

Diseminación de cepas de *Brettanomyces bruxellensis* en bodega durante la conservación en barricas



Sturm M.E.¹, Chimeno V.¹, González M.L.², Lerena M.C.², Massera A.¹, Mercado L.A.¹, Combina M.^{1,2}

Laboratorio de Microbiología Enológica, INTA EEA Mendoza, San Martín 3853, Luján de Cuyo, Mendoza, Argentina.

² Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Argentina.

sturm.maria@inta.gob.ar

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVO

La alteración del vino por levaduras contaminantes representa un serio problema para la industria causando importantes pérdidas económicas. *Brettanomyces bruxellensis* ha sido descrita como la principal levadura contaminante de vinos tintos (Malfeito-Ferreira 2018). Debido a su lento crecimiento y elevada resistencia al etanol suelen aparecer en las últimas etapas de vinificación y añejamiento en barrica (Smith y Divol, 2016). Existen pocos estudios que aborden la diversidad de cepas presentes en las bodegas y su diseminación en éstas. Conocer la diversidad de cepas de estas poblaciones y su distribución en los diferentes vinos, puede contribuir a revelar el origen y momento de la contaminación, permitiendo el diseño de estrategias de prevención y control.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la incidencia y diversidad de cepas de *Brettanomyces bruxellensis* durante la conservación en barricas de vinos tintos en una misma bodega.

MATERIALES Y METODOS

Se trabajó con 4 vinos tintos (Merlot, Cabernet Sauvignon y 2 Malbec) los cuales fueron analizados en 7 momentos: antes del llenado de las barricas y durante los 6 meses de crianza (5 barricas para cada vino). Otras muestras de vinos positivos para *Brettanomyces* en la misma bodega fueron incluidas para ampliar la detección de la diseminación de cepas. Muestras de 100 mL fueron filtradas, colocadas en medio selectivo para *Brettanomyces* (Gilis y col., 1999) e incubadas a 28 °C por 20 días. Colonias representativas de las poblaciones presentes fueron colectadas, purificadas e identificadas a nivel de género. Los 70 aislados asignados al género *Brettanomyces* fueron analizados a nivel de cepa mediante el marcador molecular RAPD M13 (5' -TTA TGA AAC GAC GGC CAG T-3') según protocolo propuesto por Crauwels y colaboradores (2014).

RESULTADOS

Los resultados mostraron que 3 de los 4 vinos analizados fueron positivos para *Brettanomyces* antes del llenado de las barricas. Sin embargo, la presencia de *Brettanomyces* en las barricas fue diferente según el vino (Figura 1).

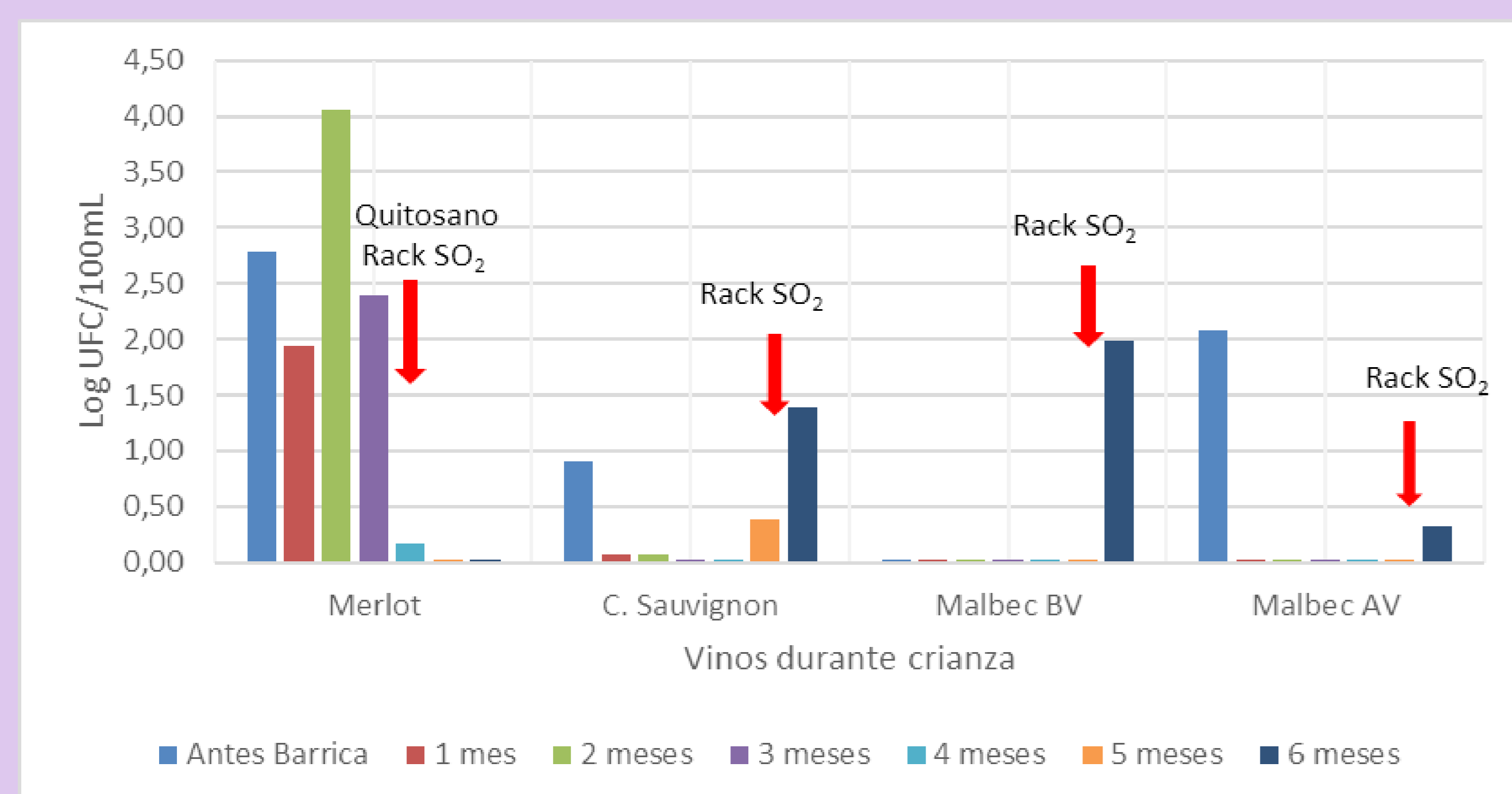


Figura 1: Recuentos de *Brettanomyces* en los vinos antes y durante la crianza en el transcurso de 6 meses. Las flechas indican prácticas enológicas realizadas por la bodega durante ensayo.

El marcador molecular utilizado permitió diferenciar 15 patrones moleculares diferentes, los cuales fueron reiteradamente detectados en diferentes aislados de *Brettanomyces* en los vinos analizados (Figura 2).

100bp XI XII XIII XV I II III IV V V VI V VII X B 100bp

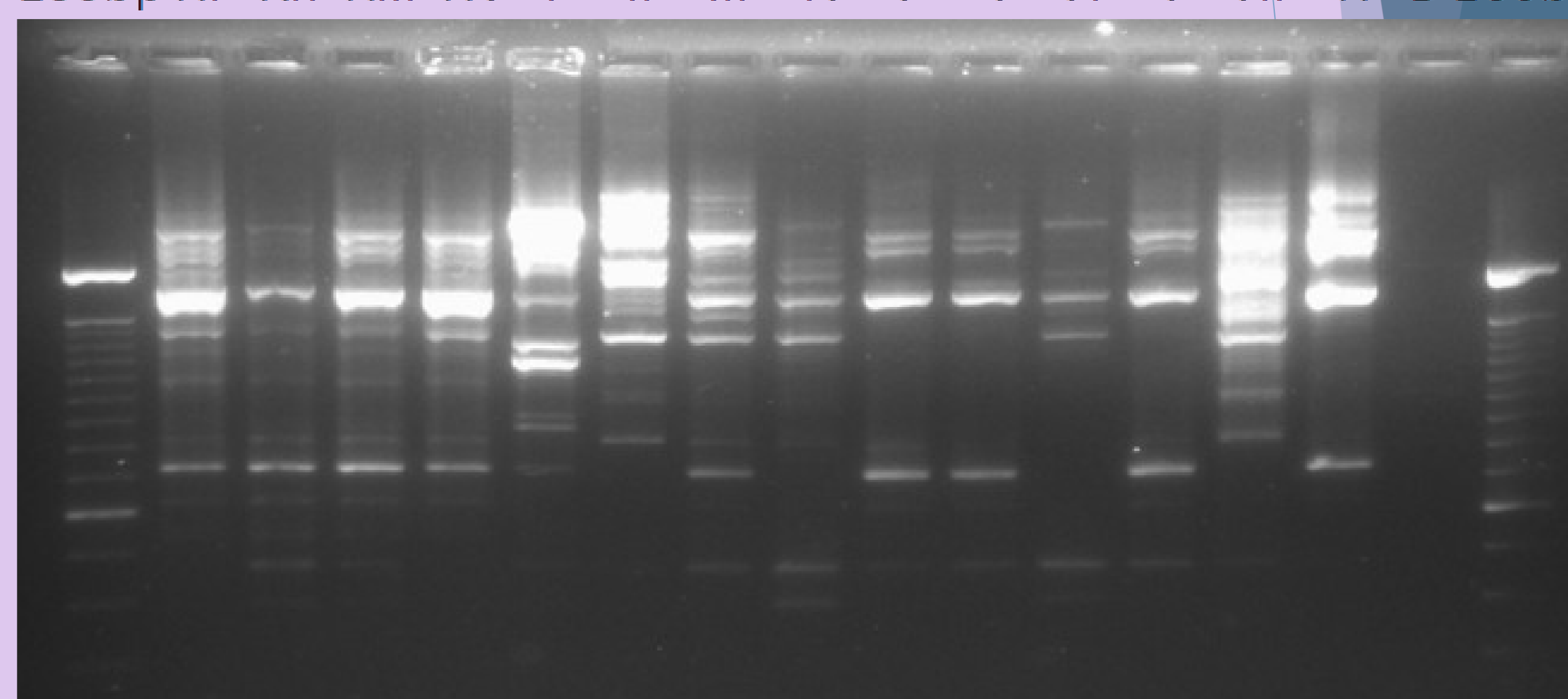


Figura 2: Diferentes patrones moleculares obtenidos mediante PCR RAPD (M13) identificados con números romanos correspondientes a dos de los vinos analizados (merlot y cabernet sauvignon). PM: 100 bp. Líneas de 1 a 14 diferentes aislados de *B. bruxellensis*. B: blanco.

Tabla 1: Patrones moleculares de los aislados obtenidos y sus porcentajes de representatividad

Muestras	Número de aislados															
	II	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XV	XVI	XVII	XX	
Antes Barrica		1	4					2	2			1	2			
1 mes	3		2	1	1		1	1								
2 meses			1			1	1				2					
3 meses			3				1	4								
4 meses																
5 meses								1		1						
6 meses			13						6						1	
Muestras externas		1							8						5	
TOTAL (70)	3	2	23	1	1	1	3	8	16	1	2	1	2	1	5	
Representatividad (%)	4	3	33	1	1	1	4	11	23	1	3	1	3	1	6	

Tres patrones moleculares (V, X, y XI) fueron detectados en elevados porcentajes de incidencia (33, 11 y 23 % respectivamente) (Tabla 1), siendo reiteradamente aislados en muestras provenientes de distintos viñedos las cuales fueron vinificadas en diferentes momentos durante la vendimia. El patrón molecular XI fue también detectado en muestras positivas de otros vinos durante la crianza provistos por la bodega. Los resultados sugieren que podría existir una población de *B. bruxellensis* residente en bodega que contamina reiteradamente los vinos elaborados. La práctica de "racking y sulfitado" (que consiste en mezclar el vino de diferentes barricas en un tanque pulmón para la corrección de SO₂), produjo la diseminación de la contaminación en las barricas que fueron mezcladas (Figura 1). Este resultado se evidenció en recuentos positivos en muestras que fueron negativas antes de realizar esta práctica (a pesar del sulfitado) donde se observaron las mismas cepas distribuidas en diferentes barricas.

CONCLUSIONES

Podría existir una población de *Brettanomyces* residente en bodega que contamina reiteradamente los vinos elaborados, tanto en etapas tempranas de la vinificación como durante la conservación. Algunas prácticas utilizadas por la bodega podrían favorecer la diseminación y multiplicación de *Brettanomyces*.

BIBLIOGRAFÍA

- Crauwels, S., Zhu, B., Steensels, J., Busschaert, P., De Samblanx, G., Marchal, K., Willems, K. A., Verstrepen, K. J., Lievens, B., (2014). Appl. Environ. Microbiol. 80:14: 4398-4413
 Gilis, J.F., (1999). Thèse Nouveau Doctorat. Institut National Polytechnique de Toulouse. Toulouse, France. Pp: 1-150.
 Malfeito-Ferreira M. (2018). Two decades of "Horse Sweat" taint and *Brettanomyces* yeasts in wine: where do we stand now?. Beverages 4: 32. Doi:10.3390/beverages4020032.
 Smith B.D., Divol B. (2016). *Brettanomyces bruxellensis*, a survivalist prepared for the wine apocalypse and other beverages. Food Microbiology 59: 161-175. Doi:10.1016/j.fm.2016.06.008.

FONDOS

Convenio de Asistencia Técnica de Ámbito Regional en tema: Identificación del origen de contaminación con *B. bruxellensis* en el proceso de elaboración de vino y estrategias para su control. Código INTA:24945.
 Proyecto estructural INTA: Calidad nutricional, sensorial y aptitud tecnológica de alimentos asociada a sistemas y territorios de producción agropecuaria con foco en las demandas del consumidor. Código: 2019-PE-E7-I517-001. Línea de trabajo 34: Presencia de *B. bruxellensis* en vinos: Identificación de factores que favorecen su desarrollo para reducción de defectos en vinos.