

# INNOVACIÓN EN LA DETECCIÓN DE *Dekkera* /*Brettanomyces* PARA VINOS TINTOS

Benito, S.; Palomero, F.; Morata, A.; Calderón, F.; González, M. C.; Suárez-Lepe, J. A.  
 Dpto. Tecnología de Alimentos. ETS Ingenieros Agrónomos  
 Universidad Politécnica de Madrid.  
 Ciudad Universitaria S/N. Madrid 28040. TF: 913365745  
 e-mail: antonio.morata@upm.es  
 FORO MUNDIAL DEL VINO. LOGROÑO, 23-25 ABRIL 2008.

GI. Enología, enotecnia y biotecnología enológica  
 Dpto. Tecnología de Alimentos

enotecUPM  
 Dept. Food Technology  
 ETS Ingenieros Agrónomos  
 Universidad Politécnica de Madrid  
 Ciudad Universitaria S/N  
 Madrid 28040 SPAIN  
 Tel. 0034 91 336 57 45  
 Fax. 0034 91 336 57 46



## INTRODUCCIÓN

Existen en la actualidad diversos métodos empleados para la detección de *Dekkera/Brettanomyces* con numerosas ventajas de distinta índole pero no exentos de algunos inconvenientes [Tabla 1], por lo que es necesario profundizar en la interpretación de los resultados de los mismos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Con objeto de paliar dichos inconvenientes se ha empleado la combinación de un medio selectivo-diferencial líquido de formulación propia adecuado para el desarrollo de *Brettanomyces/Dekkera*, y el análisis instrumental mediante técnica HPLC/DAD (columna Nova-pack C18 + equipo Agilent Technologies 1100) con objeto de evaluar la "Actividad potencial hidroxycinamato descarboxilasa y vinilfenol reductasa de un vino" mediante el seguimiento y detección de ácido *p*-cumárico, 4-vinilfenol y 4-etilfenol [Figura 1].

Dicha técnica ha sido aplicada en vino esterilizado y posteriormente inoculado con poblaciones conocidas de *Dekkera bruxellensis* (D37), y en vinos procedentes de diversas bodegas alterados por etilfenoles.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tras el seguimiento del contenido en ácido *p*-cumárico y 4-etilfenol por análisis HPLC 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. Éste comenzó a partir de las 48 horas de seguimiento para el vino inoculado ( $6 \times 10^4$  ufc/ml), retrasándose 24 horas según disminuían las poblaciones iniciales en un dígito, lo cual permitió obtener un modelo de regresión lineal, muy útil para estimar poblaciones iniciales de levaduras viables *Dekkera/Brettanomyces* en un vino problema [Figura 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, lo cual justifica que el método es válido para detectar la presencia de formas viables de *Dekkera/Brettanomyces* incluso para 1 ufc en el volumen estudiado.

## CONCLUSIONES

La metodología propuesta [Figura 3] permite detectar poblaciones pequeñas (hasta  $< 1$  ufc/ 50 ml), y trabajar con volúmenes grandes de vino. Evita problemas por posibles falsos positivos o por hongos oportunistas y detecta sólo células viables que son las que pueden originar problemas, razón que mejora en estos aspectos a las técnicas anteriores.

## AGRADECIMIENTOS

A **Monserrat Iñiguez**, directora de la Estación Enológica de Haro, José Barcenilla del Instituto de Fermentaciones Industriales-CSIC, Juan Antonio Sánchez y Susana Somolinos, personal técnico del Laboratorio de Enología de ETSIAgrónomos por su valiosa colaboración. Y al MEC por la financiación:

Proyecto AGL2005-076640-C02-01

## BIBLIOGRAFÍA

- [1] Loureiro, V. and Malfeito-Ferreira, M. (2006). Spoilage activities of *Dekkera/Brettanomyces* spp. In: Blackburn, C. (Ed.) Food spoilage microorganisms (pp. 377-380). Cambridge, Woodhead Publishers.
- [2] Stender, H., Kurtzman, C., Hyldeg-Nielsen, J. J., Sorensen, D., Broome, 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.
- [3] 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*, 32, 27-31.
- [4] 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.
- [5] 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.

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

Técnica	PCR Cuantitativo [1]	Microscopía Epifluorescencia [2]	Medios Selectivo-diferenciales [3]	Cromatografía Fenoles volátiles [4]
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 temprana.	Seguimiento actividad Metabólica.
Inconvenientes	ADN Células muertas. Reactivos mutágenicos.	Precisión	Viables no cultivables. Falsos positivos. Evaluación.	No preventivo. No cuantifica levaduras.
Precio aproximado	125 €	5-10 €	12 €	65 €

Fuente: Elaboración propia.

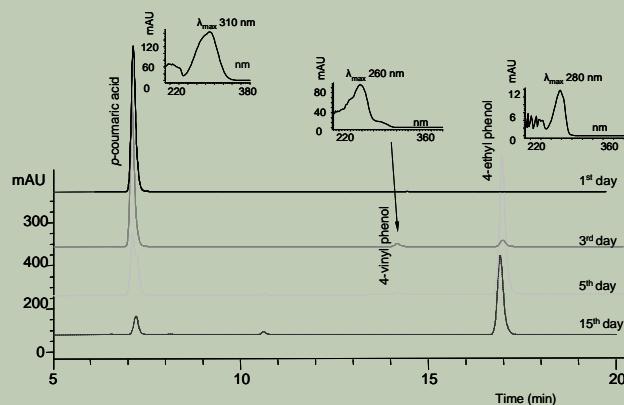


Fig. 1. Degradación de ácidos hidroxycinámicos y formación de etilfenoles por *Dekkera/Brettanomyces*

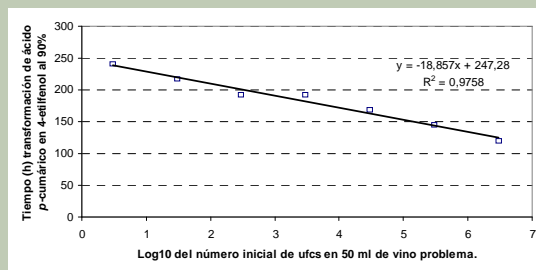


Fig. 2. Relación entre la degradación de ácido *p*-cumárico y la formación de 4-etilfenol con respecto de la población inoculada en un vino problema.



Fig. 3. Metodología propuesta según P200702790. UPM 2007, de Suárez Lepe, J. A.; Morata, A.; Benito, S. [5].