

DETECCIÓN DE *DEKKERA* /*BRETTANOMYCES* EN VINOS TINTOS

Suárez-Lepe, J. A.⁽¹⁾; Benito, S.⁽¹⁾; Palomero, F.⁽¹⁾; Morata, A.⁽¹⁾; Calderón, F.⁽¹⁾; Estrella, I.⁽²⁾

(1) Dpto. Tecnología de Alimentos. E. T. S. Ingenieros Agrónomos. Universidad Politécnica de Madrid. Madrid. 28040. España.

(2) IFI. CSIC

E-mail: antonio.morata@upm.es. Tlf. 00 34 913365745

XXXIth World Congress of Vine and Wine. OIV 2008. Verona. Italy.

Resumen

Existen en la actualidad diversos métodos empleados para la detección de *Dekkera/Brettanomyces* con numerosas ventajas pero no exentos de inconvenientes tales como umbrales de detección, diferenciación entre células viables y muertas, carácter no preventivo, falsos positivos, tiempos de espera, evaluación insegura (por olfato humano o visual) y contaminaciones por hongos oportunistas.

Con objeto de aportar soluciones a esta problemática se han combinado un medio selectivo-diferencial líquido y técnica HPLC/DAD con objeto de evaluar la “**Actividad potencial hidroxycinamato descarboxilasa y vinilfenol reductasa existente en un vino**”, mejorando algunos de los aspectos anteriores como la cuantificación de poblaciones pequeñas (1 ufc/50ml), trabajo con volúmenes grandes, y detección únicamente de células viables (verdaderas responsables de la formación de etilfenoles).

Palabras clave: etilfenoles, *Brettanomyces*, vinos tintos.

Abstract

Nowadays there are several methods used in order to detect *Dekkera/Brettanomyces* that present some advantages, but also some inconvenients such us: detection thresholds, distinguishing between alive and dead cells, no preventive nature, false positives, waiting times, insecure evaluation (human nose) and fungi contaminations.

In order to solve the above mentioned inconvenience, we have used a liquid differential-selective medium and the HPLC/DAD in order to evaluate” Potential hydroxycinnamate decarboxylase and vinylphenol reductase activity in wine”, which improves some of the previous aspects such us small populations detection (up to 1cfu/50ml), allows to detect small populations in big volumes and detects only alive cells that are the ones able to produce ethylphenols.

Palabras clave: ethylphenols, *Brettanomyces*, red wine.

Introducción

La mayoría de los trabajos realizados para la detección de esta problemática anomalía sensorial se han abordado desde puntos de vista estrictamente microbiológicos (presencia de levaduras *Dekkera/Brettanomyces*) o químicos (análisis de etilfenoles) y no desde una perspectiva puramente enológica.

La detección mediante microscopía clásica basada en la morfología particular atribuida a este género (Fig.1) como células ojivales de pequeño tamaño o estructuras ramificadas en cultivos viejos, sólo resulta útil si dicha morfología resulta evidente y la población es muy elevada.

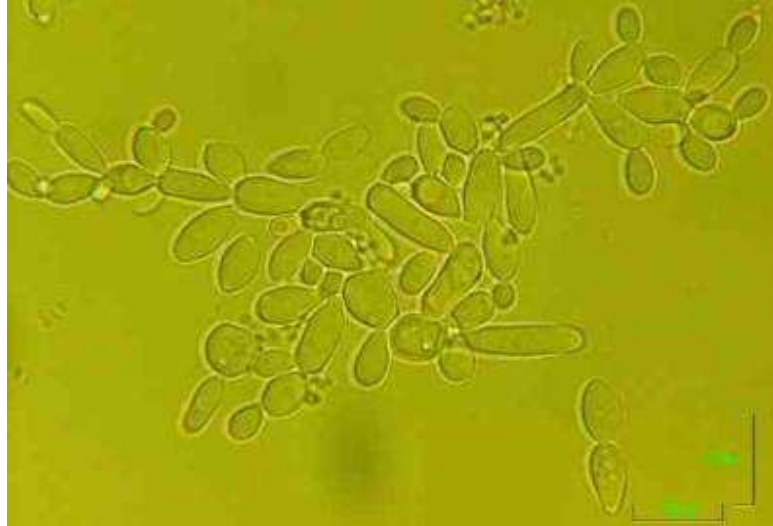


Fig.1. Ejemplo de observación microscópica de *Dekkera Bruxellensis* D37.

Existen varios métodos modernos basados en técnicas de biología molecular (Navascués & Rasines, 2003; Cocolin et al, 2004) que pueden aplicarse a la identificación de estas levaduras; entre los más importantes se deben considerar: análisis de secuencias parciales de ADN ribosómico 26S (Kurtzman & Robnett, 1998); Ampliación aleatoria de ADN polimórfico (RAPD)-PCR (Mitrakul, Henick-Kling & Egli, 1999); PCR utilizando sondas de secuencias específicas (Egli et al., 2001); hibridación con sondas de ADN específicas y detección por microscopía de fluorescencia (Stender et al., 2001). Sin embargo, muchas veces estos métodos no permiten cuantificar poblaciones pequeñas de sólo algunas células por litro que pasan desapercibidas y luego proliferan en la bodega produciendo etilfenoles. Tampoco pueden diferenciar entre células viables y muertas (Suárez & Iñigo, 2004; Suárez et al., 2007) (Fig.2), pudiendo inducir a confusión en vinos ya estabilizados .

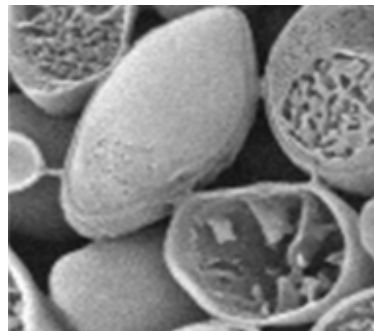


Fig. 2. Presencia de células deterioradas posibles portadoras de ADN en un vino estabilizado.

Algunas técnicas de análisis instrumental para la detección de etilfenoles como la cromatografía de gases asociada a espectrometría de masas (GC/MS) también se ha aplicado para detectar contaminación por *Dekkera/Brettanomyces*. La detección de etilfenoles se ha realizado por cromatografía gaseosa de extractos obtenidos por extracción líquido-líquido con disolventes orgánicos (Chatonnet & Boidron, 1988), microextracción en fase sólida por espacio cabeza (HSPME) (Monje, Privat, Gastine & Nepveu, 2002; Martorell, Martí, Mestres, Busto & Guasch, 2002) y extracción por absorción con twister (SBSE) (Díez et al., 2004; Marín et al., 2005). La problemática de estos análisis reside en el precio del equipo requerido y en que la detección del problema se produce una vez que este ya se ha desarrollado, lo que compromete la aplicación de medidas correctoras en el vino dentro de un periodo de tiempo prudencial.

Otra opción es la utilización de medios selectivo-diferenciales sólidos en placa Petri (Rodrigues et al., 2001), empleados para el recuento de levaduras y evaluación de la contaminación por *Dekkera/Brettanomyces*; es una técnica asequible para ser utilizada en bodega, pero no exenta de inconvenientes como los posibles falsos positivos (Benito et al., 2006), tiempos de espera y contaminaciones por hongos oportunistas (Fig. 3), mientras que los resultados positivos en medios líquidos (Couto et al., 2005) han de ser determinados generalmente mediante el olfato humano, lo cual da origen a subjetividad, discrepancias entre diferentes evaluadores y falta de rigor a la hora de homologar un resultado.

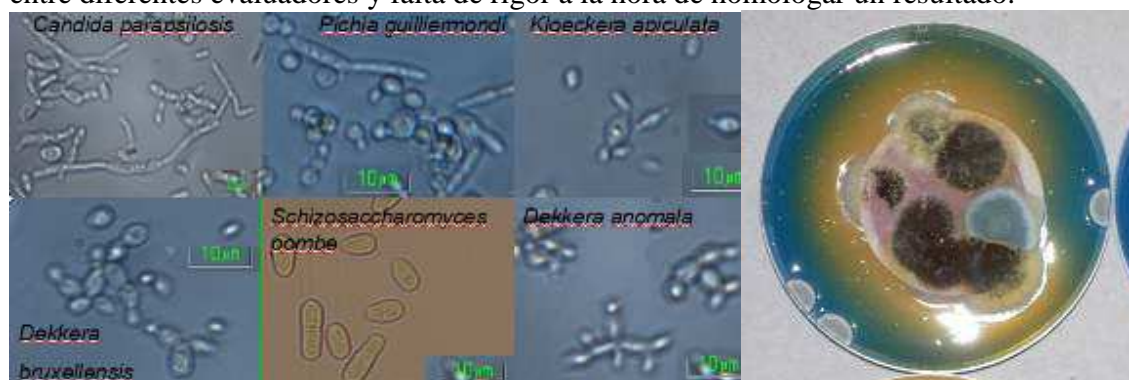


Fig.3. Principales especies responsables de falsos positivos y ejemplo de contaminación por hongos oportunistas.

Cuadro 1. Ventajas e inconvenientes de diferentes técnicas de detección de *Dekkera/Brettanomyces*

Técnica	PCR cuantitativo	Microscopía epifluorescencia	Medios Selectivo-diferenciales	Cromatografía Fenoles volátiles
Tiempo	3 días	horas	5-10 días	Horas
Umbral	10-100 ufc/ml	10-100 ufc/ml	1 ufc/volumen	2 µg/l
Ventajas	Especificidad Precisión	Rápido	Realización sencilla. Detección premature.	Seguimiento actividad Metabólica.
Inconvenientes	AND Células muertas. Reactivos mutágenos.	Precisión	Viabiles no cultibables. Falsos positivos.	No cuantifica levaduras.
Precio aproximado	125 €	5-10 €	12 €	65

Fuente: Elaboración propia.

Con objeto de paliar los inconvenientes citados anteriormente (Cuadro 1) hemos empleado la combinación de un medio selectivo-diferencial líquido de formulación propia

y análisis instrumental mediante técnica HPLC con objeto de evaluar la “**Actividad potencial hidroxicinamato descarboxilasa y vinilfenol reductasa de un vino**” (Suárez et al., 2007) (Fig.4).



Fig.4. Resumen de metodología de detección de Dekkera/Brettanomyces propuesto por Suárez, Morata & Benito P200702790 UPM2007.

La técnica propuesta permite detectar poblaciones pequeñas (hasta 1 ufc/50ml) y detecta sólo células viables que son las que pueden originar problemas, lo que mejora sustancialmente en estos aspectos a las técnicas moleculares.

La cromatografía líquida de alta presión (HPLC) no se suele utilizar debido a la falta de sensibilidad en el análisis de concentraciones pequeñas (10-100 ppb) de estos compuestos, lo cual dificulta su aplicación directa en vinos, pero ha sido aplicada con éxito en la detección de actividades enzimática hidroxicinamato descarboxilasa y vinilfenol reductasa (Fig.5) en medios sintéticos (Benito et al., 2006; Suárez et al., 2007). La técnica propuesta permite una alta sensibilidad sin precisar una preparación compleja de la muestra como las técnicas de CG.

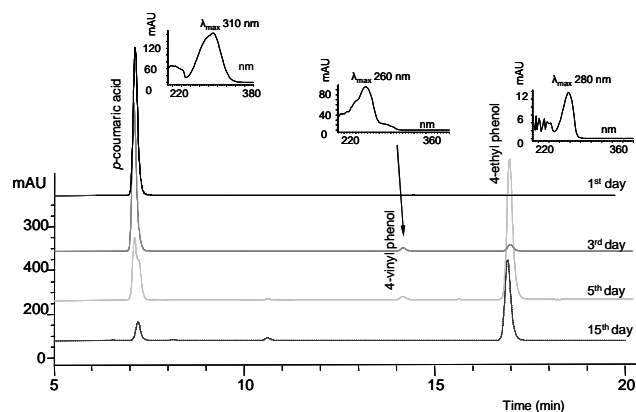


Fig.5. Cromatograma a 280 nm, el cual muestra la transformación de ácido *p*-cumárico en 4-vinilfenol y más tarde en 4-etilfenol, para distintos tiempos de retención.

Material y Métodos

3.1 Condiciones de cultivo

Se ha utilizado un medio líquido de formulación propia (Benito et al., 2006; Suárez et al., 2007). para el desarrollo de levaduras con capacidad hidroxycinamato descarboxilasa y vinilfenol reductasa pertenecientes al género *Dekkera/Brettanomyces*. Se dosificó a razón de 50 ml en 50 ml de vino problema de población microbiana conocida (Recuento en placas Petri) en matraces de 100 ml con válvula Müller. Previamente se esterilizaron en autoclave durante 15 minutos a 121 °C. Los ensayos se realizaron por triplicado. Los matraces se incubaron isotérmicamente a 25 °C.

3.2 Levadura indicadora de las actividad hidroxycinamato descarboxilasa y vinilfenol reductasa.

Las levadura utilizada como microorganismo indicadores ha sido: *Dekkera bruxellensis*. Cepa D37 de la colección de cultivos tipo del IFI (CSIC, Madrid, Spain). Debido su mayor capacidad de crecimiento respecto de otras levaduras de la misma especie (resto de cepas de *Dekkera bruxellensis* de las coelecciones de cultivos tipo del IFI y del departamento de Tecnología de los Alimentos de la Universidad Politécnica de Madrid).

3.3. Medio utilizado

Glucosa 100 g/l, Base nitrogenada sin aminoácidos añadidos y sin sulfato amónico 6 g/l, Ácido *p*-cumárico 100 mg/l, Actidiona 20 mg/l, Cloramfenicol 400 mg/l, con objeto de que la concentración final de cada compuesto sea la mitad al diluirlo en el vino problema.

3.4 Seguimiento y detección de ácido *p*-cumárico, 4-vinilfenol y 4-etilfenol.

Se desarrollo mediante cromatografía HPLC/PDA con columna Nova-pack C18 (300 x 3,9 mm). Utilizando un equipo Agilent Technologies 1100 equipado con inyector automático.

Resultados

Tras el seguimiento del contenido en ácido *p*-cumárico y 4-etilfenol por análisis HPLC (Fig. 1) en el medio selectivo líquido añadido a los vinos inoculados con *Dekkera*, se observó una disminución progresiva de ácido *p*-cumárico, junto con un incremento de 4-etilfenol que comenzó a partir de las 48 horas de seguimiento para el vino inoculado con un 1 ml de suspensión celular que permite realizar una estimación de la población inicial de levaduras viables *Dekkera/Brettanomyces* en un vino problema gracias a un modelo de regresión previamente establecido (Fig. 2). Para la población inicial inexistente (de 0 ufc/ml) en dos de las repeticiones se registró actividad potencial hidroxycinamato descarboxilasa y vinilfenol reductasa negativa; Por tanto el método es válido para detectar la presencia de formas viables de *Dekkera/Brettanomyces* incluso para 1 ufc.

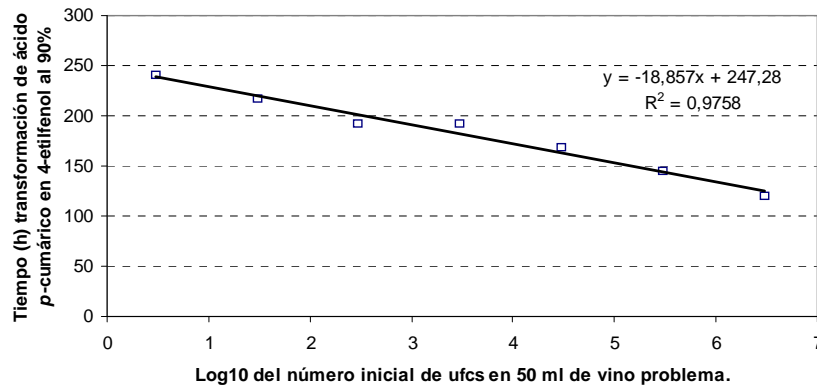


Fig.2. Relación entre la degradación de ácido *p*-cumárico y la formación de 4-etilfenol con respecto de la población inicial inoculada en un vino modelo.

En todos los ensayos se detectó que se detectó actividad potencial hidroxycinamato descarboxilasa y vinilfenol reductasa positiva, se desarrolló durante un intervalo de aproximado de 48 horas hasta la degradación casi total del ácido *p*-cumárico, obteniéndose rendimientos de transformación en 4-etilfenol de aproximadamente 90 %, similares a los de publicaciones anteriores (Dias, Pereira-da-Silva, Tavares, Malfeito-Ferreira & Loureiro, 2003; Benito, Palomero, Morata, Calderón & Suárez-Lepe. 2006).

3. Conclusiones

Existen en la actualidad herramientas muy útiles que pueden ser empleadas en la detección de levaduras de los géneros *Dekkera/Brettanomyces* con innumerables ventajas pero no exentas de inconvenientes (Tabla 1).

La técnica HPLC a pesar de no emplearse normalmente en la cuantificación de 4-etilfenoles debido a su umbral de detección, combinada con el empleo de medios líquidos selectivo-diferenciales, permite la detección de actividad potencial hidroxycinamato descarboxilasa y vinilfenol reductasa en un vino contaminado por formas viables de *Dekkera/Brettanomyces*, para umbrales de 1 ufc y la estimación de la población inicial en vinos problema.

Esta metodología permite solventar varios problemas actuales como son:

- Los posibles falsos positivos de levaduras resistentes a los factores selectivo-diferenciales, pero de actividad hidroxycinamato descarboxilasa y vinilfenol reductasa nula o reducida, que pueden falsear recuentos en medios de cultivo sólidos.
- Contaminaciones por hongos oportunistas que imposibilitan los recuentos en medios sólidos selectivo-diferenciales, pero que se desarrollan con dificultad en medios líquidos.

- Falta de rigor para confirmar un resultado positivo únicamente mediante el olfato humano, permitiendo cuantificar mediante análisis instrumental de gran precisión la presencia de sustancias como el ácido *p*-cumárico o 4-etilfenol.
- Rapidez de detección. Puede detectarse ya en las primeras fases de creación del vino y efectuar controles con cierta periodicidad, con objeto de detectar contaminaciones ocasionales en un periodo de tiempo prudencial que permita al enólogo adoptar medidas correctoras, anticipándose a la aparición de etilfenoles detectables por CG.
- Detección únicamente de células viables, las cuales son las verdaderas causantes de la generación de etilfenoles. Lo cual supone una mejora respecto de las técnicas moleculares.
- Detección de poblaciones pequeñas inferiores a 1 ufc/ml (1 ufc/50 ml). Mejorando los umbrales de detección de otras técnicas.
- Preparación de muestra sencilla respecto de otras técnicas (CG/MS).

Si se evalúa “**Actividad potencial hidroxycinamato descarboxilasa y vinilfenol reductasa de un vino**” en un medio líquido se solventan los inconvenientes de los aislamientos en medios sólidos, umbrales de detección y formas viables en métodos basados en biología molecular; mediante la determinación por técnicas instrumentales de HPLC se actúa con un rigor científico que puede permitir homologaciones a laboratorios oficiales o especializados.

4. Bibliografía

- Benito, S.; Palomero, F., Morata, A., Calderón, F., J. A. Suárez-Lepe, J.A., 2006. Detección de *Brettanomyces/Dekkera* en vinos tintos mediante el uso de medios selectivo-diferenciales. *Tecnología del vino*, 32: 27-31.
- Chatonnet, P., Boidron, J.N. 1988. Dosages de phenols volatils dans les vins par chromatographie en phase gazeuse. *Sciences des aliments*, 8 : 479-488.
- 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. *Appl. Environm. Microbiol.*, 70: 1347-1355.
- Couto, J.A.; Barbosa, A.; Hogg, T. 2005. A simple method for the presumptive detection of the yeasts *Brettanomyces/Dekkera* in wines. *Letters in Applied Microbiology*, 41: 505-510.
- Dias, L., Pereira-Da-Silva, S., Tavares, M., Malfeito-Ferreira, M., Loureiro, V. 2003 a. Factors affecting the production of 4-ethylphenol by the yeast *Dekkera bruxellensis* in enological conditions. *Food Microbiol*, 20: 377-384.
- Díez, J., Domínguez, C., A.Guillén, D., Veas, R., G.Barroso, C., 2004. Optimisation of stir bar sorptive extraction for the analysis of volatile phenols in wines. *Journal of Chromatography A*, 1025: 263-267.
- 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: 241-247.
- Kurtzman, C.P., Fell, J.W., 1998. *The Yeasts, A Taxonomic Study*. Elsevier. Amsterdam.

- 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: 143–155.
- Martorell, N., Martí, M.P., Mestres, M., Busto, O., Guasch, J., 2002. Determination of 4-ethylguaiacol in red wines using headspace-solid-phase microextraction-gas chromatography. *Journal of Chromatography*, 975: 349-354.
- Mitrakul, C. M., Henick-Kling, T., & Egli, C. M., 1999. Discrimination of *Brettanomyces/Dekkera* yeast isolates from wine by using various DNA fingerprinting methods. *Food Microbiology*, 16: 3–14.
- Monje, MC., Privat, C., Gastine, V., Nepveu, F., 2002. Determination of ethylphenol compounds in wine by headspace solid-phase microextraction in conjunction with gas chromatography and flame ionization detection. *Analytica Chimica Acta*, 458: 111-117.
- Navascués, E., & Rasines, G., 2003. Método de detección directa de *Brettanomyces* spp. en vinos de crianza en barrica. *Enólogos*, 23: 24–26.
- Rodrigues, N., Gonçalves, G., Pereira-da-Silva, S., Malfeito-Ferreira, M., Loureiro, V. 2001. Development and use of a new medium to detect yeasts of the genera *Dekkera/Brettanomyces*. *Journal of Applied Microbiology*, 90: 588-599.
- Rozes, N., Garcia-Jares, C., Larue, F., & Lonvaud-Funel, A. 1992. Differentiation between fermenting and spoilage yeasts in wine by total free fatty acid analysis. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 59: 351–357.
- Sancho, T., Jiménez-Jurado, G., Malfeito-Ferreira, M., & Loureiro, V., 2000. Zymological indicators: a new concept applied to the detection of potential spoilage yeast species associated with fruit pulps and concentrates. *Food Microbiology*, 17: 613–624.
- Stender, H., Fiandaca, M., Hyldig-Nielsen, J. J., & Coull, J., 2002. PNA for rapid microbiology. *Journal of Microbiological Methods*, 48: 1–17.
- Stender, H., Kurtzman, C., Hyldig-Nielsen, J. J., Sorensen, D., Broomer, A., Oliveira, K., et al., 2001. Identification of *Dekkera bruxellensis* (*Brettanomyces*) from wine by fluorescence in situ hybridization using peptide nucleic acid probes. *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 938–941.
- Suárez, J.A., Íñigo, B., 2004. Microbiología enológica. Mundi-Prensa. Madrid.
- Suárez, J.A., Morata, A., Benito, S. 2007. Nuevo método de detección de levaduras de los géneros *Brettanomyces/Dekkera* en vinos tintos y otras bebidas fermentadas o carbonatadas. Oficina española de patentes y marcas. Número de solicitud: P200702790.
- 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*. *Food Chemistry*, 102: 10-21.