REVISTA DE CIENCIAS

ZUBÍA

MONOGRÁFICO

25

ier

Instituto de Estudios Riojanos

ZUBÍA. MONOGRÁFICO
REVISTA DE CIENCIAS.
Nº 25 (2013). Logroño (España).
P. 1-133, ISSN: 1131-5423

DIRECTORA
Purificación Ruiz Flaño

CONSEJO DE REDACCIÓN
Luis Español González
Rubén Esteban Pérez
Rafael Francia Verde
Juana Hernández Hernández
Luis Miguel Medrano Moreno
Patricia Pérez-Matute
Enrique Requeta Loza
Rafael Tomás Las Heras

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

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

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

INSTITUTO DE ESTUDIOS RIOJANOS

ZUBÍA

REVISTA DE CIENCIAS

Monográfico Núm. 25

Investigación e Innovación al servicio de la alimentación en La Rioja: avances en el campo de la enología y en otros productos riojanos

Coordinadores:
Rafael Francia Verde
Patricia Pérez-Matute

Gobierno de La Rioja
Instituto de Estudios Riojanos
LOGROÑO
2013

Investigación e innovación al servicio de la alimentación en La Rioja: avances en el campo de la enología y en otros productos riojanos / coordinadores, Patricia Pérez-Matute, Rafael Francia Verde. -- Logroño : Instituto de Estudios Riojanos, 2013
133 p. : gráf. ; 24 cm-- (Zubía. Monográfico, ISSN 1131-5423; 25).- D.L. LR 413-2012

1. Alimentación - Investigación - La Rioja. I. Pérez-Matute, Patricia. II. Francia Verde, Rafael. III. Instituto de Estudios Riojanos. IV. Serie

664.098 (460.21)

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

© Logroño, 2013
Instituto de Estudios Riojanos
C/ Portales, 2
26001-Logroño, La Rioja (España)

© Diseño de cubierta e interior: ICE Comunicación

© Cubierta: Salas de cultivo de champiñón en CTICH, fotografía de Margarita Pérez Clavijo.
Contracubierta: Viñedos de Cenicero, fotografía de Fernando del Campo Hermosilla.

Producción gráfica: kbcreativos.com

ISSN 1131-5423
Depósito Legal LR 413-2012

Impreso en España - Printed in Spain

ÍNDICE

PRÓLOGO
Rafael Francia Verde y Patricia Pérez-Matute *(Coordinadores)*..... 7-9

J. M. MARTÍNEZ ZAPATER
Instituto de ciencias de la vid y del vino (ICVV): Origen, organización y actividad científica 11-13

F. MARTÍNEZ DE TODA, J. C. SANCHA, P. BALDA
Caracterización ampelográfica y genética e identificación de diferentes variedades de vid conocidas como "Maturana" en la DOCa. Rioja
Ampelographic and genetic characterization and identification of different grape varieties known as "Maturana" in Rioja appellation (Spain) 15-19

P. BALDA, J. C. SANCHA, F. MARTÍNEZ DE TODA
Caracterización vitícola y enológica de cuatro variedades minoritarias conocidas como Tempranillo en la D.O.Ca. Rioja.
Agricultural and enological characterization of four minority grape varieties known as Tempranillo in Rioja appellation (Spain) 21-30

J. MARTÍNEZ GARCÍA, P. RUBIO-BRETÓN
Composición fenólica no antociánica en vinos de tempranillo de la D.O.Ca. Rioja. Efecto de la añada, el empleo de microoxigenación y la crianza en barrica
Non-anthocyanic phenolic composition of tempranillo red wines from La Rioja. Effects of vintage, micro-oxygenation and barrel ageing 31-45

R. LÓPEZ, T. GARDE-CERDÁN, P. SANTAMARÍA, A.R. GUTIÉRREZ, P. GARIJO, L. GONZÁLEZ-ARENZANA, I. LÓPEZ-ALFARO
Elaboración de vinos tintos más saludables
Elaboration of healthier red wines 47-60

P. FERNÁNDEZ-ZURBANO, M.-P. SÁENZ-NAVAJAS, A. GONZALO-DIAGO, J. M. AVIZCURI, M. GONZÁLEZ HERNÁNDEZ, V. FERREIRA, M. DIZY
Propiedades gustativas de los vinos tintos y su relación con la composición química no-volátil
In-mouth sensory properties of red wine and their relationship with non-volatile chemical composition 61-83

A.R. GUTIÉRREZ, P. GARIJO, E. OCÓN, R. LÓPEZ, P. SANTAMARÍA, C. OLARTE, S. SANZ
Papel del aire en la diseminación de microorganismos enológicos implicados en la calidad y sanidad del vino
Role of air in the dissemination of microorganisms of oenological interest 85-99

CTIC-CITA, L. NAVARRO
CTIC-CITA: Innovando con la Empresa
CTIC-CITA: Innovation with the Company 101-112

M. PÉREZ CLAVIJO
CTICH: Centro Tecnológico de Investigación del Champiñón de La Rioja
CTICH: Technical Research Centre of Mushrooms in La Rioja 113-124

Zubía. Monográfico 25 85-99 Logroño 2013

PAPEL DEL AIRE EN LA DISEMINACIÓN DE MICROORGANISMOS ENOLÓGICOS IMPLICADOS EN LA CALIDAD Y SANIDAD DEL VINO

A.R. GUTIÉRREZ[1], P. GARIJO[1], E. OCÓN[2]
R. LÓPEZ[1], P. SANTAMARÍA[1], C. OLARTE[2], S. SANZ[*,2]

RESUMEN

Este trabajo es una reflexión sobre el papel del aire en la diseminación de microorganismos de interés enológico, tanto en la viña como en la bodega. Se basa en diferentes trabajos llevados a cabo por el grupo firmante en los últimos 5 años, que han sido publicados o están siendo revisados en revistas científicas internacionales. Se observó la presencia de todos los tipos de microorganismos enológicos tanto en el aire del viñedo como en el de la bodega, siendo los más abundantes los mohos y las levaduras. Se pudo comprobar que el aire juega un importante papel en la inoculación con levaduras y bacterias durante las fermentaciones alcohólica y maloláctica, y también que puede ser una vía de diseminación de microorganismos alterantes por la bodega. Además se determinó que la presencia de mohos en el aire de las bodegas está directamente relacionada con su diseño.

Palabras clave: *Bodega, aire, levaduras, mohos, bacterias lácticas*

This work is a reflection on the role of air in the dissemination of microorganisms of oenological interest, both in the vineyard as in the winery. It is

1. ICVV, Instituto de las Ciencias de la Vid y el Vino (CSIC, Gobierno de La Rioja, Universidad de La Rioja)
2. Universidad de La Rioja, Dpto. Agricultura y Alimentación
* Autor a quien debe dirigirse la correspondencia:
Susana Sanz
Departamento de Agricultura y Alimentación.
Universidad de La Rioja
C/Madre de Dios, 51
26006 Logroño (Spain)
Teléfono: 34 941 299729 Fax: 34 941299721
e-mail: susana.sanz@unirioja.es

based on different studies carried out by the signatory group during the past 5 years, which have been published or are under review in international scientific journals. It was showed the presence of all types of microorganisms of oenological interest in the air from the vineyard and in the winery. The most abundant microorganisms in the air were molds and yeasts. The air plays an important role in inoculation, with yeast and bacteria, during the alcoholic and malolactic fermentations, and may also be a route of dissemination of spoilage microorganisms in the winery. It was also determined that the presence of molds in the air of the wineries is directly related to their design.

Key words: *Winery, air, yeasts, molds, lactic bacteria*

1. INTRODUCCIÓN

La elaboración de vino es un proceso en el que tienen lugar una serie de transformaciones microbiológicas complejas. La evolución del mosto a vino se lleva a cabo a través de la fermentación alcohólica (FA), proceso realizado por levaduras. A esta primera transformación le sigue la llamada fermentación maloláctica (FML), producida por las bacterias lácticas. Ambos procesos microbiológicos tienen una contribución fundamental en la calidad final del producto. Pero asociados a la elaboración y conservación del vino también pueden estar presentes otros microorganismos (levaduras, bacterias y mohos) que provocan alteraciones en la calidad del vino e incluso riesgos para la salud del consumidor. El origen de estos microorganismos y la vía por la cual llegan hasta el mosto o el vino es una cuestión debatida desde hace tiempo, pero en la actualidad se admite que tienen dos posibles orígenes: la uva y el material de la bodega (Fleet y Heard, 1993; Mortimer y Polsinelli, 1999). La uva que entra en la bodega lleva adherida a la pruina, la capa cerosa que protege las bayas, una población microbiana importante compuesta por levaduras, bacterias y mohos. Pero también los materiales de la bodega (despalilladora, estrujadora, tuberías, depósitos…) aportan microorganismos, y así, a medida que el líquido va tomando contacto con los diferentes materiales de la bodega, las levaduras, bacterias y mohos que han permanecido sobre estas superficies, pueden pasar al medio y multiplicarse. La cantidad de microorganismos presentes en las superficies y equipos dependen en última instancia de los sistemas de limpieza empleados en cada bodega y también de la naturaleza de las superficies (Pretorius, 2000).

Las levaduras asociadas a la vinificación se pueden agrupar en dos categorías: *Saccharomyces* y No-*Saccharomyces*. En el primer grupo se incluyen levaduras pertenecientes al género *Saccharomyces* y son los principales agentes de la fermentación alcohólica (Beltrán et al., 2002). La carga microbiana de la uva que entra en la bodega está formada casi exclusivamente por levaduras No-*Saccharomyces,* por lo que la inoculación de los mostos con *Saccharomyces* se produce principalmente a través del material de la bodega. Rosini (1984) demostró que durante los meses siguientes a las vini-

ficaciones, las levaduras *Saccharomyces* que han llevado a cabo las fermentaciones, permanecen en la bodega y colonizan las superficies de la misma y la maquinaria. Pretorius (2000) indicaba que *Saccharomyces cerevisiae* es la especie mayoritaria entre las que colonizan las superficies de las bodegas.

Las bacterias lácticas están presentes durante todas las etapas de vinificación y, al igual que las levaduras, entran con la uva y permanecen en el equipamiento de las bodegas tras la FML (Fugelsang y Edwards, 2007). En las primeras etapas de la elaboración (mosto y FA) se encuentran en bajo número y pertenecen principalmente a los géneros *Lactobacillus* y *Pediococcus*. Sin embargo, a medida que avanza la vinificación se seleccionan sólo las cepas resistentes al alcohol, que pertenecen principalmente a la especie *Oenococcus oeni*, y que son los agentes de la FML.

Las primeras fermentaciones espontáneas, tanto alcohólicas como malolácticas, que tienen lugar en las bodegas cada campaña, suelen ser más largas que las que tienen lugar a continuación. La explicación podría estar en la baja tasa de prevalencia de los microorganismos implicados entre campañas sucesivas (Santamaría et al., 2008), y en la difícil adaptación de los mismos al medio líquido. Sin embargo, cuando la transformación se inicia y desarrolla en el primer depósito de la bodega, en el resto tiene lugar con gran rapidez. La razón estaría en el aumento del número de microorganismos que se produce en el primer depósito y en su diseminación por la bodega a través del utillaje, insectos, y ..... probablemente **el aire** (las levaduras y bacterias podrían ser proyectadas desde los depósitos a través del CO_2 que se desprende durante las fermentaciones alcohólica y maloláctica, y diseminarse por la bodega mediante esta vía).

Algunos microorganismos asociados a la vinificación también pueden producir alteraciones en el vino, o "enfermedades". Controlar la contaminación con estos microorganismos, su crecimiento y actividad, es esencial para obtener un producto de calidad. Es ampliamente conocido en el sector vitivinícola que las enfermedades microbianas se transmiten a través del material vinario convirtiéndose en auténticas epidemias infecciosas. A pesar de conocer esta vía de diseminación, algunas alteraciones siguen produciéndose de forma importante en todas las zonas vinícolas del mundo, lo que hace pensar en la existencia de otras vías de propagación todavía no confirmadas, entre las que se podría incluir el **aire**.

En la actualidad los microorganismos que más preocupan al sector enológico mundial durante la conservación de los vinos en bodega son las levaduras del género *Brettanomyces/Dekkera*, agente responsable de la presencia de fenoles volátiles en los vinos (Silva et al., 2004), las bacterias lácticas pertenecientes a los géneros *Pediococcus* y *Lactobacillus*, responsables de la formación de aminas biógenas y carbamato de etilo, y los mohos, principalmente de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*, responsables de la presencia de Ocratoxina A (Bellí et al., 2004) y del gusto a corcho en los vinos (Silva Pereira et al., 2000).

Brettanomyces es un microorganismo ubicuo que llega a la bodega a través de las uvas, el vino, depósitos y equipos e incluso por medio de los

insectos (Licker et al., 1999). Al contrario de otras levaduras encontradas en los vinos, *Brettanomyces* tiene un crecimiento muy lento, que le impide multiplicarse cuando hay otros microorganismos en el medio. Es por ello que esta levadura se desarrolla sobre los vinos principalmente durante la crianza en barrica, y suele alcanzar su máxima densidad de población 5 ó 7 meses después de la vinificación (Fugelsang y Zoecklein, 2003). El desarrollo de estas levaduras en el vino conduce a la aparición de olores fenólicos y animales que recuerdan al cuero, sudor o establo.

La enología moderna no sólo exige elaborar vinos de calidad, sino también vinos beneficiosos para la salud, libres de compuestos tóxicos para el organismo humano y por lo tanto libres de carbamato de etilo (Whiton y Zoecklein, 2002), de aminas biógenas, particularmente histamina (Lonvaud-Funel A., 2001) y de Ocratoxina A.

Hay numerosas referencias acerca de los efectos negativos que la histamina causa sobre personas sensibles, como dolor de cabeza, dificultades respiratorias, naúseas.... Por ello hay países que recomiendan límites máximos para la concentración de histamina entre 2 y 10 mg/l. El carbamato de etilo es un potente agente carcinógeno y la concentración máxima recomendada es de 15 mg/l por la FDA de EE.UU. Es necesario, por lo tanto, establecer soluciones para limitar su presencia. La fuente principal para la formación de estos compuestos es la materia nitrogenada del mosto, y los agentes causantes son las bacterias lácticas capaces de descarboxilar los aminoácidos precursores. La Ocratoxina A es una toxina fúngica presente en uvas y derivados, representa un riesgo importante para la salud humana (Patiño et al., 2007). Por otro lado, el gusto a corcho ha sido reconocido como un serio defecto en los vinos embotellados. El 2,4,6 tricloroanisol (TCA) se ha identificado como la principal causa de gusto a corcho en el vino, junto con otros compuestos clorados, que en pequeñas concentraciones producen olores desagradables. Su estructura y la ausencia de precursores, presuponen una vía microbiana en su generación (Suárez e Iñigo, 2004). Navascués (1998) encontró que en todos los vinos alterados con este defecto, el corcho estaba colonizado por mohos, siendo los más frecuentes *Penicillium* spp. La cantidad de compuestos organoclorados en los vinos está directamente relacionado con el grado de colonización del tapón de corcho por el micelio.

La fase más peligrosa del proceso de vinificación en la que una "infección" microbiana es más difícil de controlar por el enólogo, es la que se produce en el momento del embotellado. La contaminación en este punto implica que si el microorganismo alterante es capaz de multiplicarse en el vino embotellado, el problema para las bodegas es muy importante porque se presenta cuando ya el producto no está bajo el control del bodeguero.

La monitorización de las poblaciones microbianas en cada etapa de la vinificación, y en las distintas zonas de la bodega, es por tanto de gran importancia para la calidad final del vino. Esta tarea se lleva habitualmente a cabo mediante la combinación de técnicas microbiológicas clásicas y de biología molecular que se aplicaban sobre microorganismos aislados de la materia prima, el producto intermedio y el final (uva-mosto-vino), pero en ningún caso sobre el aire.

Es necesario subrayar que para el estudio de alguno de los microorganismos anteriores, la microbiología clásica presenta limitaciones. Este es el caso de *Brettanomyces,* para el que, por sus características especiales, no existe un medio de cultivo idóneo para su recuperación, aislamiento e identificación desde poblaciones mixtas. Algo similar ocurre con los mohos, en los que su identificación por criterios morfológicos y fisiológicos está influida por las condiciones ambientales y requiere conocimientos específicos en taxonomía fúngica. Las técnicas de biología molecular se han convertido en herramientas válidas para solventar los problemas de identificación de los microorganismos. Otra metodología utilizada para detectar la presencia de estos microorganismos indeseables en el vino es el análisis instrumental (Cromatografía de Gases/HPLC), que detecta la presencia de los metabolitos generados por ellos, confirmando la existencia del problema cuando éste ya ha tenido lugar y por ello carece de validez como método preventivo. Sin embargo, ni estos últimos métodos instrumentales, ni las técnicas de biología molecular son de fácil utilización en las bodegas como método preventivo de los diferentes problemas expuestos, aunque son fundamentales para la confirmación del problema, y también en investigación. Por el contrario, el empleo de medios de cultivo electivo-diferenciales junto con un muestreador automático del aire es una técnica de fácil empleo y manipulación, y si se confirma su capacidad para detectar los microorganismos de interés, sería de gran utilidad para el sector.

En la literatura consultada no se ha encontrado la aplicación de esta tecnología a las bodegas, aunque está extendida en otras industrias alimentarias (Salustiano et al., 2003) y hospitales (Landrin et al., 2005). Solamente Beech (1993) en sidras encontró relación entre la exposición al aire y la contaminación con levaduras *Brettanomyces*, y Connell et al. (2002), encontraron levaduras *Brettanomyces* en muestras de aire procedentes de distintas zonas de una bodega comercial. Sin embargo, el análisis de la calidad microbiológica del aire de las bodegas no se ha utilizado ni sistematizado con anterioridad.

En el trabajo desarrollado por nuestro equipo de investigación, se ha estudiado la carga microbiana del aire de la viña y de diferentes zonas de la bodega. Así mismo, se ha correlacionado su composición con la actividad microbiológica que tiene lugar en las distintas instalaciones de la bodega (depósitos, barricas, botellas, embotelladora) a lo largo del año.

Estos estudios se vienen realizando desde el año 2007 hasta la actualidad y han contado con la financiación del Gobierno de La Rioja a través del Proyecto de Investigación Fomenta 2007/04.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

El muestreo del aire se llevó a cabo utilizando un aerobiocolector ambiental airIDEAL de Biomerieux, capaz de muestrear un volumen concreto de aire (en nuestro estudio desde 100 a 3000 litros, según el tipo de microorganismo que se estuviera estudiando). El flujo de aire aspirado por una turbina, y que previamente ha pasado un filtro para eliminar partículas, provoca el impacto

de los microorganismos que contiene sobre una placa de petri con el medio de cultivo adecuado, y posibilita la enumeración de UFC (unidades formadoras de colonias) tras la incubación del medio.

Los medios de cultivo utilizados fueron: Cloramphenicol Glucose Agar (Biokar Diagnostics, France) para levaduras, Agar Czapek (Scharlau Microbiology, Barcelona, Spain) para mohos y MRS-Agar modificado (Scharlau Microbiology, Barcelona, Spain) para bacterias lácticas. Para la detección de levaduras *Brettanomyces/Dekkera* se utilizó el medio específico para este género DBDM (Rodrígues et al. 2001).

Tras la incubación de las placas, en las condiciones adecuadas para cada microorganismo, se procedió al recuento de UFC y el aislamiento de colonias para su identificación.

La identificación de las levaduras se realizó utilizando PCR-RFLP de la región 5.8S-ITS del DNA ribosomal (Esteve-Zarzoso et al. 1999). La identificación de las levaduras aisladas se realizó por comparación con el perfil de restricción de cada levadura obtenido en nuestro laboratorio (Ocón 2005) y con los perfiles descritos en la bibliografía (Granchi et al. 1999; Guillamón et al. 1998). La identificación de los aislados de *Brettanomyces bruxellensis* fue confirmada por nested PCR (Ibeas et al., 1996).

Los aislados del género *Saccharomyces* fueron identificados mediante análisis de restricción del DNAmitocondrial (mtDNA). El Polimorfismo en la Longitud de los Fragmentos de Restricción (RFLP) del DNA mitocondrial sirvió para distinguir entre cepas de *Saccharomyces cerevisiae* (Pulvirenti y Giudici 2003).

Las bacterias aisladas fueron sometidas a tinción Gram y a estudio morfológico. Posteriormente, las colonias fueron analizadas por PCR para determinar su pertenencia la grupo de bacterias lácticas (Van de Klundert y Vliegenthart, 1993). Los productos de esas PCR fueron purificados y secuenciados por Macrogen Inc. facilities (Seoul, South Korea) para determinar las especies a las que pertenece cada aislado. Por su parte, las especies de *Oenococcus oeni* fueron confirmadas por el método de PCR específico descrito por Zapparoli et al. (1998) basado en la amplificación de un fragmento del gen de la enzima maloláctica específica de esta especie. Finalmente, la clasificación de los clones de *Oenococcus oeni* fue realizada via Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) usando la enzima de restricción S*fi*I y el sistema CHEF-DR II (BioRad), según método descrito por Birren y Lai (1993) modificado (López et al., 2007).

Las colonias aisladas de agar Czapek fueron transferidas y desarrolladas en placas del mismo medio hasta su identificación. Para ello se utilizaron criterios morfológicos basados tanto en su micelio vegetativo como en sus estructuras formadoras de esporas (Samson et al., 1995). La identificación taxonómica de los aislados se realizó, pues, mediante la observación macroscópica y microscópica siguiendo los criterios establecidos en las guías publicadas para cada género.

3. RESULTADOS

A continuación se resumen los principales resultados obtenidos por nuestro grupo en esta línea de investigación, estructurados en los trabajos que han sido publicados o están en vías de publicación.

3.1. Microorganismos de interés enológico en el aire de la viña

En este trabajo se estudió la presencia y evolución de levaduras y bacterias lácticas en el aire de una viña, durante el período de maduración de la uva, con objeto de analizar el papel del aire en la diseminación en la viña de estos microorganismos de interés enológico.

Para ello se tomaron muestras de uva de la variedad Tempranillo procedentes de un viñedo acogido a la D. O. Ca. Rioja, durante las 4 semanas anteriores a la vendimia. En el momento de la toma de muestras de uva, se realizó igualmente el muestreo del aire de la viña. Este procedimiento se repitió en dos años sucesivos.

El número de bacterias presentes en los racimos y en el aire de la viña fue muy reducido, pero todas ellas pertenecían al grupo de bacterias lácticas de interés enológico. En el caso de las levaduras, los resultados obtenidos indicaron que su presencia en el aire es mucho menor que la detectada en los racimos. La mayoría de las levaduras No-*Saccharomyces* encontradas en el aire de la viña son las mismas que las que se identificaron en los racimos durante el periodo de maduración de la uva, lo que sugeriría un posible intercambio de microorganismos entre ambos medios.

Este fue el primer estudio que analizó la composición microbiológica del aire de una viña y el papel que este medio desempeña en la diseminación, inoculación, y contaminación de las uvas con los microorganismos que participan en la fermentación. Si bien previamente, en la tesis doctoral de Pilar Santamaría (2009), ya se sugirió al viento como posible vehículo transmisor, entre viñedos próximos, de las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* que llegaban a las uvas y que posteriormente iniciaban las fermentaciones. Sin embargo, en el presente trabajo no se pudieron aislar levaduras de esta especie en el aire del viñedo.

Los resultados obtenidos en este estudio fueron publicados en la revista *European Food Research Technology* (Garijo et al., 2011)

3.2. Microorganismos de interés enológico presentes en el aire de la bodega durante el período de vinificación

Inicialmente se estudió la presencia y evolución de microorganismos de interés enológico (levaduras, bacterias lácticas y mohos) en el aire de una bodega acogida a la D. O. Ca. Rioja durante el período de vinificación (Septiembre-Diciembre).

Los resultados obtenidos indicaron que la presencia en el aire de la bodega de los distintos grupos de microorganismos estudiados, está directamente relacionada con el proceso de vinificación que tiene lugar en la misma. Así, el número de mohos presentes en el aire disminuyó una vez finalizada la entrada de uvas en las instalaciones, el número máximo de levaduras en el aire se encontró cuando todos los depósitos de vinificación estaban fermentando, y las bacterias lácticas no fueron detectadas hasta que comenzó la primera fermentación maloláctica. Las especies de levaduras identificadas también estuvieron relacionadas con los procesos de vinificación. La coincidencia de las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* presentes en los depósitos de vinificación durante la fermentación alcohólica con las aisladas del aire, confirman el papel de este último como vehículo transmisor de microorganismos durante la fermentación alcohólica.

Los resultados obtenidos en este trabajo fueron publicados en la revista *International Journal of Food Microbiology* (Garijo et al., 2008)

3.3. Levaduras presentes en el aire de diferentes zonas de la bodega a lo largo del año

A la vista de estos resultados, se consideró conveniente ampliar el estudio de la composición microbiológica del aire en una bodega, analizando, además de la etapa de vinificación, las fases de crianza y envejecimiento de vinos. Para ello se realizó el análisis microbiológico del aire durante todo el año y en zonas diferentes de la bodega en las que se llevaban a cabo distintas actividades.

Así, mensualmente a lo largo de un año (Febrero 2008-Enero 2009) se estudiaron las levaduras presentes en el aire de cuatro zonas diferentes de una bodega (elaboración, barricas, botellero y embotellado). Se identificaron 382 levaduras que fueron aisladas en dos medios de cultivo diferentes, un medio genérico para levaduras y otro medio selectivo para *Brettanomyces/Dekkera*. El mayor número de levaduras en el aire se encontró puntualmente en la zona de vinificación durante la época de vendimia. Sin embargo, la zona de embotellado fue la que presentó mayores recuentos de forma continua a lo largo del año.

Las levaduras de la especie *Saccharomyces cerevisiae* sólo se detectaron en el aire de la zona de elaboración durante las vinificaciones. La mayoría de las levaduras aisladas pertenecían al grupo No-*Saccharomyces*, siendo los géneros *Sporidiobolus* y *Cryptococcus* los predominantes en el aire, que además aparecieron de forma continua en todas las zonas estudiadas. Algunos géneros estuvieron más presentes en determinadas zonas: *Debaryomyces* en barricas, *Candida* y *Sporidiobolus* en el botellero. Los géneros *Williopsis, Torulaspora* y *Bullera* se aislaron exclusivamente en el aire de la zona de embotellado. La mayor diversidad se detectó dentro del género *Cryptococcus,* con 11 especies distintas identificadas. La levadura alterante *Brettanomyces/Dekkera* no se detectó en ninguno de los muestreos realizados.

Estos resultados han sido publicados en la revista *Food Control* (Ocón et al., 2013a).

Con el objeto de confirmar la significación de estos resultados, se repitió este estudio en tres bodegas con antigüedad y diseño diferentes. Así, se estudió la flora levaduriforme presente en el aire de cuatro zonas diferentes de tres bodegas a lo largo de un año (invierno, primavera, verano e invierno). El objetivo planteado fue caracterizar las levaduras presentes en estos ecosistemas y compararlos con los datos obtenidos en el anterior estudio, para evaluar la importancia del aire como vehículo de transmisión de levaduras alterantes.

Las áreas de muestreo fueron: zona de elaboración, embotelladora, botellero y envejecimiento en barrica. Se identificaron un total de 367 levaduras procedentes de dos medios de cultivo: 258 fueron aisladas desde un medio de cultivo genérico para levaduras y 109 aisladas de un medio selectivo para las levaduras alterantes pertenecientes al género *Brettanomyces /Dekkera*.

Los niveles de levaduras detectadas en el aire fueron reducidos, y los recuentos encontrados tuvieron variaciones ligadas a la actividad enológica desarrollada en cada zona de la bodega: durante las vinificaciones aumentó la presencia de levaduras en el aire de la nave de elaboración, y al embotellar aumenta la población en el área de embotellado. Tal y como ocurría en el trabajo anterior, la mayoría de las levaduras aisladas pertenecían al grupo de las No-*Saccharomyces: Aureobasidium* y *Cryptococcus* fueron los géneros dominantes en el aire y se encontraron de forma continuada en todas las zonas analizadas de las tres bodegas objeto de estudio. De nuevo, las levaduras de la especie *Saccharomyces cerevisiae* solo se detectaron en el aire de la zona de elaboración durante el período de vinificación. No se encontraron grandes diferencias entre las distintas bodegas estudiadas, ni en cuanto al número de levaduras presentes en el aire ni en los principales géneros identificados.

Al igual que ocurría en el trabajo anterior, en las tres bodegas analizadas, el número medio de levaduras en aire más elevado se encontró en la embotelladora, lo que la convierte en la zona de la bodega que necesita mayor vigilancia. Sin embargo, el tipo de levaduras detectadas en ambos trabajos no pertenecían a especies alterantes, por lo que su presencia en el aire no supone *a priori* un peligro de contaminación del vino que se está embotellando. En una de las bodegas estudiadas, se detectó la presencia de levaduras alterantes *Brettanomyces/Dekkera* en el aire de la zona de barricas, coincidiendo con el momento en que se trasegaba un vino que contenía estas levaduras. Este hecho confirma que en las bodegas, el aire actúa como vía de diseminación de levaduras cuando se manipula el vino que las contiene y sugiere que la manipulación de vinos infectados se debe hacer con precaución para evitar su diseminación por la bodega.

Este trabajo permitió establecer una primera descripción de los niveles de levaduras, de los géneros y especies habitualmente presentes en el aire de las bodegas, y de los riesgos que pueden suponer en la estabilidad y alteración de los vinos. Estos datos deberían ser confirmados con trabajos realizados en otras zonas vitivinícolas.

Todos estos resultados han dado lugar a un trabajo que se encuentra publicado en la revista *Food Control* (Ocón et al., 2013b).

3.4. Bacterias lácticas presentes en el aire de bodega

También las bacterias lácticas del aire fueron objeto de estudio y así se analizó su presencia y evolución en el aire de una bodega. El muestreo se realizó durante el período comprendido entre Septiembre del 2007 y Julio del 2008 en la nave de elaboración. Los resultados obtenidos indicaron que la presencia de bacterias lácticas en la atmósfera podía ser detectada en tres momentos distintos del proceso de vinificación, inicialmente cuando las uvas entraban en la bodega, posteriormente mientras ocurría la fermentación maloláctica y finalmente cuando se manipulaba el líquido que contenía bacterias. Las especies y clones de bacterias lácticas identificadas, que fueron aisladas del aire, coincidieron con las presentes en los depósitos de vinificación en todas las etapas de la elaboración del vino.

Estos datos vuelven a incidir en la importancia del aire en la diseminación de microorganismos durante las fermentaciones (en este caso, la fermentación maloláctica), así como en la importancia de la manipulación de vinos cargados de microorganismos.

Este trabajo y las conclusiones que de él se derivan fueron publicadas en la revista *International Journal of Food Microbiology* (Garijo et al., 2009)

3.5. Mohos presentes en el aire de bodega

Además de los microorganismos de interés enológico directamente relacionados con la elaboración del vino, como son las levaduras y las bacterias lácticas, también se estudió la presencia de mohos en el aire de las bodegas. Al analizar este tipo de microorganismos en el aire, también se consideraron factores de influencia como la época del año, el punto de muestreo y el tipo de actividad llevado a cabo en la bodega.

Los resultados obtenidos indicaron que ni el tipo de actividad ni las variaciones de temperatura y humedad relativa son factores que determinen la presencia de mohos en el aire. Para este grupo de microorganismos es el diseño de la bodega el factor fundamental que condiciona su distribución. Áreas con escasa ventilación favorecen elevados niveles de humedad relativa y mayores recuentos de mohos en el aire. La población de mohos en estas zonas no fue muy diversa, lo que indica que la colonización por cierto tipo de mohos, que se han adaptado a las condiciones establecidas, es permanente. Áreas con mayor ventilación, constante actividad y limpiezas frecuentes muestran menores niveles de mohos en el aire, pero estos muestran una composición más variada.

Este trabajo, realizado en una única bodega, fue publicado en la revista científica *Journal of Food Science* (Ocón et al., 2011) y en la revista divulgativa del sector *Enoviticultura* (Ocón et al., 2010).

A la vista de los resultados y viendo que el diseño de la bodega resultaba ser el factor determinante en la presencia de mohos en el aire, se estimó conveniente ampliar el estudio a tres bodegas de diferente diseño, producción y antigüedad.

Los resultados obtenidos confirmaron que el diseño de la bodega es el factor que condiciona los niveles de humedad relativa y temperatura, que a su vez son los que determinan los recuentos totales de mohos en el aire. Sin embargo, el diseño no influyó en la distribución de los principales tipos de mohos (*Penicillum* y *Cladosporium*) encontrados en las distintas zonas estudiadas.

La actividad llevada a cabo en cada una de las zonas de la bodega, principalmente cuando tiene lugar la entrada de uva durante la vendimia y cuando se manipulan materiales auxiliares, afectó al número total de mohos en el aire. Señalar que la zona de embotellado registró puntualmente altos valores de humedad relativa y recuentos importantes de mohos en aire. También pudo establecerse una relación entre la actividad de la bodega y el índice de diversidad. Además, se encontró que las bodegas de mayor antigüedad tenían mayores índices de diversidad que aquellas de construcción más reciente.

Estos resultados han dado lugar a un trabajo sometido actualmente a revisión para su publicación (Ocón et al., 2013c).

4. CONCLUSIONES

Recientemente algunas empresas han sugerido la conveniencia de introducir, en el sector enológico, sistemas para purificar el aire de algunas zonas de las bodegas con el fin de prevenir las posibles contaminaciones microbianas y los efectos negativos que éstas producen. Para justificar el empleo de estos sistemas es necesario conocer la carga microbiana del aire de las bodegas y su evolución, a lo largo de distintas épocas del año y en diferentes zonas. Los únicos trabajos sobre el tema son los realizados por Mandl et al. (2008), en el que analizaron el contenido de mohos en el aire de distintas bodegas austriacas y los llevados a cabo por nuestro grupo, comentados anteriormente, y cuyas conclusiones se exponen a continuación:

1.- El aire puede ser un agente diseminador de microorganismos en el viñedo, puesto que hubo un alto grado de coincidencia entre las levaduras No-*Saccharomyces* detectadas en el aire y en las uvas. Sin embargo, no se ha podido demostrar su papel diseminador de los microorganismos de interés enológico (*Saccharomyces cerevisiae* y *Oenococcus oeni*) al no detectarlos en el aire en ninguno de los muestreos efectuados. Los bajos recuentos con los que estos microorganismos aparecen sobre las uvas (datos que han sido confirmados en muchos trabajos previos) podría explicar esta ausencia en el aire del viñedo.

2.- La presencia de microorganismos enológicos en el aire de las bodegas está relacionado con el tipo de actividad y las características de cada zona. Así, el aire de la zona de elaboración es el que mayor número de microorganismos presenta tanto en cantidad como en diversidad, pero sólo durante el período de vendimias, a diferencia de la embotelladora que tiene el nivel medio más elevado de microorganismos en el aire a lo largo de todo el año. Por su parte, el nivel de microorganismos en el aire de las naves de barricas y botellero son muy reducidos durante todo el tiempo. La mayor

parte de los microorganismos encontrados son mohos y levaduras, observándose niveles muy bajos de bacterias lácticas.

3.- En la zona de vinificación, durante la época de vendimia, se observa que con la manipulación de la uva en la recepción, las levaduras, bacterias lácticas y mohos adheridas a ella pasan al aire en gran cantidad, pudiendo diseminarse por esta vía a través de la bodega. Posteriormente, durante las fermentaciones alcohólica y maloláctica, *Saccharomyces cerevisiae* y *Oenococcus oeni* son detectadas en gran cantidad en el aire, lo que demuestra que éste es un agente diseminador de estos microorganismos durante las fermentaciones. Finalmente la manipulación de vinos que contienen gran cantidad de microorganismos es una fuente de expulsión de los mismos al ambiente y una posible diseminación por la bodega.

4.- La manipulación del vino cargado de microorganismos y su diseminación por la bodega puede ser positivo o negativo, en función de la naturaleza de los microorganismos dispersados. Sería positivo en el caso de *Saccharomyces cerevisiae* y *Oenococcus oeni* porque sembraría los depósitos adyacentes facilitando en ellos el inicio de las fermentaciones. Sin embargo, también podría ser una vía de diseminación de microorganismos alterantes, aspecto que se ha confirmado para la levadura *Brettanomyces*. Por lo tanto, la manipulación de los vinos debe hacerse con precaución.

5.- Los elevados niveles de microorganismos (levaduras y mohos) encontrados en el aire de la zona de embotellado, implica un riesgo de contaminación en la etapa final de elaboración del vino sobre el que resulta difícil actuar con posterioridad. Es esta zona en la que podría estar justificada una inversión en sistemas de purificación de aire. Sin embargo, la naturaleza escasamente alterante de los géneros detectados en nuestros trabajos, minimizaría el riesgo.

6.- La presencia de los mohos en el aire de las bodegas está relacionada fundamentalmente con su diseño, el cual a su vez condiciona los valores de humedad relativa, temperatura y grado de ventilación. La composición de la población de mohos presentes en el aire de una bodega se mantiene prácticamente constante, con variaciones mínimas según actividad de cada zona de la bodega y la antigüedad de la misma.

Se confirma, por tanto, el papel del aire como vía de diseminación de microorganismos en el entorno de una bodega.

BIBLIOGRAFÍA

BEECH, F.W. (1993). Yeasts in cider-making. En: *The Yeasts*. 2nd edn., Vol. 5, "Yeast technology", Rose and Harrison Eds,. Academic press, London. pp169-213.

BELLÍ, N., MARÍN, S., DUAIGÜES, A., RAMOS, A.J., SANCHÍS, V. (2004). Ochratoxin A in wines, musts and grape juices from Spain. *J. Sci. Food Agric.,* 84, 591-594.

BELTRÁN, G., TORIJA, M.J., NOVO, M., FERRER, N., POBLET, M., GUILLAMÓN, J.M. (2002). Analysis of yeast populations during alcoholic fermentation: a six year follow-up study. *System. Appl. Microbiol.*, 25, 287-293.

BIRREN, B., LAI, E. (1993). Preparation of DNA for pulsed field analysis. In: *pulsed gel electrophoresis*. Hartcourt Brace Jovanich Ed,. A practical guide. Academic Press, San Diego, pp 25-74.

CONNELL, L., STENDER, H., EDWARDS, C.G., (2002). Rapid detection of *Brettanomyces* from winery air samples based on peptide nucleic acid analysis. *Am. J. Enol. Vitic*., 53, 322-324.

ESTEVE-ZARZOSO, B., BELLOCH, C., URUBURU, F. AND QUEROL, A. (1999). Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *Int. J. Syst. Bacteriol.,* 49, 329-337

FLEET, G.H., HEARD, G.M. (1993). Yeast: growth during fermentation. En: *Wine microbiology and biotechnology*. Ed. Fleet, G.H. Harwood Academic Publishers, Switzerland. pp 27-54.

FUGELSANG K.C., ZOECKLEIN, C.G. (2003). Population dynamics and effects of *Brettanomyces bruxellensis* strains on Pinot noir (*Vitis vinifera* L.) wines. *Am. J. Enol. Vitic*., 54, 294-300.

FUGELSANG, K.C., EDWARDS, C.G. (2007). *Wine Microbiology. Practical applications and procedures*. Springer Science+Business Media, LLC, New York.

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 a Spanish winery during vintage. *Int. J. Food Microbiol*., 125, 141-145.

GARIJO P., SANTAMARÍA P., LÓPEZ R., SANZ S., OLARTE C., GUTIÉRREZ A.R. (2009). Presence of lactic acid bacteria in the air of a winery along one vintage. *Int. J. Food Microbiol.*, 136, 142-146.

GARIJO P., LÓPEZ R., SANTAMARÍA P., OCÓN E., OLARTE C., SANZ S., GUTIÉRREZ A.R. (2011).Presence of enological micro-organisms in the air of a vineyard during the ripening period. *European Food Research Technology,* 233, 359-365

GRANCHI, L., AUGRUSO, S., GANUCCI, D., VICENZINI, M. (2007). Biodiversité genomique de *Saccharomyces cerevisiae* pendant la fermentation spontanée du vin conditionnée par le progression de la vendage dans la cave. Proceedings XXXth OIV World Congress, Budapest.

GUILLAMÓN, J.M., SABATÉ, J., BARRIO, E., CANO, J., QUEROL, A. (1998). Rapid identification of wine yeast species based on RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region. *Archives of Microbiology*, 169, 387-392.

IBEAS, JI., LOZANO, I., PERDIGONES, F., JIMÉNEZ, J. (1996). Detection of *Dekkera-Brettanomyces* strains in sherry by a nested PCR method. *Applied Environmental Microbiology,* 62 (3) 998–1003.

LANDRIN, A., BISSERY, A., KAC, G. (2005). Monitoring air sampling in aperating theatres: can particle counting replace microbiological sampling?. *J. Hospital infection*, 61, 27-29.

LICKER, J.L., ACREE, T.E., HENICK-KLING, T. (1999). What is "Brett" (*Brettanomyces*) flavor? A preliminary investigation. En: *Chemistry of wine flavor*. Waterhouse and Ebeler Eds., Am. Chem. Soc., Washington, DC. pp 96-115.

LONVAUD-FUNEL A. (2001). MiniReview. Biogenic amines in wines: role of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 199, 9-13.

LÓPEZ, I., TENORIO, C., ZARAZAGA, M., DIZY, M., TORRES, C., RUIZ-LARREA, F. (2007). Evidence of mixed wild populations of *Oenococcus oeni* strains during wine spontaneous malolactic fermentations. *European Food Research and Technology*, 226, 215-223.

MANDL, K., CLEMENZ, A., STERFLINER, K., KNEIFEL, W., SCHATTAUER, D. (2008). Characterisation of the aeromycololgical flora of selected wine cellars in Austria. 31 Congresso Mondiale della Vigna e del Vino, Verona, Italia

MORTIMER, R., POLSINELLI, M. (1999). On the origin of wine yeast. *Res. Microbiol.*, 150, 199-204.

NAVASCUÉS, E. (1998). *Origen y presencia en vinos de compuestos organoclorados relacionados con el metabolismo microbiano.* Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid.

OCÓN, E. (2005). Estudio de las levaduras No-*Saccharomyces* que participan en la elaboración de vinos de la D.O.Ca. Rioja. Trabajo de Investigación, Programa de Doctorado en Ciencias Agrarias y Alimentarias. Universidad de La Rioja.

OCÓN, E., GUTIÉRREZ, A.R., GARIJO, P., SANTAMARÍA, P., LÓPEZ, R., OLARTE, C., SANZ, S. (2010). El diseño de la bodega: un factor determinante en la presencia de mohos en el aire. *Enoviticultura,* 6, 18-23.

OCÓN, E., GUTIÉRREZ, A.R., GARIJO, P., SANTAMARÍA, P., LÓPEZ R., OLARTE, C., SANZ, S. (2011). Factors of influence in the distribution of mold in the air in a wine cellar. *Journal of Food Science,* 76 (3) 169-174

OCÓN, E., GUTIÉRREZ, A.R., SANZ, S., OLARTE, C., GARIJO, P.,LÓPEZ , R., SANTAMARÍA, P. (2013a). Analysis of airborne yeast flora in one winery and their possible influence in the quality of wine. *Food Control*, 30, 585-589.

OCÓN, E., GARIJO,P., SANZ, S., OLARTE, C., LÓPEZ, R.. SANTAMARÍA, P., GUTIÉRREZ,A.R. (2013b). Airborne yeast contamination of wine from the air present in the winery. *Food Control*, 34, 261-267.

OCÓN, E., GUTIÉRREZ, A.R., GARIJO, P., SANTAMARÍA, P., LÓPEZ , R., OLARTE, C., SANZ, S., (2013c). Influence of age and design in the distribution of molds in the air in three wine cellars. *Journal of Food Science* (sometido).

PATIÑO, B., VAZQUEZ, C., GONZÁLEZ-SALGADO, A., GIL, J., GONZÁLEZ-JAEN, M.T. (2007). PCR: una herramienta estratégica para la prevención de OTA en vinos. International Symposium Microbiology and Food safety of Wine « Microsafety wine », Villafranca del Penedés, España.

PRETORIUS, I.S. (2000). Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast,* 16, 675-729.

PULVIRENTI, A., GIUDICI, P. (2003). Identification of yeasts by molecular techniques. *Bulletin de l O.I.V.,* 869-870, 635-649.

RODRÍGUES, N., GONÇALVES, G., PEREIRA-DA-SILVA, S., MALFEITO-FERREIRA, M., LOUREIRO, V. (2001). Development and use of a differential medium to detect yeast of the genera *Dekkera/Brettanomyces. J. Appl. Microbiol.*, 90, 588-599.

ROSINI, G. (1984). Assessment of dominance of added yeast in wine fermentation and origin of *Saccharomyces cerevisiae* in wine-making. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 30, 249-256.

SALUSTIANO, V.C., ANDRADE, N.J., CARDOSO, S.C., CORDEIRO, R.M., KITAKAWA, S.A. (2003). Microbiological air quality of processing areas in a dairy plant as evaluated by sedimentation technique and a one-stage air sampler. *Brazilian J. Microbiol.*, 34, 255-259.

SAMSON, R.A., HOEKSTRA, E.S., FRISVAD J.C., FILTENBORG, O. (1995). *Introduction to food-borne fungi.* CBS, Baarn, Netherlands.

SANTAMARÍA, P. (2009). *Ecología de la fermentación alcohólica en la D. O. Ca. Rioja. Selección de levaduras para la elaboración de vinos tintos.* Tesis doctoral. Universidad de La Rioja. Logroño.

SANTAMARÍA, P., LÓPEZ, R., LÓPEZ, E., GARIJO, P., GUTIÉRREZ, A.R. (2008). Permanence of yeast inocula in winery ecosystem and presence in spontaneous fermentations. *Eur. Food Res. Tech*., 227, 1563-1567.

SILVA, P., CARDOSO, H., GERÓS, H. (2004). Wine spoilage capacity of *Brettanomyces/Dekkera* spp. Am. J. Enol. Vitic., 55 (1) 65-71.

SILVA PEREIRA, C., FIGUEIREDO MARQUES, J.J., SAN ROMAO, M.V. (2000). Cork taint in wine: Scientific knowledge and public perception- a critical Review. *Crit. Rev. Microbiol*., 26 (3) 147-162.

SUÁREZ LEPE, J.A., IÑIGO LEAL, B. (2004). *Microbiología enológica. Fundamentos de Vinificación.* Ed. Mundi-Prensa, Valencia

VAN DE KLUNDERT, J.A.M., VLIEGENTHART, J.S. (1993). PCR detection of genes coding for aminoglycoside-modifying enzymes. En: D*iagnostic Molecular Microbiology. Principles and Applications.* American Society For Microbiology, Washington D.C. p. 548.

WHITON, R.S., ZOECKLEIN, B.W. (2002). Determination of ethyl carbamate in whine by solid-phase microextraction and Gas Chomatography/Mass Spectrometry. *Am J. Enol. Vitic.*, 53 (1) 60-63.

ZAPPAROLI, G., TORRIANI, S., PESENTE, P., DELLAGLIO, F. (1998). Design and evaluation of malolactic enzyme gene targeted primers for rapid identification and detection of Oenococcus oeni in wine. L*etters in Applied Microbiology*, 27, 243-246.

ZUBÍA

25

Gobierno de La Rioja
www.larioja.org

Instituto
de Estudios
Riojanos