration of *Hanseniaspora* species from wine and juice.
462 *Am. J. Enol. Vitic.* **58**:229-233.

- 463 Renouf, V., O. Claisse, and A. Lonvaud-Funel. 2005. Understanding the microbial
464 ecosystem on the grape berry surface through numeration and identification of yeast
465 bacteria. *Aust. J. Grape Wine Res.* **11**:316-327.
- 466 Renouf, V., M. Falcou, C. Miot-Sertier, M.C. Perello, G. De Revel, and A. Lonvaud-
467 Funel. 2006. Interactions between *Brettanomyces bruxellensis* and other yeast species
468 during the initial stages of winemaking. *J. Appl. Microbiol.* **100**:1208-1219.
- 469 Renouf, V. and Lonvaud-Funel, A. (2007). Development of an enrichment medium to
470 detect *Dekkera/Brettanomyces bruxellensis*, a spoilage wine yeast., on the surface of
471 grape berries. *Microbiological Research* **162**, 154-167.
- 472 Rodrigues, N., G. Gonçalves, S. Pereira da Silva, M. Malfeito-Ferreira, and V. Loureiro.
473 2001. Development and use of a new medium to detect yeasts of the genera
474 *Dekkera/Brettanomyces*. *J. Appl. Microbiol.* **90**:588-599.
- 475 Salinas, F., D. Garrido, A. Ganga, G. Veliz, and C. Martínez. 2009. Taqman real-time
476 PCR for the detection and enumeration of *Saccharomyces cerevisiae* in wine. *Food*
477 *Microbiol.* **26**:328-332.
- 478 Sambrook, J., E.F. Fritsch, and F. Maniatis. 1989. *Molecular cloning: a laboratory*
479 *manual* (Cold Spring Harbor Lab. Press: New York, United States) v. 1, p. 1.21.
- 480 Snowdon, E.M., M.C. Bowyer, P.R. Grbin, and P.K. Bowyer. 2006. Mousy off-flavor: a
481 review. *J. Agric. Food Chem.* **54**:6465-6474.
- 482 Suárez, R., J.A. Suárez-Lepe, A. Morata, and F. Calderón. 2007. The production of
483 ethylphenols in wine by yeasts of the genera *Brettanomyces* and *Dekkera*: a review.
484 *Food Chem.* **102**:10-21.
- 485 Tessonnière, H., S. Vidal, L. Barnavon, H. Alexandre, and F. Remize. 2009. Design and
486 performance testing of a real-time PCR assay for sensitive and reliable direct
487 quantification of *Brettanomyces* in wine. *Int. J. Food Microbiol.* **129**:237-243.

- 488 Woolfit, M., E. Rozpedowska, J. Piskur, and K.H. Wolfe. 2007. Genome survey
489 sequencing of the wine spoilage yeast *Dekkera (Brettanomyces) bruxellensis*.
490 Eukaryot. Cell **6**:721-733.
- 491 Zott, K., O. Claisse, P. Lucas, J. Coulon, A. Lonvaud-Funel, and I. Masneuf-Pomarede.
492 2010. Characterization of the yeast ecosystem in grape must and wine using real-time
493 PCR. Food Microbiol. **27**:559-567.
- 494

495 **Figure captions**

496 **Figure 1:** Melting temperature curves of amplicons generated by Q-PCR of
497 *Brettanomyces* DNA. Specific melting temperature: 85 °C. Amplicons were
498 generated from DNA extracted from 10-fold dilution series, from 3×10^6 to 3×10^4
499 cells mL⁻¹, of *Brettanomyces* cells in red wine.

500

501 **Figure 2:** Amplification curves of Q-PCR analysis of DNA extracted from 10-
502 fold dilution series, from 4×10^6 (curve *a*) to 4 cells mL⁻¹ (curve *g*) of
503 *Brettanomyces* cells in red wine.

504

505 **Figure 3:** Q-PCR results obtained with three different methods for DNA extraction
506 from *Brettanomyces* cells in wine. Fluorescence detection cycle threshold values are
507 plotted versus the logarithm of cells mL⁻¹. DNA extraction methods: (A) Method IV
508 (DNA fractionated precipitation); (B) Method V (Amicon filters); and (C) Method VI
509 (DNA fractionated precipitation with PVPP). R²: linear correlation coefficient.

510

511 **Figure 4:** Q-PCR results obtained with cell washing methods A and B described in
512 Experimental section. Fluorescence detection cycle threshold values are plotted versus
513 logarithms of cells mL⁻¹. (A) Cell washing method A for low turbidity wines (≤ 50
514 NTU). (B) Cell washing method B for high turbidity wines (> 50 NTU). R²: linear
515 correlation coefficient.

516

517 **Table 1:** Results of classical PCR analysis of yeast DNA obtained following six
 518 different extraction methods.
 519

Sample (cells mL ⁻¹)	PCR results					
	DNA extraction methods					
	I	II	III	IV	V	VI
4 10 ⁷	-	-	-	+	+	+
4 10 ⁶	-	-	-	+	+	+
4 10 ⁵	-	-	-	+	+	+
4 10 ⁴	-	-	-	+	+	+
4 10 ³	-	-	-	+	+	+
4 10 ²	-	-	-	+	+	+
40	-	-	-	-	+	+
4	-	-	-	-	-	-

520

521 A negative result (-) indicates no amplified band. A positive result (+) indicates specific amplified band
 522 by PCR analysis. DNA extraction methods as described in the Experimental section: (I) extraction using
 523 InstaGene matrix; (II) extraction with PrepMan reagent; (III) extraction using DNeasy plant columns;
 524 (IV) extraction by cell lysis and DNA fractionated precipitation; (V) extraction using Amicon filters; (VI)
 525 extraction by cell lysis and DNA fractionated precipitation using PVPP (20 mg mL⁻¹).

526

527 **Table 2** – Analyses of red wine samples by Q-PCR and culture on the *Brettanomyces*-
 528 specific medium.

Group	Q-PCR analysis	<i>Brett</i> -specific culture analysis	Wine samples ^a (%)	Agreement (%)	Kappa
1)	+	+	68 (21.0 %)		
2)	-	-	112 (34.6 %)		
3)	-	+	25 (7.7 %)		
4)	+	-	103 (31.8 %)		
5)	-	false positives ^b	16 (4.9 %)		
Total number of analysed wine samples			324	86.8	0.69

529

530 A positive result (+) in the Q-PCR analysis indicates appearance of a specific fluorescence signal and
 531 quantification. A positive result (+) in the *Brettanomyces*-specific culture analysis indicates appearance
 532 of acidogenic colonies on the culture medium and colony counting.

533 ^a Percentage respect to the total number of analysed wine samples. ^b False positives indicate that isolates
 534 grown onto the specific culture medium were confirmed by PCR as non-*Brettanomyces*.

Figure 1

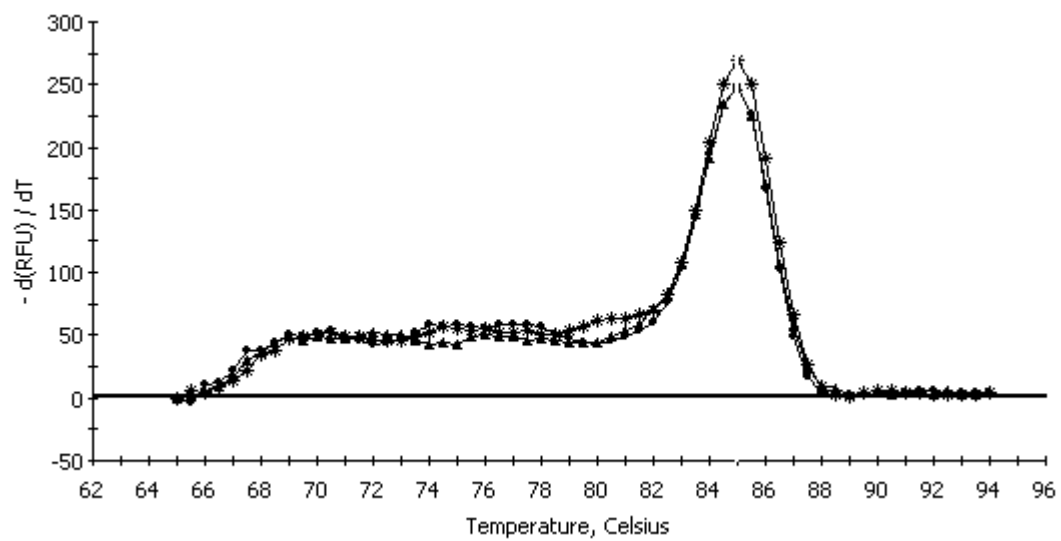


Figure 1

Figure 2

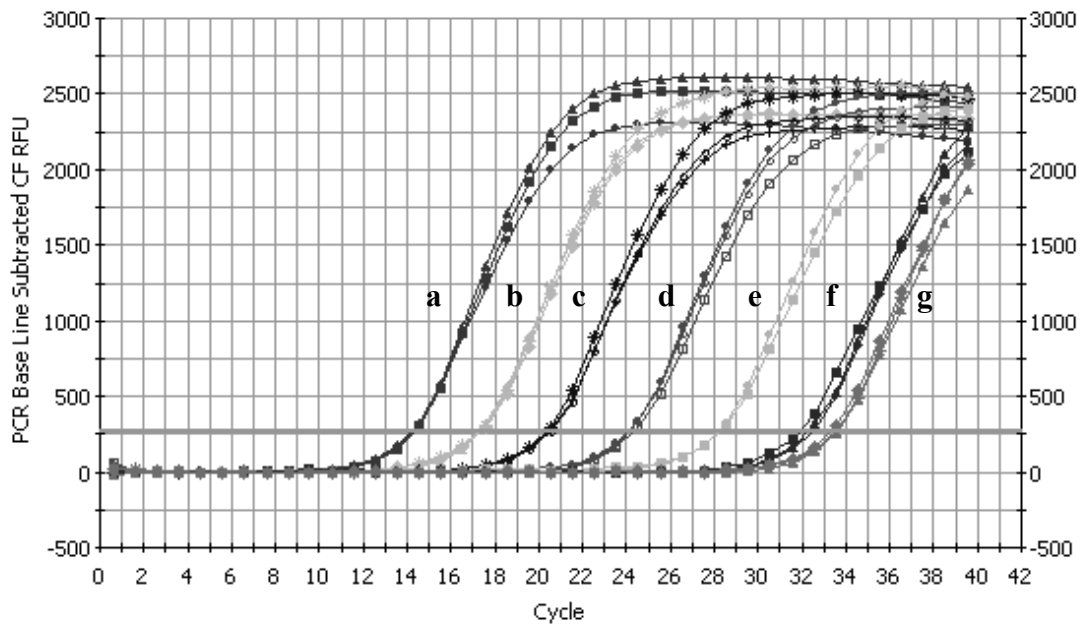


Figure 2

Figure 3

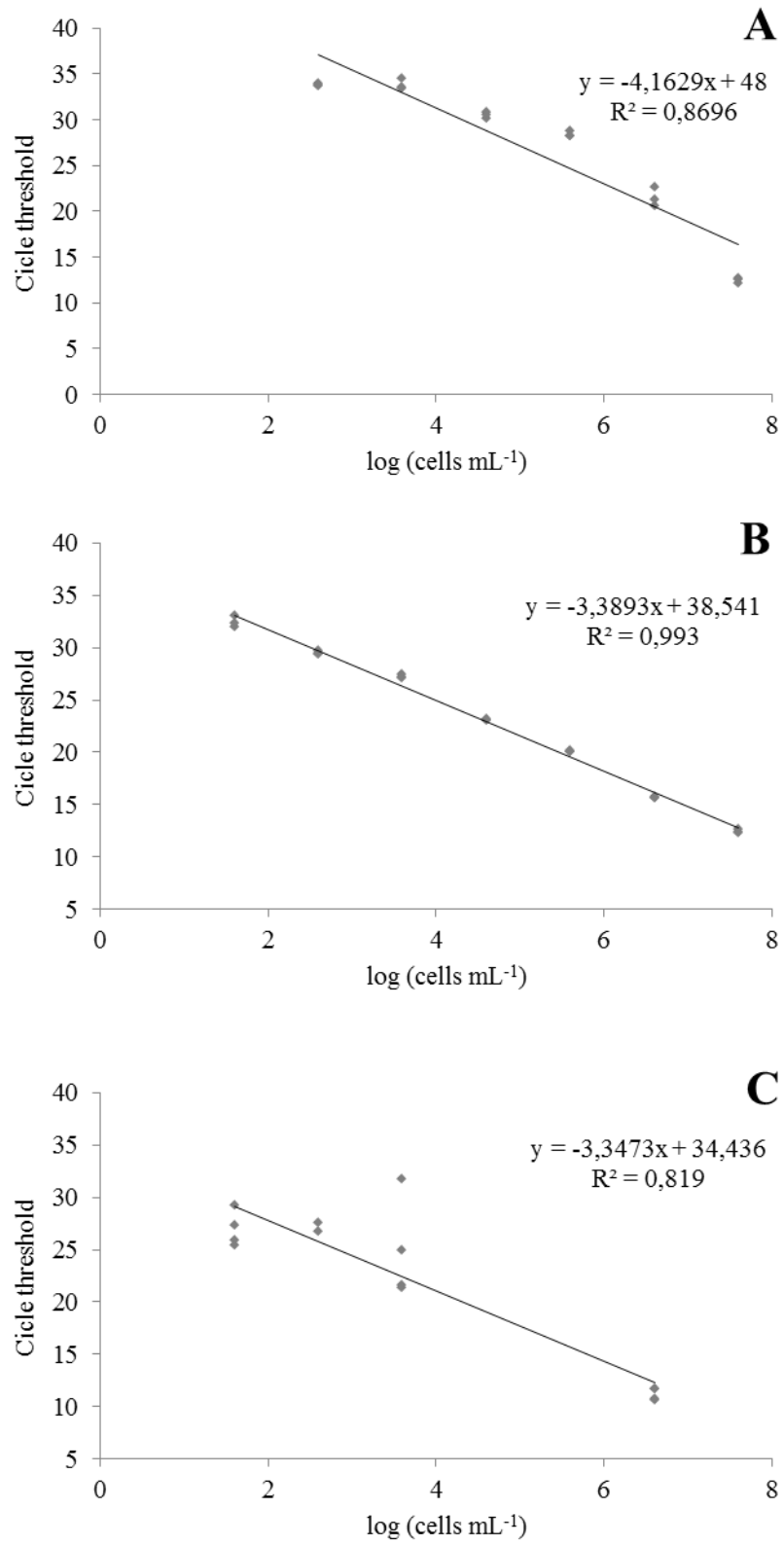
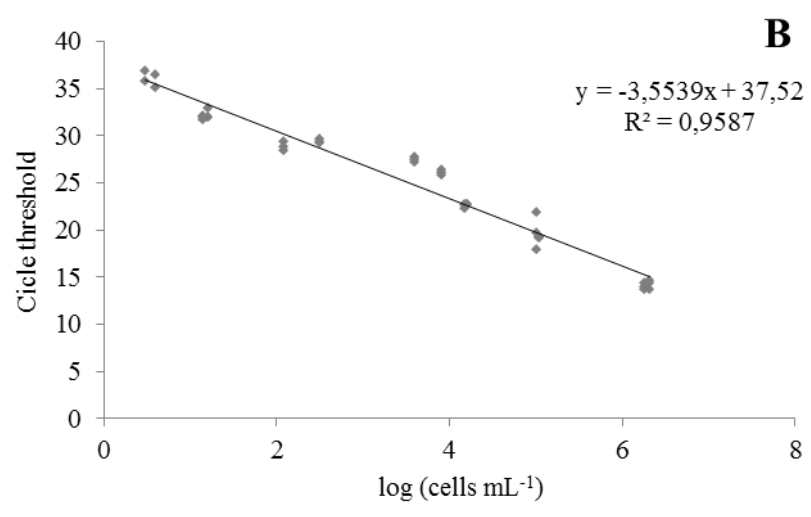
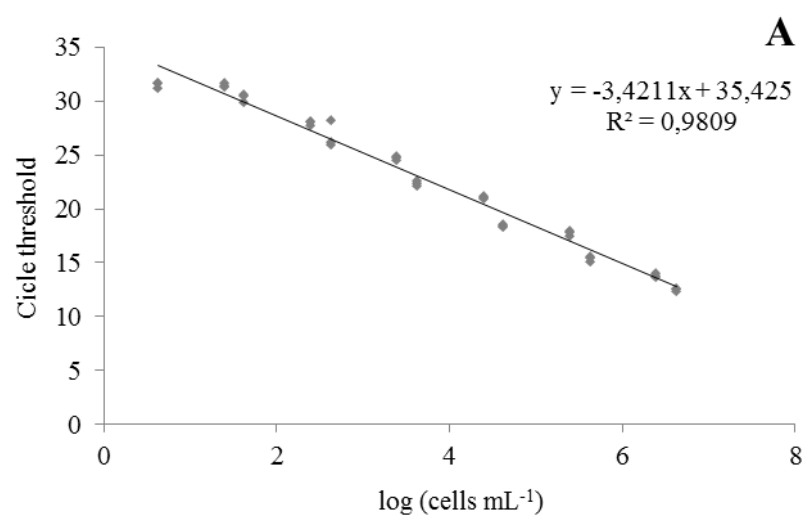


Figure 4



This piece of the submission is being sent via mail.

Brettanomyces bruxellensis susceptibility to antimicrobial agents used in wine industry

Journal:	<i>Australian Journal of Grape and Wine Research</i>
Manuscript ID:	Draft
Manuscript Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Portugal, Cauré; University of La Rioja, Instituto de Ciencias de la Vid y del Vino (UR, CSIC,GR), Sáenz, Yolanda; Centro de Investigación Biomédica de La Rioja, Área de Microbiología Molecular, Rojo-Bezales, Beatriz; Centro de Investigación Biomédica de La Rioja, Área de Microbiología Molecular, Zarazaga, Myriam; University of La Rioja, Departamento de Agricultura y Alimentación. Área de Bioquímica y Biología Molecular Torres, Carmen; University of La Rioja, Departamento de Agricultura y Alimentación. Área de Bioquímica y Biología Molecular Cacho, J; University of Zaragoza, Analytical Chemistry Ruiz-Larrea, Fernanda; University of La Rioja, Instituto de Ciencias de la Vid y del Vino (UR, CSIC,GR),
Keywords:	Brettanomyces, sulphur dioxide, volatile phenols, chitosan, oenological tannins, dimethyldicarbonate

1
2
3 1 ***Brettanomyces bruxellensis* susceptibility to antimicrobial agents used in**
4
5
6 2 **wine industry**
7
8
9 3

10 4 Cauré B. Portugal ^a, Yolanda Sáenz ^d, Beatriz Rojo-Bezares ^d, Myriam Zarazaga ^c, Carmen
11
12 5 Torres ^c, Juan Cacho ^b and Fernanda Ruiz-Larrea ^{a,*}
13
14
15 6

16
17 7 Running title: Antimicrobial agents against *Brettanomyces*
18

19
20 8 ^a University of La Rioja, Instituto de Ciencias de la Vid y del Vino (CSIC, Universidad de La Rioja,
21
22 9 Gobierno de La Rioja), Av. Madre de Dios 51, 26006 Logroño, España.
23

24 10 ^b Dept. Analytical Chemistry, Faculty of Sciences, University of Zaragoza, 50009 Zaragoza, España.
25
26

27 11 ^c University of La Rioja. Área de Bioquímica y Biología Molecular. Departamento de Agricultura y
28
29 12 Alimentación. Av. Madre de Dios, 51. 26006 Logroño, España.
30

31 13 ^d Centro de Investigación Biomédica de La Rioja, Área de Microbiología Molecular, Logroño, España
32
33
34 14

35 15 ***Correspondence to:** Fernanda Ruiz-Larrea
36
37

38 16 University of La Rioja, Instituto de Ciencias de la Vid y del Vino (CSIC-UR-CAR), Av.
39
40 17 Madre de Dios 51, 26006 Logroño, Spain.
41
42

43 18 E-mail: fernanda.ruiz@unirioja.es
44

45 19 Fax: 34 941 299721; Tel: 34 941 299749
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

20 **Abstract**

21 **Background and Aims:** *Brettanomyces bruxellensis* is a wine spoiling yeast responsible
22 for developing off-odours described as "Brett-character". The objective was to compare the
23 antimicrobial activity against *Brettanomyces* of four oenological compounds: potassium
24 metabisulphite (PMB), chitosan, oenological tannins and dimethyl dicarbonate.

25 **Methods and Results:** Minimal inhibitory concentrations and minimal biocide
26 concentrations of the antimicrobial agents were determined, and a comparative study
27 between *B. bruxellensis* and *Saccharomyces cerevisiae* was performed. Results allowed
28 assessing the anti-*Brettanomyces* efficacy, and PMB was assayed under winery conditions
29 in wines naturally contaminated by *Brettanomyces*. Volatile phenol production was
30 monitored after wine long-term storage.

31 **Conclusions:** A direct correlation was demonstrated between the quantitative data of 4-
32 ethylphenol, 4-ethyl-guaiacol, 4-propyl-guaiacol and 4-vinylphenol, and *Brettanomyces*
33 populations, and 100 mg/L of total PMB was shown to prevent efficiently *Brettanomyces*
34 growth in wines.

35 **Significance of Study:** The preservatives of this systematic study are most frequently used
36 in the wine industry against *Brettanomyces*. This is the first time that 4-propylguaiacol is
37 shown to correlate with *Brettanomyces* growth in wine. It is of oenological significance
38 that 100 mg/L of total PMB efficiently prevented *Brettanomyces* growth in wines and that
39 phenol production took place only in those low protected wines.

40
41 **Keywords:** *Brettanomyces*; sulphur dioxide; volatile phenols; chitosan; oenological
42 tannins; dimethyldicarbonate

44

45

46 Introduction

47 *Brettanomyces bruxellensis* is a well-known yeast species in wine industry because of the
48 great economic losses it causes. Yeast spoilage has increased in recent years as a result of
49 the higher microbial susceptibility of wines, partially due to the lower doses of
50 preservatives demanded by consumers, and partially due to the increase of wine pH that is
51 emerging in wine producing regions undergoing climate warming trends (Jones et al.
52 2005). *Brettanomyces*, named *Dekkera* when growing as its sporulating teleomorph, is
53 responsible for developing off-odours described as animal, stable, horse sweat, mousy,
54 burnt plastic, medicinal, or phenolic taint (Licker et al. 1998; Chatonet et al. 1992), and
55 because of the widespread use of the term "Bret-character" in oenology and that the non-
56 sporulating form is the one commonly found in wines, the name *Brettanomyces* will be
57 used in this article, in spite of recent taxonomy texts that give preference to the name of the
58 spore forming teleomorph *Dekkera* (Kurtzman et al. 2011). The principal spoiling
59 compounds associated with Bret-character are volatile ethyl-phenols, mainly 4-
60 ethylphenol, 4-ethylguaiacol, 4-vinylphenol and 4-vinylguaiacol, all of them secondary
61 metabolites produced by *Brettanomyces* from the phenolic acids naturally present in wine
62 (Coulon et al. 2010; Dias et al. 2003; Benito et al. 2009; Tchobanov et al. 2008; Harris et
63 al. 2008; Godoy et al. 2008). The mousy taint has been also associated to N-heterocyclic
64 compounds of the family of pyridines, which can be synthesized by *Brettanomyces* from
65 wine residual aminoacids, sugars, and ethanol (Costello & Henschke 2002; Romano et al.
66 2008). Nevertheless, not all *Brettanomyces* spoiling strains are capable of producing
67 pyridines in the same amount, but they all are able to produce volatile phenols over a
68 similar range of high relative concentrations (Romano et al. 2008). This is the reason why

1
2
3 69 monitoring Brett-character in wineries is routinely performed by analysis of wine volatile
4
5 70 phenols by gas chromatography (Suárez et al. 2006). Their production by active
6
7 71 *Brettanomyces* cells leads as well to the loss of the fresh and fruity character of wines. The
8
9 72 Brett-character in red wines is detected when volatile phenols are above their perception
10
11 73 threshold (426 µg/L for a 1:10 mix of ethylphenol and ethylguaiacol, Chatonet et al. 1992),
12
13 74 and this happens when active cells are present in the wine at concentrations above 10³
14
15 75 cells/mL (Chatonet et al. 1995; Lonvaud-Funel & Renouf 2005).

16
17
18
19 76 *Brettanomyces* is probably one of the best-adapted yeast to survive in dry red wine; it
20
21 77 has been described as surviving in wine under minimal sugar availability (< 150 mg/L of
22
23 78 glucose, Suarez et al. 2006), and growing in total absence of sugars with ethanol as the sole
24
25 79 carbon source (Silva et al. 2004). It is most frequently found in wines ageing in wooden
26
27 80 barrels, vats and equipment that are difficult to sterilise (Fungelsang 1998). For wine
28
29 81 makers of premium red wines submitted to the process of ageing in wood, regular
30
31 82 monitoring of *Brettanomyces* population is mandatory, and when the problem arises,
32
33 83 efficient antimicrobial actions should be implemented. A range of antimicrobial treatments
34
35 84 are available to wine makers: physicochemical treatments such as thermal inactivation
36
37 85 (Couto et al. 2005), high pressures (Puig et al. 2003), low electric current (Lustrato et al.
38
39 86 2010), pulsed electric fields (Puértolas et al. 2009), high power ultrasound (Yap et al.
40
41 87 2008; Yap & Bagnall 2009), steam, ozone and UV irradiation (Guzzon et al. 2011), or
42
43 88 filtration (Ubeda & Briones 1999; Millet & Lonvaud-Funel 2000) and racking to non-
44
45 89 contaminated vats. Nevertheless, these actions are palliative, their effect is transitory and
46
47 90 does not protect wine from further contaminations of *Brettanomyces* cells. A range of
48
49 91 preservatives, both chemical and of biological origin, have been reported to inhibit
50
51 92 *Brettanomyces* growth in wines. The longest-established additive is sulphur dioxide
52
53 93 because of its antioxidant and antimicrobial properties (Agnolucci et al. 2010) and
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 94 alternative inhibitors of the growth of *Brettanomyces* have been proposed in the last ten
4
5 95 years. Recently, a range of compounds have been included as *Brettanomyces* inhibitors
6
7 96 whose use is approved or recommended in wine making. The use of dimethyl dicarbonate
8
9 97 (DMDC) is currently allowed exclusively for wines with sugar content ≥ 5 g/L and its
10
11 98 application should be performed shortly before bottling (EU regulation 643/2006).
12
13 99 Chitosan, a deacetylated polysaccharide derived from chitin, has been reported as an
14
15 100 efficient antimicrobial agent against *Brettanomyces*, with the advantages of being
16
17 101 biodegradable and nontoxic (Kong et al. 2010). Hydroxycinnamic acids (Harris et al.,
18
19 102 2010), synthetic peptides (Enrique et al., 2007) and some yeast killer toxins isolated from
20
21 103 *Pichia anomala*, *Kluyveromyces wickerhamii* (Comitini et al., 2004; Comitini & Ciani,
22
23 104 2011), *Pichia membranaefaciens* (Santos et al., 2009) and *Ustilago maydis* (Santos et al.
24
25 105 2011) strains, have been reported to possess fungicidal effect against *Brettanomyces*.
26
27
28
29

30 106 The objective of this work was to perform a systematic study comparing the activity,
31
32 107 both as growth inhibitors and as fungicides against *Brettanomyces*, of four compounds that
33
34 108 currently are available in the market for wine making: potassium metabisulphite (PMB),
35
36 109 chitosan, oenological tannins and DMDC. This systematic study was performed with 31
37
38 110 oenological strains, including the species *Brettanomyces bruxellensis* and *Saccharomyces*
39
40 111 *cerevisiae*. We determined minimal inhibitory concentration (MIC) and minimal biocide
41
42 112 concentration (MBC) of the antimicrobial agents alone and in presence of ethanol. Results
43
44 113 allowed determining the anti-*Brettanomyces* efficacy, and PMB was assayed under winery
45
46 114 conditions in wines naturally contaminated by *Brettanomyces*. In addition, volatile phenol
47
48 115 production was monitored after long-term storage (22 months) of the contaminated wines.
49
50
51
52

53 116

54
55 117
56
57
58
59
60

1
2
3 118 **Materials and methods**
4

5 119 *Yeast strains and culture conditions*
6

7
8 120 Sixteen *B. bruxellensis* and 15 *S. cerevisiae* strains were included in this study; 22 of them
9
10 121 were recovered from red wines during the period 2005-2010 and belong to the collection of
11
12 122 oenological isolates of the Department of Food and Agriculture of the University of La
13
14 123 Rioja; 6 *S. cerevisiae* strains were commercial yeast starters for winemaking, and 3 strains
15
16 124 were obtained from the Spanish Culture Type Collection (CECT) as shown in **Table 1**.
17
18 125 Yeast species identification was performed by specific PCR analysis: *B. bruxellensis*,
19
20 126 according to the method of Cocolin et al. (2004), and *S. cerevisiae*, according to the
21
22 127 method of Fernández-Espinar et al. (2000). Yeast strains were cultivated for 24 h to 48 h
23
24 128 on YPD agar [10 g/L yeast extract (Oxoid Ltd., Basingstoke, UK), 20 g/L peptone (Becton,
25
26 129 Dickinson Co., LePont de Claix, France), 20 g/L glucose (Panreac Química S.A.,
27
28 130 Barcelona, Spain), 20 g/L agar (Becton, Dickinson Co.)] and fresh cultures were used for
29
30 131 the antimicrobial activity assays described below.
31
32
33
34
35
36
37

38

39 133 *MIC and MBC determination*
40

41 134 MICs were determined by the microtiter dilution method, in duplicates and using serial
42
43 135 double dilutions of the antimicrobial agents. Yeast cells from a fresh culture were
44
45 136 resuspended in sterile saline solution to reach 1.2 optical density units (OD) at 600 nm, and
46
47 137 12.5 μL was added to a final volume of 100 μL in the microtiter assay. Cell growth was
48
49 138 determined by absorbance at 655 nm. YPD broth, at pH values adjusted to either 4.0 or 3.5,
50
51 139 was used for the microtiter assays. MIC was defined as the smallest amount of
52
53 140 antimicrobial agent needed to inhibit more than 50 % the growth of the strain after
54
55 141 incubation for 48 to 72 h. MBC was determined as the minimal concentration of the
56
57
58
59
60

1
2
3 142 antimicrobial agent that killed more than 99.9% of the initial inoculum after incubation for
4
5 143 48 to 72 h. MIC₅₀ and MIC₉₀ were defined as the MIC that inhibited 50% and 90%,
6
7 144 respectively, of the tested microorganisms. Analogous definitions were applied to MBC₅₀
8
9 145 and MBC₉₀. Potassium metabisulphite (PMB) (Dolmar, Gimileo, Spain) was tested in the
10
11 146 concentration range from 50 to 0.003 g/L; oenological chitosan (Lallemand, Toulouse,
12
13 147 France) was tested from 250 to 0.12 mg/L; and oenological tannins (total polyphenol index
14
15 148 = 29.2) (TaniStop, Dolmar) were tested in the concentration range from 4 to 0.002 mL/L;
16
17 149 dimethyl dicarbonate commercialised as Velcorin® (99.8% purity) (Lanxess, Leverkusen,
18
19 150 Germany) was tested in the range of 5 to 0.002 g/L, all of them in double serial dilutions.
20
21
22 151 The antimicrobial agents were tested both alone and combined with 12.5% ethanol
23
24 152 (Panreac Química S.A.), always in duplicates.
25
26
27
28
29

30
31
32 153

33 154 *Wine production*

34
35 155 Red wine was elaborated from c.v. Tempranillo red grapes from local vineyards of the
36
37 156 northern Spanish region of La Rioja. Fermentations were carried out in 15,000 L wooden
38
39 157 tanks. Alcoholic fermentation was performed in the presence of grape skins, seeds and
40
41 158 stalks, with the indigenous *S. cerevisiae* yeast strains and after SO₂ addition. At the end
42
43 159 point of alcoholic fermentation, wine was drawn off from the lees (racking) and placed
44
45 160 homogeneously into wooden barrels for malolactic fermentation.

46
47 161 Temperature was maintained around 22 °C. After malolactic fermentation (malic acid
48
49 162 content < 0.10 g/L), the wine recovered with solid particles from the bottom of one barrel
50
51 163 was employed for the experiment as it presented a slight taint of some non-identifiable
52
53 164 aroma deviation. Turbidity was measured (Turbidimeter 2100N, Hatch Co.) and the value
54
55 165 obtained was 219 NTU. The general chemical composition of the wine was determined
56
57
58
59
60

1
2
3 166 according to EC official methods (1990), rendering the following values: pH 3.8; volatile
4
5 167 acidity 0.61 g/L; total acidity 3.09 g/L, residual sugars < 1.8 g/L, and total SO₂
6
7 168 concentration 14 mg/L. PMB (Dolmar) was added when necessary to obtain final
8
9 169 concentrations of 28 mg/L, 50 mg/L and 100 mg/L and experiments were carried out in 15
10
11 170 repeats. Samples were bottled and stored at 15 °C under darkness for 22 months.
12
13 171 Microbiological analyses were performed on the initial wine, after 4 months and at the end
14
15 172 of storage, and chemical analysis of volatile phenols was performed at the end of storage.
16
17
18
19
20
21
22
23

24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48 174 *Analysis of volatile phenols (SPE and GC-Ion Trap-MS analysis)*

49
50
51 175 This analysis was carried out using the method proposed and validated by Lopez et al.
52
53 176 (2002). In accordance with the method, 50 mL of wine, containing 25 µL of 3-*tert*-butyl-4-
54
55 177 hydroxyanisole solution (containing 10 mg of this compound per g of ethanol) and 75 µL
56
57 178 of a surrogate standard solution that included 2-octanol, was passed through a cartridge
58
59 179 filled with LiChrolut-EN resin (Merck, Darmstadt, Germany) at about 2 mL/min. The
60
180 sorbent was dried by letting air pass through (-0.6 bar, 10 min). Analytes were recovered
181 by elution with 1.3 mL of dichloromethane. An internal standard solution was added to the
182 eluted sample. The extract was then analyzed by GC with ion trap MS detection under the
183 conditions described by Lopez et al. (2002).
184

185 *Microbiological analysis*

186 Wine samples were processed for microbiological analysis as follows: 10 mL of wine
187 sample was placed in a sterile tube and centrifuged at 3,000 g for 10 min. The supernatant
188 was discarded and the pellet resuspended in 1 mL of sterile 0.15 M saline solution. 100 µL
189 of the suspension was spread onto YPD-agar plate [10 g/L yeast extract (Oxoid), 20 g/L

1
2
3 190 peptone (Becton, Dickinson Co.), 20 g/L glucose (Panreac Química S.A.)] for total yeasts
4
5 191 counting. DBDM medium with some modifications (Rodrigues et al. 2001) named as
6
7 192 *Brettanomyces*-specific medium, was used for *Brettanomyces* counting, and mannitol-agar
8
9 193 [5 g/L yeast extract (Oxoid), 3 g/L peptone (Becton, Dickinson Co.), 25 g/L D-mannitol
10
11 194 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany)] for acetic acid bacteria (AAB) counting. MRS-agar
12
13 195 (Oxoid) plates were used to identify lactic acid bacteria. Isolates obtained from
14
15 196 *Brettanomyces*-specific medium were species confirmed by PCR analysis (Cocolin et al.
16
17 197 2004).
18
19
20
21
22
23

198

199 *Statistical Analysis*

200 Statistical methods used for data analysis were as follows: discriminant function analysis
201 and two-sided Pearson's correlation coefficients were used to examine relationships among
202 the analysed variables (microbial populations and concentrations of volatile phenols).
203 Analysis of variance (ANOVA) was applied for data with normal distribution and
204 homogeneous variances, and Kruskal-Wallis test was applied for data that did not fulfill
205 those requisites. IBM-SPSS Statistics 19.0 software for Windows (IBM-SPSS Inc.,
206 Chicago, IL, USA) was used for data processing.

207

208

209 **Results and Discussion**

210 *Potassium metabisulphite antimicrobial activity*

211 **Figure 1** shows MIC values of PMB determined at pH 4.0 (**Figure 1A**) and 3.5 (**Figure**
212 **1B**), and it is clearly shown that the antimicrobial activity of this agent against
213 *Brettanomyces* was higher at pH 3.5 than at pH 4 (10-fold higher). This increased activity

1
2
3 214 at lower pH is in accordance with the acid character of metabisulphite (pK value of 1.81)
4
5 215 (Usseglio-Tomasset & Bosia, 1984), which in solution yields higher amounts of the
6
7 216 molecular and more active SO₂ form at lower pH values. Our results are in agreement with
8
9 217 former studies that reported PMS inhibitory concentrations against *Brettanomyces* in the
10
11 218 range of 20-60 mg/L (equivalent to free molecular SO₂ concentrations of 0.25 - 0.67 mg/L)
12
13 219 in synthetic wine (Du Toit et al. 2005; Agnolucci et al., 2010) and culture broth (Barata et
14
15 220 al., 2008; Conterno et al., 2006).

16
17
18
19 221 **Figure 2** shows that PMB increased its activity in presence of 12.5 % ethanol (MIC₅₀
20
21 222 = 24 mg/L), when compared with 6 % ethanol (MIC₅₀ = 96 mg/L) or without ethanol
22
23 223 (MIC₅₀ = 48 mg/L) in the growth medium. Biocide action of PMB was also powerful in
24
25 224 combination with 12.5% ethanol, as shown in Table 2 (MBC₉₀= 48 mg/L) when compared
26
27 225 with no ethanol addition (MBC₉₀= 96 mg/L), or 6% ethanol (MBC₉₀= 190 mg/L, data not
28
29 226 shown). This effect of ethanol in potentiating the inhibitory activity of PMB was in
30
31 227 accordance with results reported for other PMB sensitive microorganisms, such as lactic
32
33 228 acid bacteria (Rojo-Bezares et al. 2007) that can also spoil wines when their growth is not
34
35 229 under strict control. This synergic action of PMB and 12.5 % ethanol is of great
36
37 230 importance for the wine maker who can achieve the biocide activity of PMB with low
38
39 231 concentrations of this agent (48 - 96 mg/L) in a wine with 12.5 % ethanol, which can
40
41 232 undergo ageing and storage with this anti-*Brettanomyces* preservative.

42
43
44
45
46 233 Regarding the effect of PMB on *S. cerevisiae*, strains of this species were much more
47
48 234 resistant than *Brettanomyces* strains, and they tolerated high concentrations of PMB in
49
50 235 absence of ethanol (MIC₅₀ and MBC₉₀= 780 mg/L), as shown in **Table 2**. Nevertheless,
51
52 236 PMB resistance decreased in presence of 12.5% ethanol (MIC₅₀= 48 mg/L, MBC₉₀= 390
53
54 237 mg/L). It is important to note that this species itself can produce a certain amount of SO₂,
55
56 238 in the range of 10 to 40 mg/L, as a fermentation by-product (Romano & Suzzi, 1993). The
57
58
59
60

1
2
3 239 rules of the International Organisation of Vine and Wine (OIV) consider 150 and 200 mg/L
4
5 240 as maximal limits for total SO₂ concentrations that can be found in red and white wines
6
7 241 respectively, which according to our results could be considered efficient concentrations
8
9 242 not only to inhibit *Brettanomyces* growth, but also as operative biocide concentrations. It
10
11 243 should be also taken into account that PMB efficacy is strongly dependent on the wine acid
12
13 244 pH, as discussed above.
14
15
16
17
18

245

246 *Antimicrobial activity of chitosan, oenological tannins and DMDC*

247 **Figure 3** and **Table 2** show the antimicrobial activity of the three studied fungicides,
248 which are currently used in winemaking against *Brettanomyces*: chitosan, oenological
249 tannins and DMDC, and **Table 3** shows the corresponding MIC and MBC of the
250 antimicrobial agents for each *Saccharomyces* and *Brettanomyces* strain of this study.
251 **Figures 3 A** and **3 B** show that the inhibitory activity of chitosan against *Brettanomyces*
252 was very similar in absence and in presence of 12.5 % ethanol in the culture broth (YPD
253 broth, pH 3.5), showing the same MIC₉₀ value of 62 mg/L (Table 2). Its biocide
254 concentration MBC₉₀ value could not be determined as it was over the studied
255 concentration range, and its MBC₅₀ in presence of 12.5 % ethanol was 62 mg/L, which
256 means that this concentration was enough to kill and avoid cell growth of 50% of the
257 strains. Previous studies had reported that 6 g/L of shell crab chitosan was required to
258 control *Brettanomyces* growth (Gómez-Rivas et al., 2004), nevertheless, the currently
259 allowed chitosan for oenological practices should be exclusively of fungal origin, and our
260 results were obtained with the fungal chitosan for oenological use, which explains the
261 difference between our results and the previously reported value.
262
263
264
265
266
267
268
269
270
271
272
273
274
275
276
277
278
279
280
281
282
283
284
285
286
287
288
289
290
291
292
293
294
295
296
297
298
299
300

1
2
3 262 Regarding the assayed oenological tannins [commercial solution with a 29.2 total
4
5 263 polyphenol index, equivalent to 244 mg/L of tannic acid (Mataix & Luque de Castro,
6
7 264 2001)] **Figures 3 C** and **3 D** show that ethanol played a major role, and Table 2 shows that
8
9 265 the concentrations needed to inhibit 50 % and 90 % of *Brettanomyces* strains drastically
10
11 266 decreased respectively from 0.5 mL/L and 1 mL/L, to 0.12 mL/L in presence of 12.5 %
12
13 267 ethanol in the culture broth. Tannins presented biocide activity against 50% of the studied
14
15 268 strains at a concentration of 0.25 mL/L, and as in the case of chitosan, the MBC₉₀ value
16
17 269 was above the studied concentration range, which included the legal limit for the use of
18
19 270 commercial oenological tannins against *Brettanomyces* (0.4 mL/L). Tannins are known to
20
21 271 strongly associate with proteins and glycolipids and to provoke precipitation of large
22
23 272 macromolecular aggregates in wine, mainly stabilised by hydrophobic interactions and
24
25 273 hydrogen bonds (Ribéreau-Gayon et al. 2006). The antifungal activity of tannins may be
26
27 274 associated to this character, and the effect of ethanol in strongly potentiating their
28
29 275 antifungal activity, shown in Table 2, supports this hypothesis as ethanol reduces the local
30
31 276 dielectric constant and modifies hydrogen bonds, thus inducing cell flocculation (Soares
32
33 277 2011). Chitosan antifungal activity has been associated to its cationic character, which
34
35 278 increases at acid pH and with a higher degree of deacetylation, therefore, the higher
36
37 279 positive charge density, the stronger antimicrobial activity of chitosan (Kong et al. 2010).
38
39 280 Our results showed that ethanol did not modify significantly chitosan activity against
40
41 281 *Brettanomyces*, which could be expected as ethanol is not able to modify the electric
42
43 282 charge of chitosan.
44
45
46
47
48

49
50 283 DMDC in the assayed concentration range (5 to 0.002 g/L) showed a potent inhibitory
51
52 284 effect on *Brettanomyces* and *Saccharomyces* growth under our experimental conditions, as
53
54 285 shown in **Figures 3 E** and **3 F**. DMDC way of action was reported to be by penetrating
55
56 286 yeast cells and binding histidine residues located at the catalytic centre of key enzymes for
57
58
59
60

1
2
3 287 yeast survival (Hornsey, 2007). Former studies (Costa et al., 2008; Delfini et al. 2002;
4
5 288 Renouf et al., 2008) reported DMDC MIC values in the range of 100 - 250 mg/L against
6
7 289 *Brettanomyces* assayed in grape juice or in wines supplemented with glucose, and our
8
9 290 results obtained for strains growing in YPD broth containing 12.5 % ethanol are in
10
11 291 agreement with those formerly reported.

12
13
14 292 Both yeast genera of our study, *Saccharomyces* and *Brettanomyces*, were affected by
15
16 293 the presence of ethanol in the culture broth and presented increased sensitivity to the
17
18 294 antimicrobials when these were present in the culture broth in combination with 12.5 %
19
20 295 ethanol. Nevertheless, *Brettanomyces* strains were more sensitive to chitosan and
21
22 296 oenological tannins, which showed specificity against *Brettanomyces* and did not show
23
24 297 biocide activity against *Saccharomyces* strains either in absence or in presence of ethanol
25
26 298 (**Table 2**) at concentrations equal or under their corresponding legal limits (100 mg/L for
27
28 299 chitosan and 0.4 mL/L for oenological tannins). In the case of DMDC, it could inhibit the
29
30 300 growth of both *Brettanomyces* and *Saccharomyces* strains (MIC₅₀ values under the legal
31
32 301 limit of 200 mg/L) and showed a MBC₅₀ value under the legal limit only against
33
34 302 *Brettanomyces* in presence of ethanol (**Table 2**).

35
36
37
38
39 303

40 41 42 304 *Potassium metabisulphite activity against Brettanomyces in wines*

43
44 305 The selected antimicrobial agent to study biocide activity against *Brettanomyces* in
45
46 306 naturally contaminated red dry wines was PMB. The initial red wine (turbidity 219 NTU)
47
48 307 of this study showed 1.6×10^3 CFU/ml (counted on YPD agar-plates) of total yeast
49
50 308 population, no colonies for *Brettanomyces*, and an initial acetic acid bacteria (AAB)
51
52 309 population of 8.0×10^2 CFU/ml (mannitol-agar plates). Figure 4 shows the results obtained
53
54 310 for total yeast, *Brettanomyces* and AAB populations in the series of bottled wines with
55
56
57
58
59
60

1
2
3 311 total PMB concentrations of 28, 50 and 100 mg/L after 4 and 22 months of storage in
4
5 312 bottles. No lactic acid bacteria were found in any of the assayed wines. AAB populations
6
7 313 remained around 7 CFU/ml during the whole period of storage, and no significant
8
9 314 differences were observed among AAB populations of wines treated with different
10
11 315 concentrations of PMB. Statistically significant differences were observed in
12
13 316 *Brettanomyces* populations among wines treated with 28, 50 and 100 mg/L of PMB after 4
14
15 317 months of storage (**Figure 4A**). After 22 months of storage, no viable *Brettanomyces*
16
17 318 colonies were obtained in those wines treated with 50 and 100 mg/L of PMB, whereas a
18
19 319 residual population of *Brettanomyces* viable cells was still present in wines treated with 28
20
21 320 mg/L of PMB (**Figure 4B**). Total yeast populations decreased 0.9 log units from 4 to 22
22
23 321 months of storage, and the residual yeast populations at the end of storage included some
24
25 322 *Brettanomyces* cells (3 CFU/ml mean value) only in those wines treated with the lowest
26
27 323 PMB concentration (28 mg/L), whereas there were no significant differences among the
28
29 324 non-*Brettanomyces* residual yeast populations under the three PMB treatments, showing
30
31 325 again that *Brettanomyces* was more sensitive to PMB than the other wine yeasts.

32
33
34
35
36 326 **Figure 5** shows volatile phenol concentrations of the wine samples at the end of the
37
38 327 storage period (22 months). Statistically significant lower concentrations of 4-ethylphenol
39
40 328 (**Figure 5 D**) and 4-ethylguaiacol (**Figure 5 B**) were detected in those wines treated with
41
42 329 100 mg/L of PMB than in wines with lower PMB concentrations (50 and 28 mg/L); and
43
44 330 the highest concentrations of 4-vinylphenol, which is the precursor molecule for 4-
45
46 331 ethylphenol, were found in those wines treated with the lowest PMB concentration (28
47
48 332 mg/L) as shown in **Figure 5 C**. Regarding 4-propylguaiacol, statistically significant
49
50 333 differences among mean values were found, and the higher concentration of PMB used to
51
52 334 treat the wines, the lower content of 4-propylguaiacol in the wines after storage (**Figure 5**
53
54 335 **A**). This volatile phenol had been previously reported in aged red wines, and its
55
56
57
58
59
60

1
2
3 336 concentrations correlated, as in our results, with the wine content in 4-ethylphenol and 4-
4
5 337 ethylguaiacol (Aznar et al. 2003, Ferreira et al., 2006) and in these former reports authors
6
7 338 hypothesized that 4-propylguaiacol could have a microbiological origin, however, this
8
9 339 supposition could not be confirmed. This molecule was also shown to exert a role in the
10
11 340 aromatic deviation of wines in an additive effect with 4-ethylphenol and 4-ethylguaiacol
12
13 341 (Cullere et al., 2004). Certain strains of lactic acid bacteria of the species *Lactobacillus*
14
15 342 *plantarum*, *Lactobacillus brevis* and *Pediococcus pentosaceus* (Chatonnet et al. 1992)
16
17 343 have been reported as producers of vinylphenols, but since no viable acid lactic bacteria
18
19 344 were detected in our wines, their putative contribution to volatile phenol production was
20
21 345 excluded.
22
23
24

25 346 **Figure 6** shows the scores for the 45 wine samples on two canonical discriminating
26
27 347 functions, grouped according to PMB treatments (28, 50 and 100 mg/L for groups 1, 2 and
28
29 348 3 respectively) and with 7 variables (3 microbial populations and 4 volatile phenols).
30
31 349 Functions 1 and 2 explained 97.4 and 2.6 % respectively of the variance values, and the
32
33 350 highest standardised correlation coefficients of Function 1 corresponded to the variables:
34
35 351 concentration of 4-ethylguaiacol (coefficient 1.224), concentration of 4-propylguaiacol
36
37 352 (coefficient 1.116), concentration of 4-ethylphenol (coefficient -1.919) and *Brettanomyces*
38
39 353 population after 4 months of storage (coefficient 0.999), and these four variables showed
40
41 354 as well the highest absolute correlation with Function 1 (Table 4); on the contrary, the
42
43 355 lowest correlation was for AAB population (coefficient 0.181). Therefore, our results
44
45 356 showed that *Brettanomyces* population after storage in glass bottles for 4 months was
46
47 357 dependent on the PMB treatment and correlated inversely with the PMB concentration
48
49 358 adjusted before storage, being 100 mg/L of total PMB sufficient to prevent *Brettanomyces*
50
51 359 growth. Levels of the volatile phenols: 4-ethylguaiacol and 4-ethylphenol, which are the
52
53 360 metabolic final products of the vinyl-phenol reductase (Tchobanov et al., 2008) of
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 361 *Brettanomyces* (**Figure 7**), followed the same trend as *Brettanomyces* population, showing
4
5 362 the lowest concentrations in those wines that had been treated with 100 mg/L of PMB and
6
7 363 showed a negligible *Brettanomyces* population (0.5 CFU/ml) after 4 months and no viable
8
9 364 cell counts after 22 months of storage. Regarding 4-propylguaiacol, its concentrations
10
11 365 followed the same trend as *Brettanomyces* population after 4 months storage and correlated
12
13 366 inversely with the PMB treatment concentration. This result supports the previous
14
15 367 hypothesis that this volatile phenol can be generated by *Brettanomyces* and its enzymatic
16
17 368 activity on a precursor molecule extracted from the oak wood, such as *p*-coumaric acid,
18
19 369 which by two successive reduction steps could generate 4-propylguaiacol. Nevertheless,
20
21 370 further studies are needed to identify and characterise the putative enzyme activity
22
23 371 involved in this process.
24
25
26
27

28 372 From the oenological point of view it is important to note that an adequate PMB
29
30 373 concentration was able to efficiently control *Brettanomyces* populations in wine, that
31
32 374 volatile phenol production seems to occur during the first months of storage, and finally,
33
34 375 that *Brettanomyces* viable cell populations were found only in those least protected wine
35
36 376 samples that contained less than 100 mg/L of total PMB.
37
38

39 377

40 41 42 378 **Acknowledgments**

43
44
45 379 This research was financially supported by grant CENIT-2008/1002 of the Spanish
46
47 380 Ministry of Science and Innovation MICINN-CDTI. Cauré B Portugal was a contractual
48
49 381 researcher supported by grant CENIT-2008/1002.
50
51

52 382

53 54 55 383 **References**

56
57
58
59
60

- 1
2
3 384 Agnolucci, M., Rea, F., Sbrana, C., Cristani, C., Fracassetti, D., Tirelli, A. and Nuti, M.
4
5 385 (2010) Sulphur dioxide affects culturability and volatile phenol production by
6
7 386 *Brettanomyces/Dekkera bruxellensis*. *International Journal of Food Microbiology* 143
8
9 387 (1-2), 76-80.
- 11
12 388 Aznar, M., Lopez, R., Cacho, J., and Ferreira, V. (2003). Prediction of aged red wine
13
14 389 aroma properties from aroma chemical composition. Partial least squares regression
15
16 390 models. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 51, 2700-2707.
- 18
19 391 Barata, A., Caldeira, J., Botelho, R., Pagliara, A., Malfeito-Ferreira, M. and Loureiro, V.
20
21 392 (2008) Survival patterns of *Dekkera bruxellensis* in wines and inhibitory effect of
22
23 393 sulphur dioxide. *International Journal of Food Microbiology* 121, 201-207.
- 25
26 394 Benito, S., Palomero, F., Morata, A., Calderón, F., and Suárez-Lepe, J.A. (2009). A
27
28 395 method for estimating *Dekkera/Brettanomyces* populations in wines. *Journal of Applied*
29
30 396 *Microbiology* 106, 1743-1751.
- 32
33 397 Chatonnet, P., Dubordieu, D. and Boidron, J.N. (1995) The Influence of
34
35 398 *Brettanomyces/Dekkera* sp. Yeasts and Lactic Acid Bacteria on the Ethylphenol
36
37 399 Content of Red Wines. *American Journal of Enology and Viticulture* 46 (4), 463-468.
- 39
40 400 Chatonnet, P., Dubourdie, D., Boidron, J.N., and Pons, M. (1992) The origin of
41
42 401 ethylphenols in wines. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 60 (2), 165-178.
- 44
45 402 Cocolin, L., Rantsiou, K., Iacumin, L., Zironi, R. and Comi, G. (2004) Molecular detection
46
47 403 and identification of *Brettanomyces/Dekkera bruxellensis* and *Brettanomyces/Dekkera*
48
49 404 *anomalus* in spoiled wines. *Applied and Environmental Microbiology* 70 (3), 1347-
50
51 405 1355.
- 52
53
54
55
56
57
58
59
60

- 1
2
3 406 Comitini, F., De, J.I., Pepe, L., Mannazzu, I. and Ciani, M. (2004) *Pichia anomala* and
4
5 407 *Kluyveromyces wickerhamii* killer toxins as new tools against *Dekkera/Brettanomyces*
6
7 408 spoilage yeasts. *FEMS Microbiology Letters* 238 (1), 235-240.
8
9
10 409 Comitini, F. and Ciani, M. (2011) *Kluyveromyces wickerhamii* killer toxin: purification
11
12 410 and activity towards *Brettanomyces/Dekkera* yeasts in grape must. *FEMS Microbiology*
13
14 411 *Letters*, 316, (1) 77-82.
15
16
17 412 Conterno, L., Lucy Joseph, C.M., Arvik, T.J., Henick-Kling, T. and Bisson, L.F. (2006)
18
19 413 Genetic and physiological characterization of *Brettanomyces bruxellensis* strains
20
21 414 isolated from wines. *American Journal of Enology and Viticulture* 57 (2), 139-147.
22
23
24 415 Costa, A., Barata, A., Malfeito-Ferreira, M. and Loureiro, V. (2008) Evaluation of the
25
26 416 inhibitory effect of dimethyl dicarbonate (DMDC) against wine microorganisms. *Food*
27
28 417 *Microbiology* 25 (2), 422-427.
29
30
31 418 Costello, P.J. and Henschke, P.A. (2002) Mousy off-flavor of wine: precursors and
32
33 419 biosynthesis of the causative N-heterocycles 2-ethyltetrahydropyridine, 2-
34
35 420 acetyltetrahydropyridine, and 2-acetyl-1-pyrroline by *Lactobacillus hilgardii* DSM
36
37 421 20176. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50 (24), 7079-7087.
38
39
40 422 Coulon, J., Perello, M.C., Lonvaud-Funel, A., De Revel, G. and Renouf, V. (2010)
41
42 423 *Brettanomyces bruxellensis* evolution and volatile phenols production in red wines
43
44 424 during storage in bottles. *Journal of Applied Microbiology* 108 (4), 1450-1458.
45
46
47 425 Couto, J.A., Neves, F., Campos, F.M., and Hogg, T. (2005) Thermal inactivation of the
48
49 426 wine spoilage yeasts *Dekkera/Brettanomyces*. *International Journal of Food*
50
51 427 *Microbiology* 104, 337-344.
52
53
54
55
56
57
58
59
60

- 1
2
3 428 Culleré, L., Escudero, A., Cacho, J., and Ferreira, V. (2004). Gas chromatography-
4
5 429 olfactometry and chemical quantitative study of the aroma of six premium quality
6
7 430 spanish aged red wines. *J Agric Food Chem.* 52(6):1653-60.
8
9
10 431 Delfini, C., Gaia, P., Schellino, R., Strano, M., Pagliara, A. and Ambrò, S. (2002)
11
12 432 Fermentability of grape must after inhibition with dimethyl dicarbonate (DMDC).
13
14 433 *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 50, 5605-5611.
15
16
17 434 Dias, L., Dias, S., Sancho, T., Stender, H., Querol, A., Malfeito-Ferreira, M. and Loureiro,
18
19 435 V. (2003) Identification of yeasts isolated from wine-related environments and capabe
20
21 436 of producing 4-ethylphenol. *Food Microbiology* 20, 567-574.
22
23
24 437 Du Toit, M., Pretorius, I.S. and Lonvaud-Funel, A. (2005) The effect of sulphur dioxide
25
26 438 and oxygen on the viability and culturability of a strain of *Acetobacter pasteurianus* and
27
28 439 a strain of *Brettanomyces bruxellensis* isolated from wine. *Journal of Applied*
29
30 440 *Microbiology* 98, 862-871.
31
32
33 441 Enrique, M., Marcos, J.F., Yuste, M., Martínez, M., Vallés, S. and Manzanares, P. (2007)
34
35 442 Antimicrobial action of synthetic peptides towards wine spoilage yeasts. *International*
36
37 443 *Journal of Food Microbiology* 118 (3), 318-325.
38
39
40 444 Fernández-Espinar, M.T., Esteve-Zarzoso, B., Querol, A. and Barrio, E. (2000) RFLP
41
42 445 analysis of the ribosomal internal transcribed spacers and the 5.8S rRNA gene region of
43
44 446 the genus *Saccharomyces*: a fast method for species identification and the
45
46 447 differentiation of flor yeasts. *Antonie van Leeuwenhoek* 78 (1), 87-97.
47
48
49
50 448 Ferreira, V., Jarauta, I., and Cacho, J. (2006). Physicochemical model to interpret the
51
52 449 kinetics of aroma extraction during wine aging in wood. Model limitations suggest the
53
54 450 necessary existence of biochemical processes. *Journal of Agriculture and Food*
55
56 451 *Chemistry*, 54, 3047-3054.
57
58
59
60

- 1
2
3 452 Fugelsang, P.K. (1998) *Brettanomyces*: Dr Jekyll ou Mr Hyde des vins? *Biofutur* 182, 22-
4
5 453 23.
6
7
8 454 Godoy, L., Martínez, C., Carrasco, N. and Ganga, M.A. (2008) Purification and
9
10 455 characterization of a p.coumarate decarboxylase and a vinylphenol reductase from
11
12 456 *Brettanomyces bruxellensis*. *International Journal of Food Microbiology* 127, 6-11.
13
14
15 457 Gómez-Rivas, L., Escudero-Abarca, B.I., Aguilar-Uscanda, M.G., Hayward-Jones, P.M.,
16
17 458 Mendoza, P. and Ramírez, M. (2004) Selective antimicrobial action of Chitosan against
18
19 459 spoilage yeasts in mixed culture fermentations. *Journal of Industrial Microbiology and*
20
21 460 *Biotechnology* 31, 16-22.
22
23
24 461 Guzzon, R., Widmann, G., Malacarne, M., Nardin, T., Nicolini, G. and Larcher, R. (2011)
25
26 462 Survey of the yeast population inside wine barrels and the effects of certain techniques
27
28 463 in preventing microbiological spoilage. *European Food Research and Technology* 233
29
30 464 (2), 285-291.
31
32
33 465 Harris, V., Ford, C. M., Jiranek, V. and Grbin, P. R. (2008) *Dekkera* and *Brettanomyces*
34
35 466 growth and utilisation of hydroxycinnamic acids in synthetic media. *Applied Microbial*
36
37 467 *and Cell Physiology* 78, 997-1006.
38
39
40 468 Harris, V., Jiranek, V., Ford, C. and Grbin, P. (2010) Inhibitory effect of hydroxycinnamic
41
42 469 acids on *Dekkera* spp. *Applied Microbiology and Biotechnology* 86 (2), 721-729.
43
44
45 470 Hornsey, I. S. (2007). *Chemistry and Biology of Winemaking*. Cambridge: The Royal
46
47 471 Society of Chemistry.
48
49
50 472 Jones, G., White, M., Cooper, O. and Storchmann, K. (2005) Climate Change and Global
51
52 473 Wine Quality. *Climatic Change* 73 (3), 319-343.
53
54
55
56
57
58
59
60

- 1
2
3 474 Kong, M., Chen, X.G., Xing, K. and Park, H.J. (2010) Antimicrobial properties of chitosan
4
5 475 and mode of action: A state of the art review. *International Journal of Food*
6
7 476 *Microbiology* 144 (1), 51-63.
8
9
10 477 Kurtzman, C.P., Fell, J.W. and Boekhout, T. (2011) The yeasts: A taxonomic study.
11
12 478 (Elsevier B.V.: London, Burlington, San Diego).
13
14
15 479 Licker, J. L., Acree, T.E. and Henick-Kling, T. (1998) What is "Brett" (*Brettanomyces*)
16
17 480 flavor?: A preliminary. *Chemistry of Wine Flavor* 714, 96-115.
18
19
20 481 Lonvaud-Funel, A. and Renouf, V. (2005) Incidence microbiologique de l'usage de
21
22 482 barriques neuves et/ou de barrique usagées. *Revue Française d'Oenologie* 211, 10-14.
23
24
25 483 López, R., Aznar, M., Cacho, J. and Ferreira, V. (2002) Determination of minor and trace
26
27 484 volatile compounds in wine by solid-phase extraction and gas chromatography with
28
29 485 mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A* 966 (1-2), 167-177.
30
31
32 486 Lustrato, G., Vigentini, I., De Leonardis, A., Alfano, G., Tirelli, A., Foschino, R. and
33
34 487 Ranalli, G. (2010) Inactivation of wine spoilage yeasts *Dekkera bruxellensis* using low
35
36 488 electric current treatment (LEC). *Journal of Applied Microbiology* 109 (2), 594-604.
37
38
39 489 Mataix E., and Luque de Castro, M. D. (2001). Simultaneous (or sequential) determination
40
41 490 of the total polyphenol index (or I280) and density in wines by flow injection. *Analyst*,
42
43 491 *126*, 251–255.
44
45
46 492 Millet, V. and Lonvaud-Funel, A. (2000). The viable but non-culturable state of wine
47
48 493 micro-organisms during storage. *Letters in Applied Microbiology* 30 (2), 136-141.
49
50
51 494 Puértolas, E., López, N., Condón, S., Raso, J. and Álvarez, I. (2009) Pulsed electric fields
52
53 495 inactivation of wine spoilage yeast and bacteria. *International Journal of Food*
54
55 496 *Microbiology* 130 (1), 49-55.
56
57
58
59
60

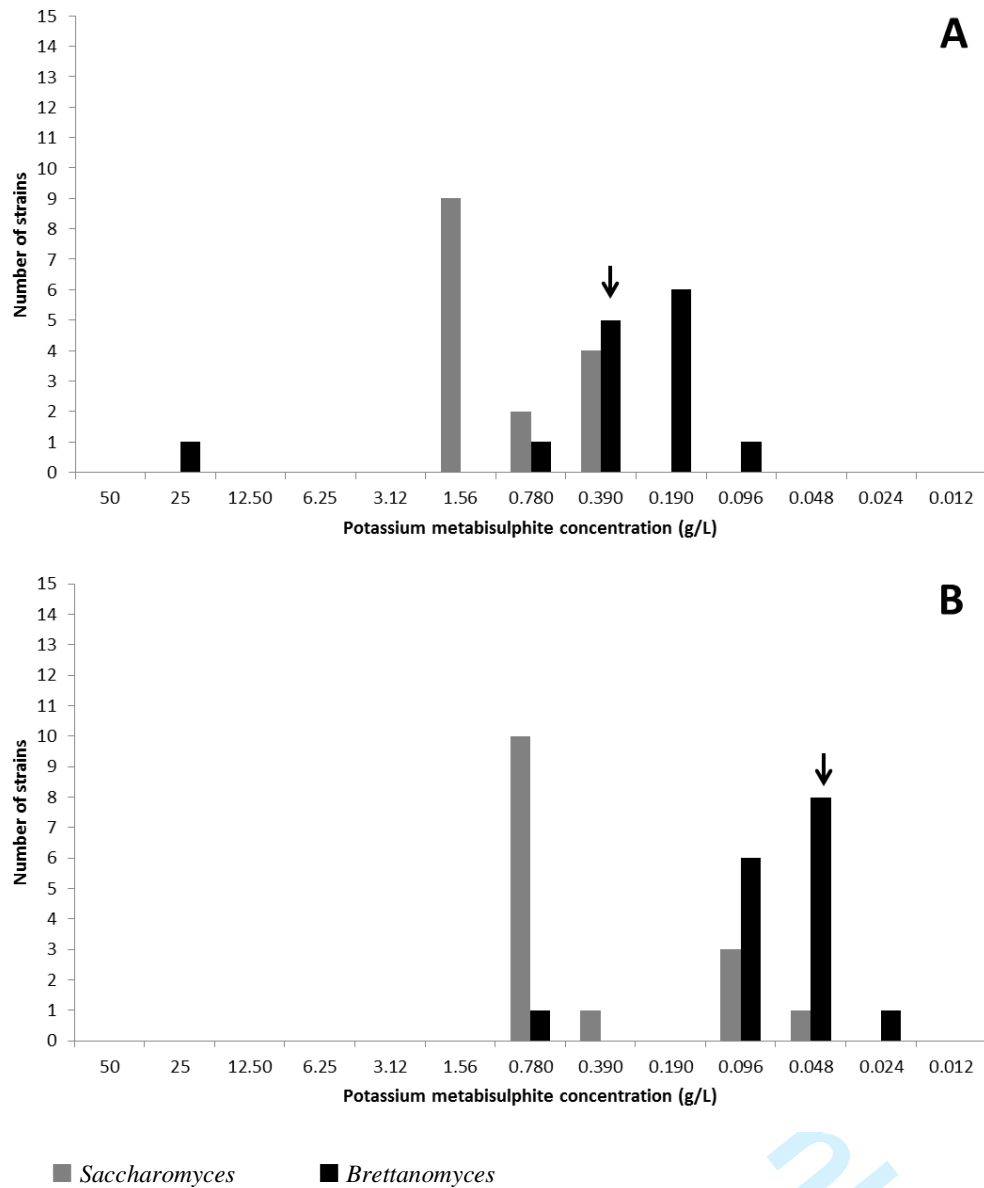
- 1
2
3 497 Puig, A., Vilavella, M., Daoudi, L., Guamis, B., and Mínguez, S. (2003). Microbiological
4
5 498 and biochemical stabilization of wines using the high pressure technique. *Bulletind de*
6
7 499 *I'OIV 76(869/870): 569–617.*
- 8
9
10 500 Renouf, V., Strehaiano, P. and Lonvaud-Funel, A. (2008) Effectiveness of
11
12 501 dimethyldicarbonate to prevent *Brettanomyces bruxellensis* growth in wine. *Food*
13
14 502 *Control* 19 (2), 208-216.
- 15
16
17 503 Ribéreau-Gayon, P., Dubourdie, D., Donèche, B. and Lonvaud-Funel, A. (2006) Handbook
18
19 504 of enology: the microbiology of wine and vinifications, 2 ed. (JohnWiley & Sons: The
20
21 505 Atrium, Southern Gate, Chichester, West Sussex).
- 22
23
24 506 Rodrigues, N., Gonçalves, G., Pereira da Silva, S., Malfeito-Ferreita, M. and Loureiro, V.
25
26 507 (2001) Development and use of a new medium to detect yeasts of the genera
27
28 508 *Dekkera/Brettanomyces*. *Journal of Applied Microbiology* 90, 588-599.
- 29
30
31 509 Rojo-Bezares, B., Sáenz, Y., Zarazaga, M., Torres, C. and Ruiz-Larrea, F. (2007)
32
33 510 Antimicrobial activity of nisin against *Oenococcus oeni* and other wine bacteria.
34
35 511 *International Journal of Food Microbiology* 116, 32-36.
- 36
37
38 512 Romano, P., and Suzzi, G. (1993). Sulphur dioxide and wine microorganisms. In: Fleet, G.
39
40 513 (Ed.), *Wine Microbiology and Biotechnology* (p. 373-393). Harwood Academic
41
42 514 Publishers.
- 43
44
45 515 Romano, A., Perello, M.C., De Revel, G. and Lonvaud-Funel, A. (2008) Growth and
46
47 516 volatile compound production by *Brettanomyces/Dekkera bruxellensis* in red wine.
48
49 517 *Journal of Applied Microbiology* 104 (6), 1577-1585.
- 50
51
52 518 Santos, A., San Mauro, M., Bravo, E. and Marquina, D. (2009) PMKT2, a new killer toxin
53
54 519 from *Pichia membranifaciens*, and its promising biotechnological properties for control
55
56 520 of the spoilage yeast *Brettanomyces bruxellensis*. *Microbiology* 155 (2), 624-634.
57
58
59
60

- 1
2
3 521 Santos, A., Navascués, E., Bravo, E. and Marquina, D. (2011) *Ustilago maydis* killer toxin
4
5 522 as a new tool for the biocontrol of the wine spoilage yeast *Brettanomyces bruxellensis*.
6
7 523 *International Journal of Food Microbiology* 145 (1), 147-154.
8
9
10 524 Silva, P., Cardoso, H. and Gerós, H. (2004) Studies on the wine spoilage capacity of
11
12 525 *Brettanomyces/Dekkera* spp. *American Journal of Enology and Viticulture* 55 (1), 65-
13
14 526 72.
15
16
17 527 Soares, E.V. (2011) Flocculation in *Saccharomyces cerevisiae*: a review. *Journal of*
18
19 528 *Applied Microbiology* 110 (1), 1-18.
20
21
22 529 Suárez, R., Suárez-Lepe, J.A., Morata, A. and Calderón, F. (2006) The production of
23
24 530 ethylphenols in wine by yeasts of the genera *Brettanomyces* and *Dekkera*: a review.
25
26 531 *Food Chemistry* 102 (1), 10-21.
27
28
29 532 Tchobanov, I., Gal, L., Guilloux-Benatier, M., Remize, F., Nardi, T., Guzzo, J., Serpaggi,
30
31 533 V. and Alexandre, H. (2008) Partial vinylphenol reductase purification and
32
33 534 characterization from *Brettanomyces bruxellensis*. *FEMS Microbiology Letters* 284,
34
35 535 213-217.
36
37
38 536 Úbeda, J.F. and Briones, A.I. (1999) Microbiological quality control of filtered and non-
39
40 537 filtered wines. *Food Control* 10 (1), 41-45.
41
42
43 538 Usseglio-Tomasset, L. and Bosia, P.D. (1984). La prima costante di dissociazione
44
45 539 dell'acido solforoso. *Vini d'Italia* 5, 7-14.
46
47
48 540 Yap, A. and Bagnall, W. (2009) High Power ultrasonics: a new powerful tool for removing
49
50 541 tartrate deposits and killing viable *Brettanomyces* cells in barrels. *Australian and New*
51
52 542 *Zealand Wine Industry Journal* 24(5), 29-39.
53
54
55
56
57
58
59
60

- 1
2
3 543 Yap, A., Schmid, F., Jiranek, V., Grbin, P.R. and Bates, D. (2008) Inactivation of
4
5 544 *Brettanomyces/ Dekkera* in wine barrels by high power ultrasound. *Australian and New*
6
7 545 *Zealand Wine Industry Journal* 23 (5), 32-40.
8
9
10 546
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

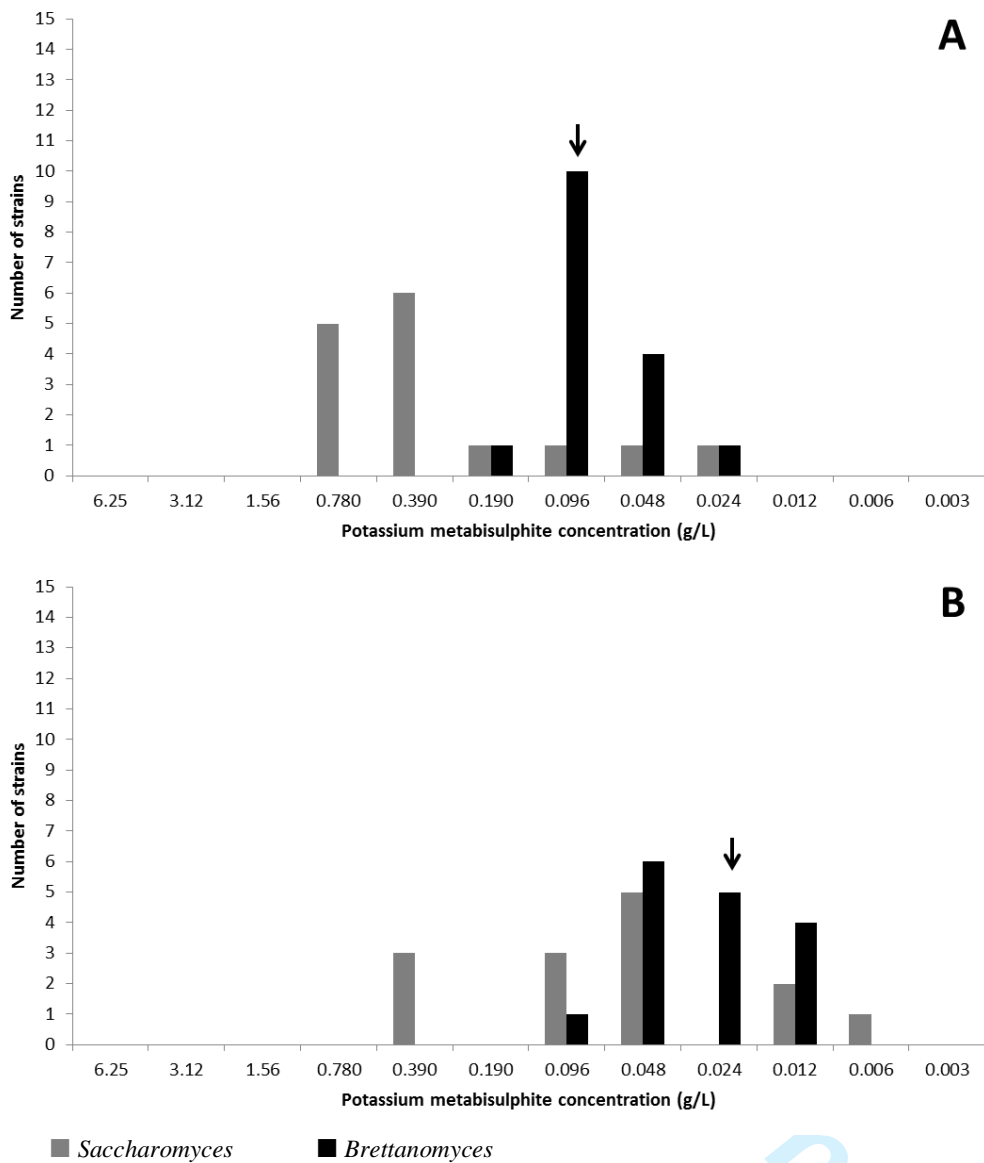
For Peer Review Only

Figure 1: Minimal inhibitory concentrations of potassium metabisulphite at different pH values against *Saccharomyces* and *Brettanomyces* strains.



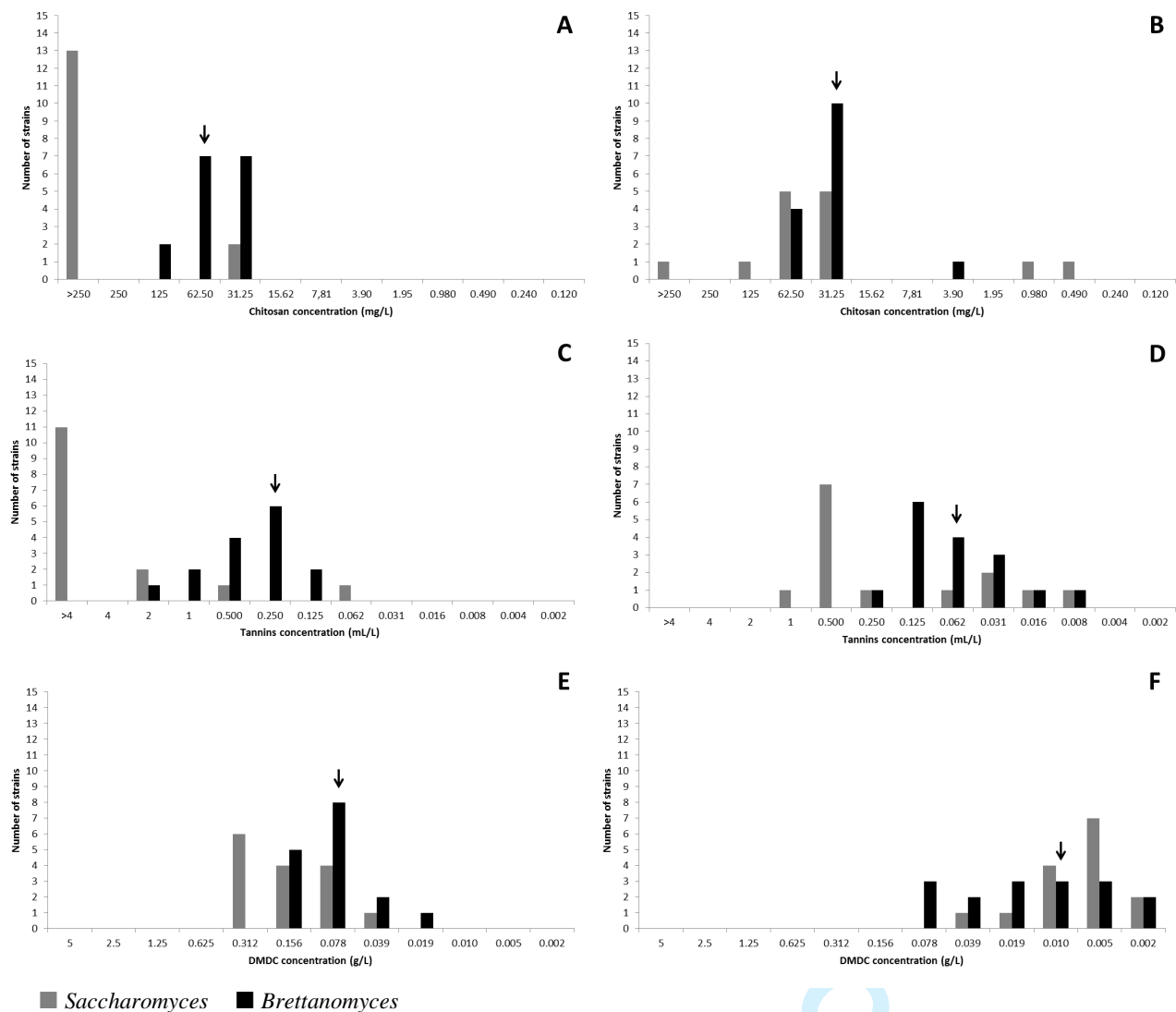
(A) pH 4.0 (B) pH 3.5. Arrows indicate MIC₅₀ for *Brettanomyces*.

Figure 2: Minimal inhibitory concentrations of potassium metabisulphite combined with different concentrations of ethanol against *Saccharomyces* and *Brettanomyces* strains.



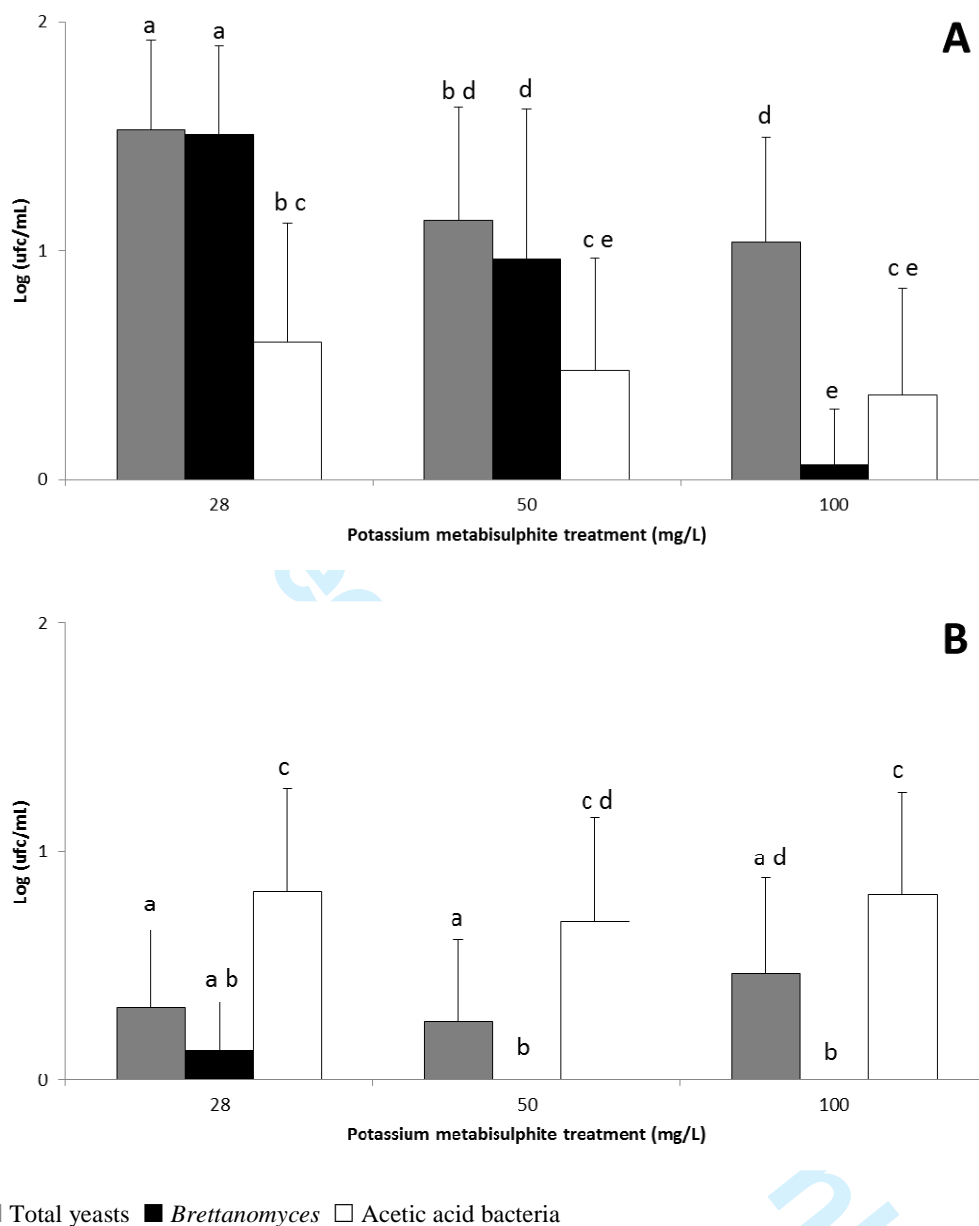
(A) 6% and (B) 12.5% in the culture broth. Arrows indicate MIC₅₀ for *Brettanomyces*.

Figure 3: Minimal inhibitory concentrations of chitosan, oenological tannins, and dimethyl dicarbonate (DMDC) against *Saccharomyces* and *Brettanomyces* strains.



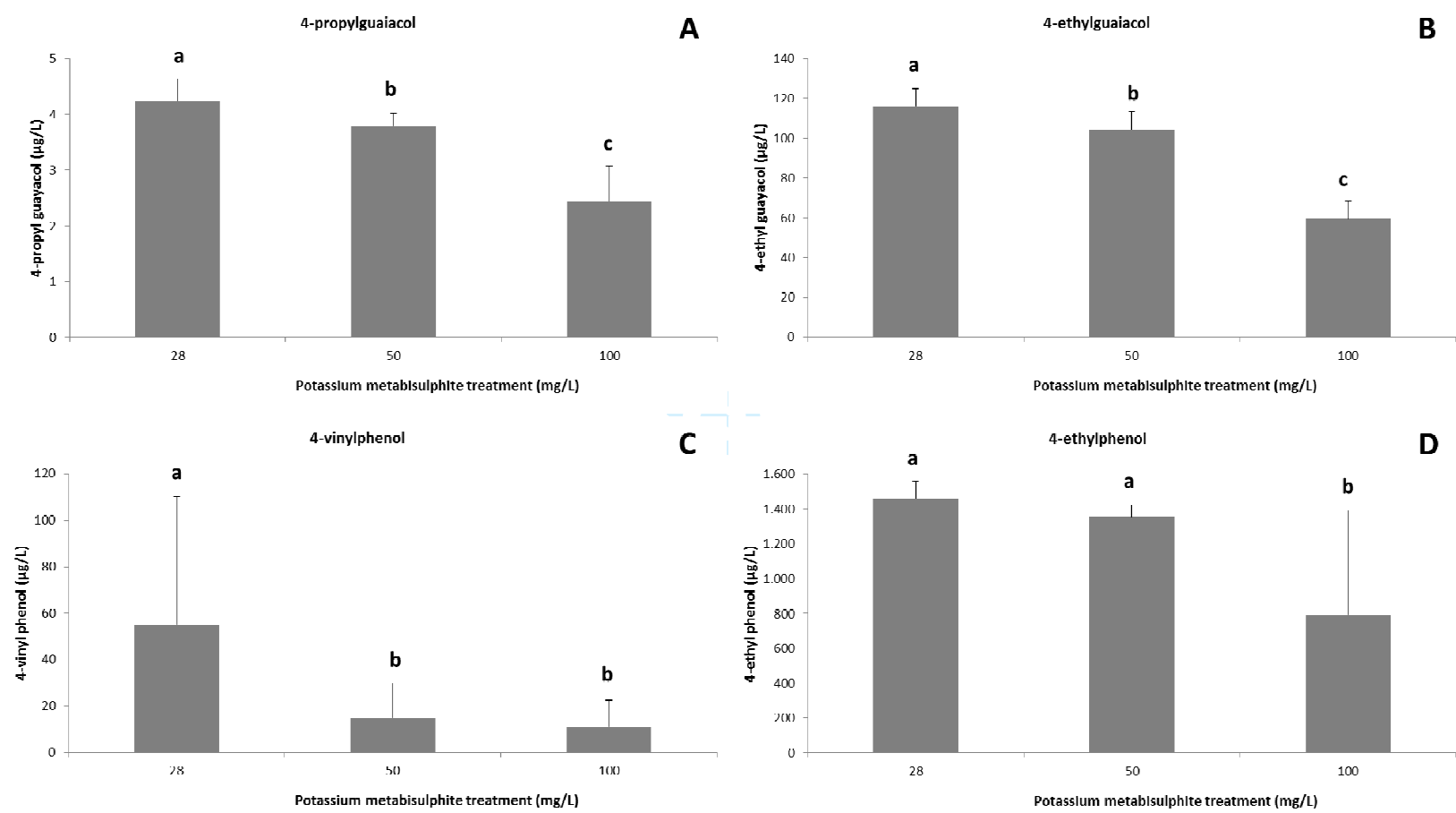
Minimal inhibitory concentrations of chitosan (A), chitosan combined with 12.5 % ethanol (B), oenological tannins (C), oenological tannins combined with 12.5 % ethanol (D), DMDC (E), and DMDC combined with 12.5 % ethanol (F). Arrows indicate MIC₅₀ for *Brettanomyces*.

Figure 4: Microbial populations of wine samples after storage.



Mean and standard deviation of microbial populations in wine samples after 4 months (A) and 22 months (B). Bars with different letters have significant statistical differences ($p < 0.05$).

Figure 5: Results of volatile phenols analysis of the wine samples after storage of 22 months.



Mean and standard deviation values of concentrations of volatile phenols: 4-propylguaiacol (A), 4-ethylguaiacol (B), 4-vinylphenol (C), 4-ethylphenol (D). Bars with different letters have significant statistical difference ($p < 0.05$).

Figure 6: Discriminant function analysis

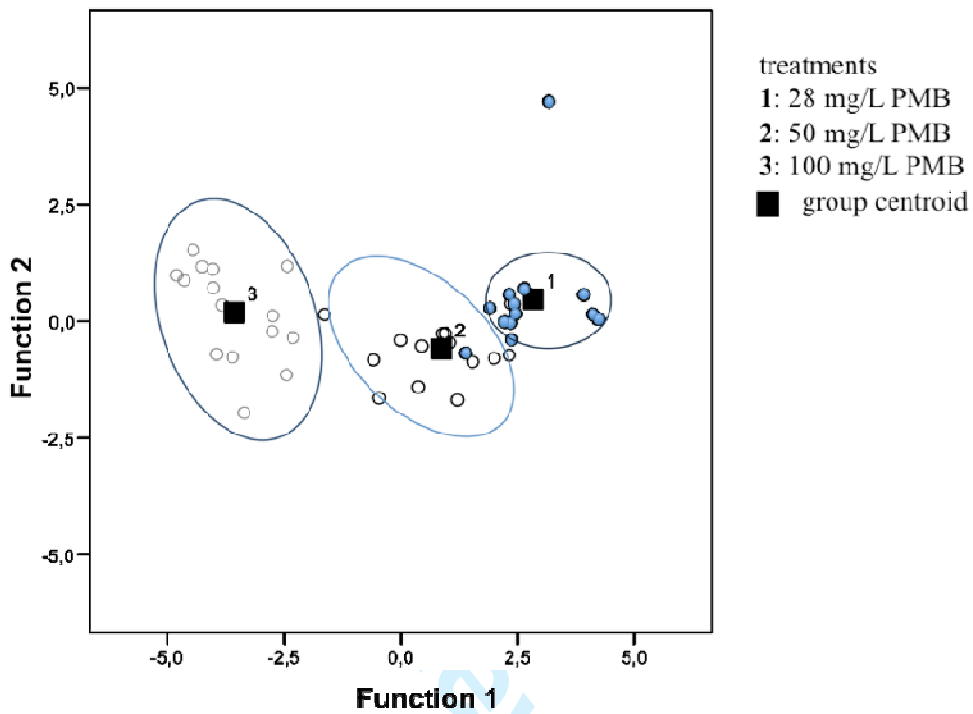
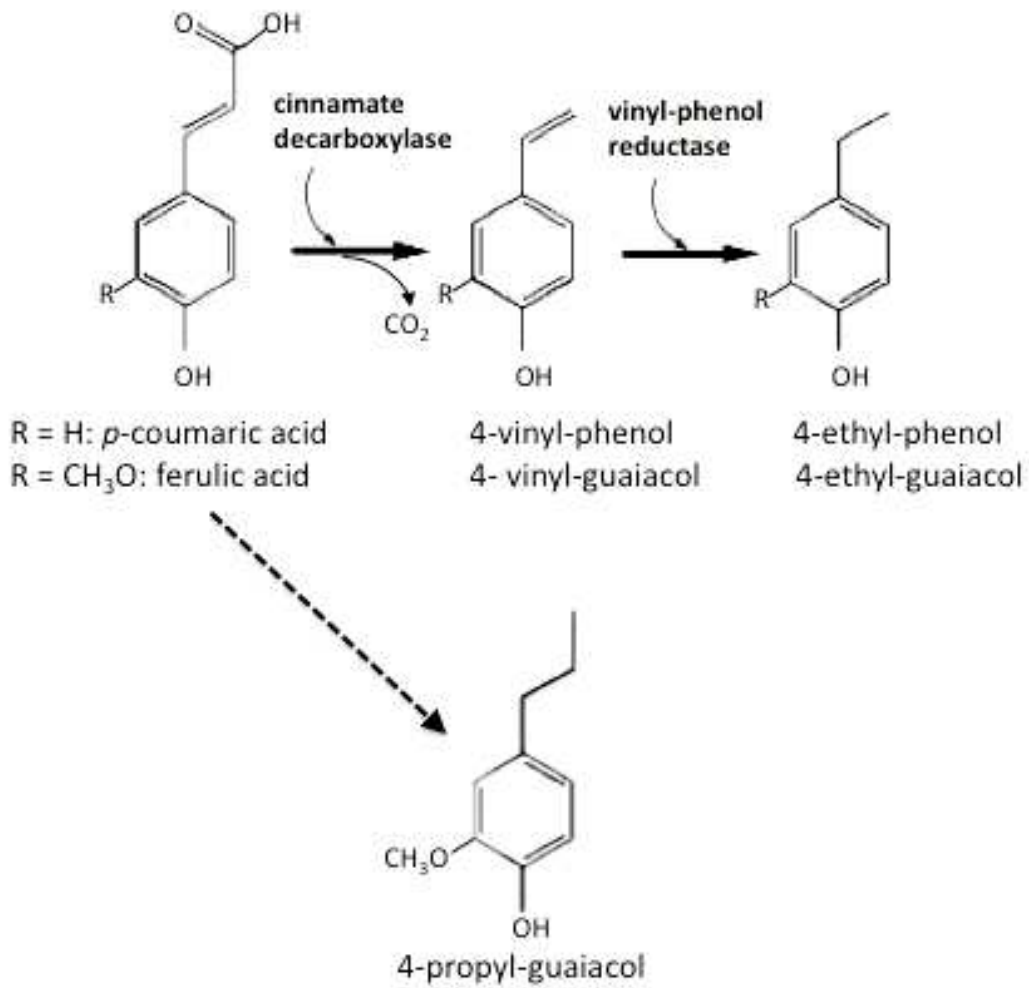


Figure 7: Schematic representation of the transformation of cinnamic acids into volatile phenols by *Brettanomyces* enzymes



Only

Table 1: Yeasts included in the study.

Species	Source	Number of strains
<i>Brettanomyces bruxellensis</i>	wine	15
<i>Dekkera bruxellensis</i>	CECT-1009	1
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	wine	7
<i>S. cerevisiae</i>	CECT-1678	1
<i>S. cerevisiae</i>	CECT-1182	1
<i>S. cerevisiae</i> †	Actiflore F33 (Laffort, Bordeaux, France)	1
<i>S. cerevisiae</i> var. <i>cerevisiae</i> †	Lalvin 71B (Lallemand, Blagnac, France)	1
<i>S. cerevisiae</i> var. <i>bayanus</i> †	Lalvin BRL97 (Lallemand)	1
<i>S. cerevisiae</i> var. <i>bayanus</i> †	Enoferm QA23 (Lallemand)	1
<i>S. cerevisiae</i> var. <i>cerevisiae</i> †	Uvaferm VRB (Lallemand)	1
<i>S. cerevisiae</i> var. <i>cerevisiae</i> †	Uvaferm WAM (Lallemand)	1

† Commercial yeast strain.

CECT: Spanish Culture Type Collection.

Table 2: Values of minimal inhibitory concentrations MIC₅₀ and MIC₉₀, and minimal biocide concentrations MBC₅₀ and MBC₉₀ for the studied antimicrobial agents.

Antimicrobial agent	Range	Microorganism	MIC		MBC	
			MIC ₅₀	MIC ₉₀	MBC ₅₀	MBC ₉₀
Ethanol	8 – 20%	<i>S. cerevisiae</i>	>20%	>20%	>20%	>20%
		<i>B. bruxellensis</i>	>20%	>20%	>20%	>20%
PMB	6.25 – 0.003 g/L	<i>S. cerevisiae</i>	780 mg/L	780 mg/L	780 mg/L	780 mg/L
		<i>B. bruxellensis</i>	48 mg/L	96 mg/L	96 mg/L	96 mg/L
PMB + ethanol†	6.25 – 0.003 g/L	<i>S. cerevisiae</i>	48 mg/L	390 mg/L	190 mg/L	390 mg/L
		<i>B. bruxellensis</i>	24 mg/L	48 mg/L	48 mg/L	48 mg/L
Tannins	4 – 0.002 mL/L	<i>S. cerevisiae</i>	>4 mL/L	>4 mL/L	>4 mL/L	>4 mL/L
		<i>B. bruxellensis</i>	0.5 mL/L	1 mL/L	>4 mL/L	>4 mL/L
Tannins + ethanol†	4 – 0.002 mL/L	<i>S. cerevisiae</i>	0.5 mL/L	0.5 mL/L	4 mL/L	>4 mL/L
		<i>B. bruxellensis</i>	0.125 mL/L	0.125 mL/L	0.25 mL/L	>4 mL/L
Chitosan	250 – 0.12 mg/L	<i>S. cerevisiae</i>	>250 mg/L	>250 mg/L	>250 mg/L	>250 mg/L
		<i>B. bruxellensis</i>	62 mg/L	62 mg/L	250 mg/L	>250 mg/L
Chitosan + ethanol†	250 – 0.12 mg/L	<i>S. cerevisiae</i>	62 mg/L	125 mg/L	250 mg/L	>250 mg/L
		<i>B. bruxellensis</i>	31 mg/L	62 mg/L	62 mg/L	>250 mg/L
DMDC	5 – 0.002 g/L	<i>S. cerevisiae</i>	156 mg/L	312 mg/L	625 mg/L	1250 mg/L
		<i>B. bruxellensis</i>	78 mg/L	156 mg/L	312 mg/L	625 mg/L
DMDC + ethanol†	5 – 0.002 g/L	<i>S. cerevisiae</i>	5 mg/L	30 mg/L	625 mg/L	1250 mg/L
		<i>B. bruxellensis</i>	10 mg/L	60 mg/L	120 mg/L	625 mg/L

MIC: minimum inhibitory concentration; MBC: minimum biocide concentration

† Fixed concentration at 12.5% (v/v).

Table 3: Minimal inhibitory and biocide concentrations of the antimicrobial agents against each of the studied strains.

Strain	MIC								MBC								
	PMB (mg/L)		Tannins (mL/L)		Chitosan (mg/L)		DMDC (mg/L)		PMB (mg/L)		Tannins (mL/L)		Chitosan (mg/L)		DMDC (mg/L)		
	A*	B*	A*	B*	A*	B*	A*	B*	A*	B*	A*	B*	A*	B*	A*	B*	
<i>S. cerevisiae</i>	F33	0.780	0.048	> 4	0.06	> 250	125	0.312	0.005	0.780	0.190	> 4	1	> 250	> 250	1.25	1.25
	WAM	0.780	0.097	> 4	1	> 250	31.25	0.312	0.019	0.780	0.190	> 4	> 4	> 250	> 250	1.25	1.25
	QA23	0.780	0.390	> 4	0.5	> 250	31.25	0.156	0.039	0.780	0.390	> 4	4	> 250	250	0.625	0.625
	BRL97	0.780	0.390	2	0.5	> 250	31.25	0.312	0.010	0.780	0.390	> 4	> 4	> 250	250	1.25	1.25
	C208	0.390	0.097	> 4	0.5	> 250	62.50	0.078	0.005	0.390	0.097	> 4	2	> 250	125	0.312	0.312
	C209	0.097	0.012	> 4	0.008	> 250	5	0.078	0.002	0.190	0.048	> 4	> 4	> 250	125	0.312	0.156
	C201	0.048	0.006	0.5	0.016	31.25	1	0.156	0.005	0.097	0.024	> 4	> 4	250	250	1.25	0.625
	C199	0.097	n/g	0.062	n/g	31.25	> 250	0.039	0.002	0.097	n/g	0.5	n/g	125	125	0.156	0.01
	71B	0.097	0.048	> 4	0.5	> 250	62.50	0.078	0.005	0.097	0.048	> 4	> 4	> 250	250	0.312	0.625
	VRB	0.780	0.390	> 4	0.5	> 250	62.50	0.312	0.005	0.780	0.190	> 4	> 4	> 250	> 250	1.25	0.625
	CNL14a	0.780	0.097	> 4	0.250	> 250	31.25	0.312	0.010	0.780	0.190	> 4	0.5	> 250	250	1.25	0.625
	CNL15a	0.780	0.012	2	0.031	> 250	62.50	0.078	0.005	0.780	0.097	2	2	> 250	> 250	0.312	0.312
	CNL16a	0.780	0.048	> 4	0.5	> 250	62.50	0.156	0.010	0.780	0.190	> 4	1	> 250	> 250	0.312	0.625
	CNL21a	0.780	0.048	> 4	0.5	> 250	> 250	0.156	0.005	0.780	0.190	> 4	1	> 250	> 250	1.25	0.625
	CNL23a	0.780	0.048	> 4	0.031	> 250	31.25	0.312	0.010	0.780	0.190	> 4	1	> 250	250	1.25	1.25
<i>B. bruxellensis</i>	BY24	0.097	0.024	0.250	0.125	31.25	31.25	0.039	0.010	0.097	0.097	2	2	62.50	62.50	0.312	0.078
	BY48	0.097	0.024	0.250	0.031	31.25	31.25	0.039	0.005	0.097	0.024	4	0.5	62.50	62.50	0.312	0.156
	CP1	0.048	0.012	0.250	0.062	31.25	31.25	0.078	0.002	0.097	0.024	0.062	0.031	125	31.25	0.312	0.078
	CP16	0.048	0.024	0.125	0.125	31.25	31.25	0.019	0.002	0.097	0.024	2	0.250	62.50	62.50	0.156	0.078
	CP34	0.048	0.024	0.250	0.031	31.25	62.50	0.078	0.005	0.048	0.024	1	0.125	62.50	62.50	0.312	0.156
	NA36f	0.048	0.048	1	0.125	62.50	31.25	0.156	0.019	0.097	0.048	> 4	> 4	> 250	250	0.312	0.312
	PL126	0.048	0.024	1	0.125	62.50	31.25	0.156	0.078	0.048	0.048	> 4	> 4	> 250	> 250	0.625	0.312
	PL144	0.097	0.012	0.5	0.125	62.50	62.50	0.156	0.078	0.097	0.048	> 4	0.250	> 250	> 250	0.625	0.625
	PL155	0.780	0.048	0.250	0.031	31.25	31.25	0.078	0.010	0.780	0.048	> 4	> 4	62.50	62.50	0.312	0.156
	PL2	0.048	0.012	0.5	0.062	62.50	62.50	0.078	0.019	0.048	0.012	> 4	0.250	250	125	0.312	0.312
	PL45	0.097	0.048	0.125	0.016	31.25	4	0.156	0.078	0.097	0.048	> 4	n/g	> 250	31.25	0.625	0.625
	PL52	0.097	0.048	0.5	0.062	62.50	62.50	0.156	0.039	0.097	0.048	> 4	0.250	> 250	> 250	0.625	0.312
	PL80	0.048	0.048	2	0.250	125	62.50	0.078	0.019	0.048	0.048	> 4	2	> 250	250	0.625	0.312
	1009	0.024	0.012	0.5	0.008	125	31.25	0.078	0.039	0.048	0.024	> 4	0.125	> 250	> 250	0.625	0.156
	PL463	0.097	0.097	0.5	0.062	62.50	31.25	0.078	0.005	0.190	0.097	> 4	0.250	> 250	62.50	0.312	0.039
	BY3	0.048	0.048	0.250	0.125	62.50	31.25	0.078	0.010	0.097	0.048	0.5	0.250	62.50	31.25	0.312	0.156

A*: Without ethanol, B*: With 12.5% ethanol.

(n/g) no growing

Table 4: Pearson's correlation coefficient values among microbial populations at 4 and 22 months and concentrations of volatile phenols.

		4-propylguaiacol	4-ethylguaiacol	4-vinylphenol	4-ethylphenol
4 months	Total yeasts	0.373*	0.270	0.274	0.250
	<i>Brettanomyces</i>	0.566**	0.436**	0.264	0.402**
	Acetic acid bacteria	0.098	0.080	0.247	0.042
22 months	Total yeasts	-0.122	-0.099	0.019	-0.095
	<i>Brettanomyces</i>	0.293	0.226	0.151	0.185
	Acetic acid bacteria	-0.008	-0.008	0.119	-0.033

* Significant correlation at 0.05

** Significant correlation at 0.01