



# UNIVERSIDAD DE LA RIOJA

## TRABAJO FIN DE ESTUDIOS

Título

Empleo de la Citometría de Flujo para la cuantificación de levaduras en la vinificación

Autor/es

PATRICIA IBARRA BELTRÁN

Director/es

SUSANA A. SANZ CERVERA y ANA ROSA GUTIÉRREZ VIGUERA

Facultad

Facultad de Ciencia y Tecnología

Titulación

Grado en Enología

Departamento

AGRICULTURA Y ALIMENTACIÓN

Curso académico

2019-20



***Empleo de la Citometría de Flujo para la cuantificación de levaduras en la vinificación***, de PATRICIA IBARRA BELTRÁN

(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, 2020

© Universidad de La Rioja, 2020

[publicaciones.unirioja.es](http://publicaciones.unirioja.es)

E-mail: [publicaciones@unirioja.es](mailto:publicaciones@unirioja.es)



# UNIVERSIDAD DE LA RIOJA

Facultad de Ciencia y Tecnología

## TRABAJO FIN DE GRADO

Grado en Enología

Empleo de la Citometría de flujo para la cuantificación de levaduras en la vinificación.

Realizado por:

Patricia Ibarra Beltrán

Tutelado por:

Susana A. Sanz Cervera

Ana Rosa Gutiérrez Viguera

Logroño, junio, 2020

## ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	3
RESUMEN .....	4
INTRODUCCIÓN .....	5
Microorganismos que participan en la vinificación .....	5
Levaduras de la especie <i>Brettanomyces/Dekkera</i> .....	6
Formación de etilfenoles en el vino .....	7
Control del problema .....	8
Detección de <i>Brettanomyces bruxellensis</i> .....	10
Medios de cultivo sólidos .....	10
Medios de cultivo líquidos .....	10
Métodos de biología molecular .....	11
Citometría de flujo .....	12
OBJETIVOS.....	17
MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
Citometría de flujo: .....	18
Análisis de los vinos:.....	19
Muestras analizadas:.....	20
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	22
Recuento de <i>Brettanomyces</i> activas durante fermentación alcohólica .....	22
Recuento de levaduras activas al finalizar la FML, después de filtrado y sulfitado .....	29
Características analíticas de los vinos estudiados.....	34
Etapas en las que aplicar la metodología durante la vinificación .....	35
CONCLUSIONES .....	37
REFERENCIAS.....	38

## ABREVIATURAS

4-EP	4 – etilfenol
4-EG	4 – etilguaiacol
4-EC	4 – etilcatecol
µm	Micrometro
BSM	Bacterial Standard Medium
DBDM	Differential Brettanomyces Dekkera Medium
DMDC	Dicarbonato de dimetilo
FISH	Fluorescence in situ hybridization
FOH	Fermentación alcohólica
FSC	Forward Scatter Channel
g	Gramo
MEA	Malt Extract Agar
ml	Mililitro
nm	Nanómetro
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PNA	Péptidos de Ácidos Nucleicos
RAPD-PCR	Amplificación aleatoria de DNA polimórfico
RNA	ÁcidoRibonucleico
SSC	Side Scatter Channel
SO <sub>2</sub>	Dióxido de azufre
qPCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa Cuantitativa
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
UPO	Umbral de Percepción Sensorial
VBNC	Viable But Non Culturable
YPD	Yeast Extract Peptone Dextrose

## RESUMEN

Durante el proceso de vinificación intervienen diversos microorganismos, entre ellos diversas levaduras, siendo la principal responsable de la fermentación alcohólica *Saccharomyces cerevisiae*. No obstante, en etapas posteriores a la fermentación es conveniente que el vino no contenga microorganismos para garantizar la estabilidad del producto final. Uno de los principales contaminantes desde el final de la fermentación alcohólica hasta el embotellado es la levadura *Brettanomyces bruxellensis*, que debido a su metabolismo puede producir fenoles volátiles, compuestos que generan en el vino olores desagradables.

La citometría de flujo es una técnica que permite el recuento de los microorganismos presentes en una determinada muestra en cualquier momento de la vinificación. Su ventaja es la rapidez de los análisis, la posibilidad de detectar células viables, pero no cultivables (VBNC), la capacidad de conocer su estado fisiológico (vivas, débiles, muertas) y su especificidad. La detección de *Brettanomyces* por Inmunocitometría se realiza en menos de 1h 30 min gracias al empleo de un anticuerpo selectivo para este microorganismo.

El objetivo de este trabajo fue estudiar la aplicación de la citometría de flujo para cuantificar levaduras en distintas etapas del proceso de vinificación. Para ello, se hizo el seguimiento de 13 vinos desde la etapa de fermentación alcohólica hasta los tratamientos de estabilización posteriores a la fermentación maloláctica, y se pudo validar esta técnica como herramienta para la toma de decisiones en bodega en relación con la presencia de levaduras *Brettanomyces*.

## ABSTRACT

Various microorganisms are involved during the wine making process, including several yeasts. *Saccharomyces cerevisiae* is the main yeast responsible for the alcoholic fermentation. When fermentation is about to finish it is important that there are no microorganisms in order to achieve the wine's stability. One of the main pollutants of wine from the end of fermentation till bottling is *Brettanomyces bruxellensis*, a yeast that due to its metabolism it produces volatile phenols that generates unpleasant odors in the wine.

Flow cytometry is a method that allows to do recounts of any particular sample at any stage of the wine making process. One of the advantages that it has, is the speed in which the analysis is done, the possibility of detecting viable cells that cannot be cultivated (VBNC), the ability of knowing their physiological state (alive, weak, dead) and their specificity.

*Brettanomyces* can be detected in less than 1h 30min using Immune Cytometry, a method that uses selected antibodies that are specific for this microorganism.

The aim of this bachelor's final thesis is to study the application of Flow Cytometry in the quantification of yeasts at different stages of the wine making process. To do this, 13 wines were monitored from alcoholic fermentation till the stabilization treatments done after malolactic fermentation, being able to validate this technique as a tool when making decisions in a winery in relation to the presence of *Brettanomyces*.

## INTRODUCCIÓN

### Microorganismos que participan en la vinificación

En la elaboración del vino es necesaria la participación de diversos microorganismos que permiten obtener un producto con las propiedades que lo definen (etanol, aromas, etc.). Entre estos microorganismos, se encuentra la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, que es la principal responsable de llevar a cabo la fermentación alcohólica. Sin embargo, al finalizar las fermentaciones alcohólica y maloláctica (llevada a cabo por bacterias lácticas), se debe evitar la presencia de cualquier microorganismo en el vino, debido a la posible desestabilización del producto final por su actividad metabólica.

El concepto de microorganismos alterantes en el vino ha cambiado a lo largo de los años y su importancia ha aumentado considerablemente debido, sobre todo, a las importantes pérdidas económicas que suponen (Loureiro & Querol, 1999). La gran mayoría de los microorganismos indeseables ya vienen del viñedo con la materia prima, por lo que es común encontrarla en diversos lugares de la bodega (Fleet & Heard, 1993) y en los vinos de todas las regiones del mundo.

El bajo pH del mosto y del vino impide el crecimiento de microorganismos patógenos para los humanos. Sin embargo, un gran número de microorganismos pueden afectar negativamente a la calidad del vino debido a la producción de sustancias indeseadas procedentes de la degradación de sustancias que sí son favorables.

Un grupo de estos microorganismos incluye las levaduras de los géneros *Hansenula*, *Hanseniopsis*, *Pichia* y *Candida*. Estas levaduras tienen un metabolismo oxidativo, pueden metabolizar los azúcares y ácidos orgánicos en presencia de oxígeno y son capaces de sobrevivir a niveles de alcohol muy elevados. Algunos subproductos no deseados que resultan de su metabolismo son el ácido acético, el acetato de etilo y el acetaldehído. *Kloeckera apiculata* es una levadura predominante en el mosto de uva antes de comenzar la fermentación alcohólica y soporta bajas temperaturas. Esta es capaz de producir grandes cantidades de ácido acético y acetato de etilo. También podemos encontrar algunas cepas indígenas de *Saccharomyces spp.* que pueden producir cantidades elevadas de ácido acético, SO<sub>2</sub>, urea y sustancias volátiles que resultan perjudiciales para la calidad del vino (Trioli & Hofmann, 2009).

Además de levaduras, encontramos también bacterias que son capaces de producir sustancias indeseadas. Dentro del grupo de las bacterias acéticas, encontramos *Gluconobacter*, que suele encontrarse en uvas dañadas y degrada los azúcares en ácido acético y otros compuestos y *Acetobacter*, que utiliza el etanol como sustrato y lo metaboliza en ácido acético. Aparte de las bacterias acéticas, encontramos bacterias lácticas heterofermentativas, que también son capaces de producir cantidades excesivas de acidez volátil.

Se ha documentado una diversidad considerable de levaduras alterantes del vino, pero entre todas ellas destaca el género *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 & Edwards, 2007).

### Levaduras de la especie *Brettanomyces/Dekkera*

El nacimiento del término "*Brettanomyces*" radica en Gran Bretaña donde, en 1904, esta levadura fue aislada por primera vez por Claussen. Mientras que Claussen llamó a sus células aisladas "*Brettanomyces*" (del griego *Brettano* [cervecero británico] y *Myces* [hongo]), inicialmente fueron clasificadas como pertenecientes al género *Torula*. Sin embargo, en 1921, Kufferath y Van Laer aislaron una cepa de levadura de cervezas belgas con las mismas características que las aisladas por Claussen y las clasificaron como *Brettanomyces bruxellensis* (Custers, 1940). La primera investigación sistemática de levaduras del género *Brettanomyces* fue realizado por Mathieu Custers en 1940, caracterizando 17 especies diferentes, aisladas de cervezas inglesas y belgas (Steensels, y otros, 2015).

*Brettanomyces* son levaduras de multiplicación muy lenta en el mosto. Son células de forma esferoidal ligeramente alargada, frecuentemente ojival, con unas dimensiones de (2-7) x (3-28) µm, presentándose aisladas o por parejas e incluso cadenas de hasta 4 o 5 unidades. Pueden formar velos en la superficie de los vinos de mayor o menor espesor. Multiplicadas en medios de cultivo, toman una forma más redondeada, con un aspecto de color crema, húmedo y brillante (Hidalgo Togados, 2003). Se trata de una levadura capaz de modificar su genoma rápidamente, lo que le permite adaptarse a un medio hostil como el vino (Vigentini, Lucy Joseph, Picozzi, Foschino, & Bisson, 2013).

Las dos formas de levadura, *Brettanomyces* (anamórfica, asexual) y *Dekkera* (teleomórfica, sexual y formadora de esporas o esporulada), pueden ser encontradas en el contexto vitivinícola. Su presencia ha sido observada en mostos de uva y en mostos en plena fermentación alcohólica (Licker, Acree, & Henick-Kling, 1998). Se encuentra en el campo y determinadas zonas o parcelas son más propicias a su desarrollo en los vinos (Lonvaud-funel, Renouf, & Strehaiano, 2010). Apenas se ha logrado aislarlo de la uva por el amplio ecosistema presente en la fruta y su representación en el mosto es casi nula (inferior al 5% del total de las especies) (Renouf, y otros, 2006) lo que dificulta su detección temprana. En el mosto fermentado es fácil localizarlo sobre todo en vinos afectados por *Botrytis cinérea* y si quedan levaduras después de las fermentaciones es posible que algunas sean *B. bruxellensis* (Renouf, y otros, 2006). Es importante tener en cuenta que bajos niveles de dióxido de azufre libre, la existencia de azúcares residuales (fructosa y glucosa) y la liberación de nutrientes por la autólisis celular (Barata, y otros, 2008) pueden favorecer el desarrollo de estas levaduras.

Además, en el mismo ambiente de la bodega es 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 difícil (Fugelsang P. , 1998). Se han detectado *B. bruxellensis* a 8mm dentro de la madera de las barricas donde apenas llega el vino (Tubia, y otros, 2018). Además, se ha detectado en el aire en las zonas de barricas, lo que sugiere que el aire puede ser también un medio de diseminación de estas levaduras en bodega, depositándose posteriormente sobre superficies, materiales o vinos (Ocón, y otros, 2013).

Recientemente se ha demostrado que ciertas prácticas de vinificación también pueden favorecer el crecimiento de *Brettanomyces* en bodega, como las temperaturas inadecuadas de vinificación y almacenamiento (Barata, y otros, 2008) y las prácticas de embotellado sin filtrar (Henick-Kling, Egli, Licker, Mitrakul, & Acree, 2000).



## Formación de etilfenoles en el vino

El problema causado por las levaduras del género *Brettanomyces* se debe a la producción y acumulación en el vino de 4 etil fenol (4-EP) y 4 etil guayacol (4-EG), compuestos conocidos como etil fenoles o fenoles volátiles. Los precursores del 4-EP, 4-EG y 4-EC son ácidos hidroxicinámicos (*p*-cumárico, ferúlico y caféico, respectivamente), que se descarboxilan enzimáticamente por una cinamato descarboxilasa, que los transforma en vinil fenoles. En una segunda etapa por acción de una vinil-fenol reductasa se produce una reducción de los vinilfenoles a etilfenoles (Figura 1) (Catania & Avagnina, 2007). A pesar de que algunas bacterias son capaces de producir estos compuestos, solamente *Brettanomyces* es capaz de producirlos en niveles tales que pueden modificar sensorialmente el vino, por lo tanto la presencia de estos controvertidos aromas es indicio de la contaminación con *Brettanomyces* (Chatonnet, Dubourdie, Boidron, & Pons, 1992).

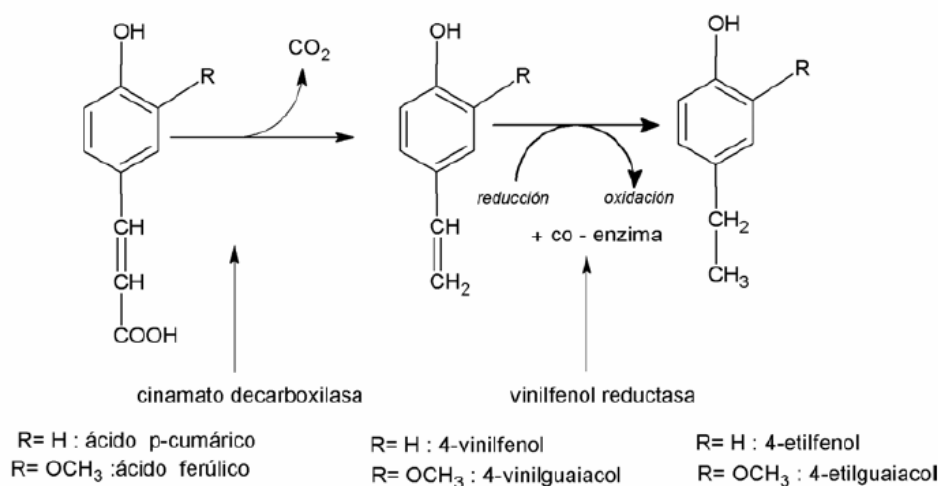


Figura 1: Biosíntesis de los etilfenoles en vino por *Brettanomyces/Dekkera* sp. (Catania & Avagnina, 2007).

El umbral de percepción sensorial (UPO) del 4-etilfenol, responsable del descriptor establo de caballo o medicinal, es de aproximadamente 425  $\mu\text{g/L}$  y el del 4-etilguaiacol, responsable del descriptor humo y jamón, está en 110  $\mu\text{g/L}$  (Chatonnet, Dubourdie, Boidron, & Pons, 1992). Para detectar un defecto en el aroma del vino, la concentración de 4-EP debe superar los 620  $\mu\text{g/L}$ , pero este compuesto aporta notas favorables al aroma si su concentración es cercana a 400  $\mu\text{g/L}$ . Estos son los denominados límites de tolerancia (Hernandez & Barbero, 2007).

La formación del “carácter Brett” encontrado en vinos alterados depende de muchos factores: la cepa involucrada, pH, disponibilidad de nutrientes en el mosto y de la etapa en que se produce la contaminación (Romano, Perello, De Revel, & Lonvaud-Funel, 2008). Esta desviación organoléptica resulta de la mezcla compleja de compuestos odoríferos activos (alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres y fenoles), que originan descriptores diversos como “sudor de caballo”, “establo”, “animal”, “cuero mojado”, “ratón”, entre otros (Licker, Acree, & Henick-Kling, 1998). Los compuestos relacionados con estos descriptores son principalmente fenoles volátiles siendo el más importante el 4-etilfenol (4-EP), seguido del 4-etilguaiacol (4-EG) y el 4-etilcatecol (4-EC). Además, otros productos del metabolismo de *Brettanomyces* como los ácidos isovalérico e isobutírico tienen influencia en el olor a “sudor a caballo” (Malfeito-Ferreira, 2018). Se ha demostrado que algunas bacterias lácticas como *Lactobacillus*

*plantarum* son capaces de formar fenoles volátiles, pero se ha comprobado que solo *Brettanomyces* es capaz de producir estos compuestos en cantidad suficiente para alcanzar los umbrales de detección en el vino (Chatonnet, Dubourdieu, & Boidron, 1995).

También se ha relacionado con el carácter *Brett* la presencia de determinadas piridinas. Estos compuestos N-heterocíclicos derivados de aminoácidos, azúcares y etanol (Costello & Henschke, 2002); (Romano, Perello, De Revel, & Lonvaud-Funel, 2008); (Snowdon, Bowyer, Grbin, & Bowyer, 2006) pueden originar el conocido “gusto a ratón” en los vinos alterados, siendo muy desagradable y produciendo en boca sensaciones aún peores por la acción secuestrante que estos compuestos ejercen sobre los compuestos de la saliva (Suárez, Suárez-Lepe, Morata, & Calderón, 2007).

Otra alteración importante que tiene lugar por la proliferación de *Brettanomyces* en el vino es el incremento de la acidez volátil, ya que esta levadura produce cantidades importantes de ácido acético a partir de glucosa y etanol en condiciones de aerobiosis (Aguilar-Usanga, Escudero-Abarca, Gomez-Rodríguez, & Cortes-García, 2007).

Además de la producción de olores desagradables en los vinos en los que se desarrolla, *Brettanomyces* tiene la capacidad de promover o acelerar las alteraciones en el color del vino, ya que esta levadura es capaz de hidrolizar las antocianinas, liberando glucosa al medio y desestabilizando la molécula (Mansfield, Zoecklein, & Whiton, 2002).

Otro problema es la presencia de aminas biógenas en el vino. *Brettanomyces*, aparte de su potencial para producir alteraciones como aromas desagradables, turbidez, acidez volátil y precipitación de materia colorante (Sponholz, 1993), es una de las especies de levaduras que mayor cantidad de aminas biógenas produce (hasta 15 mg/L), especialmente feniletilamina y etanolamina (Caruso, y otros, 2002).

### Control del problema

La eliminación de este defecto del vino no es fácil. Se puede reducir la concentración de 4-etilfenol con adsorbentes (lías de levadura, agentes de clarificación, etc.) pero los componentes aromáticos favorables y el color son reducidos también. Sin embargo, cuando las medidas preventivas han fallado, el carbón activo puede ser una solución para la eliminación de fenoles volátiles, aunque también disminuyen la intensidad colorante y los aromas del vino, pudiendo ser usado este para la mezcla con otros vinos no contaminados. El uso de nanofiltración + carbón activo o la ósmosis inversa son otras alternativas para la reducción de estos fenoles volátiles (Malfeito-Ferreira, 2018).

Sin embargo, es más económico y mejor para la calidad del vino la prevención de la presencia de *Brettanomyces*. El control de los valores de pH, oxígeno y temperatura, además de la prevención de maceraciones muy intensas o prolongadas son variables que pueden ser vigiladas fácilmente y pueden reducir las condiciones favorables al crecimiento y proliferación de *Brett* (Suárez, Suárez-Lepe, Morata, & Calderón, 2007). Además, el filtrado de los vinos puede ayudar a controlar la población de levaduras en las etapas finales de la vinificación. Sin embargo, cuando hay constancia de la presencia de microorganismos alterantes en el vino, incluso después de los filtrados, es necesario un control microbiológico riguroso que asegure la estabilidad de los vinos tras el embotellado (Úbeda & Briones, 1999).

En el caso de contaminaciones evidentes de agentes microbianos, es necesario decidir qué tratamiento es el adecuado para eliminar esta contaminación. El agente antimicrobiano, además de agente antioxidante, más empleado en bodega es el dióxido de azufre (Du Troit, Pretorius, & Lonvaud-Funel, 2005), que es capaz de inhibir el crecimiento de un gran número de bacterias y de levaduras, y a su vez permite el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* si se adiciona en concentraciones dentro de los límites permitidos.

El dióxido de azufre es un producto problemático debido a las reacciones alérgicas que causa en algunos consumidores, por lo que se han propuesto otras alternativas durante los últimos años para combatir *Brettanomyces* en vinos, como por ejemplo el quitosano. Se trata de un derivado polisacárido con más de 5000 unidades de glucosamina, obtenido a partir de paredes de hongos y de la quitina mediante desacetilación. Es favorable para la eliminación de contaminantes orgánicos y minerales, permite combatir *Brettanomyces* y presenta acción antifúngica.

El uso de dicarbonato de dimetilo (DMDC) es otro ejemplo, siendo más activo frente a las levaduras que el SO<sub>2</sub> porque mata las células, mientras que el SO<sub>2</sub> sólo inhibe su crecimiento manteniéndolas en estado VBNC (Viable But Non Culturable). Las dosis dependen de la levadura que se pretende combatir (*Brettanomyces*: 150 mg/L) y de la población de células (para poblaciones mayores de 10<sup>6</sup> UFC/ml, la dosis máxima autorizada no es efectiva).

Tal y como se ha mencionado anteriormente, *Brettanomyces* representa un gran problema durante el envejecimiento en barrica, por lo que estas necesitan un cuidado especial debido a la dificultad de su limpieza y porque son prácticamente imposibles de esterilizar una vez contaminadas por los microorganismos alterantes (Boulton, Singleton, Bisson, & Kunkee, 1996). A pesar de los avances tecnológicos que se han producido en el sector vitivinícola, los métodos de desinfección de las barricas han cambiado poco y se siguen empleando los tratamientos químicos habituales y se ha demostrado que los lavados con agua caliente no son efectivos para el control de *Brettanomyces* (Yap, Schmid, Jiranek, Grbin, & Bates, 2008)

Evitar la aparición de *Brettanomyces* es difícil, por lo que es necesario encontrar una herramienta que permita detectar su presencia en etapas tempranas de su desarrollo y otra herramienta que permita eliminarlas. Se ha comprobado que la alteración organoléptica del vino aparece cuando la población de estas levaduras supera el nivel de 10<sup>3</sup> UFC/ml. Por debajo de esa concentración el metabolismo de la levadura estaría activo pero no produciría compuestos alterantes a niveles detectables (Hernandez & Barbero, 2007).

La citometría de flujo (citómetro de flujo + test específicos) puede ser empleada para la detección preventiva de *Brettanomyces*, así como para realizar controles de calidad de los tratamientos empleados para la eliminación de estas levaduras. Este análisis posibilita el control de diferentes acciones realizadas en las bodegas, así como la eficacia de los tratamientos en tiempo real: ajustar el sulfitado y la dosis de otros productos antimicrobianos, evitar las contaminaciones cruzadas al realizar coupages de vinos, controlar la eficacia de filtraciones, la esterilidad en el embotellado... etc.

En definitiva, entre la procedencia del campo y las contaminaciones en la propia bodega, son raras las vinificaciones en las que *B. bruxelliensis* está totalmente ausente. Por eso lo que se intenta no es eliminarlo totalmente, sino evitar su multiplicación y bloquear su metabolismo (Lonvaud-funel, Renouf, & Strehaiano, 2010)

## Detección de *Brettanomyces bruxellensis*

Las levaduras de la especie *Brettanomyces bruxellensis*, al contrario que las levaduras responsables de la FOH del mosto, están caracterizadas por un crecimiento lento y una actividad fermentativa baja. Puede crecer en los medios de cultivo habituales de levaduras (MEA, YPD), pero si se desea aislarlas del vino, es necesario emplear medios de cultivo diferenciales que impidan el crecimiento de otras levaduras más activas que impiden el desarrollo de las colonias de *Brettanomyces* (Navascués López, 2009).

Sin embargo, estos medios de cultivo diferenciales requieren periodos de cultivo prolongados y únicamente cuantifican células viables y metabólicamente activas. Sin embargo, las técnicas de biología molecular han permitido el desarrollo de nuevos métodos que permiten una identificación más rápida y específica.

### Medios de cultivo sólidos

Esta técnica permite determinar la concentración de células de una muestra, pero uno de sus mayores problemas es que *Brettanomyces* presenta un crecimiento lento y muy frecuentemente se encuentra en medios densamente poblados por otras levaduras más activas, en especial *Saccharomyces* (Fugelsang P. , 1998). Considerando las características bioquímicas de esta levadura, diversos trabajos propusieron diferentes medios de cultivo selectivos para la detección y cuantificación de *Brettanomyces* viables en vinos (Alguacil, y otros, 1998). Se considera la inclusión de ácidos hidroxicinámicos en el medio, en especial el ácido p-cumárico, precursor del 4-etilfenol y principal responsable de la aparición del defecto olfativo típico del "carácter Brett". Los medios selectivos suelen incluir un indicador de pH que permite una identificación positiva por el viraje del color. Actualmente se conoce la capacidad de *Brettanomyces* para utilizar el etanol como fuente de carbono (Rodrigues, Gonçalves, Pereira da Silva, Malfeito-Ferreita, & Loureiro, 2001), por lo que se adiciona para el diseño de un medio diferencial. Se emplean también antimicrobianos inhibidores de bacterias Gram-positivas, Gram-negativas, mohos y levaduras *Saccharomyces*, empleando principalmente la ciclohexamida porque se conoce la especial resistencia de *Brettanomyces* a concentraciones elevadas de este antibiótico (Kurtzman, Fell, & Boekhout, 2011).

La siembra en medios selectivos diferenciales es sin duda el método menos costoso y más sencillo para detectar y cuantificar *Brettanomyces* en el vino, pero no detecta levaduras en estado VBNC (Viable But Non Culturable), lo que se traduce en falsos negativos. Otro inconveniente de la técnica es que requiere un largo periodo de incubación (1 a 2 semanas).

Entre los medios sólidos más empleados destacan: AZ23 (Oenodev), BSM (Bacterial Standard Medium) (Millipore Corp.) y DBDM (Differential Brettanomyces Dekkera Medium) (Rodrigues, Gonçalves, Pereira da Silva, Malfeito-Ferreita, & Loureiro, 2001).

### Medios de cultivo líquidos

Existen también medios líquidos, como por ejemplo Sniff Brett, que permiten la detección de *Brettanomyces* por el olor generado debido a la conversión del 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, Palomero, Morata, Calderón, & Suárez-Lepe, 2009).

El medio de cultivo contiene los nutrientes adecuados para el desarrollo de levaduras y moléculas precursoras de los aromas de etil-fenoles volátiles y es líquido debido a que en medio líquido se desarrollan mejor los microorganismos VBNC, evitando así falsos negativos.

El protocolo a seguir es muy sencillo y consta únicamente de 4 pasos. Comienza con una toma de muestra estéril en el depósito o barrica, seguido de la adición de 20 ml de la muestra dentro del frasco "Sniff-brett". A continuación, se pone en incubación durante 10 días preferiblemente a 30°C. Se realizan lecturas a los 2, 6, 8 y 10 días y se considera que hay *Brettanomyces* en la muestra cuando el medio está turbio o al detectarse olores pútridos (Dolmar Productos Enológicos, 2018). La aparición de turbidez o mal olor tendrá lugar en menor tiempo cuanto mayor sea la concentración inicial de *Brettanomyces*.

Las ventajas de estos medios de cultivo son su rapidez en la detección de contaminaciones, su bajo coste y la sencillez de su método. Sin embargo, en caso de detectar una débil contaminación, es preferible analizar rápidamente el depósito mediante un test microbiológico clásico para mayor precisión en los recuentos de la levadura.

#### Métodos de biología molecular

Diversos trabajos proponen métodos basados en técnicas de biología molecular para tratar de eliminar los problemas de tiempo en la detección y cuantificación de *Brettanomyces* en vinos. Por un lado podemos encontrar 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 *Brettanomyces bruxellensis* (Stender, y otros, 2001). La ventaja de este método es su sencillez y especificidad, sin requerir lisis celular debido a que las sondas atraviesan la pared de la célula.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una alternativa específica, rápida y sensible para la detección rápida de estas levaduras. Para ello, se propone una amplificación aleatoria de DNA polimórfico (RAPD-PCR) para la diferenciación de cepas de *Brettanomyces* a partir de vinos (Mitrakul, Henick-Kling, & Egli, 1999).

Sin ninguna duda, el método de biología molecular más empleado en la detección de *Brettanomyces* es la PCR en tiempo real o cuantitativa (qPCR), ya que permite no solo la detección rápida y específica de las células de estas levaduras, sino además su cuantificación. La detección directa de *Brettanomyces* en vino mediante qPCR se basa en la extracción del DNA de la muestra de vino y emplear unos primers específicos para *Brett* (Olguín, Esteve-Zaroso, Rozés, Mas, & Guillamón, 2006). Uno de los principales problemas de estos métodos de detección y cuantificación de *Brettanomyces* en vinos tintos es que la elevada presencia de polifenoles y demás sustancias colorantes inhiben la reacción en cadena de la enzima Taq-polimerasa (Phister & Mills, 2003).

## Citometría de flujo

La citometría de flujo es una técnica cuantitativa y cualitativa de análisis y separación de partículas (células, bacterias, cromosomas, orgánulos, etc.), capaz de medir de forma casi instantánea (30 minutos) múltiples parámetros.

El fundamento de la citometría de flujo consiste en hacer pasar las células alineadas por delante de un láser y medir la luz emitida por cada una de las células a medida que lo atraviesa. De esta forma, el sistema mide el grado de dispersión de la luz (indicador del tamaño, forma o estructura de la célula). Además, si se emplean reactivos que tiñan las células con fluorescencia, el láser excita estas células proporcionando información biológica adicional relacionada con cada partícula individual (por ejemplo, si la célula está dañada o si su estructura está intacta) (Andrés Vaquero, 2009). Los citómetros de flujo empleados en esta determinación constan de diversas partes: un rayo láser, un sistema de flujo que contiene la preparación a analizar, diferentes detectores lumínicos y fluorescentes y un sistema electrónico de registro de la información.

En la Figura 2 se muestra un esquema del funcionamiento del citómetro. Cuando la muestra pasa por el capilar se irradia con un láser que puede ser verde, azul o violeta. Los dispositivos de detección permiten obtener información según los ángulos formados respecto al haz incidente:

- Ángulos cercanos a  $180^\circ$ : Cuando una célula atraviesa el haz de luz, provoca una penumbra longitudinal al láser. Esta penumbra es proporcional al tamaño de la célula y se puede detectar colocando un receptor luminoso en el recorrido del láser. Este estudio se denomina Forward Scatter Channel (FSC).
- Ángulos de  $90^\circ$ : Los orgánulos intracelulares provocan difracciones en el haz de luz. El nivel de esta difracción de luz será proporcional al contenido de orgánulos de la célula. Estos haces de luz pueden detectarse colocando un receptor lumínico perpendicularmente al láser. Este parámetro se conoce como Side Scatter Channel (SSC).
- Fluorescencia: Se emplea un anticuerpo específico (en este caso producido a partir de *Brettanomyces*). Los anticuerpos específicos tendrán conjugado el mismo fluorocromo (molécula capaz de absorber fotones y emitir fotones de menor energía y mayor longitud de onda), y se unirán de forma específica a un antígeno. Si la célula no posee el antígeno concreto, el anticuerpo no podrá unirse y por lo tanto la célula no emitirá fluorescencia de ese color. Puede haber uno o más detectores de fluorescencia (530 nm, 578 nm...).

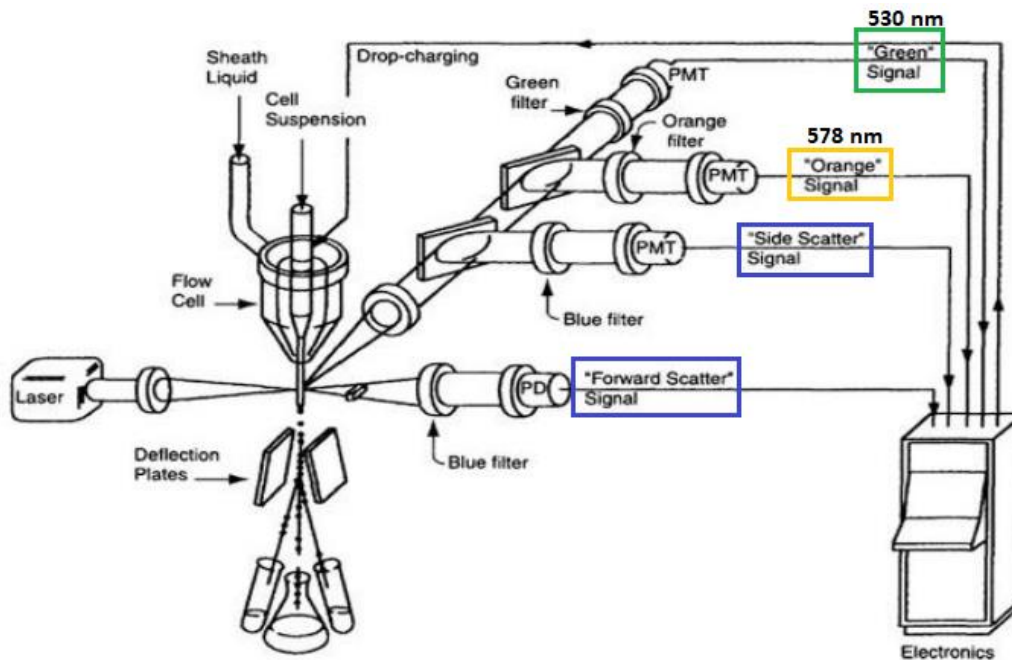


Figura 2: Esquema de funcionamiento de un citómetro de flujo (Givan, 2013)

Son numerosas las aplicaciones de la citometría de flujo, siendo las más importantes las siguientes (Laguado, 2007):

- **Citometría de flujo en microbiología clínica:** La citometría de flujo es una herramienta fundamental en microbiología ya que combina la detección directa y rápida de microorganismos, el estudio de su tamaño y de otras características bioquímicas y fisiológicas de una población o de células individuales. Hoy en día, la citometría de flujo ha mostrado ser de gran utilidad en la detección o identificación de microorganismos como *Staphylococcus aureus*, *Plasmodium*, *Cyclospora*, diferentes familias de virus como *Baculoviridae*, *Herpesviridae*, *Myoviridae*, *Picornaviridae*, *Retroviridae*, *Chlamydia* y *Rotavirus*, bacterias como *Leptospira*, *Salmonella*, *Listeria*, *E. coli*, *Francisella tularensis* y hongos de varias especies.
- **Citometría de flujo en microbiología industrial:** La citometría de flujo no solo se usa en muestras clínicas, sino que también es aplicable a muestras ambientales y de alimentos, siendo una aplicación muy frecuente en el monitoreo de la calidad de los productos lácteos, ya que requiere un análisis detallado de la carga microbiana.
- **Citometría de flujo en análisis ambientales:** También es aplicada en la degradación de hidrocarburos, ya que se ha demostrado que esta degradación se produce mayormente por microorganismos del suelo o agua donde estos han sido derramados. La citometría de flujo permite la identificación y el estudio de la capacidad de adaptación y evolución de las diferentes comunidades de bacterias capaces de degradar hidrocarburos.
- **Citometría de flujo en veterinaria:** La aplicación más importante de la citometría en veterinaria se basa en los estudios de la respuesta inmune de infecciones económicamente relevantes para: a) la fabricación de vacunas; b) la mejora de las vacunas ya existentes; c) la mejora genética de especies bovinas y equinas; d) el desarrollo de modelos de respuesta inmune en animales como primates no humanos.
- **Citometría de flujo en enología:** La principal aplicación en el ámbito de la enología es en la detección rápida y específica de *Brettanomyces*. Además, gracias a la



inmuncitometría se ha elaborado recientemente un método de detección específico para estas levaduras, indicando su presencia y su viabilidad.

- **Inmuncitometría**

**Levadura total: Levia test (Amarok Biotechnologies)**

Este kit de citometría permite el recuento de levaduras totales mediante un marcador de viabilidad que absorbe en el rango del láser azul y emite en el verde. Las levaduras con fluorescencia verde son las viables, las que tengan poca fluorescencia están dañadas y las que no emitan se consideran muertas (Genty, 2017).

Una levadura con una gran vitalidad será muy activa en la fermentación, mientras que una levadura agotada no podrá realizar esta actividad. El principio de detección de este método se basa en la actividad enzimática de las levaduras vivas y su capacidad para expulsar un colorante con un mecanismo activo.

En una muestra con levaduras viables y activas, el empleo del kit de *Levia test* dará lugar a levaduras viables fluorescentes que al cabo de 15 minutos dejarán de emitir esta fluorescencia debido a que, al ser activas, habrán eliminado el compuesto fluorescente. En cambio, en una muestra de levaduras viables pero agotadas, al añadir el reactivo del kit de *Levia test*, dará lugar a levaduras viables fluorescentes, pero al cabo de 15 minutos, estas levaduras seguirán emitiendo fluorescencia debido a que, al estar agotadas, no han sido capaces de eliminar el compuesto fluorescente. Esto se muestra en la Figura 3:

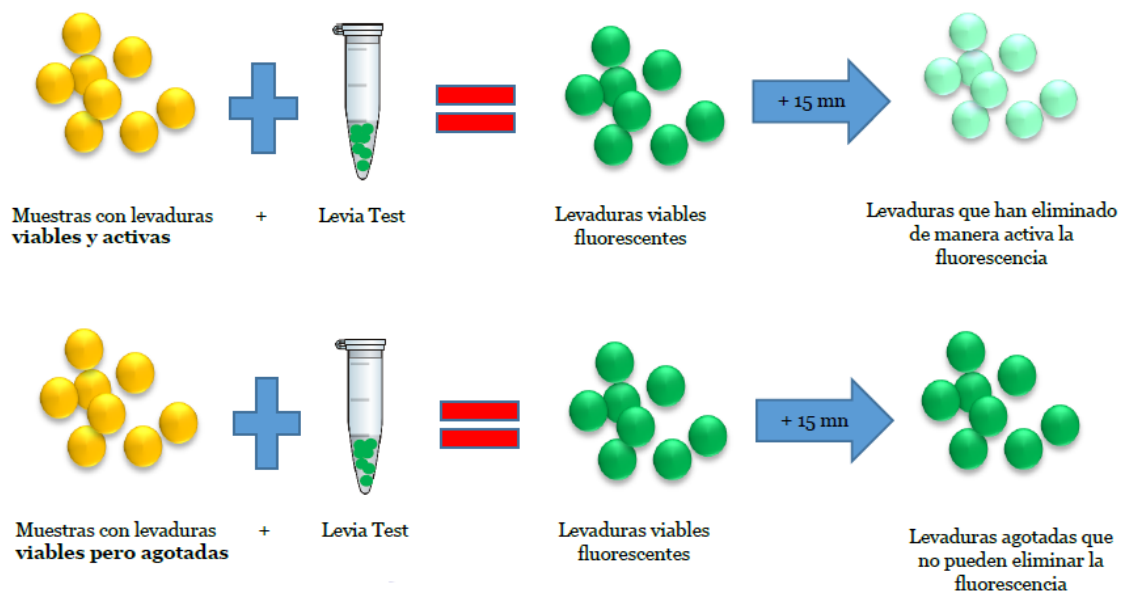


Figura 3: Esquema de funcionamiento del kit Levia test para recuento y medición de la vitalidad de las levaduras. (Manual de usuario de kit Levia test de Amarok Biotechnologies).

Se trata de un método rápido, se realiza en unos 30 minutos y se pueden realizar unos 12 análisis por hora sin ser necesario personal altamente cualificado. Tampoco es necesario un calibrado del equipo ni la elaboración de una recta patrón y puede realizarse en la propia bodega y de forma confidencial.



### **Recuento de *B. bruxellensis*: *Bretta test* (Amarok Biotechnologies)**

Este kit de citometría permite conocer el recuento de *B. bruxellensis* y su viabilidad. Mediante un anticuerpo selectivo de esta levadura, acoplado a un segundo anticuerpo que emite amarillo por fluorescencia, se consigue una señal amarilla si la célula está marcada con el anticuerpo. Las células que tengan fluorescencia amarilla y verde son *B. bruxellensis* vivas, y las que tengan fluorescencia verde pero no amarilla son levaduras vivas diferentes de *B. bruxellensis* (Chaillet, Martin, & Genty, 2014).

Este método se realiza en 1h20min, tampoco necesita personal altamente cualificado ni calibrado del equipo y puede realizarse en la propia bodega y de forma confidencial.

Las ventajas de *Bretta test* sobre las técnicas conocidas hasta ahora son las siguientes (S.L.U. & Amarok Biotechnologies, 2018):

- **Cultivos microbiológicos:** El tiempo medio para obtener un resultado confirmado de recuento de levaduras es de 5 a 7 días y las levaduras viables no cultivables (VBNC) no son contabilizadas. Sin embargo, *Bretta test* caracteriza en sólo 2 horas el conjunto de levaduras viables y viables no cultivables.
- **Microscopía:** Este método requiere mano de obra especializada y sólo un bajo número de células pueden ser identificadas. En cambio, *Bretta test* junto con citometría de flujo permite enumerar varios miles de células en pocos segundos e identificar pequeñas poblaciones.
- **PCR:** Este método es más específico, pero necesita laboratorios organizados en un flujo de trabajo unidireccional, ya que no se realiza la extracción en el mismo lugar que la amplificación. Además, también tiene dificultad en la distinción entre levaduras vivas y muertas aparte de ser la técnica más cara. Sin embargo, *Bretta test* es un método específico a un precio asequible y capaz de identificar las *Brettanomyces* viables y viables no cultivables.

Tanto *Levia test* como *Bretta test* son métodos baratos, rápidos y sencillos para poner de manifiesto que el vino está exento de levaduras o microorganismos. Supone una importante inversión inicial ya que el precio del citómetro de flujo es de 45.000€ sin IVA, pero la inversión inicial resulta rentable si se pretenden realizar numerosos análisis debido a que permite ahorrar en análisis externalizados. El material fungible de *Levia/Bretta test* supone un coste de menos de 1€/análisis, y los reactivos de *Levia test* tienen un precio de 2.39€/análisis y *Bretta test* 16.50€/análisis.

Externalizar una qPCR, por ejemplo, tiene un precio de más de 100€/muestra. Por lo tanto, una vez amortizada la inversión realizada al comprar el citómetro de flujo, saldrá mucho más económico realizar *Levia test* y *Bretta test* en la propia empresa. Además, permite ahorrar en tratamientos en bodega, ya que disponer de un citómetro de flujo y reactivos de *Levia* y *Bretta test* en la empresa, permite realizar análisis de los vinos en cualquier momento y así optimizar las operaciones y evitar tratamientos innecesarios.

La preocupación de la Compañía Vinícola del Norte de España (CVNE) por los vinos almacenados con problemas de *Brettanomyces*, le llevó a contactar con la empresa Amarok Biotechnologies para hacer pruebas con el citómetro en la vendimia 2019. Por ello se realizaron análisis de vinos en fermentación en octubre que confirmaron la presencia de estas

levaduras en esta etapa y el riesgo que suponían para la calidad de los vinos. Por ello, la bodega se planteó adquirir el equipo para disponer de una estrategia de seguimiento de los vinos en cualquier momento de la vinificación.

## OBJETIVOS

El objetivo inicial que se planteó para este Trabajo Fin de Grado fue la validación de la citometría de flujo para la cuantificación de levaduras *Brettanomyces* como un método más rápido y eficaz que otros métodos de cuantificación (medio de cultivo específico DBDM, sniff-Brett, qPCR y MALdit-off). Debido al confinamiento por la crisis de covid-19 no ha sido posible realizar los análisis comparativos pertinentes entre las diferentes técnicas, y por ello, con los datos obtenidos antes de marzo, se ha elaborado esta memoria.

El objetivo final de este Trabajo Fin de Grado es estudiar la aplicación de la citometría de flujo como herramienta para la toma de decisiones en bodega en relación con la presencia de levaduras *Brettanomyces*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Citometría de flujo:

#### **Citómetro de flujo Guava EasyCyte (Luminex)**

Las muestras de vino se analizaron utilizando un citómetro de flujo Guava EasyCyte (Luminex) (Figura 3). Este instrumento está equipado con un láser de 488 nm, 160 mW y un detector *forward scatter* (FSC, para el tamaño celular) y otro *side scatter* (SSC, para la granularidad). La fluorescencia verde se obtiene utilizando un filtro de 525 nm ( $\pm 30$  nm) y la fluorescencia amarilla se obtiene empleando un filtro de 583 nm ( $\pm 26$  nm). El software utilizado fue el Guavasoft 3.3.



Figura 4: Citómetro de flujo Guava EasyCyte (Luminex). ([www.luminexcorp.com](http://www.luminexcorp.com))

#### **Levia test (Amarok Biotechnologies)**

Este kit permite el recuento de levaduras totales mediante un colorante de viabilidad.

Se siguió el protocolo de 30 minutos detallado a continuación:

Las muestras de vino se filtraron mediante un filtro de 30  $\mu\text{m}$  para evitar obturar el capilar del citómetro. Se centrifugaron 1.5 mL a 500 g durante 5 minutos y se añadió el tampón del kit *Levia test* (Amarok Biotechnologies). A continuación, se añadió el colorante fluorescente de dicho kit y se incubó 20 minutos en eppendorfs negros, impidiendo el paso de la luz, y a temperatura ambiente antes de pasar la muestra por el citómetro de flujo (velocidad lenta, volumen 100  $\mu\text{L}$ , umbral en la fluorescencia verde: 10).

Las levaduras viables emitirán fluorescencia verde. Las levaduras que emitan una intensidad de fluorescencia por debajo de  $10^1$  serán consideradas levaduras débiles que no producirán problemas de contaminaciones, las levaduras que emitan fluorescencia por encima de  $10^1$  serán consideradas activas, las cuales podrían provocar contaminaciones futuras, y las levaduras que no emitan fluorescencia serán consideradas no viables/muertas.

Para realizar los blancos se empleó el tampón que se incubó con el reactivo 20 minutos en la oscuridad.

### **Bretta test (Amarok Biotechnologies)**

Este kit permite el recuento de *B. bruxellensis* mediante la adición de un anticuerpo primario que se une a un anticuerpo secundario fluorescente (amarillo). También se mide el estado fisiológico mediante un marcador de viabilidad. El protocolo seguido de 1 hora 20 minutos de duración fue el siguiente:

Las muestras de vino se filtraron con un filtro de 30  $\mu\text{m}$  para evitar obturar el capilar. Se centrifugaron 1.5 mL a 500g durante 5 minutos y se añadió el tampón *Bretta test* suministrado por Amarok Biotechnologies. Se incubó la muestra con un anticuerpo primario durante 20 minutos en la oscuridad y a temperatura ambiente. A continuación, se centrifugó nuevamente y se añadió el anticuerpo secundario fluorescente y el marcador de viabilidad (*Bretta test*). Pasados 15 minutos de incubación en la oscuridad y a temperatura ambiente, se leyó la muestra en el citómetro de flujo (velocidad media, volumen: 130  $\mu\text{m}$ , umbral en el tamaño: 10).

Las levaduras viables emitirán fluorescencia verde. Las levaduras que emitan fluorescencia por debajo de  $10^2$  serán consideradas levaduras débiles que no producirán problemas de contaminaciones, las levaduras que emitan fluorescencia por encima de  $10^2$  serán consideradas activas, las cuales podrían provocar contaminaciones futuras, y las levaduras que no emitan fluorescencia serán consideradas no viables/muertas. Si además de emitir fluorescencia verde por encima de  $10^2$ , emiten también fluorescencia amarilla, serán *Brettanomyces*.

### **Análisis de los vinos:**

El grado alcohólico, acidez total y pH de los vinos se analizó con un FOSS WineScan. Se trata de un analizador FTIR, es decir, se realiza una espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier, que se fundamenta en la absorción de radiación infrarroja por las moléculas en vibración del mosto o vino. Cada molécula presenta un espectro infrarrojo característico, lo que provoca la absorción de determinadas longitudes de onda. Analizando qué longitudes de onda son absorbidas, se puede saber qué moléculas componen el mosto/vino.

En CVNE disponen de 2 analizadores FOSS. Uno se encuentra en la zona de las tolvas, en el que se realizan los análisis de los mostos, tanto en controles de maduración como en muestras tomadas. El segundo se encuentra en el laboratorio y es utilizado para vinos casi secos. El FOSS WineScan se muestra en la Figura 5.



Figura 5: FOSS WineScan ([www.scancotec.com](http://www.scancotec.com))

### Muestras analizadas:

Los mostos empleados en este trabajo proceden de la variedad Tempranillo de 4 fincas propias de CVNE. La vendimia se realizó de forma manual en palots de 200kg y se llevó a la bodega, donde se llevó a cabo una selección de las uvas gracias a una mesa de selección con tecnología de visión óptica y posteriormente se encubó en depósitos de 15.000L.

El día 5 de octubre de 2019 se realizó la vendimia de la finca Pasadillas (Cidamon) y parte de la finca Vareta A (Briones). Se obtuvieron 14.112 L de mosto que se encubaron en un único depósito.

Desde el día 6 hasta el día 9 de octubre continuó la vendimia de la finca Vareta A, obteniéndose un total de 78.496 L de mosto, repartiéndose en 6 depósitos de 15.000 L.

El día 10 de octubre se realizó la vendimia de la finca Caballeros (Rodezno), de la cual se obtuvieron 11.923 L de mosto que se encubaron en un único depósito.

Por último, entre el día 10 y el día 13 de octubre se realizó la vendimia de la finca Almendros, obteniéndose un total de 53.593 L de mosto, que se encubaron en 5 depósitos diferentes.

Los litros exactos y la finca de la que procede la uva de cada depósito se muestran en la Tabla1.

*Tabla 1: Litros de mosto, fecha de llenado y procedencia de la uva de los depósitos.*

DEPÓSITO	LITROS	FECHA LLENADO	PROCEDENCIA
H0504	14.112	05/10/2019	Finca Pasadillas (Cidamon) + Finca Vareta A (Briones)
H0505	13.428	06/10/2019	Finca Vareta A (Briones)
H0506	12.613	06/10/2019	Finca Vareta A (Briones)
H0507	13.020	08/10/2019	Finca Vareta A (Briones)
H0508	13.050	08/10/2019	Finca Vareta A (Briones)
H0509	12.981	09/10/2019	Finca Vareta A (Briones)
H0525	13.404	09/10/2019	Finca Vareta A (Briones)
H0526	11.923	10/10/2019	Finca Caballeros (Rodezno)
H0527	11.654	10/10/2019	Finca Almendros (Cidamon)
H0528	9.908	10/10/2019	Finca Almendros (Cidamon)
H0529	11.470	11/10/2019	Finca Almendros (Cidamon)
H0530	11.417	12/10/2019	Finca Almendros (Cidamon)
H0531	9.144	13/10/2019	Finca Almendros (Cidamon)

El 17 de octubre de 2019 se tomaron muestras de cada uno de los depósitos en botellas de cristal de 500 ml de capacidad y se analizaron los mostos siguiendo el protocolo de trabajo desarrollado por la compañía Amarak Biotechnologies, empleando el recuento de *Brettanomyces* mediante *Bretta test*.

Tras la fermentación alcohólica, los vinos se sangraron y los orujos se prensaron. A continuación, se llevó a cabo la fermentación maloláctica.

Una vez terminada dicha fermentación maloláctica, los vinos se sulfitaron y filtraron. Después se siguió el protocolo de Amarok Biotechnologies, empleando el recuento de levaduras totales mediante *Levia test* para comprobar que se habían eliminado las levaduras. En el caso de haber contenido los vinos cantidades elevadas de levaduras, se habría procedido a realizar *Bretta test* con el fin de saber si dichas levaduras eran *Brettanomyces* y podrían producir problemas de contaminación por etilfenoles durante la crianza de los vinos.

Una vez filtrados y sulfitados los vinos, y sabiendo que la concentración de levaduras era nula, se realizaron análisis para conocer el pH, acidez total y grado alcohólico de los vinos mediante métodos infrarrojos usando el FOSS WineScan.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Recuento de *Brettanomyces* activas durante fermentación alcohólica

Los análisis de los mostos en fermentación se realizaron mediante *Bretta test*, que permite conocer el número de levaduras totales, levaduras activas y *Brett* activas junto al porcentaje de estas respecto de las levaduras activas (Tabla 2). Los análisis se realizaron el día 17 de octubre, por lo que los mostos se encontraban en fermentación alcohólica.

Se observan cantidades de levaduras activas en los mostos del orden de  $10^6 - 10^7$  células/ml. Estas cantidades tan elevadas se pueden explicar debido a que la uva transporta en el hollejo gran cantidad de levaduras (entre ellas *Brettanomyces*), que llegan a la bodega desde el viñedo. Además, a estas levaduras que llegan desde el campo, se suman las levaduras que se inoculan en la bodega para llevar a cabo la fermentación alcohólica y las generadas durante la fermentación alcohólica.

Se pueden observar en la tabla unas cantidades de *Brettanomyces* extremadamente elevadas, del orden de  $10^5 - 10^6$  células/ml. Sin embargo, la fermentación alcohólica no es una fase en la que *Brettanomyces* suela causar dificultades, a no ser que los mostos se encuentren poco sulfitados. Estas levaduras podrían comenzar a desarrollarse al comienzo de la fermentación, pero pronto serán eclipsadas por *Saccharomyces cerevisiae* por lo que no suponen una importante preocupación en esta fase (Algarrada, 2001).

Los resultados obtenidos permitieron a la empresa saber que la uva procedente de sus viñedos propios entra en la bodega con una enorme cantidad de *Brettanomyces*. Además, permitió a la bodega estar prevenidos en el caso de una ralentización de la fermentación, ya que si esto hubiera ocurrido, en lugar de administrar pequeñas cantidades de oxígeno al vino para reactivar las levaduras *Saccharomyces*, la idea era realizar una nueva siembra de *Saccharomyces* bien activas, ya que la aireación del vino podría haber provocado el desarrollo de *Brettanomyces* sobre *Saccharomyces* debido a que estas se adaptan mejor a condiciones de elevado grado alcohólico que *Saccharomyces* y pueden utilizar la trealosa procedente de la autólisis de las levaduras como nutrientes (Navascués, 2019).

Gracias a estos análisis, también supieron que era importante que la fermentación maloláctica comenzase inmediatamente después de la fermentación alcohólica, ya que había riesgo de que *Brettanomyces* proliferara en el caso de un arranque tardío de esta fermentación maloláctica.

Una vez descubados y trasegados los vinos, comienza la fermentación maloláctica, en la que se vigilan las temperaturas, pero no es necesario su control ya que permanecen estables durante el proceso.

La medida más importante que se tomó gracias a estos análisis fue el filtrado y sulfitado de los vinos al finalizar la fermentación maloláctica para eliminar la mayor parte de las levaduras. Una vez realizados el filtrado y sulfitado, en enero, se realizaron análisis de *Levia test* para comprobar que el resultado es óptimo. En el caso de obtener recuentos de *Brettanomyces* positivos, se realizaría una adición de quitosano pero no fue el caso.

Realizar análisis mediante *Bretta test* a los mostos en fermentación sirve sobre todo para conocer la población de levaduras activas que están presentes en dicha fermentación, que podrán ser responsables de contaminaciones del vino en fases posteriores de la vinificación.

Al conocer las altas poblaciones de *Brettanomyces* que contenían los mostos, se establecieron protocolos de limpieza de las instalaciones más estrictos. Los equipos de entrada de uva, junto



con la despalladora-estrujadora se limpiaron con agua a presión para limpiar las superficies y, a continuación, se desinfectaron espolvoreando ácido tartárico en estado sólido mientras los equipos se encontraban en funcionamiento. Otra posibilidad era añadir una solución sulfurosa con un pulverizador en lugar de ácido tartárico. La limpieza de los depósitos se realizó con una disolución de sosa.

Tabla 2: Recuento de levaduras totales, levaduras activas, *Brettanomyces* activas y porcentaje de *Brettanomyces* activas durante la fermentación alcohólica empleando Brett test de Amarok Biotechnologies.

<b>BRETTATEST 17/10/2019</b>						
<b>Fecha análisis</b>	<b>Depósito</b>	<b>Fecha Llenado</b>	<b>Levaduras totales</b>	<b>Levaduras activas</b>	<b>Brett activas</b>	<b>Brett activas/Lev. activas (%)</b>
17/10/2019	H0504	05/10/2019	9,57E+06	7,55E+06	3,19E+06	42,27
17/10/2019	H0505	06/10/2019	3,60E+06	3,23E+06	3,35E+05	10,39
17/10/2019	H0506	06/10/2019	3,33E+06	2,08E+06	4,45E+05	24,41
17/10/2019	H0507	08/10/2019	1,09E+07	8,97E+06	5,00E+06	55,78
17/10/2019	H0508	08/10/2019	5,50E+06	4,62E+06	5,33E+05	11,55
17/10/2019	H0509	09/10/2019	1,03E+07	9,76E+06	1,12E+06	11,46
17/10/2019	H0525	09/10/2019	8,05E+06	7,47E+06	1,30E+06	11,47
17/10/2019	H0526	10/10/2019	1,22E+07	1,07E+07	4,56E+05	4,25
17/10/2019	H0527	10/10/2019	1,34E+07	1,27E+07	4,31E+05	3,39
17/10/2019	H0528	10/10/2019	3,79E+06	3,27E+06	4,43E+05	13,55
17/10/2019	H0529	11/10/2019	1,64E+07	1,62E+07	1,57E+07	0,97
17/10/2019	H0530	12/10/2019	8,49E+06	6,76E+06	6,44E+05	9,53
17/10/2019	H0531	13/10/2019	1,39E+07	1,34E+07	3,89E+05	2,9

El software empleado para esta determinación permite obtener los recuentos de forma gráfica, lo que resulta más visual y facilita la interpretación de los datos. En las Figuras 5, 6, 7 y 8 se muestran las gráficas de los depósitos H0506, H0507, H0508 y H0529, que muestran las diferencias de población más evidentes.

La gráfica a) se trata del gráfico tamaño/estructura (abscisas/ordenadas). La zona delimitada por el polígono rojo rodea las levaduras viables. Los puntos de color rojo corresponden a *Brettanomyces*, si son de color amarillo son levaduras débiles en general y si son de color verde son levaduras diferentes de *Brettanomyces*.

La gráfica b) es un gráfico de fluorescencia verde. Las levaduras que emitan esta fluorescencia serán levaduras viables. El polígono rojo delimita las levaduras que emiten fluorescencia por encima de  $10^2$ , lo que corresponde a las levaduras activas que podrían suponer un peligro en el futuro. Por debajo de este límite ( $10^2$ ) se consideran levaduras débiles, que en el caso de ser *Brettanomyces* no producirán alteraciones organolépticas de los vinos en el futuro.

El gráfico c) es el gráfico de estructura en función de la fluorescencia amarilla de las levaduras activas (las que emiten fluorescencia verde mayor de  $10^2$ ). Las células rojas son *Brett* (emiten fluorescencia amarilla), las verdes no lo son y las que están en los límites del polígono tienen parentesco con *Brett*, pero no lo son.

En la Figura 6 se muestran las gráficas de recuento de *Brettanomyces* del depósito H0506. En este caso se observan  $3.33 \cdot 10^6$  levaduras viables, de las cuales  $2.08 \cdot 10^6$  son activas, y de estas  $4.45 \cdot 10^5$  son *Brett* activas. Estas *Brett* activas suponen un 21.41% frente a las levaduras activas.

En la gráfica a) podemos observar como predominan los puntos verdes sobre los puntos rojos, lo que parece indicar que, de todas las levaduras viables presentes en el mosto, habrá mayor cantidad de levaduras no *Brettanomyces* que levaduras *Brettanomyces*. Lo mismo ocurre en la gráfica b), ya que también se observan mayores cantidades de puntos verdes que corresponden a levaduras no *Brettanomyces*.

Por último, la gráfica c) es la más importante, ya que es la que muestra las *Brettanomyces* activas. En este caso, el 21.41% de las levaduras activas del mosto son *Brettanomyces* potencialmente activas ( $4.45 \cdot 10^5$  *Brett* activas/ml, una cantidad muy elevada). En el momento de fermentación del mosto no suponen peligro, pero sabiendo que a partir de una concentración de  $10^3$  UFC/ml *Brettanomyces* es capaz de producir alteraciones organolépticas, habrá que tener mucho cuidado en las fases posteriores de la vinificación.

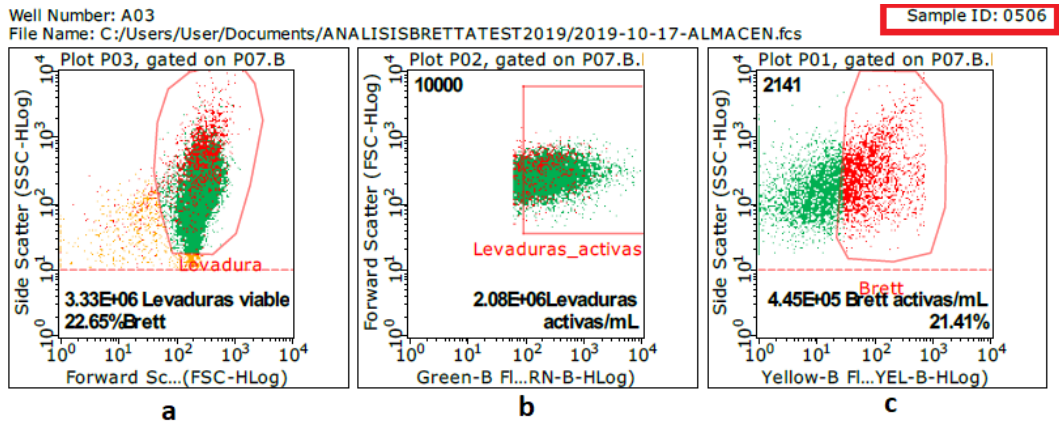


Figura 6: Recuento de *Brettanomyces* (*Bretta test*) del depósito H0506 durante fermentación alcohólica.

Lo mismo ocurre con el depósito H0507 que se muestra en la Figura 7. En este caso, se observan manchas rojas mucho más grandes que en el caso anterior, lo que permite suponer de forma rápida que el depósito H0507 tendrá un porcentaje mucho mayor de *Brettanomyces* que el depósito H0506. Esto se puede comprobar después observando los datos numéricos obtenidos en la analítica, observando que el mosto contiene  $1.09 \cdot 10^7$  levaduras viables/ml, de las cuales  $8.97 \cdot 10^6$  son activas y  $5 \cdot 10^6$  son *Brett* activas, suponiendo un 55.78% de las levaduras activas.

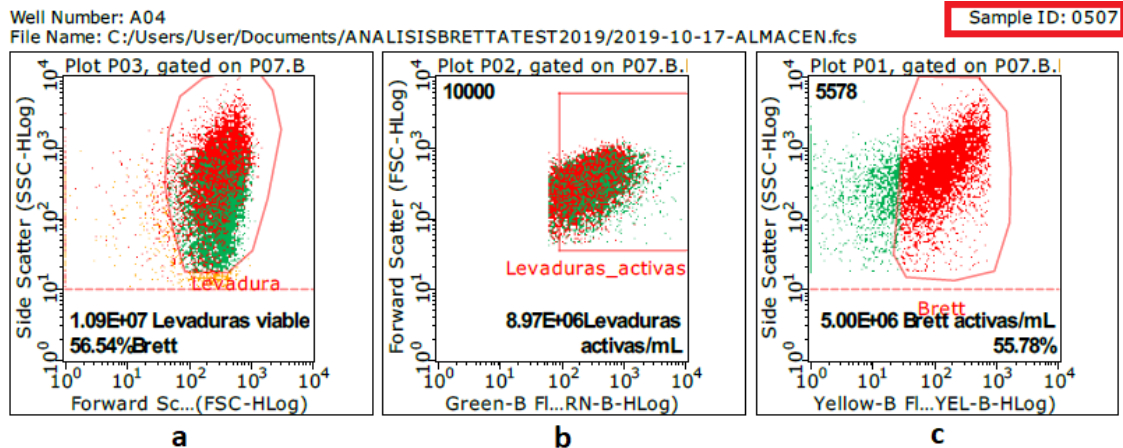


Figura 7: Recuento de *Brettanomyces* (*Bretta test*) del depósito H0507 durante fermentación alcohólica.

En la Figura 8 se muestra la gráfica de los recuentos del depósito H0508. Este caso se observan más puntos verdes que rojos tanto en la gráfica a) como en la gráfica b). Además, se observa mucha menor concentración de puntos rojos (*Brett* activas) en la gráfica c), que se confirma al ver que sólo el 11.55% de las levaduras activas del mosto son *Brett* activas.

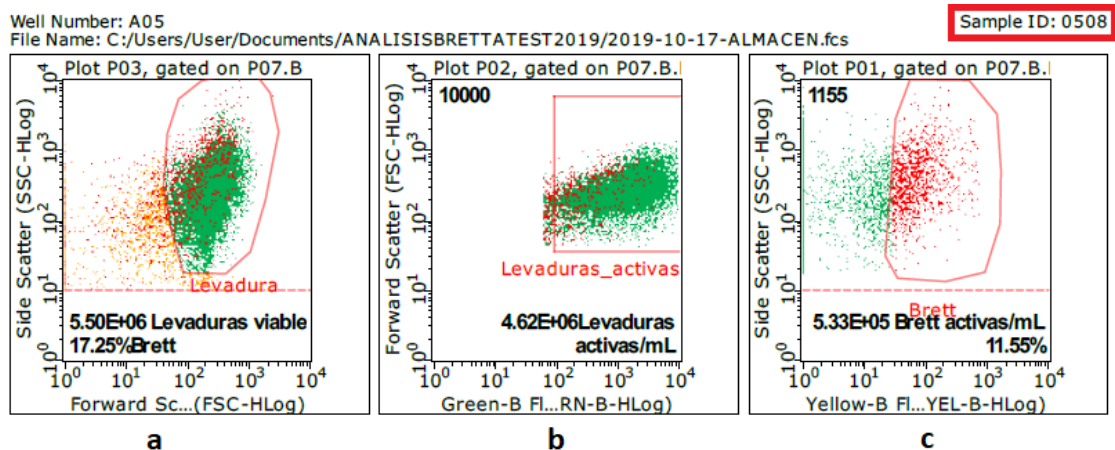


Figura 8: Recuento de *Brettanomyces* (*Bretta test*) del depósito H0508 durante fermentación alcohólica.

Por último, se muestran en la Figura 9 las gráficas de los recuentos del depósito H0529. En este caso se observa cómo las levaduras delimitadas por los polígonos rojos tanto en la gráfica a) como en la gráfica b) son prácticamente verdes, lo que significa que la mayoría de las levaduras que contiene el mosto son diferentes de *Brettanomyces*. En la gráfica c) se puede observar cómo tan solo el 0.97% de las levaduras activas son *Brettanomyces* activas. No obstante, este mosto contiene  $1.57 \cdot 10^5$  *Brett* activas/ml, por lo que, aunque en fermentación alcohólica no suponga problemas, en fases posteriores de la vinificación sí que podría producir alteraciones organolépticas en los vinos, por lo que habrá que tomar precauciones.

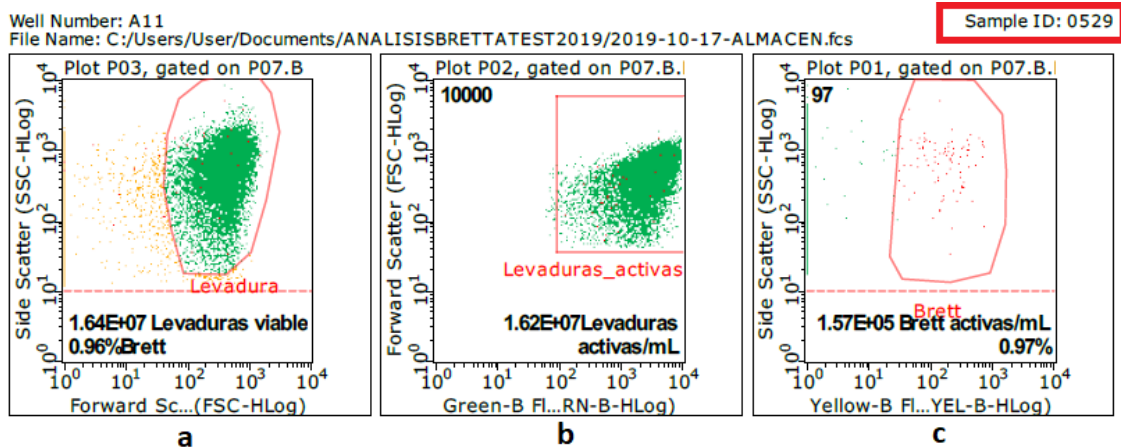


Figura 9: Recuento de *Brettanomyces* (*Bretta test*) del depósito H0529 durante fermentación alcohólica.

Como se ha podido observar, *Bretta test* permite conocer la población exacta de levaduras totales, activas y *Brettanomyces* activas en cualquier momento de la vinificación y gracias a las gráficas que proporciona el método, se puede ver fácil y rápidamente qué depósitos supondrán mayores peligros de contaminación en las fases posteriores a la fermentación.

En este caso, los recuentos de *Brettanomyces* de todos los depósitos analizados contienen más de  $10^3$  levaduras/ml que, aunque en mostos en fermentación no suponen riesgo de contaminación, si lo supondrán más adelante. Gracias a *Bretta test* la bodega pudo prevenir de forma mucho más eficiente las contaminaciones posteriores, controlando el final de las fermentaciones alcohólicas y comenzando inmediatamente después las fermentaciones malolácticas para evitar la proliferación de *Brettanomyces*. También se controlaron de forma

muy rigurosa las fermentaciones malolácticas para proceder al filtrado y sulfitado de los vinos una vez finalizada dichas fermentaciones, eliminando así prácticamente la totalidad de las levaduras contenidas en el vino.

### Recuento de levaduras activas al finalizar la FML, después de filtrado y sulfitado

Una vez terminada la fermentación maloláctica, los vinos se filtraron y sulfitaron para eliminar las levaduras presentes en el vino con el fin de evitar posteriores contaminaciones microbiológicas. Esta vez, en lugar de realizar el control microbiológico con *Bretta test*, se empleó *Levia test*. Se empleó este método ya que es más económico que *Bretta test* y al haberse filtrado y sulfitado los vinos, se supuso que la concentración de levaduras presentes en estos sería muy baja o nula y, por lo tanto, la población de *Brettanomyces* sería también nula y no supondría peligro de futuras alteraciones organolépticas.

*Levia test* proporciona recuentos de las levaduras totales presentes en los vinos, además de las levaduras vivas y las levaduras muertas o débiles que no supondrían peligro para la estabilidad del vino. Los resultados de los recuentos obtenidos con *Levia test* se muestran en la Tabla 3.

Para comenzar, se puede observar cómo las poblaciones de levaduras viables se han reducido considerablemente, pasando de poblaciones del orden de  $10^6 - 10^7$  levaduras/ml en los mostos en fermentación a poblaciones del orden de  $10^2 - 10^3$  levaduras totales/ml. No obstante, interesan más los recuentos de levaduras activas (columna LEV. ACTIVAS/ml), donde se puede observar que en ninguno de los depósitos se superan las 50 levaduras/ml (o el 4% de levaduras activas si se mira en porcentaje).

Al igual que con *Bretta test*, el software empleado permite obtener gráficas de los análisis realizados con *Levia test* para observar más fácilmente los recuentos de levaduras obtenidos.

Tabla 3: Recuento de levaduras totales, levaduras activas y porcentaje de levaduras muertas tras la fermentación maloláctica, filtrado y sulfitado de los vinos mediante Levia test de Amarok Biotechnologies.

VINOS FDOS DESPUES DE F.MALOLÁCTICA						
FECHA	LOCAL. INICIAL	TEST VIVO MUERTO LEV. TOTALES/ml	LEV. ACTIVAS/ml		MUERTAS	VALORACIÓN
17/01/2020	H0508	1926,87	49,92	2,07%	97,93%	BAJA POBLACIÓN ACTIVA
17/01/2020	H0509	3743,93	39,94	0,80%	98,93%	MUY BAJA POBLACIÓN ACTIVA
17/01/2020	H0504	1886,95	29,95	1,59%	98,41%	BAJA POBLACIÓN ACTIVA
21/01/2020	H0505	171,24	5,71	3,33%	96,67%	MUY BAJA POBLACIÓN VIABLE
21/01/2020	H0506	451,29	0,00	0,00%	100%	SIN POBLACIÓN ACTIVA
21/01/2020	H0507	273,19	0,00	0,00%	100%	SIN POBLACIÓN ACTIVA
21/01/2020	H0527	3522,29	5,05	0,14%	99,86%	MUY BAJA POBLACIÓN ACTIVA
21/01/2020	H0528	558,99	5,76	1,03%	98,97%	BAJA POBLACIÓN ACTIVA
21/01/2020	H0529	2257,13	29,16	1,29%	98,71%	BAJA POBLACIÓN ACTIVA
21/01/2020	H0530	1718,07	40,63	2,36%	97,64%	BAJA POBLACIÓN ACTIVA
21/01/2020	H0531	564,44	0,00	0,00%	100%	SIN POBLACIÓN ACTIVA
21/01/2020	H0525	215,73	0,00	0,00%	100%	SIN POBLACIÓN ACTIVA
21/01/2020	H0526	141,88	0,00	0,00%	100%	SIN POBLACIÓN ACTIVA



Se muestran a continuación las gráficas obtenidas de los análisis de *Levia test* realizados a los vinos contenidos en los depósitos H0506, H0507, H0508 y H0529.

La gráfica a) corresponde a la gráfica tamaño/estructura (abscisas/ordenadas). En la zona delimitada por el polígono rojo se encuentran las levaduras. Los puntos rojos son levaduras activas, los puntos amarillos son levaduras débiles que no supondrán peligro y los puntos negros corresponden a otro tipo de células.

La gráfica b) muestra un histograma de fluorescencia verde (levaduras viables). Las levaduras que emiten fluorescencia por encima de  $10^1$  son consideradas levaduras activas y las que emiten por debajo de  $10^1$  no se cuentan ya que son levaduras débiles que no causarán problemas en el futuro.

La gráfica c) es el gráfico de fluorescencia verde. A la izquierda de la línea roja se muestran las levaduras muertas y a la derecha las levaduras vivas. Esta gráfica sólo aparece en el depósito H0508.

En la Figura 10 se observan los recuentos de levaduras totales del depósito H0508. Se puede observar que la filtración y el sulfitado del vino resulta un método eficaz para eliminar levaduras. Se observa en la gráfica a) cómo el polígono rojo no contiene prácticamente ningún punto rojo, que correspondería a levaduras activas, sino que son todos negros o amarillos. En el histograma que se muestra en la gráfica b), se observa como el 100% de la población de levaduras se encuentra en la zona que corresponde a levaduras débiles, que son levaduras que están a punto de morir y no supondrán peligro de contaminaciones posteriores del vino.

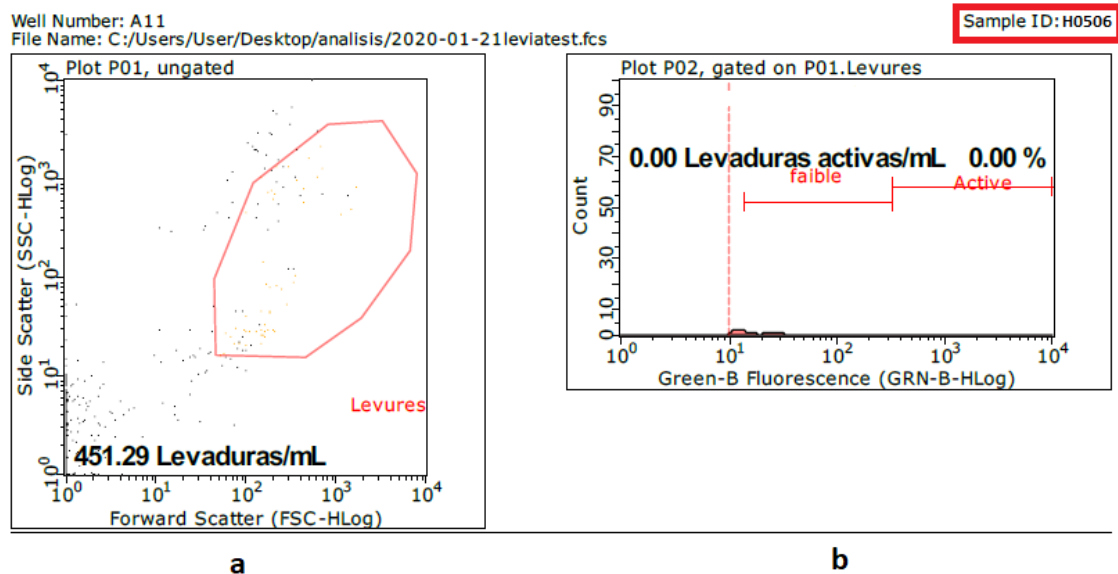


Figura 10: Recuento de levaduras totales (*Levia test*) del depósito H0506.

En la Figura 11 ocurre lo mismo que en el caso anterior. El polígono rojo de la gráfica a) no contiene prácticamente levaduras, y además muy pocas de ellas son activas. Esto se comprueba en la gráfica b), donde se observa un pico de población de levaduras débiles y un 0% de levaduras activas.

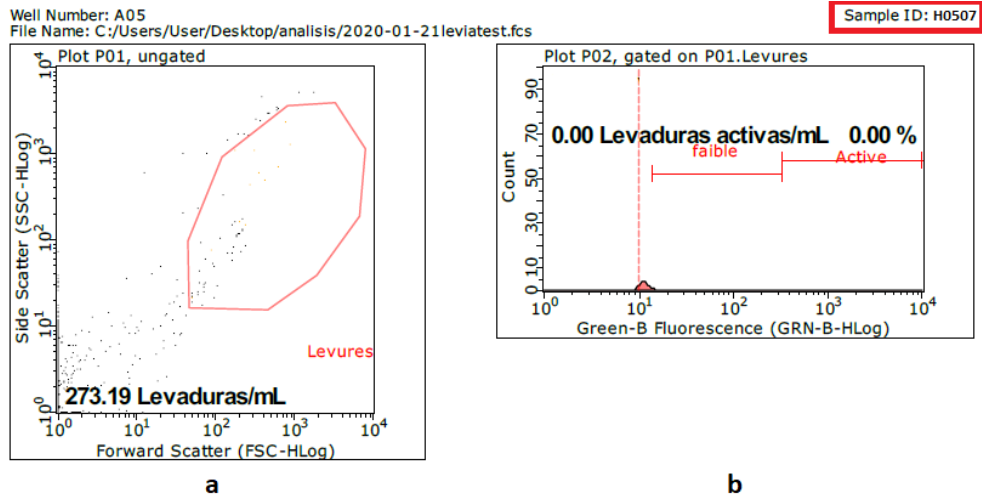


Figura 11: Recuento de levaduras totales (Levia test) del depósito H0507.

En la Figura 12 se presentan los recuentos de levaduras totales y activas del depósito H0508. En este caso se observan diferencias respecto de los casos anteriores. En la gráfica a) se puede observar como hay una mayor cantidad de puntos negros en el exterior del polígono rojo, lo que indica que esta muestra contiene mayor cantidad de células diferentes de levaduras. Además, dentro del polígono se pueden observar más puntos rojos que en los casos anteriores, por lo que se presupone que la cantidad de levaduras activas de esta muestra es mayor que en los depósitos ya comentados.

En la gráfica b) se puede observar como la mayor parte de las células presentes en la muestra emiten fluorescencia verde por debajo de  $10^1$ , por lo que se consideran levaduras débiles que no supondrán riesgo de contaminaciones futuras, quedando un porcentaje de levaduras activas muy bajo.

Por último, en la gráfica c) se puede observar el recuento en base a la fluorescencia verde, considerando las células que emiten fluorescencia verde por encima de  $10^1$  como activas y las que emiten por debajo como muertas. En este caso se observa como la mayor parte de las levaduras contadas se encuentran a la izquierda de la línea roja, por lo que son levaduras muertas. Esto se puede comprobar con los resultados numéricos obtenidos del análisis, comprobando que tan solo un 2.07% (49.92 células/ml) son levaduras activas.

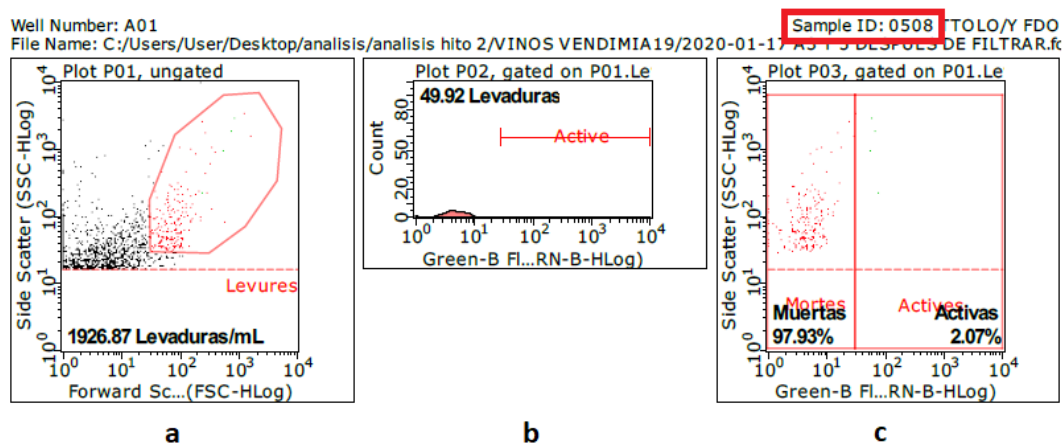


Figura 12: Recuento de levaduras totales (Levia test) del depósito H0508.

Por último, se muestran en la Figura 13 las gráficas obtenidas en el recuento de levaduras totales del depósito H0529. En este caso se observa cómo el polígono rojo del gráfico a) contiene una mayor cantidad de puntos que en el caso anterior. Con los datos numéricos de la Tabla 4 se puede comprobar que el vino de este depósito contiene una mayor concentración de levaduras que en los casos anteriores (2257.13 levaduras/ml). Sin embargo, gracias al histograma de la gráfica b), se puede ver fácilmente que casi el 100% de estas levaduras son levaduras muertas, teniendo la muestra tan solo 29.16 levaduras activas/ml, lo que corresponde a un 1.29% de las levaduras totales.

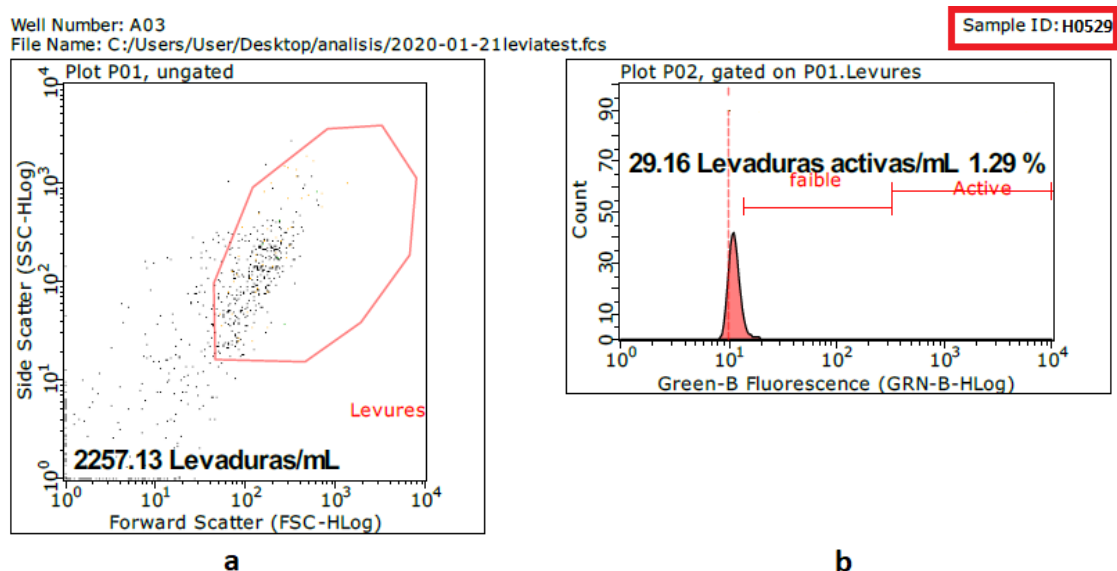


Figura 13: Recuento de levaduras totales (Levia test) del depósito H0529.

Gracias a *Levia test* se pudo comprobar que el filtrado y posterior sulfitado de los vinos conseguía eliminar las enormes poblaciones de levaduras, y sobre todo de *Brettanomyces*, que se habían detectado en los mostos en fermentación. Además, al proporcionar el software los recuentos de forma gráfica, resulta mucho más sencillo y visual detectar cuales son las muestras que contienen una mayor cantidad de levaduras.

Al haber obtenido poblaciones de levaduras activas prácticamente nulas en todos los depósitos, no fue necesario realizar análisis complementarios de *Bretta test*, ya que en el caso de que alguna de las levaduras activas en los vinos fuera *Brettanomyces*, las poblaciones de estas serían tan bajas que no habría riesgo de desviaciones organolépticas. No obstante, durante la crianza de los vinos en bodega, es conveniente realizar análisis de *Bretta test* para prevenir contaminaciones en el caso de que estas levaduras comenzaran a reproducirse.

### Características analíticas de los vinos estudiados

Una vez filtrados y sulfitados los vinos, y sabiendo que la concentración de levaduras era nula, se realizaron análisis para conocer el grado alcohólico, pH y acidez total de los vinos. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 4.

Todos los vinos obtenidos poseen un grado alcohólico elevado, con una acidez adecuada ya que los pHs se encuentran en torno a 3.5, aunque la acidez total de algunos de estos vinos podría considerarse baja, siendo lo más común encontrar vinos con una acidez total superior a 4 g/L de ácido tartárico. Además, se realizaron análisis organolépticos de todos los vinos, en los que no se detectaron defectos, lo que avala la eficacia del control realizado.

*Tabla 4: Resultados del análisis final de los vinos tras la fermentación maloláctica, filtrado y sulfitado.*

<b>DEPÓSITO</b>	<b>GRADO ALCOHÓLICO (% vol.)</b>	<b>pH</b>	<b>ACIDEZ TOTAL (g/L tartárico)</b>
<b>H0504</b>	15	3.57	3.77
<b>H0505</b>	14.9	3.45	3.57
<b>H0506</b>	14.8	3.41	3.61
<b>H0507</b>	15	3.48	3.68
<b>H0508</b>	14.8	3.41	3.45
<b>H0509</b>	14.7	3.44	3.46
<b>H0525</b>	14.7	3.52	3.98
<b>H0526</b>	15	3.42	3.68
<b>H0527</b>	14.5	3.52	4.21
<b>H0528</b>	14.5	3.51	4.07
<b>H0529</b>	14.9	3.48	4.14
<b>H0530</b>	14.8	3.52	3.47
<b>H0531</b>	14.7	3.36	3.89

### Etapas en las que aplicar la metodología durante la vinificación

Son numerosas las etapas de la vinificación en las que se puede aplicar la Inmunocitometría, obteniendo información sobre el estado microbiológico de los vinos en todo momento, lo que permite una mejora en la toma de decisiones, la realización de controles de calidad de todos los procesos deseados y una optimización de tiempo y recursos. Además, supone una reducción de costes ya que solo se realizan los tratamientos justos y realmente necesarios.

En la Figura 14 se muestran las etapas de la vinificación donde se considera más importante la realización de análisis con *Levia test* y *Bretta test*.

La uva que llega a la bodega procede de campos históricamente limpios de *Brett*. Esta uva se estruja y se lleva a depósitos para llevar a cabo la fermentación alcohólica. A mitad de fermentación alcohólica, sería conveniente realizar un análisis con *Bretta test*. Si el porcentaje de *Brett* es bajo, no habrá de qué preocuparse, pero si supera el 30%, podría ser peligroso y habrá que tomar precauciones en las etapas posteriores.

En el caso de ser necesario un pie de cuba, gracias a *Levia test*, se pueden validar proveedores y encontrar los inóculos de mejor calidad, optimizar la cantidad de inóculo necesario, reduciendo gastos de producto y mano de obra necesaria.

Una vez terminada la fermentación alcohólica, se procede al descube y prensado. Las prensas tendrán mayor riesgo de contaminación ya que *Brettanomyces* se encuentra sobre todo en el hollejo. Por ello, el vino prensa se filtra.

Además, también sería conveniente analizar la población de *Brett* de los vinos descubados. En el caso de contener poblaciones elevadas de esta levadura, se procedería a un filtrado para reducir su cantidad y posteriormente se llevaría a cabo la fermentación maloláctica.

Una vez terminada dicha fermentación maloláctica, el vino se trasiega a otro depósito y se sulfita. A continuación, podría realizarse un *Levia test*, y en el caso de tener una población nula de levaduras, este vino podría trasegarse a una barrica para llevar a cabo la crianza. En el caso de contener levaduras, este debería filtrarse, y cuando se compruebe (mediante *Levia test*) que la población de levaduras es nula, puede procederse a la crianza en barrica.

Gracias a *Bretta test*, podría llevarse a cabo la crianza sobre lías de los vinos, ya que podemos analizar estas lías y conocer la población de *Brettanomyces* de estas. En el caso de tener el vino un bajo porcentaje de *Brett* activas, se podría realizar este tipo de crianza.

Cada mes de crianza sería conveniente realizar análisis de *Bretta test* ya que nos permitirá saber si *Brettanomyces* se está reproduciendo y puede generar contaminación por fenoles en estos vinos. También sería conveniente realizar controles con *Levia test* antes del embotellado para asegurar la esterilidad del vino.

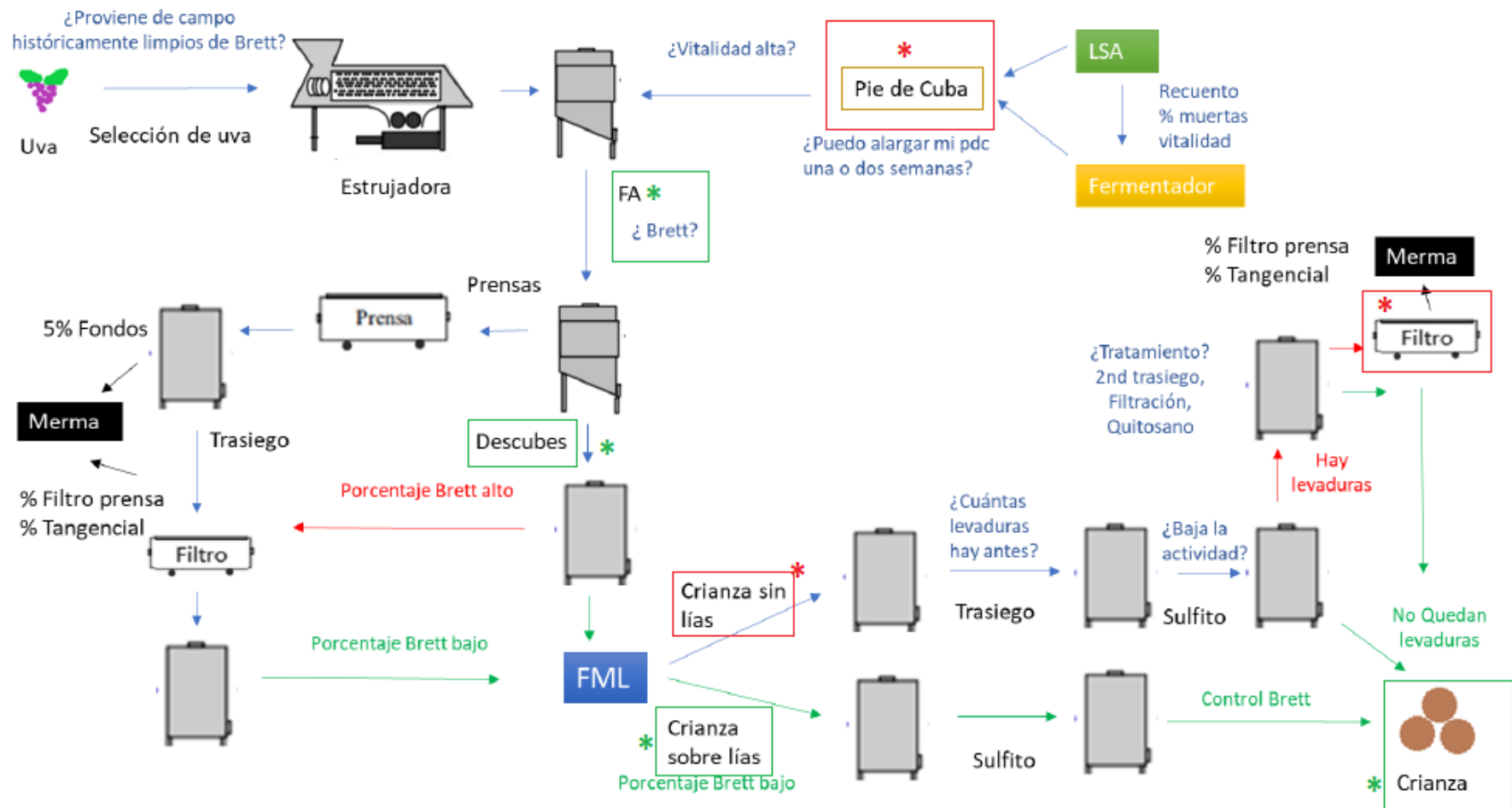


Figura 14: Diagrama de flujo del proceso de vinificación. Los asteriscos rojos indican etapas en las que sería conveniente realizar Levia test y los asteriscos verdes indican etapas en las que sería conveniente realizar Brett test.

## CONCLUSIONES

1. La citometría de flujo combinada con marcaje inmunológico es un método eficiente para la detección y cuantificación de *Brettanomyces* en mostos y vinos, permitiendo monitorizar su presencia y eliminación después de los tratamientos de desinfección más habituales en bodega.
2. Los análisis mediante *Bretta test* realizados a los mostos en fermentación permitieron conocer la enorme población de *Brettanomyces* que llegaba a las instalaciones de la bodega desde el viñedo. Al conocer estas altas poblaciones de *Brett*, se establecieron protocolos de limpieza de las instalaciones más estrictos y se trató de evitar la proliferación de estas levaduras durante las etapas posteriores de la vinificación.
3. Los análisis de *Levia test* realizados a los vinos tras su fermentación maloláctica permitieron saber que la filtración y posterior sulfitado de los vinos eliminó prácticamente el 100% de las levaduras presentes.
4. *Levia test* y *Bretta test* son métodos aplicables en cualquier momento de la vinificación para controlar las levaduras tanto *Brett* como no *Brett*, evitando tratamientos de control de *Brettanomyces* innecesarios.
5. La citometría de flujo combinada con marcaje inmunológico es un método rápido (el procedimiento más largo dura 1h 20 min), sencillo (no necesita personal altamente cualificado) y barato (supone una gran inversión inicial, pero es rentable si se realizan numerosos análisis).

## REFERENCIAS

- Aguilar-Usanga, M., Escudero-Abarca, B., Gomez-Rodríguez, 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.
- Algarrada, M. A. (2001). *El Mundo Vino*. Obtenido de [http://elmundovino.elmundo.es/elmundovino/noticia.html?vi\\_seccion=4&vs\\_fecha=200103&vs\\_noticia=985933605](http://elmundovino.elmundo.es/elmundovino/noticia.html?vi_seccion=4&vs_fecha=200103&vs_noticia=985933605)
- Alguacil, M., Fidalgo, M., Jiménez, J., Lozano, J., Neva, M., & Perdignes, F. (1998). Detección de *Brettanomyces/Dekkera* en instalaciones de vendimia mediante PCR. *Alimentación, equipos y tecnología* 8, 81-85.
- Andrés Vaquero, J. (2009). *Centro de Medicina Regenerativa de Barcelona*. Obtenido de <https://www.cmr.eu/plataformas-tecnicas/citometria.html>
- Barata, A., Caldeira, J., Botelho, R., Pagliara, A., Malfeito-Ferreira, V., & Loureiro, V. (2008). Survival patterns of *Dekkera bruxellensis* in wines and inhibitory effect of sulphur dioxide. *International Journal of Food Microbiology*, 121, 201-207.
- Benito, S., Palomero, F., Morata, A., Calderón, F., & Suárez-Lepe, J. (2009). A method for estimating *Dekkera/Brettanomyces* populations in wines. *Journal of Applied Microbiology* 106, 1743-1751.
- Boulton, R., Singleton, V., Bisson, L., & Kunkee, R. (1996). *Principles and practices of winemaking*. New York, United States: Chapman & Hall.
- 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.
- Catania, C., & Avagnina, S. (2007). Los defectos del vino. En *Curso Superior de Degustación de Vinos*.
- Chaillet, L., Martin, G., & Genty, V. (2014). *Mise au point d'une méthode de détection des Brettanomyces par immunocytométrie*. AFC-SCI Congress.
- Chatonnet, P., Dubourdie, D., Boidron, J., & 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. Yeast and Lactic Acid Bacteria on the Ethylphenol Content of Red Wines*. American Society for Enology and Viticulture.
- Costello, P., & Henschke, P. (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*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 7079-7087.
- Custers, M. (1940). *Onderzoekingen over het gistgeslacht Brettanomyces*. Delft: Delft University.
- Deken, R. H. (1966). *The Cabtree Effects: A Regulatory System in Yeast*. J. Gen. Microbiol.



- Dolmar Productos Enológicos, S. (2018). *Dolmar*. Obtenido de [www.dolmarproductos.com](http://www.dolmarproductos.com)
- Du Troit, M., Pretorius, I., & 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.
- Fleet, G., & Heard, G. (1993). Yeasts-Growth during fermentation. En *Wine microbiology and biotechnology* (págs. 1-25). Singapore: Hartwood Academic Publisher.
- Fugelsang, K., & Edwards, C. (2007). *Wino Microbiology: Practical applications and procedures*. New York: Springer.
- Fugelsang, P. (1998). Brettanomyces: Dr Jekyll ou Mr Hyde des vins? *Biofutur* 182, 22-23.
- Genty, V. (2017). *Microbiología. Pilotaje de la fermentación alcohólica. Métodos de seguimiento en rutina*. Obtenido de [www.amarokbiotech.com](http://www.amarokbiotech.com)
- Givan, A. (2013). *Flow cytometry: first principles*. J. W. & Sons.
- Henick-Kling, T., Egli, C., Licker, J., Mitrakul, C., & Acree, T. (2000). Brettanomyces in wine. *Fifth International Symposium on Cool Climate Viticulture & Oenology*, (págs. 16-20). Melbourne, Australia.
- Hernandez, I., & Barbero, F. (Octubre - Diciembre de 2007). *Guserbiot S.L.* Obtenido de [guserbiot.com](http://guserbiot.com)
- Hernández, I., & Barbero, F. (Octubre-Diciembre de 2007). *Guserbiot S.L.* Obtenido de [guserbiot.com](http://guserbiot.com)
- Hidalgo Togores, J. (2003). *Tratado de Enología*. Ediciones Mundi-Prensa.
- Kurtzman, C., Fell, J., & Boekhout, T. (2011). *The yeasts: A taxonomic study*. London, Burlington, Sadn Diego: Elsevier B.V.
- Laguado, J. (2007). Aplicaciones de la citometría de flujo en microbiología, veterinaria y agricultura. *MVZ Córdoba*, 1077-1095.
- Licker, J., Acree, T., & Henick-Kling, T. (1998). What is "Brett" (Brettanomyces) flavor?: A preliminary. *Chemistry of Wine Flavor* 714, 96-115.
- Lonvaud-funel, A., Renouf, V., & Strehaiano, P. (2010). *Microbiologie du vin. Bases fondamentales et applications*. T. & D. Lavoisier.
- Loureiro, V., & Querol, A. (1999). The prevalence and control of spoilage yeasts in foods and beverages. *Trends in Food Sciences and Technology*, 10, 356-365.
- Malfeito-Ferreira, M. (2018). Two Decades of "Horse Sweat" Taint and Brettanomyces Yeasts in Wine: Where do We Stand Now? *Beverages*.
- Mansfield, A., Zoecklein, B., & Whiton, R. (2002). Quantification of glycosidase activity in selected strains of *Brettanomyces bruxellensis* and *Oenococcus oeni*. *American Journal of Enology and Viticulture*, 53, 303-307.

- Mitrakul, C., Henick-Kling, T., & Egli, C. (1999). Discrimination of *Brettanomyces*/*Dekkera* yeast isolates from wine by using various DNA finger-print methods. *Food Microbiology*, *16*, 3-14.
- Navascués López, E. (2009). BRETTANOMYCES/DEKKERA. Control y detección en bodega. *Revista Enología N°1*, 12-16.
- Navascués, E. (2019). Brettanomyces: Mejor prevenir que curar. Agrovín.
- Ocón, E., Garijo, P., Sanz, S., Olarte, C., López, R., Santamaría, P., & Gutiérrez, A. (2013). *Screening of yeast mycoflora in winery air samples and their risk of wine contamination*. Logroño: Elsevier Ltd.
- Olgún, N., Esteve-Zarzoso, B., Rozés, N., Mas, A., & Guillamón, J. (2006). Técnicas independientes de cultivo para la identificación y cuantificación de microorganismos en el vino. *Tecnología del Vino*, *36*, 62-67.
- Phister, T., & Mills, D. (2003). Real-time PCR assay for detection and enumeration of *Dekkera bruxellensis* in wine. *Applied and Environmental Microbiology*, *69*, 7430-7434.
- Renouf, V., Falcou, M., Miot-Sertier, C., Perello, M., De Revel, G., & Lonvaud-Funel, A. (2006). Interactions between *Brettanomyces bruxellensis* and other yeast species during the initial states of winemaking. *Journal of Applied Microbiology*, *100*, 1208-1219.
- 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.
- Romano, A., Perello, M., De Revel, G., & Lonvaud-Funel, A. (2008). Growth and volatile compound production by *Brettanomyces*/*Dekkera bruxellensis* in red wine. *Journal of Applied Microbiology* *104*, 1577-1585.
- S.L.U., S. a., & Amarok Biotechnologies. (2018). *Ventajas de Brett test sobre las técnicas actuales*.
- Snowdon, E., Bowyer, M., Grbin, P., & Bowyer, P. (2006). Mousy off-flavor: a review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *54*, 6465-6474.
- Sponholz, W. (1993). Wino spoilage by microorganisms. En *Wine Microbiology and Biotechnology* (págs. 395-420). Chur: Harwood Academic Publishers.
- Steensels, J., Daenen, L., Malcorps, P., Derdelinckx, G., Verachtert, H., & Verstrepen, K. (2015). *Brettanomyces* yeasts - From spoilage organisms to valuable contributors to industrial fermentations. *International Journal of Food Microbiology*.
- Stender, H., Kutzman, C., Hyldig-Nielsen, J., Sorensen, D., Broomer, A., Oliveira, K., . . . Coull, J. (2001). Identification of *Dekkera bruxellensis* (*Brettanomyces*) from wine by fluorescence in situ hybridization using peptide nucleic acid probes. *Applied and Environmental Microbiology*, 938-941.
- Suárez, R., Suárez-Lepe, J., Morata, A., & Calderón, F. (2007). The production of ethylphenols in wine by yeasts of the genera *Brettanomyces* and *Dekkera*: a review. *Food Chemistry*, *102*, 10-21.
- Trioli, G., & Hofmann, U. (2009). *Código de buenas prácticas vitivinícolas ecológicas*. ORWINE.

- Tubia, I., Prasad, K., Pérez-Lorenzo, E., Abadín, C., Zumárraga, M., Oyanguren, I., . . . et al. (2018). Beverage spoilage yeast detection methods and control technologies: A review of *Brettanomyces*. *International Journal of Food Microbiology*, 283, 65-76.
- Úbeda, J., & Briones, A. (1999). Microbiological quality control of filtered and non-filtered wines. *Food Control*, 10 (1), 41-45.
- Vigentini, I., Lucy Joseph, C., Picozzi, C., Foschino, R., & Bisson, L. (2013). *Assessment of the Brettanomyces bruxellensis metabolome during sulphure dioxide exposure*. Yeast Research.
- Yap, A., Schmid, F., Jiranek, V., Grbin, P., & 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.