



Universidad Nacional de Río Cuarto
Facultad de Ciencias Exactas Físico-Químicas y Naturales

**“Prevención de la aparición de defectos asociados a
Brettanomyces/Dekkera aplicando modelado de variables
predisponentes en vinos tintos”**

TESIS DOCTORAL EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Microbióloga María Elena STURM

Septiembre 2015

Trabajo presentado por la microbióloga María Elena Sturm para optar por el Título de Doctora en Ciencias Biológicas otorgado por la Universidad Nacional de Río Cuarto.

Directora:

Dra. Mariana COMBINA _____

Co-Directora:

Dra. María Laura RAMIREZ _____

Aprobado por:

Dra. Claudia RASPANTI _____

Dra. Marcela SANGORRIN _____

Dr. Fabio VAZQUEZ _____

Río Cuarto, Septiembre de 2015

Dedicado a
...Guille y a la bebé en camino
...a mis padres.

A Guille por estar incondicionalmente, por su estímulo y comprensión.

A mi familia por estar presentes y apoyarme en mis elecciones. Especialmente a mis padres por transmitirme buenos valores, por estar siempre a mi lado y por darme el regalo de la vida.

A Mariana y Laurita por acompañarme y guiarme en mi crecimiento como profesional y por sobre todo por su calidad de ser.

A mis compañeros de microbiología, de aromas y de la bodega por compartir trabajo, conocimiento, mates y alegrías en el transcurso de todo este proceso.

A Palala por su amistad y por recibirme y hacerme sentir siempre como en casa.

A Noé y al equipo del Instituto de la Grasa por su aporte para que pueda realizar una parte esencial de este trabajo.

A los miembros de la Comisión de Tesis por su participación, buena predisposición y seguimiento en los años que llevó este trabajo.

A la Universidad Nacional de Río Cuarto por permitirme una vez más avanzar en mi carrera profesional.

A INTA por darme la oportunidad de desarrollarme tanto personal como profesionalmente.

Título: Prevención de la aparición de defectos asociados a *Brettanomyces/Dekkera* aplicando modelado de variables predisponentes en vinos tintos.

Palabras clave: Microbiología predictiva, *Dekkera bruxellensis*, vinos, crecimiento, fenoles volátiles.

Autor: Microbiól. María Elena STURM

Directora: Dra. Mariana COMBINA

Co-Directora: Dra. María Laura RAMIREZ

Resumen

La alteración del vino por levaduras contaminantes representa un serio problema para la industria causando importantes pérdidas económicas. *Dekkera* spp ha sido descrita como la principal levadura contaminante de vinos tintos y está asociada con la detección de fenoles volátiles que le confieren al vino características organolépticas negativas asociadas con aroma animal, sudor de caballo, cuero o establo. Estos aromas provienen del metabolismo de los ácidos hidroxicinámicos (ácido *p*-cumárico y ferúlico) presentes en la uva, los cuales son decarboxilados a vinilfenoles y luego reducidos a etilfenoles. Estos últimos son compuestos muy volátiles y presentan un bajo umbral de percepción. La relación que existe entre el crecimiento de la levadura y la síntesis de fenoles volátiles en vinos es motivo de controversia. Una vez que el vino desarrolla el defecto, no es posible de eliminar sin reducir la calidad global del mismo. La forma más eficaz para controlar la aparición de defectos asociados a *D. bruxellensis* es previniendo su formación. Los modelos probabilísticos permiten obtener las interfaces de crecimiento/no crecimiento de microorganismos alteradores en función de los factores ambientales, representando una herramienta útil para prevenir el crecimiento de *Dekkera* en vinos. En el presente trabajo se identificaron las levaduras productoras de defecto en vinos tintos de Argentina y se demostró que *D. bruxellensis* era la única especie encontrada. Se diseñó un medio de cultivo simil-vino químicamente definido que permitió la obtención de resultados reproducibles en condiciones controladas, los cuales fueron luego exitosamente extrapolados a los vinos. Se caracterizaron las actividades cumarato decarboxilasa y vinilfenol reductasa de 5 cepas nativas de *D. bruxellensis* y se correlacionaron con la formación de fenoles volátiles, concluyendo que estas actividades no son indicadoras de la capacidad de la cepa para producir fenoles volátiles en condiciones simil-vino. Se evaluaron diferentes concentraciones de ácidos hidroxicinámicos precursores y se observó que una mayor concentración de ácidos hidroxicinámicos permite una mayor síntesis de fenoles volátiles por *D. bruxellensis* en condiciones simil-vino, independientemente de la cepa involucrada. Por otro lado, se caracterizó el crecimiento de la levadura y se determinó el momento en el cual se sintetizan los fenoles volátiles en condiciones simil-vino. La curva de crecimiento para las diferentes cepas mostró dos ciclos de desarrollo. En el primer ciclo de crecimiento se observó la completa transformación de los precursores a fenoles volátiles y, coincidentemente la mayor producción de etilfenoles. Paralelamente, se evidenció el consumo de todos los azúcares en esta etapa. Nuestro trabajo demostró que la síntesis de fenoles volátiles se produce durante el crecimiento activo de *D. bruxellensis* en condiciones simil-vino. Este resultado brindó las bases para desarrollar un modelo predictivo para *D. bruxellensis* en vinos, ya que inhibiendo su crecimiento se inhibe consecuentemente la formación de fenoles volátiles. Se determinó el límite de crecimiento/no crecimiento de *D. bruxellensis* en función del pH, SO₂ libre y etanol. Los niveles de las variables en estudio aplicadas de un modo combinado fueron: etanol (10-15 %, v/v), pH (3,4-4,0), SO₂ libre (0-50 mg/L) y tiempo (7, 14, 21 y 30 días). El análisis de los datos se realizó mediante un modelo logístico/probabilístico utilizando al tiempo como variable *dummy*, generando gráficos de superficie de respuesta. El modelo obtenido fue validado exitosamente en vinos. El modelo tiene una aplicación directa para la industria determinando las condiciones necesarias para inhibir el crecimiento de esta levadura en función de variables que pueden ser ajustadas durante la elaboración de un vino y permite determinar otras combinaciones de las variables limitantes en función de las necesidades de la industria.

Title: Prevention of the occurrence of defects associated with *Brettanomyces/Dekkera* applying modeling predisposing variables in red wines.

Keywords: Predictive microbiology, *Dekkera bruxellensis*, wine, growth, volatile phenols.

Author: Microbiól. María Elena STURM

Director: Dra. Mariana COMBINA

Co-Director: Dra. María Laura RAMIREZ

Abstract

Wine spoilage is a serious problem for the wine industry because it renders the product unacceptable and can lead to huge economic losses. *Dekkera* species has long been recognized as a common contaminant in wine. Wine spoilage by *D. bruxellensis* has been associated with production of volatile acidity and phenolic off-flavours described as horse sweat, band aid, barnyard and burnt plastic. The formation of these volatile phenols has been shown to be the result of the enzymatic transformation of phenolic (hydroxycinnamic) acids naturally present in grape and wine into vinylphenol derivatives through the action of a coumarate decarboxylase activity and then reduced to an ethyl derivative through a vinylphenol reductase enzyme. These volatile phenols, especially the ethylphenols, have a low sensorial threshold. The overall information about the growth of *D. bruxellensis* and phenols production appears to be sometimes contradictory. Once the wine develops the defect, it is not possible to remove it without reducing the overall quality. The most efficient way to prevent wine spoilage by *D. bruxellensis* is to control its development and ethylphenol production through winemaking management using a preventive approach. Probabilistic models have been widely used in predictive microbiology to obtain the growth/no growth interfaces of spoilage and pathogen microorganisms as a function of environmental factors and could be a good approach to prevent *Dekkera* growth in wines. During the present work we have demonstrated that *D. bruxellensis* was the only species present in spoiled red wines from Argentina. A chemically-defined 'wine-like' medium was design which allowed us to obtain reproducible results in controlled conditions that can be extrapolated, in this particular case, to yeast behavior in wine. The coumarate decarboxylase (CD) and vinylphenol reductase (VR) enzyme activities in 5 native *D. bruxellensis* strains was determined and also their relation with the production of ethylphenols under 'wine-like' conditions. We concluded that potential spoilage of wine by *D. bruxellensis* was more related to the ability of the strains to develop in the wine environment than the CD and VR enzymatic activity recorded in laboratory conditions. Different concentrations of hydroxycinnamic acid precursors were evaluated and we observed that at high concentration of hydroxycinnamic acids allow a high volatile phenol synthesis by *D. bruxellensis* in 'wine-like' conditions, regardless of the strain evaluated. On the other hand, the growth of yeast was characterized in order to determine the moment when volatile phenol were synthesized in 'wine-like' conditions. Growth of *D. bruxellensis* under 'wine-like' conditions showed two growth phases. Sugars were completely consumed during the first growth phase. Transformation of HCAs into ethylphenols also occurred during active growth of the yeast. According to this result, inhibition of growth of *D. bruxellensis* in wine seems to be the most efficient way to avoid ethylphenol production and the consequent loss of wine quality. We used a probabilistic model to determine the growth/no growth interfaces of the spoilage wine yeast *D. bruxellensis* as a function of ethanol (10–15 %, v/v), pH (3.4–4.0) and free SO₂ (0–50 mg/l) using time (7, 14, 21 and 30 days) as a dummy variable. Data analysis was performed using a logistic/probabilistic model using time as dummy variable, generating response surface graphics. The model obtained was successfully validated in wines. The model gives us a first indication of the growth probability of this spoilage yeast under wine conditions and could be a valuable tool for the wineries because it allows, as a function of the needs of the industry, estimating diverse combinations of the environmental variables which inhibit the growth of this species.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

Resumen	5
Abstract	6
1. Introducción	12
1.1. La vid y el vino	12
1.2. Las levaduras del vino	13
1.3. Levaduras contaminantes y defectos en los vinos	17
1.4. <i>Dekkera bruxellensis</i> -Taxonomía e identificación	19
1.5. Características fisiológicas de <i>Dekkera</i>	22
1.6. Defectos asociados a <i>Dekkera</i> en vinos	24
1.7. Control de <i>Dekkera</i> en vinos	28
1.8. Prevención de la contaminación con <i>Dekkera</i>	29
2. Hipótesis	32
3. Objetivos	33
4. Materiales y Métodos	34
4.1. Aislamiento e identificación de levaduras contaminantes provenientes de vinos tintos de Mendoza	34
4.2. Producción y adaptación de inóculo de <i>D. bruxellensis</i>	36
4.3. Diseño y elección de medios de cultivo simil-vino	38
4.4. Caracterización de la actividades enzimáticas relacionadas al metabolismo de los ácidos hidroxicinámicos y su relación con la producción final de fenoles volátiles en condiciones simil-vino en diferentes cepas de <i>D. bruxellensis</i>	39
4.4.1. Evaluación de la actividad cumarato decarboxilasa (CD) y vinilfenol reductasa (VR)	39
4.4.2. Producción de fenoles volátiles en medio simil-vino	40
4.4.2.1. Determinación de ácidos hidroxicinámicos	41
4.4.2.2. Determinación de vinilfenoles y etilfenoles	41
4.5. Relación entre la concentración de ácidos hidroxicinámicos precursores y la producción de etilfenoles en medio simil-vino	43
4.6. Determinación de la etapa del crecimiento de <i>D. bruxellensis</i> donde se sintetizan los fenoles volátiles en condiciones simil-vino	44
4.6.1. Análisis de fuentes de carbono, ácidos orgánicos y alcoholes	45
4.6.2. Análisis de ácidos hidroxicinámicos y fenoles volátiles	45
4.7. Desarrollo de modelo probabilístico de crecimiento/no crecimiento de <i>D. bruxellensis</i> en condiciones simil-vino	46

4.7.1. Microorganismo y medio de cultivo	46
4.7.2. Diseño experimental	46
4.7.3. Medición del crecimiento	47
4.7.4. Modelo logístico probabilístico y análisis estadístico	48
4.8. Validación del modelo predictivo	50
5. Resultados y Discusión	53
5.1. Aislamiento e identificación de levaduras contaminantes provenientes de vinos tintos de Mendoza	53
5.2. Producción y adaptación de inóculo de <i>D. bruxellensis</i>	55
5.3. Diseño y elección de medios de cultivo simil-vino	56
5.4. Caracterización de la actividades enzimáticas relacionadas al metabolismo de los ácidos hidroxicinámicos y su relación con la producción final de fenoles volátiles en condiciones simil-vino en diferentes cepas de <i>D. bruxellensis</i>	61
5.4.1. Evaluación de la actividad cumarato decarboxilasa (CD) y vinilfenol reductasa (VR)	61
5.4.2. Producción de fenoles volátiles en medio simil-vino	62
5.5. Relación entre la concentración de ácidos hidroxicinámicos precursores y la producción de etilfenoles en medio simil-vino	65
5.6. Determinación de la etapa del crecimiento de <i>D. bruxellensis</i> donde se sintetizan los fenoles volátiles en condiciones simil-vino	69
5.7. Construcción de modelo probabilístico de crecimiento/no crecimiento de <i>D. bruxellensis</i> en condiciones simil-vino	78
5.7.1. Modelo logístico global	79
5.7.2. Superficies de crecimiento/no crecimiento 3D	81
5.7.3. Perfiles de inhibición de crecimiento para cada factor individual	83
5.7.4. Interfaces de crecimiento/no crecimiento en función de dos variables	88
5.8. Validación del modelo predictivo	93
5.8.1. Medio de cultivo simil-vino (usado para crear el modelo)	93
5.8.2. Vino estéril inoculado	95
5.8.3. Vinos naturalmente contaminados con <i>Dekkera</i>	97
6. Conclusiones	99
7. Proyecciones	100
8. Bibliografía	101

ÍNDICE DE TABLAS

Materiales y Métodos

Tabla 1. Composición de los medios de cultivo simil-vino. 39

Tabla 2. Variables estudiadas con sus respectivos niveles. 44

Resultados y Discusión

Tabla 3. Identificación de levaduras aisladas en el medio selectivo para *Brettanomyces* mediante secuenciación del dominio D1/D2, del gen ribosomal 26S. 54

Tabla 4. Actividad CD y VR de cepas de *D. bruxellensis* y concentraciones de ácido *p*-cumárico residual y fenoles volátiles finales en medio de cultivo. 61

Tabla 5. Concentraciones de ácidos hidroxicinámicos y fenoles volátiles finales cuantificados en el medio simil-vino inoculado con las diferentes cepas de *D. bruxellensis*. 64

Tabla 6. Concentraciones de ácidos hidroxicinámicos y fenoles volátiles finales cuantificados en el medio simil-vino inoculado con las diferentes cepas de *D. bruxellensis*. 66

Tabla 7. Coeficientes del modelo logístico global ($p \leq 0,05$) con sus respectivas razones de probabilidad y valores estandarizados. 80

Tabla 8. Valores experimentales y valores predichos por el modelo para dos cepas de *D. bruxellensis* en medio simil-vino. 94

Tabla 9. Valores experimentales y valores predichos por el modelo para la cepa *D. bruxellensis* CH29 en diferentes vinos estériles. 96

Tabla 10. Valores experimentales y valores predichos por el modelo diferentes vinos naturalmente contaminados con *Dekkera*. 97

ÍNDICE DE FIGURAS

Introducción

Figura 1. Imagen de un viñedo de la zona del Valle de Uco en la Provincia de Mendoza. 13

Figura 2. Representación metafórica de cómo la alteración con levaduras asemeja un iceberg. 17

Figura 3. Imagen de células de *D. bruxellensis* captada en el microscopio óptico con contraste de fases (400X). 20

Figura 4. Formación de fenoles volátiles vía decarboxilación de los ácidos hidroxicinámicos. 26

Materiales y Métodos

Figura 5. Colonias de *D. bruxellensis* en medio de cultivo sólido WL. 37

Figura 6. Inóculos de cepas nativas de *D. bruxellensis* (B11, VC20 y CH29) y su respectivo control (sin inocular) utilizados durante el ensayo en el medio de cultivo de adaptación y producción de biomasa YPD líquido suplementado con 50 % de vino (V). 43

Figura 7. Unidades experimentales de 700mL utilizadas en el ensayo para la determinación del momento de producción de fenoles volátiles durante el crecimiento de 5 cepas de *D. bruxellensis*. 44

Figura 8. Niveles de validación del modelo predictivo. 51

Resultados y Discusión

Figura 9. Productos puros de amplificación mediante PCR del gen ribosomal 26S en gel de agarosa 0,8 %. Calle1: E4; Calle 2: E9; Calle 3: B10; Calle 4: B11; Calle 5: B12; Calle 6: PM14; Calle 7: LC16; Calle 8: LA17; Calle 9: VC20; Calle 10: CH29, Calle 11: CZ30; Calle 12: Cepa de referencia de *Brettanomyces bruxellensis* (CECT 11045); Calle 13: Control; Calle 14: Marcador estándar de tamaño (100 bp DNA ladder). 53

Figura 10. Relación entre recuento de células viables y D.O. de la cepa nativa de *D. bruxellensis*: B11. 55

Figura 11. Recuento de *D. bruxellensis* CECT 11045 en el medio simil-vino propuesto por Ferreira y colaboradores (2006) inoculados con diferentes poblaciones iniciales A) 100 UFC/mL; B) 1000 UFC/mL; C) 10000 UFC/mL. 57

Figura 12. Desarrollo de la cepa *D. bruxellensis* B11 adaptada para producción de biomasa en dos medios diferentes (S y V) e inoculada en el medio A. 58

Figura 13. Desarrollo de las cepas CECT 11045 (A) y B11 (B) en los diferentes medios de cultivo simil-vino evaluados.	59
Figura 14. Poblaciones viables de las cepas nativas de <i>D. bruxellensis</i> B11 (A), V20 (B) y CH29 (C) en medio simil-vino con diferentes concentraciones de ácidos hidroxicinámicos.	68
Figura 15. Poblaciones viables de las 5 cepas nativas de <i>D. bruxellensis</i> en medio simil-vino con 6 mg/L de ácidos hidroxicinámicos durante 60 días.	70
Figura 16. Seguimiento de las poblaciones viables de <i>D. bruxellensis</i> y concentraciones de azúcares, ácidos orgánicos y etanol en medio simil-vino de las cepas B11 (A), VC20 (B), CH29 (C), PM14 (D) y LA17 (E).	72
Figura 17. Seguimiento de las poblaciones viables de <i>D. bruxellensis</i> y concentraciones de precursores y fenoles volátiles en medio simil-vino de las cepas B11 (A), VC20 (B), CH29 (C), PM14 (D) y LA17 (E).	76
Figura 18. Interfaces de crecimiento/no crecimiento 3D para un nivel de probabilidad de 0,01 en función del pH, del etanol (% v/v) y del SO ₂ libre (mg/L) para los 4 períodos de tiempo estudiados (t=1, 7 días; t=2, 14 días; t=3, 21 días; t=4, 30 días). Los círculos abiertos muestran las condiciones donde la levadura <i>D. bruxellensis</i> CH29 fue capaz de crecer.	82
Figura 19. Perfiles de probabilidad de crecimiento en función del pH, manteniendo fijos los niveles de etanol en 10; 12,5 y 15 % (v/v), y los niveles de SO ₂ libre en 0, 30 y 50 mg/L para t=1 (7 días) y t=4 (30 días).	85
Figura 20. Perfiles de probabilidad de crecimiento en función de la concentración de etanol (% v/v), manteniendo fijos los niveles de pH en 3,4; 3,7 y 4,0, y los niveles de SO ₂ libre en 0, 30 y 50 mg/L para t=1 (7 días) y t=4 (30 días).	86
Figura 21. Perfiles de probabilidad de crecimiento en función de la concentración de SO ₂ libre (mg/L), manteniendo fijos los niveles de pH en 3,4; 3,7 y 4,0, y los niveles de etanol en 10; 12,5 and 15 % (v/v) para t=1 (7 días) y t=4 (30 días).	87
Figura 22. Interfaces de crecimiento/no crecimiento 2D en función del pH y del SO ₂ libre (mg/L) para diferentes niveles de etanol (10; 12,5 and 15 %, v/v) y períodos de tiempo (t=1, 7 días; t=2, 14 días; t=3, 21 días; t=4, 30 días). Probabilidad de crecimiento fijada en p=0,01. Los círculos abiertos muestran las condiciones donde la levadura <i>D. bruxellensis</i> CH29 fue capaz de crecer.	89

1. INTRODUCCIÓN

1.1. La vid y el vino

La industria vitivinícola en Argentina presenta un desarrollo muy importante en los últimos 15 años. De ser una actividad destinada al consumo interno, actualmente exporta más de U\$S 975 millones, y el Plan Estratégico de la Vitivinicultura Argentina 2020 apunta a incrementar la exportación a 2000 millones de dólares (PEVI, 2004). Argentina ocupa un importante lugar en el contexto vitivinícola mundial y comienza a posicionarse como un exportador altamente competitivo de los tradicionales países vitivinícolas tales como Francia, España e Italia. Nuestro país junto a Australia, EEUU, Chile, Sudáfrica y Nueva Zelanda, compone el Nuevo Mundo Vitivinícola y la importancia de este grupo en el comercio mundial se ha incrementado en la última década. Las exportaciones vitivinícolas se han incrementado desde 242,2 millones de dólares en el año 2001 a 974,8 millones de dólares en el 2010. Su tasa de crecimiento anual promedio es del 17 % (INV, 2014). El actual comercio mundial de vinos demanda productos diferenciados, de calidad constante y sin defectos.

Por otro lado, la vitivinicultura argentina contribuye significativamente a la economía nacional en términos de valor de la producción, valor agregado y empleo (trabajo). El impacto va más allá de sus efectos directos debido a la fuerte interrelación que tiene con otros sectores productivos y de servicios como el turismo, ventas minoristas, bares, restaurantes así como con toda la gama de proveedores para los subsectores vitícolas y vinícolas. En 2010 la vitivinicultura contribuyó en casi 14 mil millones de pesos al valor de la producción bruta de la República Argentina en forma directa. El valor de la producción bruta del conjunto de la cadena vitivinícola, permite visualizar que el mercado interno contribuye con un 65,5 % a la generación de ese valor, en tanto que el sector externo lo hace en un 27,4 % y el resto corresponde a la valoración del stock (INV, 2014).

La provincia de Mendoza es la región vitivinícola más importante de Argentina, y su producción representa más del 75 % de la producción nacional de vinos. Sus condiciones naturales como la altitud (entre 500 y 1500 metros sobre el nivel del mar), aridez, suelos pedregosos y una marcada amplitud térmica entre el día y la noche, son el marco ideal para el cultivo de la vid (Figura 1). Actualmente en Mendoza se cultivan alrededor de 284.000 ha, de las cuales la vid ocupa el 53,2 % de la superficie implantada, los frutales el 31 % y las hortalizas el 12,6 %. De acuerdo con los datos estadísticos de las dos últimas décadas, la vid tiene la mayor importancia en el valor

bruto de la producción agrícola correspondiendo al 72 % del mismo, mientras que los frutales y las hortalizas representan el 11 % y 17 % respectivamente. Esta situación define que los ingresos del sector agrícola de la Provincia dependan de manera casi exclusiva de lo que suceda en la viticultura (INV, 2014).

En Mendoza, la uva se destina principalmente para la producción de vino y una pequeña proporción para otros usos tales como: consumo en fresco, mosto concentrado, etc. Los principales cultivares de uva fina para vinificación son Sauvignon Blanc, Chenin, Chardonnay entre las blancas y Cabernet Sauvignon, Malbec, Merlot y Syrah entre las tintas (INV, 2014).



Figura 1. Imagen de un viñedo de la zona del Valle de Uco en la Provincia de Mendoza.

1.2. Las levaduras del vino

La transformación del jugo de uva en vino es un proceso complejo que involucra varias reacciones bioquímicas en el cual intervienen tanto levaduras como bacterias. Solamente un número limitado de especies microbianas son capaces de crecer como consecuencia de sus bajos valores de pH y alto contenido de azúcar.

Tradicionalmente el vino se produce por la fermentación natural causada por el desarrollo de levaduras procedentes de la uva y de la bodega (Ribéreau-Gayon y col., 2006; Romano y col., 2006).

En general las levaduras se encuentran diseminadas en la naturaleza tanto en el suelo, en la superficie de los vegetales, como en el tracto digestivo de los animales. El viento y los insectos son vectores que ayudan a su diseminación. Se distribuyen de manera irregular sobre la superficie de la uva en la vid; se las encuentra en pequeñas cantidades en las hojas, en el tallo y en las uvas inmaduras, colonizando posteriormente la piel de la uva durante su maduración (Ribéreau-Gayon y col., 2006).

La microbiota presente en la superficie de la uva se ve afectada por un gran número de factores que determinan el tipo y la proporción de las diferentes especies de levaduras presentes tales como: la ubicación geográfica, las condiciones climáticas, la variedad y madurez de la uva, los daños físicos causado por el ataque de aves, insectos y hongos, y la aplicación de productos agroquímicos tales como fungicidas e insecticidas (Longo y col., 1991; Dubois y col., 1996; Pretorius y col., 1999). Numerosos autores han sugerido que el clima ejerce la mayor influencia, siendo la lluvia uno de los factores más importantes (Rousseau y Doneche 2001). De esta forma, cada región presenta una microbiota característica de acuerdo con el área en la que se encuentran los viñedos. En un estudio realizado en Argentina se caracterizaron las especies de levaduras presentes en uvas de la variedad Malbec cultivadas en la provincia de Mendoza durante dos vendimias consecutivas. Los resultados mostraron que las especies más frecuentes en los dos viñedos muestreados en la vendimia 2000 pertenecían a levaduras apiculadas (50 %), siendo identificadas todas como *Kloeckera apiculata*. Se identificaron también otras especies en proporciones relativamente diferentes en ambos viñedos. Ellas fueron, en orden decreciente por su porcentaje de aislamiento: *Metschnikowia pulcherrima*, *Saccharomycodes ludwigii*, *Pichia membranifaciens*, *Issatchenkia orientalis*, *Candida stellata*, *Candida raghi* y *Rhodotorula* sp. Por otra parte en la vendimia 2001, los porcentajes relativos para cada especie se modificaron con respecto al año anterior, observándose un aumento de levaduras oxidativas. Las diferencias encontradas en este estudio podrían estar relacionadas con las condiciones climáticas, ya que la vendimia 2001 presentó precipitaciones muy próximas a la fecha de cosecha a diferencia de la vendimia 2000 (Combina y col., 2005).

Las levaduras del género *Dekkera*, han sido descritas originalmente como parte de la microbiota epífita de la superficie de la uva y se encuentran en muy bajos porcentajes en los viñedos. Sin embargo, existen pocos trabajos que describan la presencia de estas levaduras en las uvas. Por otro lado, el proceso de elaboración del vino alberga múltiples etapas donde *Dekkera* spp. puede sobrevivir y se han producido numerosos debates sobre la fuente inicial y la forma de dispersión de estas levaduras en la bodega (Licker y col., 1998). En 1987, Guerzoni y Marchetti informaron su aislamiento a partir de uvas dañadas por podredumbre ácida. Estudios posteriores confirmaron que había una conexión entre *Dekkera* y uvas dañadas, afectadas por moho gris (*Botrytis*) (Taillandier 2007). Renouf y Lonvaud-Funel (2006) tuvieron éxito en la recuperación de *Dekkera* spp. a partir de uvas, luego de que estas levaduras fueran aisladas de mostos en fermentación en numerosas investigaciones anteriores (Licker y col., 1998; Pretorius 2000; Jolly y col., 2003; Prakitchaiwattana y col., 2004; Van de Water 2004). La escasa detección de *Dekkera* spp. en la uva podría deberse al bajo número de células presentes en medio de un ecosistema microbiano diverso donde dominan otras levaduras salvajes y especies de bacterias, además de la dificultad que presenta su aislamiento al poseer un crecimiento lento, como se describirá en detalle más adelante. Renouf y Lonvaud-Funel (2006), sin embargo, superaron este problema mediante el desarrollo de un medio de enriquecimiento que les permitió detectar *Dekkera bruxellensis* en bayas de uva. Posteriormente fueron capaces de detectar esta levadura en varios viñedos y en diferentes etapas de desarrollo de las bayas de uva. Gilis y colaboradores (2008) confirmaron también la presencia de *Dekkera* sobre las uvas y mostraron que diferentes factores ambientales capaces de modificar la integridad de las uvas tienen influencia sobre la presencia de la levadura en el viñedo. La selección de racimos en la viña y la disminución de todos los factores susceptibles de dañar las uvas, son importantes para limitar la presencia de *Dekkera* en la materia prima ya que en promedio, estas levaduras se detectaron en el 12,5 % de muestras de racimos dañados. Además, estos autores observaron la presencia sistemática de esta levadura contaminante en mayor proporción en racimos dañados por los pájaros y atacados por *Botrytis* y también en las zonas húmedas, situadas a la sombra del bosque. Así mismo en otros estudios se ha mencionado la presencia de *Dekkera* en racimos de uva (Pretorius 2000; Suárez y col., 2007). Por otro lado se ha demostrado que la superficie de la maquinaria de bodega (prensas, tanques, fermentadores, bombas, etc.) que entra en contacto con el jugo de uva, representa otra fuente de aporte de levaduras (Fernández-Espinar y col., 2005; Mercado y col., 2007). *Dekkera* ha sido descrita en equipo de vinificación y se

encuentra en vinos en altas proporciones, más frecuentemente luego de la fermentación alcohólica (Licker y col., 1998; Loureiro y Malfeito-Ferreira 2003; Renouf y col., 2007; Wedral y col., 2010). De hecho, las levaduras del género *Dekkera* son generalmente descritas en las últimas etapas de la vinificación y se encuentran estrechamente relacionadas con finales lentos de fermentación, añejamiento en barrica y estibado en botellas (Shinohara y col., 2000).

A medida que avanza el proceso de fermentación, el establecimiento de condiciones anaeróbicas, la actividad antimicrobiana del anhídrido sulfuroso (SO₂) añadido, el agotamiento de nutrientes y los niveles crecientes de etanol, hacen el medio cada vez más selectivo para las especies microbianas presentes (Ribéreau-Gayon y col., 2006; Romano y col., 2006). Las levaduras no-*Saccharomyces* presentes en el jugo de uva, comienzan a declinar cuando la producción de etanol por *Saccharomyces cerevisiae* supera el 5-7 % (Gao y Fleet 1988; Heard y Fleet 1988). En la mitad de la fermentación *S. cerevisiae* representa casi la totalidad de las levaduras aisladas. Durante la parte final de la misma, la población de *S. cerevisiae* disminuye progresivamente y en las semanas que siguen a la terminación de la fermentación alcohólica, las poblaciones viables de *S. cerevisiae* disminuyen por debajo de unos pocos cientos de células/mL. Cuando la actividad de *Saccharomyces* decrece, otras especies de levaduras resistentes al etanol que han permanecido en bajas poblaciones, pueden comenzar a desarrollar en el vino, entre ellas se encuentran especies de *Dekkera* (Ribéreau-Gayon y col., 2006).

En muchos casos, las levaduras alteradoras también pueden desarrollar en los vinos durante la conservación en barricas o el almacenamiento en botellas. Algunas levaduras tienen un metabolismo oxidativo del etanol y forman un velo en la superficie del vino, tales como *Pichia* o *Candida*, o incluso algunas cepas de *S. cerevisiae* (seleccionadas para crianza de vinos con flor). Algunas otras levaduras, como *Dekkera*, pueden desarrollarse gracias al consumo de pequeñas cantidades de azúcares que han sido incompletamente o no fermentadas por *S. cerevisiae* (Ribéreau-Gayon y col., 2006). Estos géneros mencionados están asociados con la alteración de los vinos, produciendo cambios organolépticos en los mismos como es el caso de especies pertenecientes a los géneros *Pichia* y *Dekkera* (Dias y col., 2003a).

1.3. Levaduras contaminantes y defectos en los vinos

La microbiota alteradora/contaminante de los alimentos está constituida, en la mayoría de los casos, por poblaciones mixtas de bacterias, hongos filamentosos, y levaduras. La alteración microbiana es un proceso competitivo entre estos diferentes grupos de microorganismos, en el cual prevalecerán aquellos que muestren una mejor adaptación a las condiciones ambientales en cada producto. En algunos casos, no es el crecimiento del microorganismo, sino la producción de metabolitos secundarios volátiles los que producen el defecto en el alimento (Loureiro y Malfeito-Ferreira, 2003).

Como describe Stratford (2006) las alteraciones con levaduras en alimentos, las cuales no siempre presentan síntomas evidentes, permanecen no reportadas y representan el 95 % de las contaminaciones reales de los alimentos. Esta situación es metafóricamente representada como un iceberg donde sólo se observa el 5 % de su real dimensión. El 5 % corresponde a alteraciones fácilmente visibles causadas por especies de levaduras extremófilas o altamente fermentativas. El 95 % de la alteración se encuentra bajo la superficie; causado por una higiene deficiente que permite la proliferación de las levaduras alteradoras oportunistas (Figura 2). Dentro de las alteraciones de los alimentos, los defectos aromáticos son aún menos reportados, ya que dependen de la sensibilidad de los consumidores y de su familiaridad con el aroma habitual del alimento.

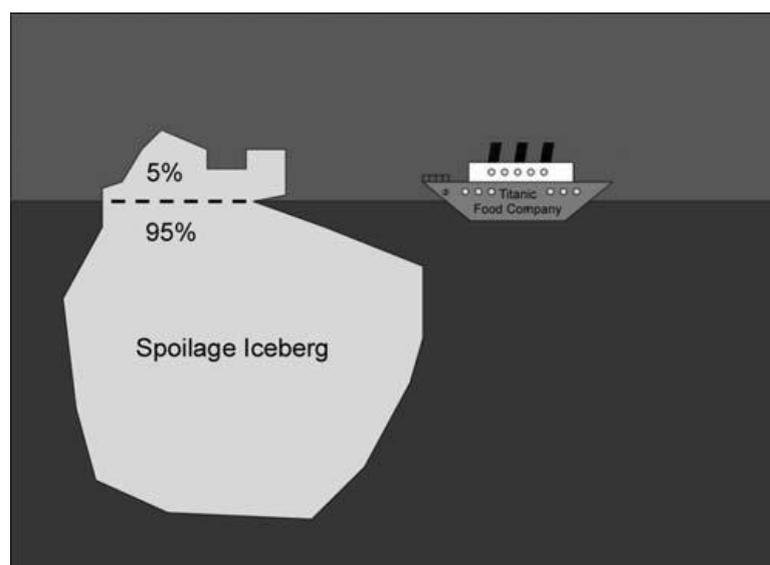


Figura 2. Representación metafórica de cómo la alteración con levaduras asemeja un iceberg (extraído de Querol y Fleet, 2006).

De todas las levaduras aisladas a partir de los alimentos, sólo unas pocas especies son responsables de cambios indeseables en los mismos, éstas se llaman levaduras alteradoras o de deterioro. La alteración producida por ellas puede ser visible o detectable a través de las propiedades físicas y sensoriales del alimento (Loureiro y Malfeito-Ferreira, 2003). Por otro lado, el concepto de levadura alteradora está condicionado por el tipo de producto y el momento en que las levaduras ejercen su actividad. Por ejemplo, en la elaboración de vinos, se recomienda el uso de la levadura *S. cerevisiae* por sus buenas características fermentativas. Sin embargo, en etapas posteriores al proceso de elaboración, esta especie es considerada como una levadura alteradora peligrosa en vinos dulces embotellados, ya que es capaz de fermentar el azúcar residual (Loureiro y Malfeito-Ferreira, 2003).

Las alteraciones en el vino son un problema grave para la industria vitivinícola, ya que hacen que el producto se torne inaceptable y pueden conducir a grandes pérdidas económicas (Oelofse y col., 2008).

Dentro de las levaduras alteradoras de vinos están aquellas que producen refermentaciones y comprenden especies fermentativas como *Zygosaccharomyces*, *Saccharomyces* y *Saccharomycodes* y aquellas que producen defectos debido a los productos de su metabolismo. Dentro de esta última clasificación se encuentra *Dekkera* (Deák, 2008).

Dekkera bruxellensis, o su estado anamorfo *Brettanomyces bruxellensis*, se ha descrito como la principal levadura alteradora de vinos tintos (Loureiro y Malfeito-Ferreira, 2003; Querol y Fleet, 2006). Su presencia en vinos está asociada con la detección de *flavours* fenólicos que otorgan un impacto negativo a las características organolépticas del producto final (Chatonnet y col., 1992).

Las levaduras del género *Dekkera* tienen una distribución ubicua en la naturaleza (Loureiro y Malfeito-Ferreira, 2006). La mayoría de los estudios asocian a estas levaduras con productos alimenticios fermentados que van desde quesos y leche fermentada a varias bebidas alcohólicas las cuales incluyen vinos, cervezas, sidras, kombucha (té de hongos) y tequila (Kumara y Verachtert, 1991; Lachance, 1995; Kosse y col., 1997; Licker y col., 1998; Gadaga y col., 2002; Teoh y col., 2004; Loureiro y Malfeito-Ferreira, 2006; Oelofse y col., 2008).

Durante la década de 1950 varios autores mencionaron el aislamiento de este género de levadura en mostos y vinos de Francia e Italia (Van der Walt y van Kerben,

1958). Desde entonces, diversas publicaciones han mencionado el aislamiento de *Dekkera* spp. en muchos países productores de vinos como Francia, Italia, España, Australia, Nueva Zelanda y Estados Unidos (Rodrigues y col., 2001). Sin embargo, no fue hasta la década de 1980 y de 1990 que esta levadura fue caracterizada por su habilidad para producir aromas particulares en el vino (Henschke y col., 2007; Wedral y col., 2010).

En Argentina la incidencia real de *Dekkera* y su defecto en los vinos tintos está escasamente documentada, ya que las bodegas no dan difusión a estos sucesos, pero puede encontrarse fácilmente este tipo de defecto en los vinos durante su añejamiento e incluso en algunos ya embotellados. Roccato y colaboradores (2001) realizaron un estudio sobre la distribución de *Dekkera* en uva, mostos y vinos de la provincia de Mendoza y detectaron a esta levadura en dos de las tres variedades de uvas tintas analizadas sin evidenciar defecto organoléptico. Además se ha encontrado que de un total de 300 muestras de vinos analizados provenientes de diferentes bodegas de la provincia de Mendoza, el 50 % de las muestras fueron positivas para *Dekkera* y el 27 % presentó un elevado recuento de la misma (Falconi y col., 2011). En la zona del Alto Valle, en la provincia de Río Negro, en un estudio realizado en seis muestras de vinos alterados provenientes de dos bodegas familiares también se evidenció la presencia de *Dekkera* en tres de las muestras de vinos de una de dichas bodegas patagónicas (Saez y col., 2007).

1.4. *Dekkera bruxellensis* -Taxonomía e identificación

La primera referencia al género *Brettanomyces* está registrada en 1904 cuando N.H. Claussen aisló una levadura de una fermentación secundaria de una cerveza clásica inglesa que se fermenta en barricas (Gilliland, 1961; Rodrigues y col., 2001; Oelofse y col., 2008). Los aromas y sabores producidos por esta levadura se convirtieron en una característica de las cervezas británicas de ese momento y es por ello que el nombre *Brettanomyces* derivó de "British brewing fungus". No fue hasta 1940, cuando M.T.J. Custers realizó el primer estudio sistemático de esta levadura, que *Brettanomyces* fue asociada con el vino (Custers, 1940; Oelofse y col., 2008). La taxonomía del género *Brettanomyces* ha sufrido numerosas reclasificaciones a través de los años. Originalmente se incluían especies como *B. bruxellensis*, *B. lambicus*, *B. clausenii*, *B. anomalus* y *B. intermedius*, las cuales presentaban reproducción asexual por medio de gemación (Custers, 1940; Van der Walt y Van Kerben, 1958; Oelofse y col., 2008). El género *Dekkera* fue introducido a la taxonomía en 1964 luego de que se

describió el estado sexual o teleomorfo de algunos aislados identificados como *Brettanomyces* y se describió la producción de ascosporas (Van der Walt 1964). Este estado teleomorfo (estado perfecto) solo fue encontrado en dos de las especies de *Brettanomyces* anteriormente descritas, las cuales fueron denominadas *Dekkera anomala* y *D. bruxellensis* (Oelofse y col., 2008). Las otras tres especies se mantuvieron dentro del género *Brettanomyces* y son actualmente denominadas como: *B. custersianus*, *B. naardensis* y *B. nanus* (Kurtzman y Fell, 2000; Cocolin y col., 2004; Oelofse y col., 2008).

La morfología celular del estado imperfecto o asexual de la levadura presenta gemación multilateral. Sin embargo, las células más viejas/antiguas pueden presentar una forma celular que sugiere una restricción a gemación polar, cuyo ángulo de gemación es a 45°. De este modo, dentro de un campo microscópico, algunas células pueden aparecer con forma de "caja" o "rectangular", mientras que otras pueden ser vistas como "ojivales", "en forma de barco", o "arcos góticos" (Figura 3). Por otra parte, esta levadura también puede producir pseudomicelio bajo ciertas condiciones de incubación (Fugelsang y Edwards, 2007). La morfología celular del estado perfecto o sexual de la levadura presenta ascosporas las cuales asemejan un sombrero o una forma más esférica con ala tangencial.



Figura 3. Imagen de células de de *D. bruxellensis* captada en el microscopio óptico con contraste de fases (400X).

En general, las especies incluidas en el género *Dekkera* fermentan la glucosa, y otros carbohidratos tales como galactosa, sacarosa, maltosa y trehalosa. Las especies que se encuentran en los vinos, *D. anomala* y *D. bruxellensis*, se pueden separar sobre la base de la fermentación de la lactosa (la mayoría de las cepas de *D. anomala* son capaces de fermentar el azúcar mientras que las de *D. bruxellensis* no lo hacen) y de la asimilación del succinato (la mayoría de las cepas de *D. anomala*

asimilan el ácido mientras que las de *D. bruxellensis* no lo hace). Ambas especies también pueden asimilar el nitrato. Las especies de *Dekkera* pueden utilizar etanol como única fuente de carbono y energía (Silva y col., 2004), y producen grandes cantidades de ácido acético cuando se cultivan con glucosa (Freer, 2002). De hecho, la producción de ácido acético puede ser suficiente para inhibir y eventualmente matar a cultivos mantenidos en medios sin una solución tampón. Por lo tanto, los medios de cultivo de mantenimiento de rutina de laboratorio contienen 2 % p/v de carbonato de calcio para tamponar a los ácidos producidos. Además, *Dekkera* tiende a ser una levadura de crecimiento lento, requiriendo frecuentemente varios días para que aparezcan las colonias en los medios de cultivo (Fugelsang y Edwards, 2007).

Los métodos de taxonomía clásica muchas veces otorgan una aproximación sobre la identificación de un aislado de *Dekkera*, pero resultan ser insuficientes para confirmar la presencia de la esta levadura. Es por ello que se requiere de la utilización de métodos moleculares que otorguen mayor precisión en la identificación de esta levadura. Se han desarrollado varias técnicas basadas en el ADN (Loureiro y Querol, 1999). Existen métodos basados en el análisis de regiones ribosomales, como la secuenciación o el análisis de restricción de regiones ribosomales, métodos que permiten la detección rápida y cuantificación de la levadura, como la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real, y otras nuevas tecnologías (Ivey y Phister, 2011; Cocolin y col., 2013).

La secuenciación de regiones ribosomales es un método de identificación basado en la obtención y comparación de secuencias nucleotídicas de estas regiones con las depositadas en las bases de datos. Las dos regiones ribosomales más utilizadas son las correspondientes a los dominios D1 y D2 situados en el extremo 5' del gen 26S (Kurtzman y Robnett, 1998) para levaduras y el gen 18S para bacterias (James y col., 1997). La disponibilidad de las secuencias en bases de datos, sobre todo en el caso de la región D1/D2 del gen 26S, hacen que esta técnica sea muy útil para asignar una levadura desconocida a una especie concreta cuando el porcentaje de identidad de sus secuencias sea superior o igual a 99 % (Kurtzman y Robnett, 1998). La comparación con las bases de datos se lleva a cabo usando el programa BLAST (Basic Lineal Alignment Search Tool) disponible en la página del Centro Nacional de Información de Biotecnología (NCBI) del Instituto nacional de Salud (NIH) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Además, desde la aparición de la reacción en cadena de la ADN polimerasa, que permite la amplificación directa de las regiones de interés, junto con las modernas tecnologías de secuenciación automática hacen que la

aplicación de esta técnica sea relativamente rápida. Los productos de PCR son purificados mediante *kits* comerciales para eliminar los cebadores y el exceso de desoxinucleótidos que interferirían en la reacción de secuenciación. En los sistemas de secuenciación automática se utilizan 4 colorantes fluorescentes para identificar cada una de las bases (A, G, C y T). La incorporación de los colorantes se lleva a cabo mediante amplificación por PCR usando los mismos cebadores. Los fragmentos de ADN así marcados son separados en finos capilares en función de su tamaño y simultáneamente son excitados mediante un láser produciéndose una emisión que será distinta para cada uno de los colorantes. Las señales generadas son posteriormente transformadas por un *software* en picos de colores, cada uno de los cuales corresponde a un nucleótido. La separación es rápida y permite la lectura de aproximadamente 600 nucleótidos en 2 ó 3 horas según el modelo del secuenciador (Fernández-Espinar y col., 2005).

1.5. Características fisiológicas de *Dekkera*

De las cinco especies de *Brettanomyces/Dekkera* descritas, la especie principalmente asociada con el proceso de elaboración de vino es *D. bruxellensis* (Cocolin y col., 2004; Oelofse y col., 2008), aunque las especies *D. anomala* y *B. custersianus* han sido descritas en fermentaciones de mostos en dos instancias (Querol y col., 1990; Esteve-Zarzoso y col., 2001).

Dekkera presenta características particulares que le otorgan ventajas y desventajas a la hora de desarrollar en el vino. Por un lado, presenta una lenta velocidad de crecimiento, lo que hace que su desarrollo sea más frecuente en el final de fermentación o etapas posteriores (añejamiento), cuando la actividad de *Saccharomyces* ha disminuido. Pero por otro lado, su desarrollo se ve favorecido por bajas concentraciones de azúcares, presencia de oxígeno y su elevada tolerancia al etanol y al SO₂ (Kalathenos y col., 1995; Boulton y col., 1996; Abbott y col., 2005). La autólisis de levaduras y la consecuente liberación de nutrientes que se produce en los vinos que son añejados sobre borras o sin filtrar, y el influjo de pequeñas cantidades de oxígeno favorecen también el establecimiento de poblaciones de *Dekkera* durante el añejamiento de los vinos en barricas de roble (Suárez y col., 2007; Oelofse y col., 2008).

El oxígeno es un factor crítico en el deterioro de los vinos por *Dekkera*, ya que influye fuertemente tanto en el crecimiento de *D. bruxellensis* como en su metabolismo. Contrariamente a *S. cerevisiae*, el metabolismo fermentativo de *D. bruxellensis* es estimulado por la presencia de oxígeno, este mecanismo es denominado efecto “Custer” (Scheffers, 1966; Wijsman y col., 1984). El oxígeno aumenta la velocidad de crecimiento, la biomasa y la producción de ácido acético a partir de la glucosa (Van der Walt 1964; Freer y col., 2003; Silva y col., 2004). Por otro lado, se ha demostrado que en condiciones anaeróbicas se inhibe el crecimiento y la fermentación de esta especie (Wijsman y col., 1984).

Dekkera bruxellensis es una levadura poco exigente desde el punto de vista nutricional. Las células de *D. bruxellensis* son excepcionalmente resistentes a condiciones de nutrientes mínimas. Esta habilidad podría aumentar la posibilidad de que *Dekkera* sobreviva durante las etapas de elaboración o conservación, para luego desarrollar cuando el ambiente se torne favorable. Entre algunos nutrientes testeados el sulfato de amonio y el extracto de levadura tienen un efecto significativo sobre el consumo de glucosa, el crecimiento, y la producción de etanol. Además, el extracto de levadura parece ser el componente más importante y significativo para su crecimiento, ya que se observa una correlación positiva entre la concentración de extracto de levadura adicionado al medio de cultivo y la máxima biomasa sintetizada (Aguilar-Uscanga y col., 2000).

Si bien *D. bruxellensis* puede estar presente en cualquier etapa del proceso de vinificación, se encuentra más frecuentemente asociada a vinos durante su añejamiento en barricas de roble, fermentaciones detenidas, fermentaciones alcohólicas lentas y durante fermentaciones malolácticas prolongadas (Oelofse y col., 2008). El crecimiento lento de *D. bruxellensis* hace a los vinos conservados por largos periodos en barricas de madera particularmente susceptibles a su influencia (Suárez y col., 2007). Los vinos que son añejados en barricas son más susceptibles a desarrollar defecto, ya que *D. bruxellensis* puede estar presente en barricas ya utilizadas. Se ha encontrado a *D. bruxellensis* a una profundidad de penetración de 8 mm dentro de las barricas de madera (Malfeito-Ferreira, 2005). Una vez que la barrica se ha contaminado por su presencia, este microorganismo difícilmente pueda ser eliminado mediante limpieza, raspado u otras técnicas, aunque se pueden tomar precauciones para limitar su crecimiento (Garde-Cerdán y col., 2008; Sturm y col., 2014). Los vinos tintos de alta calidad, los cuales con frecuencia tienen añejamientos en barricas por largos periodos, son los vinos que más se ven afectados por la aparición de defectos

relacionados a *D. bruxellensis*, ya que estos vinos generalmente comienzan el añejamiento en barrica como un producto premium y lo finalizan como un producto defectuoso y de baja calidad. La fermentación maloláctica es otro periodo vulnerable para la contaminación de los vinos con *Dekkera*, ya durante esta etapa el vino es mantenido con niveles bajos de SO₂ libre y temperaturas moderadas, lo que favorece el desarrollo de esta levadura (Oelofse y col., 2008). Por otro lado, las fermentaciones lentas o detenidas, donde la actividad de *S. cerevisiae* ha disminuido y los vinos aun presentan elevados contenidos de nutrientes y azúcares, con bajos niveles de SO₂, también representan situaciones favorables para el desarrollo de *Dekkera*. Además, en un intento por reactivar estas fermentaciones problemáticas, los enólogos oxigenan los vinos y los mantienen a temperaturas elevadas, estimulando así el crecimiento de *Dekkera* (Renouf y col., 2006; Suárez y col., 2007; Oelofse y col., 2008).

Por otro lado, el desarrollo de *Dekkera* se asocia más comúnmente con vinos tintos que con vinos blancos, en los cuales es aislada con menor frecuencia (Dias y col., 2003b). La pérdida de viabilidad de esta levadura en vinos blancos se debe mayormente a la eficacia del SO₂ en pHs bajos (Loureiro y Malfeito-Ferreira 2006). Además los vinos blancos no parecerían tener el carácter del aroma de *Dekkera* debido a la ausencia de los compuestos precursores (Chatonnet y col., 1992), ya que por el proceso de elaboración de éstos al ser extraídos los hollejos de las uvas la matriz permanece por un periodo breve en contacto con los mismos. La particular susceptibilidad de los vinos tintos a la alteración por *D. bruxellensis* puede ser atribuida a sus pH más elevados, su alto contenido polifenólico y al añejamiento en barricas. Por lo tanto, los varietales tintos de *Vitis vinifera* con alto contenido de precursores polifenólicos son los más susceptibles a desarrollar defecto por esta levadura (Wedral y col., 2010). La actual utilización de tecnologías pre-fermentativas para extraer mayor cantidad de compuestos del hollejo de la uva, relacionados con el color y el aroma, también favorece la extracción de los compuestos precursores del defecto (Suárez y col., 2007).

1.6. Defectos asociados a *Dekkera* en vinos

La presencia de *D. bruxellensis* en vinos ha sido asociada con varios tipos de efectos perjudiciales sobre la calidad de los vinos, ya sea visual u organoléptica, incluyendo la formación de film/película, la presencia de enturbiamiento (Fugelsang y col., 1993; Fugelsang, 1997), la pérdida de color (Mansfield y col., 2002), la producción de acidez volátil (Fugelsang y col., 1993; Aguilar-Uscanga y col., 2003), la producción

de aromas a "ratón" (tetrahidropiridinas) (Heresztyn, 1986; Snowden y col., 2006) y la formación de aromas fenólicos (Chatonnet y col., 1992; 1995; 1997; Loureiro y Malfeito-Ferreira, 2003, Dias y col., 2003a). De la amplia gama de metabolitos que la levadura produce, los más significativos son el ácido acético y los fenoles volátiles, tales como el 4-etilfenol y el 4-etilguaiacol (Chatonnet y col., 1995; 1997). Aunque el defecto "Brett" en los vinos se relaciona con hasta 10 compuestos, el 4-etilfenol y el 4-etilguaiacol son los dos productos químicos que han sido específicamente vinculados a la presencia y actividad de esta levadura (Heresztyn, 1986; Chatonnet, 1997). Recientemente, el 4-etilcatecol también se ha encontrado como un metabolito relacionado con *Dekkera* y es responsable de algunos de los caracteres aromáticos que se encuentran en los vinos contaminados (Hesford y col., 2004).

Se ha demostrado que la formación de fenoles volátiles (vinil y etilfenoles) por especies de *Dekkera* es el resultado de la transformación enzimática de compuestos precursores (ácidos hidroxicinámicos) presentes en la uva y el vino de forma natural (Suárez y col., 2007; Godoy y col., 2009). Estos fenoles volátiles, especialmente los etilfenoles, tienen un bajo umbral de percepción e incluso pequeñas cantidades son responsables de aromas desagradables que se han descrito como "animal", "medicinal", "sudor de caballo", "establo", "plástico quemado", "especiado" y "fenólico" (Suárez y col., 2007).

En bajas concentraciones, los vinilfenoles y los etilfenoles pueden presentar propiedades aromáticas inofensivas e incluso deseables otorgando complejidad al vino. Sin embargo, cuando el 4-etilfenol y el 4-etilguaiacol están presentes en concentraciones mayores a 620 µg/L y 140 µg/L, respectivamente, su contribución en el aroma y en el sabor resulta perjudicial en la calidad del vino (Chatonnet y col., 1992). Las concentraciones de 4-etilfenol/4-etilguaiacol en una relación 8:1 son bastante comunes en vinos tintos y presentan un umbral de percepción más bajo que cada compuesto por separado (426 µg/L) (Chatonnet y col., 1992; Hixson y col., 2012). La aparición de estos defectos reduce la calidad del vino, ya que estos compuestos no pueden ser eliminados fácilmente y son estables en el tiempo (Chatonnet y col., 1992; 1995; Suárez y col., 2007; Coulon y col., 2010; Malfeito-Ferreira 2011; Joseph y col., 2013).

La formación de 4-etilfenol y de 4-etilguaiacol ocurre a partir del metabolismo de los ácidos *p*-cumárico y ferúlico respectivamente. Los ácidos hidroxicinámicos (AHCs) más abundantes en las uvas son el ácido cafeico, ácido *p*-cumárico y ácido

ferúlico, en orden decreciente (Flanzy, 2000). Éstos son AHCs, que están presentes como ésteres tartáricos en la pared celular de las uvas, son liberados al jugo de uva por la acción de la actividad esterasa durante la molienda (Harris y col., 2008; Salameh y col., 2008). La conversión de los AHCs precursores ocurre en una vía que involucra dos pasos. Inicialmente, la enzima decarboxilasa los transforma a un 4-vinilderivado, el cual es luego reducido para formar el correspondiente 4-etilderivado (Chatonnet y col., 1992; Edlin y col., 1995) (Figura 4). Las enzimas cumarato decarboxilasa y vinilfenol reductasa han sido purificadas, caracterizadas y parcialmente secuenciadas en *D. bruxellensis*. Ambas enzimas tienen una expresión constitutiva baja y su actividad es inducida en presencia de los compuestos precursores (Godoy y col., 2008; Harris y col., 2009; Sangorrín y col., 2013). En medio de cultivo las actividades de estas enzimas han demostrado ser cepa dependiente dentro de la especie *D. bruxellensis* (Godoy y col., 2009; Sangorrín y col., 2013).

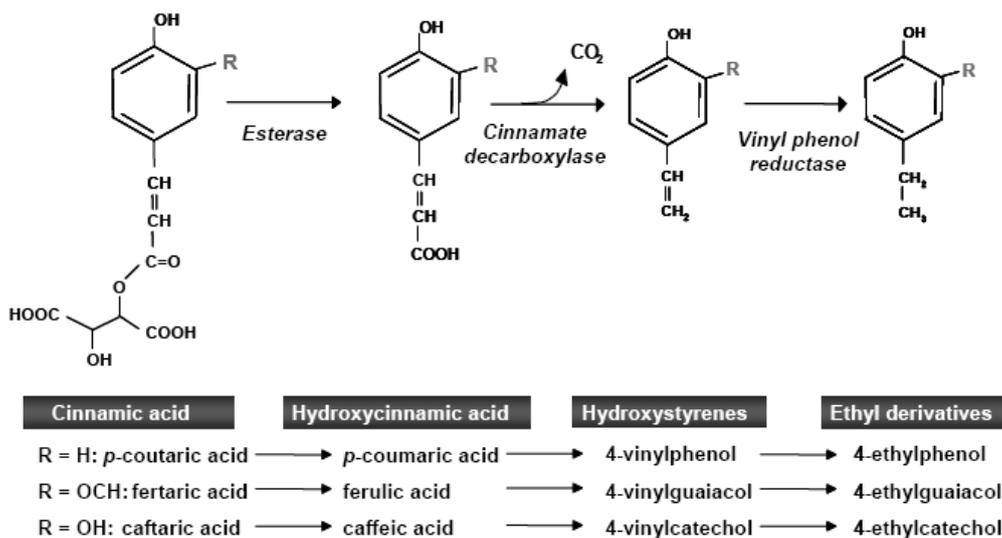


Figura 4. Formación de fenoles volátiles vía decarboxilación de los ácidos hidroxicinámicos (extraído de Oelofse y col., 2008).

Las concentraciones de los AHCs precursores, directamente responsables del defecto fenólico producido por *Dekkera*, pueden depender de la variedad de uva (Reguant y col., 2000), la calidad (Phister y Mills, 2003) y las prácticas de maceración (Suárez y col., 2007). Gerbaux y colaboradores (2002) estudiaron el efecto de la temperatura de maceración y la intensidad de la liberación de AHCs de la piel de la

uva como factores que influyen en la formación de fenoles volátiles por *Dekkera* spp. Estos factores, junto con las enzimas utilizadas para la extracción de color y las clarificaciones, como las enzimas pectolíticas y otras enzimas que contienen actividad cinamoil esterasa, pueden conducir a un aumento de los niveles de producción de fenoles volátiles por *Dekkera* spp. (Dugelay y col., 1993; Gerbaux y col., 2002).

Se han propuesto numerosas posibles explicaciones sobre el rol fisiológico del metabolismo de los AHCs por *Dekkera*. Es ampliamente conocido que ciertos AHCs pueden resultar tóxicos para algunos microorganismos y han sido evaluados para inhibir el crecimiento de diversos microorganismos, incluyendo hongos y bacterias (Van Sumere y col., 1971; Ravn y col., 1989; Stead y col., 1993; Campos y col., 2003; Walker y col., 2003). El crecimiento de diferentes especies de levaduras fue inhibido por AHCs en concentraciones mayores a 1 mM, siendo los ácidos ferúlico y *p*-cumárico generalmente los que presentaron mayor actividad inhibitoria (Ou y Kwok, 2004; Harris y col., 2010; Pastorkova y col., 2013). Por lo tanto, se postula que el metabolismo de los ácidos fenólicos por parte de *D. bruxellensis* podría actuar como un mecanismo de detoxificación del medio, para permitir a las células desarrollarse en un ambiente más favorable. La célula probablemente se beneficiaría por la reducción de los ácidos fenólicos ya que este proceso podría favorecer el crecimiento de la levadura bajo las condiciones ambientales estresantes del vino (Oelofse y col., 2008; Godoy y col., 2009; Wedral y col., 2010). Recientemente, Joseph y colaboradores (2013) observaron que la presencia de ácido *p*-cumárico estimula el crecimiento de esta levadura. Estos autores también sugieren que la conversión de 4-etilfenol podría ser utilizada por las células para reciclar NAD⁺ bajo condiciones de oxígeno limitantes.

Es conocido que niveles de 300 mg/L de azúcares residuales en los vinos son suficientes para que esta levadura forme una cantidad de etilfenoles igual al valor umbral de percepción (450 µg/L) (Chatonnet y col., 1995). Por otro lado, algunos autores han sugerido que la producción de 4-etilfenol en el vino tinto también se ve favorecida en condiciones de baja concentración oxígeno (Curtin y col., 2013). Mientras, Curtin y colaboradores (2013) observaron que bajo condiciones de aerobiosis *D. bruxellensis* no completa la conversión de ácido *p*-cumárico a 4-etilfenol, acumulando concentraciones significativas del compuesto intermediario, 4-vinilfenol.

La relación entre crecimiento y producción de etilfenoles por especies de *D. bruxellesis* en vinos no ha sido estudiada en profundidad. La información acerca de la fisiología de *D. bruxellensis* y la producción de metabolitos parece ser a veces

contradictoria; esto se debe principalmente a que los distintos estudios utilizan cepas diferentes y las condiciones de crecimiento no están bien estandarizadas (Vigentini y col., 2008; Chandra y col., 2014). Distintos estudios anteriores han llegado a diversas conclusiones utilizando diferentes condiciones de ensayo, las cuales frecuentemente están lejos de las condiciones de vinificación (medios complejos, sin etanol, alto contenido de glucosa, alta concentración de AHCs precursores, pH elevado, cultivos mixtos, entre otros). Por otra parte, existen publicaciones, en las cuales se menciona que las células en un estado viable no cultivable también son capaces de producir fenoles volátiles (Agnolucci y col., 2010; Laforgue y Lonvaud-Funel, 2012). Esto último establece una controversia con respecto a las publicaciones anteriores en el campo, y pone en evidencia la necesidad de realizar más estudios que pueden llegar a dilucidar el tema.

1.7. Control de *Dekkera* en vinos

La estabilidad microbiológica de los vinos se puede alcanzar mediante el uso de diversos tratamientos químicos, físicos, físico-químicos y biológicos (Loureiro y Malfeito-Ferreira, 2003; Suárez y col., 2007). El conservante químico más común es el SO₂. El SO₂ es ampliamente utilizado en la industria del vino y de los alimentos por sus propiedades antioxidantes y antimicrobianas. Una vez disuelto en agua, el SO₂ existe en equilibrio en forma de SO₂ molecular, bisulfito y sulfito. Este equilibrio es dependiente del pH, siendo el anión bisulfito la forma dominante bajo condiciones de vinificación (pH entre 3 y 4). Sólo el SO₂ molecular parece ejercer una acción antimicrobiana y su concentración en el vino depende de diferentes factores tales como el pH, el etanol, la temperatura, los niveles de antocianina y el contenido de nutrientes (Fugelsang y Edwards, 2007). Sin embargo, hoy en día existe una tendencia creciente a reducir los niveles de SO₂ en los vinos.

El uso de SO₂ para controlar el crecimiento de *Dekkera* en vinos es una práctica frecuente, aunque las dosis recomendadas son dependientes de las cepas y de las características de los vinos. Una dosis de 0,8 mg/L de SO₂ molecular parecer ser suficientes para inhibir a esta levadura, aunque estas concentraciones moleculares son difíciles de alcanzar en la práctica. Especialmente en las barricas, estas levaduras pueden sobrevivir a los tratamientos con SO₂ principalmente donde el contacto con el SO₂ es limitado, por ejemplo, alrededor del tapón de la barrica, en la estructura de madera de roble, y en los sedimentos de levaduras (lías). Las barricas de roble que se contaminan con *D. bruxellensis* no pueden ser esterilizadas eficazmente, ya que como

se mencionó anteriormente, se han encontrado células viables de *Dekkera* en barricas hasta 8 mm dentro de la madera de las duelas (Malfeito-Ferreira, 2005). La esterilización completa de la barrica es muy difícil de alcanzar, diferentes estudios han demostrado que la misma no se logra ni con un lavado cuidadoso seguido de un lavado con agua sulfitada, ni con un rascado y quema con fuego, ni con un tratamiento con ozono (Pollnitz y col., 2000). Esto se debe principalmente al gran volumen interno y de la naturaleza porosa de las barricas de roble (Suárez y col., 2007).

Otras opciones para el control microbiano en los vinos, son el uso de dicarbonato de dimetilo (DMDC), el quitosano (un polisacárido derivado de la quitina), los ácidos débiles (como sórbico, benzoico y fumárico), la filtración a través de membranas o bien la aplicación de altas presiones de 400-500 MPa durante 5-15 min a temperaturas de 5-20 °C. Cada una de estas opciones para el control de *Dekkera*, presenta ventajas y desventajas y pueden causar pérdida de color y de aromas en los vinos, o bien no estar autorizadas para su uso en el sector vitivinícola o estar aún en una fase experimental (Suárez y col., 2007).

Por otro lado, existen tratamientos que intentan reducir los etilfenoles que aparecen en el vino después de la contaminación con *Dekkera*; los mismos son la ósmosis inversa y la adsorción. La polivinilpirrolidona (PVPP) y el carbón activado son adsorbentes propuestos para eliminar estos compuestos, pero pueden presentar algunas desventajas. En estudios realizados con la aplicación de estos dos compuestos, se logró reducir efectivamente la concentración de etilfenoles, mientras no se observó ninguna reducción significativa en el color del vino, en los taninos, en el cuerpo (glicerol y dioles) o en la concentración de etanol. Sin embargo, se observó una reducción de la concentración de compuestos aromáticos, especialmente metil y etilvainillato y otros ésteres (Suárez y col., 2007).

Diferentes tratamientos son utilizados en el control de *Dekkera* pero de manera poco eficaz, ya que la mayoría de ellos conjuntamente con la disminución de las poblaciones de *Dekkera* y/o el defecto fenólico, causa un efecto perjudicial en la calidad global del vino.

1.8. Prevención de la contaminación con *Dekkera*

Parece lógico pensar que la forma más eficaz para prevenir la contaminación del vino por *D. bruxellensis* es controlando su desarrollo y la producción de etilfenoles a través del manejo en bodega utilizando un enfoque preventivo. Suponiendo que se

dispone de suficientes nutrientes, el crecimiento microbiano puede ser controlado principalmente por el manejo del pH, el etanol y la temperatura; factores adicionales, tales como la presencia de conservantes como sulfitos (SO_2) también podrían contribuir. Se han llevado a cabo diferentes estudios para comprender mejor el efecto que tienen los factores ambientales en el crecimiento *Dekkera*, evaluando cada variable de forma independiente (Dias y col., 2003b; Oelofse y col., 2008). Existen diversas investigaciones donde se evalúa el efecto de distintas variables sobre el crecimiento de especies de *Dekkera*, considerando cada variable de manera independiente y en diversos medios de cultivo (Du Toit y col., 2005; Aguilar Uscanga y col., 2003; Loyola y Fonseca, 2007; Loyola y Rey, 2007). Sin embargo, debido a la complejidad de la alteración microbiológica en el vino estos factores no pueden ser considerados de manera individual sino requieren un enfoque holístico (Oelofse y col., 2008).

Por otro lado, la creciente tendencia a disminuir el uso y los niveles de conservantes y aditivos en los alimentos que surge como respuesta a la demanda de los consumidores, que prefieren alimentos cada vez más “naturales”, aumentando la relevancia que tiene la prevención de la contaminación como herramienta clave en la producción de alimentos (Stratford, 2006).

La microbiología predictiva en los alimentos es un área de investigación dentro de la microbiología de los alimentos que desarrolla modelos matemáticos para predecir el comportamiento microbiano en ambientes alimentarios. Aunque los primeros modelos predictivos son descriptos a partir del siglo XX, un gran desarrollo en esta área ha ocurrido en las últimas décadas como resultado de los avances de software. Además del conocimiento exhaustivo en microbiología de los alimentos, el campo de la microbiología predictiva se basa en importantes conceptos matemáticos y de modelización. Los diferentes tipos de modelos permiten predecir el crecimiento, la inactivación, y/o la probabilidad de crecimiento de bacterias en los alimentos en diferentes condiciones ambientales, considerando factores adicionales tales como el estado fisiológico de las células o la interacción con otros microorganismos. Hoy en día, los modelos predictivos se han convertido en una herramienta necesaria para apoyar las decisiones relativas a la seguridad y calidad alimentaria, ya que los modelos pueden proporcionar respuestas rápidas a preguntas específicas. Además, los modelos predictivos han sido incorporados como elementos útiles en los sistemas seguridad alimentaria basados en Análisis de Riesgos y Puntos Críticos de Control (HACCP). Las políticas nacionales e internacionales de seguridad alimentaria actuales

se basan en el desarrollo de estudios de evaluación de riesgos microbianos cuantitativos, los cuales se apoyan en gran medida en la aplicación de modelos predictivos. La microbiología predictiva continúa creciendo y se está convirtiendo en una herramienta importante para mejorar la seguridad y calidad alimentaria (Pérez-Rodríguez y Valero, 2013).

Dentro de la microbiología predictiva, existen estudios que apuntan a estudiar la probabilidad de crecimiento y producción de toxinas (Genigeorgis, 1981; Roberts y col., 1981), que más tarde dieron lugar a un nuevo tipo de modelo, es decir, los modelos de probabilidad de crecimiento/no crecimiento o modelos para conocer la probabilidad de que los organismos crezcan y produzcan toxina dentro de un período de tiempo dado. Este tipo de modelo ha sido estudiado más extensivamente para definir los límites absolutos de crecimiento de microorganismos en ambientes alimentarios específicos (Salter y col., 2000; McMeekin y Ross, 2002; Valero y col., 2010) y han sido utilizados ampliamente en microbiología predictiva para obtener interfaces de crecimiento/no crecimiento de microorganismos alteradores y patógenos en función de los factores ambientales (Ratkowsky y Ross, 1995; Valero y col., 2010; Arroyo-López y col., 2012). La importancia que resulta de determinar los límites de crecimiento/no crecimiento de microorganismos no deseables, permiten establecer las condiciones necesarias para la estabilización del producto y también garantizar la seguridad alimentaria. Un nivel bajo de probabilidad (p) es necesario para aumentar la seguridad de los alimentos y la estabilización del producto, es por esto que las interfaces generadas por modelos logísticos, deben ser definidas para un determinado nivel de probabilidad.

Se ha observado que la aparición del defecto asociado a *Dekkera* en el vino está estrechamente relacionada con el número de levaduras, la concentración de ácidos fenólicos presentes en el mosto, el pH, la concentración de SO_2 y etanol presentes en el vino (Dias y col., 2003b; Silva y col., 2004). Por lo tanto, resulta necesario un abordaje que involucre a estas variables de una forma combinada utilizando las herramientas de la microbiología predictiva y que pueda ser extrapolable al vino. Hasta el momento, no se ha desarrollado un modelo probabilístico para la levadura alteradora del vino *D. bruxellensis*.

2. HIPÓTESIS

2.1. *Dekkera bruxellensis* puede ser aislada de vinos tintos de Mendoza.

2.2. La actividad de las enzimas cumarato decarboxilasa y vinilfenol reductasa es dependiente de la cepa de *D. bruxellensis* y determina la concentración final de fenoles volátiles que se producen en condiciones simil-vino.

2.3. Existe una relación directa entre la concentración inicial de ácidos hidroxicinámicos precursores y la concentración final de fenoles volátiles producida por *D. bruxellensis* en condiciones simil-vino.

2.4. La síntesis de fenoles volátiles se produce durante el crecimiento activo de *D. bruxellensis*.

2.5. La probabilidad de crecimiento de *D. bruxellensis* en condiciones simil-vino se encuentra estrechamente relacionada a los niveles presentes de diferentes variables como pH, concentración de etanol y niveles de SO₂ libre y su efecto combinado.

2.6. El desarrollo de un modelo probabilístico de crecimiento/no crecimiento para *D. bruxellensis* en medios de cultivo artificiales (simil-vino) produce resultados que pueden ser extrapolados a los sustratos naturales y permite predecir la probabilidad de que *D. bruxellensis* desarrolle en un determinado vino.

3. OBJETIVOS

3.1. *Objetivo General*

Desarrollar un modelo matemático que permita predecir el riesgo de aparición de defectos fenólicos causados por *Dekkera bruxellensis* en función de las características de los vinos tintos de la región vitivinícola Cuyo.

3.2. *Objetivos Específicos*

3.2.1. Aislar e identificar las levaduras contaminantes en vinos tintos que presenten alteración o defecto.

3.2.2. Diseño y elección de las condiciones experimentales para la evaluación de *D. bruxellensis* en condiciones controladas y reproducibles que asemejen un vino luego de la fermentación alcohólica.

3.2.3. Caracterizar las actividades enzimáticas relacionadas al metabolismo de los ácidos hidroxicinámicos y su relación con la producción final de fenoles volátiles en condiciones simil-vino en diferentes cepas de *D. bruxellensis*.

3.2.4. Conocer la relación entre la concentración inicial de ácidos hidroxicinámicos precursores y la producción final de fenoles volátiles en condiciones simil-vino.

3.2.5. Determinar en qué etapa del crecimiento de *D. bruxellensis* se produce la síntesis de fenoles volátiles en condiciones simil-vino.

3.2.6. Conocer el efecto combinado de distintos factores como: pH, concentración de etanol y concentración de SO₂ sobre el crecimiento de *D. bruxellensis* en un medio simil-vino.

3.2.7. Desarrollar un modelo matemático que permita predecir la probabilidad de crecimiento *D. bruxellensis* en condiciones simil-vino.

3.2.8. Validar el modelo probabilístico desarrollado en vinos tintos.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Aislamiento e identificación de levaduras contaminantes provenientes de vinos tintos de Mendoza

Se analizaron 48 muestras de vino tinto que presentaban alteración o defecto, provenientes de diversas bodegas ubicadas en la provincia de Mendoza, las cuales arribaron al laboratorio para control microbiológico. Los vinos fueron procesados mediante filtración por membrana (poro 0,45 μm) o dilución (en caso de ser necesario) y posterior siembra en el medio selectivo para *Brettanomyces*: glucosa 10 g/L, extracto de levadura 10 g/L, agar 15 g/L, cloramfenicol 0,5 g/L, actidiona (cicloheximida) 0,1 g/L, ácido *p*-cumárico 0,4 g/L; pH 4,7- 5,0 ajustado con 1 M HCl; etanol 6 % (Roccato y col., 2001). Las muestras sembradas se incubaron 10-14 días a 28 °C. Se realizó un seguimiento de los medios de cultivo durante el periodo de incubación. A partir de los 3 días se controlaron dichos medios para descartar la presencia de *Saccharomyces*, *Candida* y otras levaduras resistentes a la cicloheximida, ya que si bien el medio es selectivo pueden crecer algunas otras levaduras resistentes a éste y a otros inhibidores presentes en el medio de cultivo. A los 5 días se chequearon nuevamente los medios de cultivo y se observó si había presencia de colonias pequeñas. Generalmente *Dekkera* tiene un crecimiento lento que se visualiza a los 5-7 días de incubación, el cual al principio presenta colonias que apenas se perciben como un puntillado transparente sobre la membrana o el medio de cultivo y que con el transcurso de los días las mismas se tornan blancas, cremosas, de bordes regulares y de forma cóncava. Se controlaron las placas a los 7, 10 y 14 días y se realizaron sus respectivos recuentos previa visualización al microscopio óptico con contraste de fases. La morfología de las células de la levadura, fue coincidente con las características reportadas para la misma: célula pequeña (tamaño menor a *Saccharomyces*), células de forma alargada y gemación a 45°, entre las más importantes. Al final de la incubación de los medios de cultivo se evaluó la aparición del aroma fenólico asociado al crecimiento de *Dekkera*, producto del metabolismo del ácido *p*-cumárico presente en el medio de cultivo, abriendo levemente la placa. Cuando la muestra no mostró desarrollo de la levadura durante este periodo se consideró como negativa, sin embargo se esperó hasta 20 días antes de descartar la misma para evitar falsos negativos. En resumen se consideraron *Dekkera* positivas las colonias que presentaron: crecimiento a partir de los 5 días, producción de olor fenólico (producción de etilfenoles) y morfología celular característica de las células mediante observación al microscopio óptico.

Las colonias positivas para *Dekkera* fueron aisladas, purificadas e identificadas mediante PCR del dominio D1/D2 del gen ribosomal 26S seguido de secuenciación (Boekhout y col., 1994; Conterno y col., 2006; Suárez y col., 2007).

Para ello a partir de un cultivo puro activo de cada levadura aislada, se inoculó una ansada en 10 mL de medio de cultivo YPD líquido modificado (glucosa 40 g/L, extracto de levadura 5 g/L, peptona 5 g/L). Los mismos fueron incubados 48 horas a 28 °C con una agitación diaria. La extracción de ADN se realizó aplicando el método modificado de Hoffman y Winston (1987) que consistió en una ruptura celular mediante lisis química/mecánica de las células, seguido de una purificación con fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1) y precipitación con etanol absoluto. El análisis de la integridad del ADN se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,8 % teñido con bromuro de etidio al 0,1 %. La cuantificación del ADN se realizó por comparación visual usando ADN del bacteriófago λ digerido con *EcoR1+HindIII* como ADN patrón de peso molecular. Las imágenes fueron captadas al exponer los geles a transiluminador de UV en fotodocumentador con cámara CCD acoplada y analizadas con el software Gel Doc XR (Bio Rad Laboratorios Limited, Hemel Hempstead, UK.).

El ADN total obtenido fue diluido 20 veces con agua ultrapura estéril y se utilizaron 15 μ L de esta dilución para la reacción de amplificación del dominio D1/D2 del gen ribosomal 26S mediante la aplicación de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los cebadores: NL1 (5'GCA TAT CAA TAA GCG GAG GAA AAG 3') y NL4 (5'GGT CCG TGT TTC AAG ACG G 3'). Inicialmente se realizó la desnaturalización del ADN a una temperatura de 95 °C durante 5 minutos. Luego se realizaron 40 ciclos, a 94 °C por 1 minuto; 55,5 °C por 2 minutos; 72 °C por 2 minutos y 1 ciclo de elongación final a 72 °C por 10 minutos. Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen final de 100 μ L que contenía 15 μ L de ADN diluido (50-100 ng), 10 μ L de buffer de reacción (10X), 2 μ L de cada cebador (50 μ M), 8 μ L de mezcla de dNTP (1 mM), 5 μ L de MgCl₂ (50 mM), 57,5 μ L de agua miliQ y 0,5 μ L de Taq ADN polimerasa (1 U/uL). Para la visualización de las amplificaciones se realizó una electroforesis en geles de agarosa al 1,4 %. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador PTC-2000 (MJ Research Inc.) usando el siguiente programa: 1 ciclo a 95°C 5 min, seguido por 40 ciclos a 94 °C por 60 seg, 55,5 °C por 120 seg, 72 °C por 2 min. Se realizó una extensión final de 10 min a 72 °C, después de los 35 ciclos.

Los productos de amplificación se examinaron por electroforesis en geles de agarosa al 1,4 % teñido con bromuro de etidio (0,5 µg/mL) y fueron visualizados con luz UV en fotodocumentador (Bio Rad Laboratorios Limited, Hemel Hempstead, UK.). El tamaño de los fragmentos obtenidos se estimó por comparación visual con ADN testigo (100-bp ladder, Invitrogen,) con bandas de referencia que oscilan entre 100-1500 pb.

Los fragmentos amplificados fueron purificados mediante *kit PureLink PCR purification* (Invitrogen). Finalmente las muestras fueron enviadas al servicio de secuenciación del INTA Castelar para la obtención de las secuencias de nucleótidos con cada primer de manera independiente. Posteriormente se realizó el alineamiento de las secuencias mediante Contig-Expres (Vector Suite Inc.). Las secuencias consenso obtenidas fueron comparadas por BLAST (Basic Lineal Alignment Search Tool) con las bases de datos disponibles en la página del Centro Nacional de Información de Biotecnología (NCBI) del Instituto nacional de Salud (NIH) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

Cinco de las levaduras identificadas como *D. bruxellensis* B11, PM14, LA17, VC20 y CH29 fueron depositadas en la Colección Cultivos Microbianos de la EEA Mendoza INTA y sus secuencias fueron publicadas en el GENBANK con los respectivos números de acceso: KM236196, KM236197, KM236198, KM236195, KF002710. Estas cepas fueron utilizadas en los sucesivos ensayos, junto con la cepa de referencia de *D. bruxellensis* CECT11045.

4.2. Producción y adaptación de inóculo de *D. bruxellensis*

Para la obtención de un inóculo adaptado a las condiciones de ensayo posteriores (simil-vino) fue necesario un procedimiento gradual de acondicionamiento. La adaptación del inóculo de *D. bruxellensis* se realizó en dos pasos secuenciales utilizando dos medios de cultivo basados en la composición del YPD pero disminuyendo la concentración de azúcares, aumentando la concentración de etanol y disminuyendo el pH. A su vez, se evaluaron diferentes composiciones como la inclusión de un 50 % de vino en los medios, lo cual incluye también una adaptación de las levaduras a los precursores que intervienen en la producción de defecto y al SO₂ que se adiciona normalmente en las bodegas también.

Para la puesta a punto de la producción y adaptación de inóculo se utilizaron dos cepas de *D. bruxellensis*, la cepa nativa B11 y la cepa de referencia CECT 11045.

La biomasa de las diferentes cepas fue obtenida a partir de un cultivo puro y activo desarrollado en medio YPD agarizado, con el agregado de CaCO_3 (0,5 % p/v) incubado a 28 °C durante 7 días. Las colonias fueron posteriormente inoculadas en 20 mL de YPD líquido con 6 % de etanol y ajustado a pH 6 con HCl (1M) e incubadas a 28 °C durante 2 días tres agitaciones diarias manuales. El volumen total de dicho medio de cultivo (10 mL) se adicionó en 20 mL (proporción 1:2) de dos medios de cultivo diferentes. El medio denominado “S” fue formulado con la composición del YPD líquido modificado mediante la reducción del 50 % de la concentración de glucosa (20 g/L) y la adición de etanol al 6 %, mientras que el medio denominado “V” fue formulado con un 50 % de medio YPD líquido modificado preparado en doble concentración y un 50 % de vino tinto. Ambos medios fueron ajustados a pH 4 con HCl (1M). Los medios fueron incubados a 28 °C durante 3 días con tres agitaciones diarias manuales.

El crecimiento en los medios de cultivo fue monitoreado por cambios en la densidad óptica (D.O.) de los cultivos a 640 nm mediante espectrofotómetro (utilizando como blanco en medio de cultivo sin inocular) y por recuento de células viables mediante siembra en superficie en medios de cultivo agarizado: medio selectivo para *Brettanomyces* y medio de recuento total de levaduras WL (Oxoid) (Figura 5). La medición simultánea del crecimiento por ambos medios permitió la construcción de una curva que relaciona D.O. vs número de células viables, la cual fue luego utilizada para estimar las concentraciones celulares a inocular en los sucesivos ensayos.

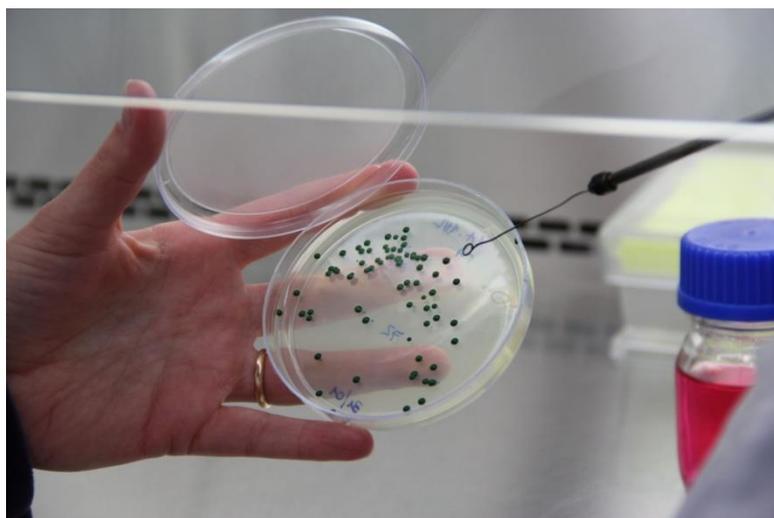


Figura 5. Colonias de *D. bruxellensis* en medio de cultivo sólido WL.

4.3. Diseño y elección de medios de cultivo simil-vino

La utilización de un medio de cultivo simil-vino para realizar los diferentes ensayos fue necesaria para trabajar en condiciones controladas, reproducibles y lo más cercanas al sustrato (vino) donde naturalmente desarrolla la levadura en estudio.

Inicialmente se utilizó el medio líquido simil-vino propuesto por Ferreira y colaboradores (2006) con modificaciones: Yeast Nitrogen Base (YNB) con aminoácidos, 6,7 g/L; glucosa, 0,6 g/L; fructosa, 1,2 g/L; tiamina, 0,25 mg/L; biotina 0,0045 mg/L; etanol, 10 % (v/v). El pH del medio se ajustó el pH a 3,6 con HCl 1 %. Dicho medio se inoculó con la cepa de referencia *D. bruxellensis* CECT 11045 por triplicado en unidades experimentales de 700 mL utilizando tres niveles de inóculo adaptado (10^2 , 10^3 y 10^4 UFC/mL). El ensayo fue mantenido a 28 °C durante 30 días con una agitación diaria manual.

En una segunda etapa y debido que en medio anterior la cepa de referencia no fue capaz de desarrollar, se diseñaron 4 nuevos medios de cultivo simil-vino basados una amplia revisión bibliográfica. La composición de los mismos se muestra en la tabla 1. Para este ensayo se utilizaron dos cepas de *D. bruxellensis* (CECT 11045 y B11), las cuales fueron producidas y adaptadas previamente en los dos medios de producción de biomasa anteriormente descritos S y V (ver sección 4.2.). Los medios simil-vino fueron inoculados con una población de 10^6 UFC/mL e incubados a 28 °C durante 42 días con una agitación diaria manual. Los diferentes medios de cultivo simil-vino sin inocular fueron usados para cada medio en particular como control. El ensayo se realizó en unidades experimentales de 700 mL por triplicado.

Se monitoreó el desarrollo de las levaduras por cambios en la D.O. (640 nm) y por recuento de células viables por siembra en superficie en medios de cultivo agarizado: medio selectivo para *Brettanomyces* y medio de recuento total de levaduras WL (Oxoid).

Tabla 1. Composición de los medios de cultivo simil-vino.

Componentes	Medio A	Medio B	Medio C	Medio D
Glucosa (g/L)	3,3	0,6	3,3	0,6
Fructosa (g/L)	6,7	1,2	6,7	1,2
Trehalosa (g/L)	0,3	-	-	-
Ext. Levadura (g/L)	2,0	-	3,0	-
Peptona (g/L)	-	-	3,0	-
(NH ₄) ₂ SO ₄ (g/L)	1,0	-	-	1,0
MgSO ₄ (g/L)	0,4	-	-	-
KH ₂ PO ₃ (g/L)	2,0	-	-	-
Biotina (mg/L)	25	-	-	-
Tiamina (mg/L)	0,45	-	-	-
Etanol (10 % v/v)	-	SI	-	-
Vino tinto (10 % etanol y 2,4 g/L glu+fru)	-	-	-	SI
pH	-	3,8	-	-

4.4. Caracterización de la actividades enzimáticas relacionadas al metabolismo de los ácidos hidroxicinámicos y su relación con la producción final de fenoles volátiles en condiciones simil-vino en diferentes cepas de *D. bruxellensis*

4.4.1. Evaluación de la actividad cumarato decarboxilasa (CD) y vinilfenol reductasa (VR)

Se trabajó con las 5 cepas nativas de *D. bruxellensis*: B11, PM14, LA17, VC20 y CH29 las cuales provenían de vinos contaminados de diferentes bodegas. Para la evaluación de las actividades enzimáticas las cepas de *D. bruxellensis* se cultivaron en medio de cultivo líquido: YNB 6,7 g/L, glucosa 20 g/L, etanol al 5 % v/v y ácido *p*-cumárico 0,6 mM (100 mg/L) hasta una concentración de 10⁸ células/mL. La cuantificación de la actividad cumarato decarboxilasa (CD) se llevó a cabo de acuerdo con Godoy y colaboradores (2008) con algunas modificaciones. La mezcla de reacción contenía: 200 µL de extracto de proteína, 50 mM de buffer fosfato pH 6 y 2 mM de ácido *p*-cumárico; esta mezcla fue incubada a 40 °C durante 40 minutos. Posteriormente, la mezcla se diluyó 50 veces para evitar interferencia con las proteínas. La actividad decarboxilasa se monitoreó mediante la disminución en la absorbancia a 285 nm. Se definió como una unidad (U) de actividad enzimática a la cantidad de enzima que consume 1 µmol de ácido *p*-cumárico por minuto. La

determinación de la actividad vinilfenol reductasa (VR) se llevó a cabo de acuerdo con la metodología propuesta por Godoy y colaboradores (2009) con algunas modificaciones. La mezcla de reacción contenía: 200 µL de extracto de proteína, 50 mM de buffer fosfato pH 6; 0,15 mM de NADPH y 2 mM de 4-vinilfenol. La mezcla se incubó a 20 °C durante 60 minutos, y la reacción se detuvo mediante la adición de 25 mM Tris-Cl que contenía 0,3 % de SDS. La actividad VR se monitoreó a 340 nm mediante la medición de la disminución en la absorbancia de NADPH, un cofactor oxidable presente en la reacción. Se definió como una unidad (U) de actividad enzimática a la cantidad de enzima que consume 1 µmol de NADPH por minuto. Después de que la reacción hubo terminado, se analizaron los AHCs precursores residuales y los fenoles volátiles presentes en el sobrenadante del medio de cultivo (YNB) de las cepas analizadas por HPLC y GC, respectivamente, como se describirá más abajo. Este estudio se realizó en colaboración con el Dr. Claudio Martínez perteneciente al Centro de Estudios en Ciencia y Tecnología de los Alimentos de la Universidad de Santiago de Chile (CECTA-USACH).

4.4.2. Producción de fenoles volátiles en medio simil-vino

Para evaluar la producción de fenoles volátiles en un medio simil vino por parte de las 5 cepas de *D. bruxellensis* las cuales habían sido previamente caracterizadas en sus actividades enzimáticas, se realizó un ensayo utilizando el medio de cultivo simil-vino B (elegido en ensayos previos) con una concentración de precursores de 6 mg/L en una proporción de ácido *p*-cumárico:ferúlico 8:1. El medio fue inoculado con un cultivo adaptado cada una de las cepas en una concentración de 10⁵ UFC/mL. Se trabajó con condiciones de oxígeno limitante las cuales se obtuvieron utilizando botellas herméticamente cerradas con un tapón de goma. Las unidades experimentales se agitaron manualmente diariamente. Las condiciones de temperatura y oxígeno utilizados fueron seleccionadas para favorecer la síntesis de fenoles volátiles en condiciones enológicas según Dias y colaboradores (2003b) y Curtin y colaboradores (2013). Las poblaciones de *D. bruxellensis* fueron monitoreadas por D.O. (640 nm) donde se utilizó el medio simil- vino B sin inocular como control. El ensayo se llevó a cabo por triplicado en unidades experimentales de 700 mL a 28 °C durante 60 días.

La medición de AHCs residuales y los fenoles volátiles producidos se realizó al final del ensayo. La cuantificación de ácido *p*-cumárico y ácido ferúlico se realizó por

cromatografía líquida (HPLC) de acuerdo a Fanzone y colaboradores (2012), como se describe a continuación.

4.4.2.1. Determinación de ácidos hidroxicinámicos

La cuantificación de ácido *p*-cumárico y ácido ferúlico se realizó mediante cromatografía líquida (HPLC) Perkin-Elmer Series 200 equipado con un detector de arreglo de diodos, una bomba cuaternaria y un automuestreador HPLC-DAD; PerkinElmer, Shelton, CT, EE.UU.) de acuerdo a la metodología propuesta por Fanzone y colaboradores (2012). Las muestras (2 mL) se filtraron con un filtro de celulosa de poro 0,22 μm , y 30 μL se inyectaron directamente en el sistema del HPLC. La separación se realizó en una columna de fase reversa Nova-Pak C18 (300 mm x 3,9 mm ID, 4 μm ; Waters Corp., Milford, MA) mantenida a 25 °C. Se emplearon dos fases móviles para la elución: A (agua/ácido acético, 98:2, v/v) y B (agua/acetronitrilo/ácido acético, 78:20:2, v/v/v). El perfil de gradiente fue el siguiente: 0-55 min: 100-20 % de A y 0-80 % de B; 55-57 min: 20-10 % de A y 80 a 90 % de B; 57-70 min: 10 % de A y 90 % B isocrático; 70-80 min: 10-0 % de A y 90 a 100 % de B; 80-125 min: 100 % de B (isocrático). Las corridas se completaron con 100 % de metanol para lavado y re-equilibración de la columna. El flujo fue de 0,9 mL/min de los 0-55 min y 1,0 mL/min de los 55-125 min. La detección por arreglo de diodos se realizó mediante escaneos a 210-360 nm con una velocidad de adquisición de 1 s. La identificación de compuestos específicos se llevó a cabo por comparación de los tiempos de retención y espectros con estándares. Todos los compuestos fenólicos individuales se confirmaron por HPLC-DAD/ESI-MS según la metodología propuesta por Monagas y colaboradores (2005). Las determinaciones cuantitativas se realizaron mediante el método de estándar externo con los estándares comerciales de ácido *p*-cumárico (501-98-4) y ácido ferúlico (537-98-4) adquiridos en Sigma-Aldrich (St Louis, MO, EE.UU.). Las curvas de calibración se obtuvieron mediante la inyección de soluciones estándar en las mismas condiciones de ensayo, y dentro de la gama de concentraciones observadas ($R^2 \geq 0,94$).

4.4.2.2. Determinación de vinilfenoles y etilfenoles

La determinación de fenoles volátiles (vinilfenoles y etilfenoles) se realizó por Microextracción en Fase Sólida en Espacio de Cabeza (HS-SPME) y Cromatografía Gaseosa-Espectrometría de Masas (GC-MS). En una primera instancia se realizó el tratamiento de la muestra. Para ello se utilizó una dilución 1:2 de la muestra con agua ultrapura (Millipore, USA) y se ajustó el pH a 7 con una solución de NaOH (5N).

Posteriormente se realizó la microextracción en fase sólida. Para ello en un vial color caramelo de 20 mL se colocaron 10 mL de la muestra diluída junto con 3 g de NaCl (Anedra, Argentina), 200 μ L de solución etanólica de anisol (Sigma Aldrich, USA) de concentración final 260 μ g/L en vial (estándar interno), y un buzo magnético para SPME. Se colocó el vial en un agitador magnético IKA MAG-RET control visc (IKA, USA) a 40°C y 1000 rpm. Bajo estas condiciones, se realizó el pre-acondicionamiento de la muestra durante 30 minutos y posteriormente la extracción de los fenoles volátiles con fibra SPME de poliacrilato 80 μ m (Supelco, USA) expuesta en espacio de cabeza durante 1 hora. Finalmente se realizó el análisis cromatográfico, para lo cual se realizó la desorción térmica de los analitos en el puerto de inyección del Cromatógrafo de Gases Varian CP3800 (Varian, USA) a 280 °C, en modo split/splitless durante 5 minutos y se utilizó Helio de alta pureza como gas carrier con un flujo de 1 ml/min. Los fenoles volátiles se separaron en una columna cromatográfica Factor Four VF5ms (30 m x 0.25 mm; Varian, USA). Se trabajó con rampa de temperatura en columna como se muestra a continuación: 50 °C (3 min.), un incremento de 15 °C/min hasta 80 °C (1 min.), luego se llevó a 120 °C (1min.) trabajando a 2,5 °C/min y finalmente a 250 °C (5 min) a 30 °C/min.

La detección de los analitos se realizó mediante un Espectrómetro de Masas Saturn 2200 (Varian, USA), con 70eV de impacto electrónico y en modo SIS (Single Ion Storage). La identificación se realizó mediante comparación de los tiempos de retención y espectro de masas de los estándares fenoles volátiles puros con los presentes en las muestras. La cuantificación se realizó mediante el método del estándar externo, construyendo curvas de calibración para 4-etilfenol (CAS Number 123-07-9; 99 % pureza), 4-vinilfenol (CAS number 2628-17-3; 10 % p/v en solución de propilenglicol), anisol como estándar interno (CAS number 100-66-3; 99 % de pureza), 4-etilguayacol (CAS Number 2785-89-9, 98 %pureza) y 4-vinilguayacol (Cas Number 7786-61-0; 98 %pureza), todos provistos por Sigma Aldrich (USA).

La eficiencia de la conversión de AHCs en etilfenoles se calculó como la proporción de la producción máxima de 4-etilfenol y 4-etilguayacol observadas en los ensayos el día 60 y la concentración máxima teórica estimada para la conversión total de *p*-cumárico y ácido ferúlico cuantificado en el medio en el día 0.

4.5. Relación entre la concentración de ácidos hidroxicinámicos precursores y la producción de etilfenoles en medio simil-vino

Con el objeto de conocer si la concentración de AHCs inicial determina la concentración final de etilfenoles producidos en condiciones simil-vino se realizó un ensayo con 3 cepas nativas de *D. bruxellensis* que presentaban diferente actividad vinilfenol reductasa: B11, VC20 y CH29. El ensayo se realizó en el medio simil-vino B adicionado con tres niveles diferentes de precursores totales; 2,5; 6 y 10 mg/L manteniendo la proporción de ácido *p*-cumárico:ferúlico 8:1. Los medios fueron inoculados con un cultivo previamente adaptado en una concentración de 10^5 UFC/mL (Figura 6). El ensayo se realizó en unidades experimentales de 700 mL en condiciones de oxígeno limitante, las cuales se incubaron a 28 °C durante 45 días con una agitación diaria. Las poblaciones de *D. bruxellensis* fueron monitoreadas durante todo el ensayo por D.O. (640 nm) y por recuento de células viables por siembra en el medio WL y medio selectivo *Brettanomyces*. La cuantificación de ácidos fenólicos precursores (ácido *p*-cumárico y ácido ferúlico) fue realizada por cromatografía líquida de alta performance (HPLC) (Fanzone y col., 2012) (sección 4.4.2.1) y la determinación de vinilfenoles (vinilfenol y vinilguayacol) y etilfenoles (4-etilfenol y 4-etilguayacol) fue realizada por cromatografía de gases acoplada a espectrómetro de masas (GC-MS) (sección 4.4.2.2). Las determinaciones se realizaron al inicio y al final del ensayo (45 días).



Figura 6. Inóculos de cepas nativas de *D. bruxellensis* (B11, VC20 y CH29) y su respectivo control (sin inocular) utilizados durante el ensayo en el medio de cultivo de adaptación y producción de biomasa YPD líquido suplementado con 50 % de vino (V).

4.6. Determinación de la etapa del crecimiento de *D. bruxellensis* donde se sintetizan los fenoles volátiles en condiciones simil-vino

Con el objeto conocer en qué etapa del crecimiento de *D. bruxellensis* se producen los fenoles volátiles, se realizó un ensayo con las 5 cepas nativas las cuales habían sido anteriormente caracterizadas en sus actividades enzimáticas (ver sección 4.4.1.). El ensayo se realizó en el medio de cultivo simil-vino B una concentración de precursores de 6 mg/L manteniendo la proporción de ácido *p*-cumárico:ferúlico 8:1. Los medios fueron inoculados con un cultivo previamente adaptado en una concentración promedio de $5,6 \pm 1,7 \times 10^5$ UFC/mL. El ensayo se realizó en unidades experimentales de 700 mL en condiciones de oxígeno limitante (sección 4.4.2.2), las cuales se incubaron a 28 °C durante 60 días (Figura 7). Las unidades experimentales se agitaron diariamente de forma manual. Las poblaciones de *D. bruxellensis* fueron monitoreadas durante todo el ensayo por D.O. (640 nm) y por recuento de células viables mediante siembra en superficie en el medio WL y en el medio selectivo para *Brettanomyces* previa dilución de las mismas. Debido a que en las sucesivas toma de muestras el volumen total del medio simil-vino fue disminuyendo y por lo tanto la superficie de contacto con el oxígeno fue aumentando, luego de cada muestreo se desplazó el aire del espacio de cabeza mediante el agregado de nitrógeno puro (Linde SA, Mendoza, Argentina) a fin de evitar reacciones oxidativas.



Figura 7. Unidades experimentales de 700mL utilizadas en el ensayo para la determinación del momento de producción de fenoles volátiles durante el crecimiento de 5 cepas de *D. bruxellensis*.

Durante todo el ensayo se evaluó el metabolismo de *D. bruxellensis*, mediante el consumo de los azúcares presentes en el medio y la síntesis de productos metabólicos y el consumo de los AHCs precursores y la síntesis de los fenoles volátiles como se describe a continuación.

Para ello, muestras de 10 mL fueron extraídas en el mismo momento que se tomaban las muestras para monitorear las poblaciones de la levadura, en 6 momentos diferentes (día: 0, 3, 10, 20, 32 y 61) durante el transcurso del ensayo. Estas muestras fueron conservadas en *freezer* a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta el momento de realizar las correspondientes determinaciones.

4.6.1. Análisis de fuentes de carbono, ácidos orgánicos y alcoholes

Las concentraciones de los azúcares (glucosa, fructosa y trehalosa), los ácidos orgánicos (cítrico, málico, láctico, succínico y acético), y los alcoholes (glicerol y etanol) se determinaron por HPLC usando un equipo Shimadzu Prominencia HPLC (Shimadzu, EE.UU.) equipado con una columna de exclusión iónica Aminex HPX-87H de acuerdo a Nissen y colaboradores (1997). Estas determinaciones se realizaron en colaboración con la Dra. Angelica Ganga del Centro de Estudios en Ciencia y Tecnología de los Alimentos de la Universidad de Santiago de Chile (CECTA-USACH).

4.6.2. Análisis de ácidos hidroxicinámicos y fenoles volátiles

La cuantificación de ácidos fenólicos precursores (ácido *p*-cumárico y ácido ferúlico) fueron realizadas por cromatografía líquida (HPLC) (sección 4.4.2.1.) y la determinación de vinilfenoles (vinilfenol y vinilguayacol) y etilfenoles (4-etilfenol y 4-etilguayacol) fue realizada por cromatografía de gases acoplada a espectrómetro de masas (GC-MS) (sección 4.4.2.2.).

4.7. Desarrollo de modelo probabilístico de crecimiento/no crecimiento de *D. bruxellensis* en condiciones simil-vino

4.7.1. Microorganismo y medio de cultivo

La cepa de levadura utilizada en el presente estudio fue la cepa nativa *D. bruxellensis* CH29 aislada originalmente de un vino tinto comercial altamente contaminado. Esta cepa fue seleccionada entre otras cepas *D. bruxellensis* debido a su rápido crecimiento en condiciones de vinificación y por la presencia de ambas actividades enzimáticas (CD y VR). Para la preparación del inóculo, la cepa se adaptó en el medio V utilizado en ensayos previos (sección 4.3). Este medio se incubó durante 3 días a 28 °C y durante ese tiempo, el crecimiento fue seguido por D.O. a 600 nm hasta alcanzar la población más alta (9×10^7 UFC/mL) justo al final de la fase de crecimiento exponencial. El medio simil-vino B fue utilizado como medio basal para llevar a cabo el ensayo y fue inoculado con el cultivo adaptado a razón de 2×10^6 UFC/mL.

4.7.2. Diseño experimental

El medio de cultivo basal simil-vino fue modificado para alcanzar los niveles de las variables a evaluar (pH, etanol y SO₂). Se utilizó ácido tartárico (85 %, w/v) para ajustar el pH y sal K₂S₂O₅ (97 % de pureza) para liberar SO₂ libre en el medio, reproduciendo de este modo las prácticas de uso de SO₂ en bodega. Ambos compuestos están permitidos para adicionarse al vino por la Organización Internacional de la Viña y el Vino (OIV 1998; Ribéreau-Gayon y col., 2006). Los niveles de las variables fueron definidos considerando las condiciones que normalmente presentan los vinos tintos argentinos. Se aplicó un diseño experimental factorial completo, resultado de la combinación de 3 niveles de etanol, 3 niveles de pH y 7 niveles de SO₂ libre haciendo un total de 63 niveles diferentes, que se realizaron por triplicado (Tabla 2). De este modo, se obtuvo un conjunto de 189 datos para cada nivel específico de la variable probada en cada tiempo evaluado. Se consideró al tiempo como una variable adicional (*dummy*), la cual fue incluida en el modelo matemático. El ensayo se realizó a 28 °C durante 30 días. Los valores y concentraciones iniciales de etanol, pH y SO₂ libre, se determinaron aplicando los métodos internacionales de análisis de vinos y mostos (OIV, 2009).

Tabla 2. Variables estudiadas con sus respectivos niveles.

Variable	Tipo	Niveles
Etanol	Cuantitativa	10.0; 12.5; 15.0 (% v/v)
pH*	Cuantitativa	3.4; 3.7; 4.0
SO ₂ libre	Cuantitativa	0; 8; 16; 25; 34; 42; 50 (mg/L)
Tiempo	<i>Dummy</i>	7 (1); 14 (2); 21 (3); 30 (4) (días)

*Fueron necesarias concentraciones de ácido tartárico de 1,53 mM, 2,04 m y 3,57 mM para llegar a los valores de pH 3,4, 3,7 y 4,0 respectivamente. Las formas no disociadas de este ácido fueron 93,4 % (pH 3,4), 96,7 % (pH 3,7) y 98,3 % (pH 4,0).

4.7.3. Medición del crecimiento

El ensayo se realizó en un espectrofotómetro automatizado Bioscreen C (Labsystem, Helsinki, Finlandia) con un filtro de banda ancha (420-580 nm) con control de temperatura que permitió el monitoreo continuo del crecimiento mediante D.O. Se realizaron mediciones cada cuatro horas después de una pre-agitación de 5 segundos para evitar la sedimentación de las células. Los pocillos de la microplaca se llenaron con 0,01 mL de inóculo y 0,35 mL del medio de cultivo símil-vino (modificado de acuerdo con el diseño experimental), para alcanzar una densidad óptica inicial (D.O.) de aproximadamente 0,2 unidades (nivel de inóculo inicial de 2×10^6 UFC/mL). El inóculo estuvo por encima del límite de detección del aparato, que se determinó por comparación con una curva de calibración previamente establecida. Se incluyeron también pocillos no inoculados en la microplaca para cada serie experimental para determinar, y, en consecuencia restar, la señal de ruido. Para cada pocillo se asumió, el crecimiento (codificado como 1) cuando se observó un aumento de D.O. de 0,2 con respecto a la D.O. inicial después de la sustracción de la señal de ruido. Por el contrario, se registró como no crecimiento (codificado como 0) cuando la D.O. inicial no aumentó en los diferentes tiempos evaluados (7, 14, 21 y 30 días). Las respuestas para cada réplica se registraron de forma independiente, y la matriz completa se sometió a un análisis estadístico. Una vez finalizado el ensayo, se seleccionaron pocillos al azar (que incluían tanto muestras con crecimiento como sin crecimiento) que representaban un 5 % del total de casos, los cuales se sembraron en placas de agar YPD que fueron incubadas a 28 °C durante 10 días. Estos recuentos permitieron

corroborar la presunción de crecimiento/no crecimiento previamente observada mediante D.O.

4.7.4. Modelo logístico probabilístico y análisis estadístico

El modelo probabilístico se basa en la regresión logística que permite obtener el logaritmo del valor “odds” para el evento dependiente, que se define como el logaritmo natural de la probabilidad de que ocurra el evento (p) dividido por la probabilidad de que el evento no ocurra (1-p). La transformación logit de p (x) se define generalmente como:

$$\text{Logit (p)} = \ln [p(x)/(1-p(x))] = \beta_0 + \sum \beta_i x_i \quad (1)$$

En el presente estudio, el modelo general descrito anteriormente fue definido como:

$$\text{Logit (p)} = \beta_0 + \sum_{i=1}^3 \beta_i x_i + \sum_{i,j=1,i>j}^3 \beta_{ij} * x_i * x_j + \text{dummy} + \epsilon \quad (2)$$

Donde:

β_0 , β_i y β_{ij} representan los coeficientes a estimar por la regresión logística

$x_{i,j}$ son las variables ambientales cuantitativas estudiadas (etanol, pH y SO₂ libre)

dummy es la variable categórica (tiempo) y

ϵ es un término de error.

El tiempo (variable *dummy*) correspondiente a 7, 14, 21 y 30 días, se codificó como 1, 2, 3 y 4, respectivamente, con el valor más alto (4) tomado como nivel de referencia. En el modelo inicial también se incluyeron términos de segundo grado, interacciones de segundo y tercer orden de las variables cuantitativas, así como también las interacciones de la variable *dummy* con el resto de los términos, pero no

se mantuvieron en la ecuación final. La probabilidad de supervivencia predicha (p), en cada combinación de la variable, se puede estimar como:

$$p = \frac{\exp(\text{logit}(p))}{1 + \exp(\text{logit}(p))} \quad (3)$$

De la ecuación (3), se puede obtener la interfase de crecimiento/no crecimiento para una probabilidad seleccionada (p) en función del pH, del SO_2 libre, y de la concentración de etanol, en cada uno de los niveles de la variable *dummy* (tiempo). Esto se consiguió graficando la ecuación resultante en función de una, dos o tres variables, manteniendo el resto de las mismas fijas en niveles predeterminados.

El modelo de regresión logística descripto anteriormente fue ajustado a los datos de crecimiento/no crecimiento obtenidos en este trabajo. Se realizó el ajuste del modelo usando el paquete de software SYSTAT 12 (Systat Software Inc., Washington, EE.UU.). Se utilizó la selección por pasos automática de la variable (máximo número de corridas permitidas establecidas en 50) con la opción de retroceso para elegir los coeficientes significativos ($p < 0,05$). Los coeficientes retenidos fueron seleccionados con la opción de probabilidad de las pruebas de coeficiente (chi-cuadrado).

Se utilizó el estadístico “log-likelihood ratio” para evaluar la importancia de cada una de las variables sobre la respuesta (datos de crecimiento/no crecimiento de la levadura). Este estadístico (que sigue una distribución chi-cuadrado) indica si los coeficientes del modelo son significativamente diferentes de cero, teniendo en cuenta el número de variables de exploración (grados de libertad) mantenidas en el modelo (Hosmer y Lemeshow, 2000). Se evaluó también la bondad del ajuste usando otro criterio como: 1) el valor rho-cuadrado de MacFadden (una transformación de la probabilidad estadística, $\rho^2 = 1 - (LL(b) / LL(0))$), con valores entre 0,2 y 0,4 considerados altamente satisfactorios; 2) el estadístico R^2 de Nagelkerke (una modificación del R^2 de Cox y Snell, $R^2_{cs} = 1 - \exp[-2 / n(LL(b) - LL(0))]$), ajustado en un rango de 0 a 1 (dividiéndolo con el máximo valor ($R^2_N = R^2_{cs} / R^2_{\text{max}}$ with $R^2_{\text{max}} = 1 - \exp[2(n-1)LL(0)]$)), con valores más cercanos a uno que indican un mejor ajuste del modelo. El significado de estos índices es diferente a R^2 , y se pueden interpretar como una varianza aproximada en el resultado representado por el modelo (Gordon, 2012). Se estimó el cociente de ajuste global (número de predicciones globales correctas dividido por el tamaño de la muestra), la sensibilidad (porcentaje de predicciones correctas en la categoría de referencia) y la especificidad (porcentaje de predicciones correctas en la categoría determinada) del modelo obtenido.

Los coeficientes del modelo “logit” representan los cambios en el logaritmo del valor “odds” (logaritmo natural de la probabilidad de que un evento podría suceder (p), el crecimiento en este caso, dividido por la probabilidad de que no podría suceder ($1-p$), el no crecimiento en este caso) respecto al cambio en una unidad, mientras que en las variables categóricas significan los cambios debido a la transición de un nivel con respecto al nivel de referencia. La interpretación es similar en los otros casos. Una forma más conveniente de interpretar estos coeficientes es a través del “odds ratio” $=\exp(b)$, derivado de la forma multiplicativa de logit (p). Entonces, $\exp(b)$ significa el cambio en el valor “odds” debido a un cambio en la unidad en la variable bajo estudio cuando no se introduce cambio alguno en las otras. En este caso, un valor de 1 ($e^0=1$) indica que la variable bajo estudio no causa ningún efecto sobre el valor “odds”. Los valores inferiores a 1 indican una disminución, mientras que valores superiores a 1 significan un aumento en el valor “odds”.

Se construyeron las interfaces de crecimiento/no crecimiento 3D o 2D predichas con el paquete de software 7.0 ESTADÍSTICO (StatSoft Inc., Tulsa, EE.UU.). Se estimaron los límites para una probabilidad de crecimiento del valor de p de 0,01, lo cual se considera apropiado para el producto ensayado (vino).

4.8. Validación del modelo predictivo

El modelo matemático desarrollado anteriormente permitió conocer el límite de crecimiento/no crecimiento de *D. bruxellensis* en función del contenido de etanol, SO_2 libre y pH de los vinos. Para la construcción del modelo se utilizó una cepa nativa de *D. bruxellensis* (CH29) y se trabajó con diferentes niveles y combinaciones de las variables (etanol, pH, SO_2 libre y tiempo) en medio de cultivo simul-vino. Sin embargo, el hecho de realizar esta idealización matemática conlleva una serie de errores que deben ser tenidos en cuenta para una aplicación correcta del modelo. Es por ello, que una vez obtenido el modelo es necesaria una validación del mismo, considerando distintos niveles, como son: i) validación del modelo con otras cepas de *D. bruxellensis* en condiciones ideales y controladas del microambiente, ii) validación del modelo en alimento esterilizado artificialmente inoculado y iii) validación del modelo en alimentos naturalmente contaminados (Figura 8).

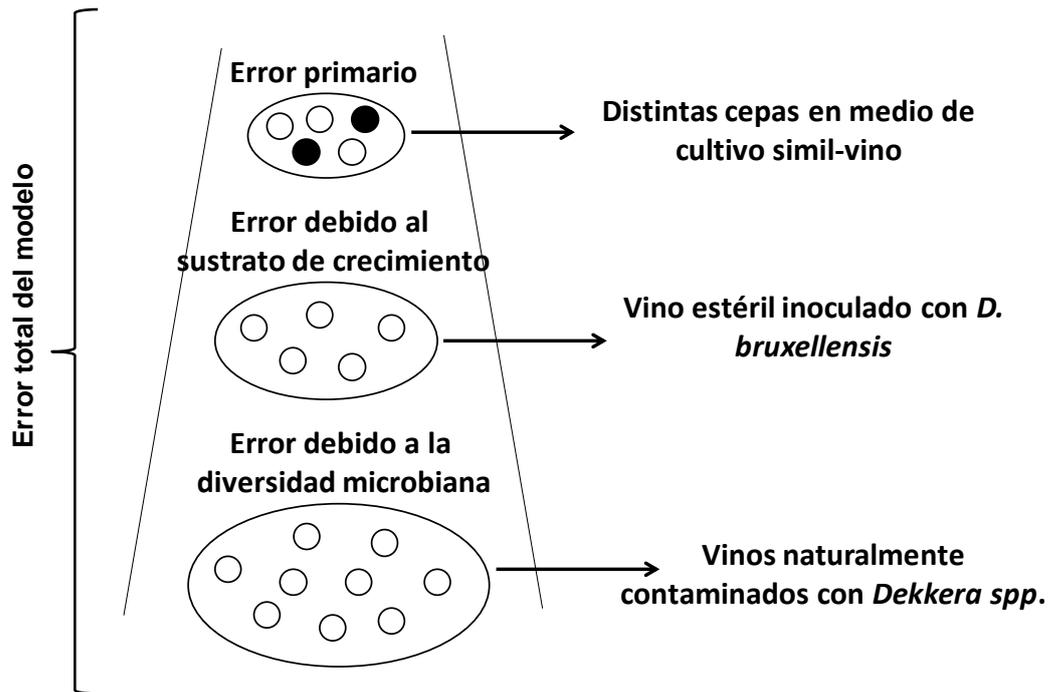


Figura 8. Niveles de validación del modelo predictivo (adaptado de Pin y col. 1999).

El modelo probabilístico previamente desarrollado se validó considerando los niveles anteriormente mencionados. En una primera instancia, se inocularon dos cepas nativas de *D. bruxellensis* (B11 y VC20) en medio simil-vino B usando algunas de las diversas combinaciones de las variables utilizadas en el modelo que incluían valores extremos e intermedios (12 combinaciones diferentes). En una segunda etapa, 16 vinos (de 13 variedades diferentes de vinos tintos) esterilizados por filtración con diferentes valores de etanol, SO_2 libre y pH fueron inoculados con la cepa CH29. En estos ensayos el medio de cultivo simil-vino B y los vinos estériles sin inocular, fueron usados como control, respectivamente. Los ensayos se realizaron durante 30 días a 28 °C en unidades experimentales de 15 mL. Se monitoreó el crecimiento semanalmente mediante D.O. y recuento de viables. Para cada muestra se asumió, el crecimiento cuando se observó un aumento de D.O. de 0,2 con respecto a la D.O. inicial después de la sustracción de la señal de ruido. Por el contrario, se registró como no crecimiento cuando la D.O. inicial no aumentó en los diferentes tiempos evaluados. Finalmente, 12 vinos naturalmente contaminados con *Dekkera* fueron caracterizados en sus valores físico-químicos como pH, SO_2 libre y etanol e incluidos en el análisis de validación.

Se aplicó la ecuación obtenida a partir del modelo matemático (ecuación 5, mencionada en la sección de resultados), introduciendo los valores de las variables físicas y químicas que presentaban los medios simil-vino y los vinos artificial y naturalmente contaminados para calcular la probabilidad de crecimiento de esta levadura en esas condiciones particulares. Estos valores se compararon con los datos experimentales obtenidos.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Aislamiento e identificación de levaduras contaminantes provenientes de vinos tintos de Mendoza

De las 48 muestras de vino tinto provenientes de diversos lugares de la región de Cuyo que arribaron al laboratorio para control microbiológico, 20 muestras fueron positivas mostrando desarrollo en el medio selectivo para *Brettanomyces*. Por otro lado, de estas muestras positivas, 13 de ellas presentaron recuentos mayores a 100 UFC/100 mL de vino. Las colonias de las muestras positivas (42 %) para el medio selectivo *Brettanomyces* fueron aisladas, purificadas e identificadas mediante reacción de PCR seguido de secuenciación del dominio D1/D2 del gen ribosomal 26S (Boekhout y col., 1994; Conterno y col., 2006; Suárez y col., 2007) (Figura 9).

De los 20 aislados sospechosos de ser *Dekkera* por desarrollar en medio selectivo, el 75 % fueron identificadas como *D. bruxellensis*, el 15 % fueron identificadas como *Candida vinaria*, el 5 % fueron identificadas como *Pichia membranifaciens* y el 5 % como *Meyerozyma/Pichia guilliermondii* (Tabla 3).

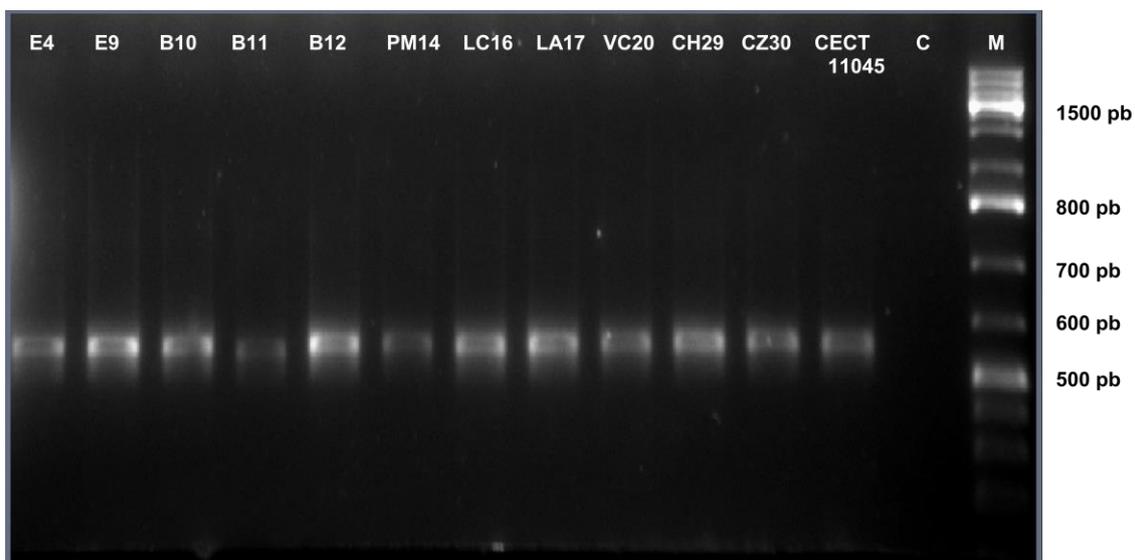


Figura 9. Productos puros de amplificación mediante PCR del gen ribosomal 26S en gel de agarosa 0,8 %. C: Blanco; M: Marcador de peso molecular (100 bp DNA ladder, Fermentas).

De las levaduras identificadas dentro del género *Dekkera*, el 100 % de las mismas pertenecieron a la especie *D. bruxellensis*. Este dato indicaría que esta especie sería la principal responsable de las alteraciones en los vinos tintos de Mendoza. De las 5 especies actualmente reconocidas dentro del taxón *Dekkera/Brettanomyces*, la especie principal asociada al vino es *D. bruxellensis* (Oelofse y col., 2008; Sangorrín y col., 2013), aunque aislamientos de *D. anomala* y *B.*

curtesianus han sido reportados en dos instancias en mostos en fermentación (Querol y col., 1990; Esteve-Zarzoso y col., 2001).

Tabla 3. Identificación de levaduras aisladas en el medio selectivo para *Brettanomyces* mediante secuenciación del dominio D1/D2, del gen ribosomal 26S.

Código	Tamaño del amplificado (pb)^a	% homología^b	Identificación final
F2	600-610	96	<i>Meyerozyma guillermondii</i> (ex <i>Pichia guillermondii</i>)
E3	600-610	99	<i>Dekkera bruxellensis</i>
E4	600-610	99	<i>Dekkera bruxellensis</i>
E5	600-610	98	<i>Candida vinaria</i>
E6	600-610	98	<i>Candida vinaria</i>
E7	600-610	100	<i>Candida vinaria</i>
E9	600-610	99	<i>Dekkera bruxellensis</i>
B10	600-610	99	<i>Dekkera bruxellensis</i>
B11	600-610	99	<i>Dekkera bruxellensis</i>
B12	600-610	98	<i>Dekkera bruxellensis</i>
PM14	600-610	99	<i>Dekkera bruxellensis</i>
LC16	600-610	99	<i>Dekkera bruxellensis</i>
LA17	600-610	100	<i>Dekkera bruxellensis</i>
VC20	600-610	99	<i>Dekkera bruxellensis</i>
K21	600-610	95	<i>Pichia membranifaciens</i>
S22	600-610	94	<i>Dekkera bruxellensis</i>
CZ23	600-610	91	<i>Dekkera bruxellensis</i>
T24	600-610	99	<i>Dekkera bruxellensis</i>
CH29	600-610	98	<i>Dekkera bruxellensis</i>
CZ30	600-610	100	<i>Dekkera bruxellensis</i>
CECT 11045	600-610	100	<i>Dekkera bruxellensis</i>

a: longitud del amplificado 26S, **b:** porcentaje de homología de la secuencia en estudio respecto de la secuencia de la base de datos.

5.2. Producción y adaptación de inóculo de *D. bruxellensis*

Debido a que los ensayos se debían realizar en un medio de cultivo que reflejara lo más cercanamente posible las características de los vinos, es decir baja concentración de azúcares, elevado contenido de etanol y bajo pH, la biomasa de las diferentes cepas a estudiar debió ser adaptada a las condiciones del sustrato. Para ello se evaluaron diferentes tiempos de incubación, en condiciones crecientes de etanol y de pH. Paralelamente se evaluó la adición de una fracción de vino en los medios para producción de biomasa. El procedimiento consistió en un crecimiento escalado en el cual se evaluaron dos cepas de *D. bruxellensis*, una cepa de referencia CECT 11045 y una cepa nativa B11, en dos medios ambos basados en YPD líquido pero preparados con el agregado de etanol al 6 % (S) o vino al 50 % (V).

Los recuentos finales obtenidos en ambos medios fueron similares, siendo de 7,3 log UFC/mL para la cepa de referencia y 7,6 log UFC/mL para la cepa nativa. Ambos medios resultaron ser aptos para la producción de biomasa, pero la adaptación de las mismas a las condiciones posteriores del ensayo (simil-vino) no fue similar como se describirá más adelante.

La medición simultánea de D.O. y recuento de células viables de dos de las cepas, permitió calcular la ecuación lineal que vincula estos dos parámetros y así poder estimar, a partir de valores de D.O., la población de levaduras alcanzada en los inóculos, y consecuentemente la dosis de inoculación de las distintas cepas de *D. bruxellensis*. En la figura 10 se muestra la relación entre la población de células viables y la D.O. para la cepa nativa B11.

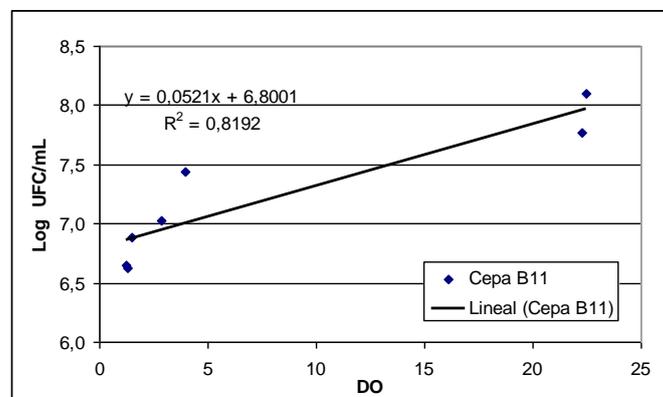


Figura 10. Relación entre recuento de células viables y D.O. de la cepa nativa de *D. bruxellensis*: B11.

Por otro lado, se observó que para poblaciones menores a 10^5 UFC/mL el seguimiento mediante D.O. fue difícil, ya que estaría por debajo de la sensibilidad de la medición utilizada. Por ello en todos los ensayos posteriores el monitoreo de las poblaciones de *D. bruxellensis* se realizó mediante recuento de células viables por siembra en superficie en medios de cultivo. La estimación del crecimiento mediante D.O. sólo fue utilizada para la preparación de los inóculos y estimación de biomasa a inocular en los sucesivos ensayos, y también para estimar las diluciones de siembra a realizar durante los mismos ensayos. El uso de esta medición permitió la inmediata toma de decisiones, ya que el recuento de células viables en el medio selectivo *Brettanomyces* demora entre 5 a 7 días en evidenciar colonias visibles de *Dekkera*.

5.3. Diseño y elección de medios de cultivo simil-vino

Para alcanzar el objetivo de este trabajo fue importante contar con un medio de cultivo que simulara las condiciones del vino y que pudiera ser reproducido modificando su composición, principalmente es sus parámetros de pH, etanol y SO_2 libre.

El medio líquido simil-vino (Ferreira y col., 2006) originalmente propuesto en el plan de trabajo fue evaluado en su capacidad para permitir el desarrollo de la cepa de referencia *D. bruxellensis* CECT 11045. El ensayo fue realizado por triplicado utilizando tres niveles de inóculo adaptado (10^2 , 10^3 y 10^4 UFC/mL) previamente puesto a punto. Se monitoreó el desarrollo de las levaduras por D.O. y por recuento de células viables por siembra en superficie en el medio selectivo para *Brettanomyces* y medio de recuento total de levaduras WL (Oxoid).

Los resultados mostraron que este medio no permitió el desarrollo de esta cepa, donde las poblaciones inoculadas no incrementaron su número, y por el contrario la viabilidad de las poblaciones se vio gradualmente disminuida. Al cabo de 10 días los recuentos en este medio fueron menores a 100 UFC/mL independientemente del nivel inicial de inóculo (Figura 11).

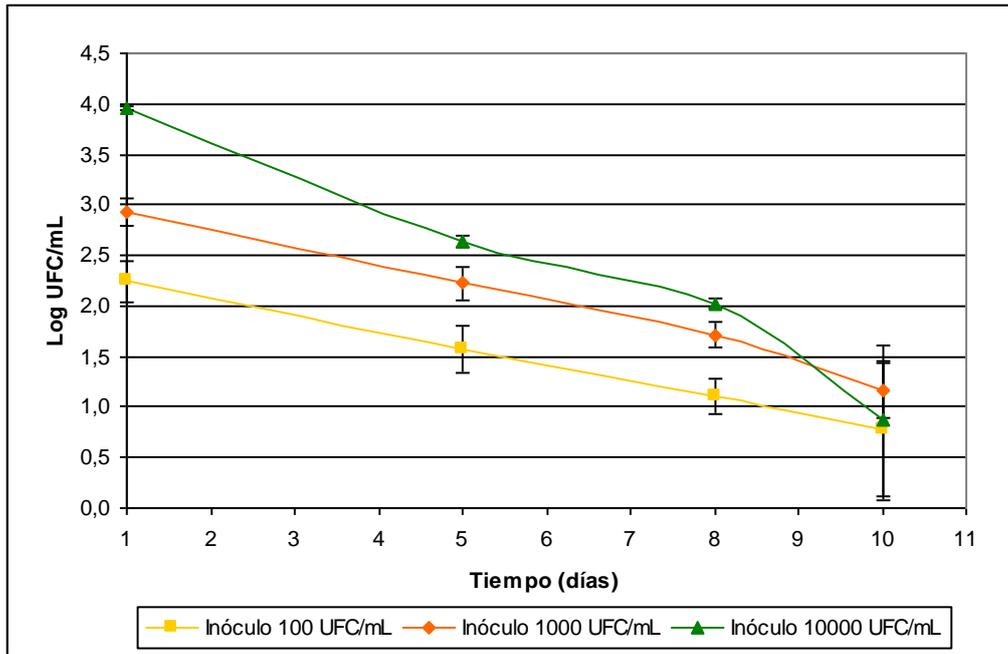


Figura 11. Recuento de *D. bruxellensis* CECT 11045 en el medio simil-vino propuesto por Ferreira y colaboradores (2006) inoculados con diferentes poblaciones iniciales A) 100 UFC/mL; B) 1000 UFC/mL; C) 10000 UFC/mL.

Como consecuencia de estos resultados, se comenzó a evaluar diferentes medios de cultivo líquidos que emularan de mejor manera la composición promedio de un vino, pero que asimismo permitieran un óptimo desarrollo de esta especie. Luego de una amplia revisión bibliográfica se diseñaron 4 medios de cultivo simil-vino los cuales se describieron en la sección de materiales y métodos (ver sección 4.3.).

Dos cepas de *D. bruxellensis* (CECT 11045 y B11) fueron crecidas y adaptadas en los dos medios de producción de biomasa S y V (ver sección 4.2.).

Los resultados mostraron que la biomasa inoculada se encontraba bien adaptada para desarrollar en los medios simil-vino, mostrando que los inóculos desarrollados en el medio que incluía vino en su formulación (medio V) presentaba una inmediata adaptación con ausencia de fase lag, siendo seleccionado para futuros ensayos (Figura 12).

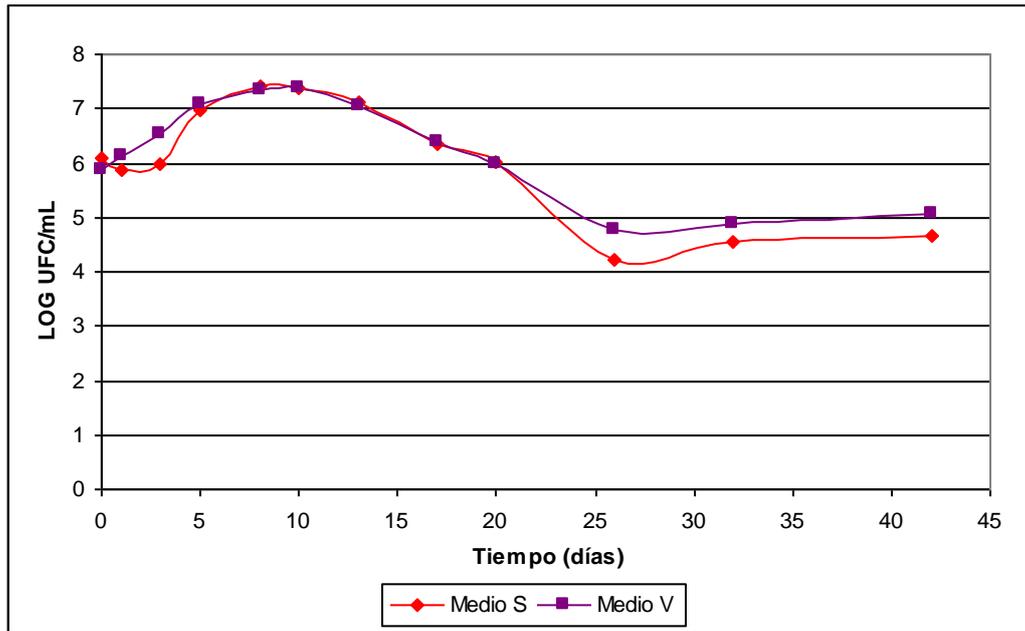


Figura 12. Desarrollo de la cepa *D. bruxellensis* B11 adaptada para producción de biomasa en dos medios diferentes (S y V) e inoculada en el medio A.

El desarrollo de las dos cepas de *D. bruxellensis* en los diferentes medios de cultivo simil-vino evaluados se muestran en la figura 13. La cepa de referencia CECT 11045 mostró una fase de declinación inicial en todos los medios, a pesar de su adaptación a las condiciones de ensayo, la cual fue seguida de una fase de crecimiento o no, dependiendo del medio ensayado. En el medio C ambas cepas mostraron una disminución de la viabilidad, la cual fue más ó menos marcada dependiendo de la cepa. En el medio D, la cepa de referencia presentó una drástica disminución de su población, la cual se recuperó lentamente hasta alcanzar valores superiores a 10^5 UFC/mL, mientras que la cepa nativa B11 presentó dos incrementos en su población. Este comportamiento con dos fases de crecimiento sólo fue observado en el medio que contenía vino en su formulación, lo cual permitió suponer que el primer aumento de la población se debió a la utilización de los azúcares disponibles en el medio, mientras que el segundo, fue realizado probablemente a expensas de compuestos no identificados presentes en el vino. En los medios A y B se observó un mejor desarrollo de la cepa nativa siendo mayor en el medio con elevada concentración de azúcares (medio A), mientras que para la cepa de referencia sólo el medio A permitió el crecimiento hasta poblaciones superiores a 10^5 UFC/mL luego de una prolongada fase lag (Figura 13).

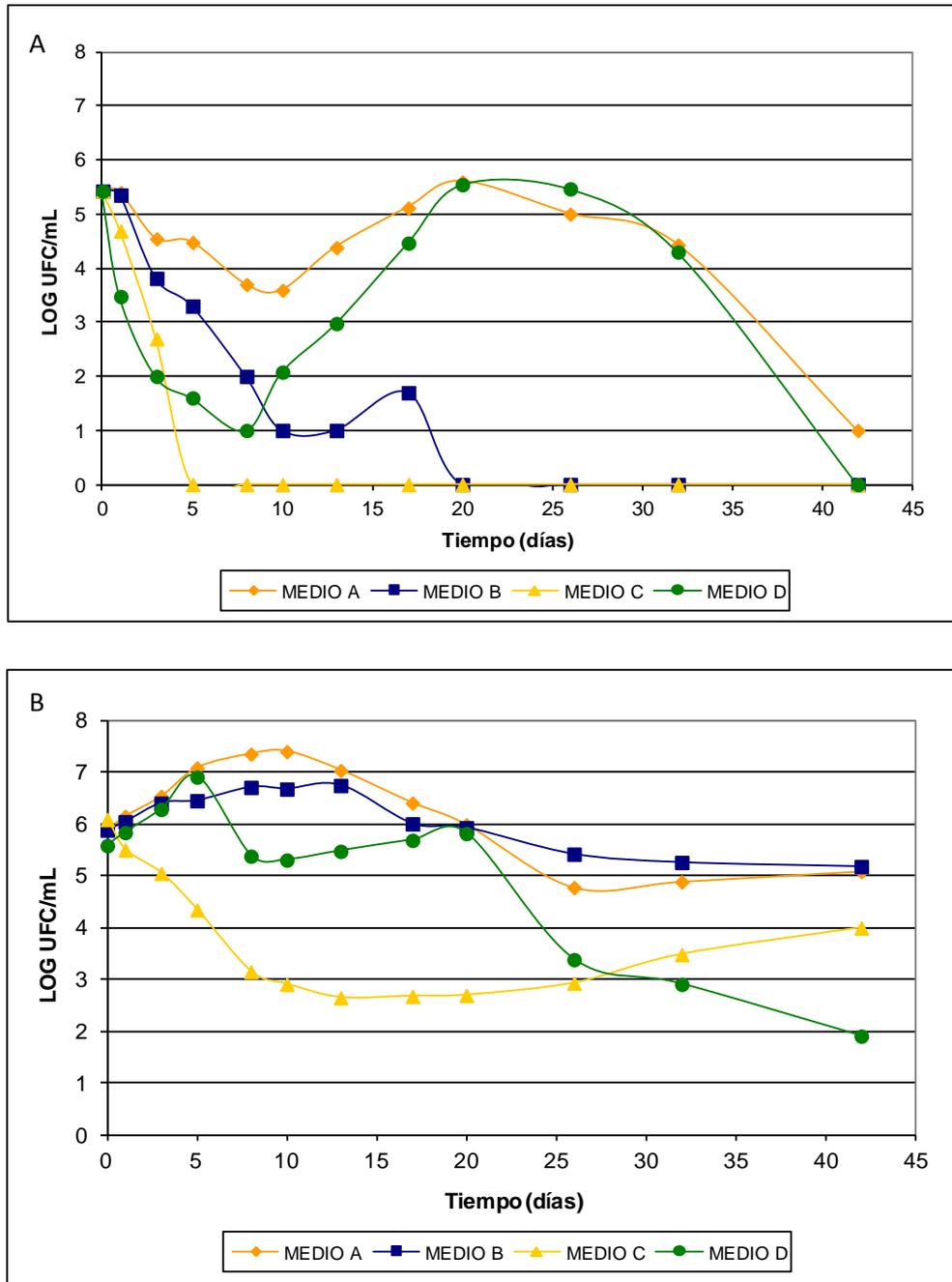


Figura 13. Desarrollo de las cepas CECT 11045 (A) y B11 (B) en los diferentes medios de cultivo simil-vino evaluados.

A partir de los resultados obtenidos se seleccionó el medio V, para la producción y adaptación de inóculo, y el medio simil-vino B, para los ensayos que simulan las características del vino en condiciones controladas y reproducibles. Cabe destacar que el medio seleccionado fue el que contenía una concentración de azúcares similar a las cantidades que se encuentran en un vino terminado (fructosa:glucosa:trehalosa 1,2:0,6:0,3 g/L), extracto de levadura, sales de amonio, magnesio y potasio y vitaminas. Los resultados obtenidos en esta etapa permitieron optimizar la producción de biomasa y medio de cultivo simil-vino, los cuales se utilizaron en los sucesivos ensayos.

D. bruxellensis presenta requerimientos nutricionales específicos que no han sido completamente identificados. Aguilar-Uscanga y colaboradores (2000) demostraron que el sulfato de amonio y el extracto de levadura tienen un efecto significativo en el consumo de glucosa, el crecimiento y la producción de etanol por parte de *D. bruxellensis*. El extracto de levadura parece ser el componente más importante y significativo para el crecimiento (Aguilar-Uscanga y col., 2000). En un vino donde *D. bruxellensis* puede desarrollar, este compuesto sería aportado por la autólisis de las levaduras durante el mantenimiento sobre lías o las pequeñas cantidades de borras con los que el vino es llevado a barricas.

Por otro lado, cabe destacar que en diversos estudios donde se evalúa el crecimiento y la producción de etilfenoles por *D. bruxellensis* se han utilizado diferentes medios de cultivo, los cuales en su mayoría no reproducen completamente la composición del sustrato natural en el que crece la levadura (vino) (Barata y col., 2008b; Oelofse y col., 2009; Joseph y col., 2013). Como se verá más adelante el medio seleccionado fue utilizado en todos los estudios posteriores mostrando, junto a las condiciones elegidas, ser el adecuado para el estudio de esta levadura.

5.4. Caracterización de la actividades enzimáticas relacionadas al metabolismo de los ácidos hidroxicinámicos y su relación con la producción final de fenoles volátiles en condiciones simil-vino en diferentes cepas de *D. bruxellensis*

5.4.1. Evaluación de la actividad cumarato decarboxilasa (CD) y vinilfenol reductasa (VR)

Se utilizaron 5 cepas nativas de *D. bruxellensis* previamente aisladas a partir de vinos contaminados e identificadas en nuestro laboratorio. Las cepas fueron caracterizadas enzimáticamente evaluando su actividad cumarato decarboxilasa (CD) y vinilfenol reductasa (VR) en medios de cultivo.

Los resultados mostraron que todas las cepas fueron capaces de consumir el ácido *p*-cumárico, considerando que la concentración adicionada al medio fue de 100 mg/L (Tabla 4).

Tabla 4. Actividad CD y VR de cepas de *D. bruxellensis* y concentraciones de ácido *p*-cumárico residual y fenoles volátiles finales en medio de cultivo.

Cepa	<i>p</i> -cumárico (mg/L)	Actividad CD* (U/mg)	4-VF final (mg/L)	Actividad VR** (mU/mg)	4-EF final (mg/L)
B11	0 ^a	29,72 ± 4,63 ^a	11,83 ± 3,04 ^a	7,6 ± 1,7 ^a	63,03 ± 1,14 ^c
PM14	0 ^a	26,94 ± 9,27 ^a	31,63 ± 9,89 ^b	9,6 ± 0,3 ^a	54,71 ± 5,21 ^b
LA17	0 ^a	12,43 ± 0,31 ^a	0 ^a	25,0 ± 0,3 ^b	68,32 ± 0,16 ^c
VC20	0,06 ^a	25,57 ± 7,17 ^a	47,95 ± 5,09 ^c	12,5 ± 1,2 ^a	38,03 ± 0,14 ^a
CH29	3,08 ^b	19,55 ± 11,28 ^a	8,69 ± 2,48 ^a	21,4 ± 3,0 ^b	63,96 ± 2,38 ^c

CD: cumarato decarboxilasa; VR: vinilfenol reductasa; 4-VP: 4-vinilfenol; 4-EP: 4-etilfenol.

* Una unidad (U) de actividad enzimática fue definida como la cantidad de enzima que consume 1 μmol de ácido *p*-cumárico por minuto a 40 °C.

**Una unidad (U) de actividad enzimática fue definida como la cantidad de enzima que consume 1 μmol de NADPH por minuto a 25 °C.

Los valores de la misma columna que presentan la misma letra no presentan diferencias significativas (Test de Duncan $p < 0,05$).

Las cepas evaluadas presentaron ambas actividades enzimáticas, pero sin diferencias significativas en sus actividades CD ($p < 0,05$). Con respecto a la actividad VR, se detectaron diferencias significativas ($p < 0,05$), formando dos grupos: las cepas

LA17 y CH29 que presentaron las mayores actividades y las cepas B11, PM14 y VC20 que presentaron las menores actividades. Los resultados mostraron que no existió una relación directa entre las actividades enzimáticas y la producción de fenoles volátiles en el medio. Ejemplo de esto es que las cepas B11, PM14 y VC20 las cuales no presentaron diferencias significativas en su actividad VR, pero sí en la producción de etilfenoles. Apoyando esto último, al hacer un análisis más general, las cepas que no presentaron diferencias en ambas actividades enzimáticas, si presentaron diferencias en las concentraciones producidas de fenoles volátiles.

La detección de 4-etilfenol se ha utilizado como método para identificar la presencia de especies de *Dekkera* en el vino (Pöllnitz y col., 2000). *Dekkera bruxellensis* produce 4-etilfenol a través de la acción de las actividades enzimáticas CD y VR (Chatonnet y col., 1992). En este trabajo, los resultados mostraron que todas las cepas poseían ambas actividades enzimáticas. Nuestros resultados coinciden con los obtenidos por Sangorrín y colaboradores (2013), quienes caracterizaron fisiológicamente 14 aislados de *D. bruxellensis* y encontraron que todas las cepas mostraron actividad CD y VR. Estos autores también encontraron que ninguna de las cepas analizadas mostraron diferencias significativas en la actividad CD, mientras que la actividad VR fue muy variable entre las mismas. En coincidencia con nuestros resultados, los autores no observaron ninguna correlación entre la actividad VR y la producción de 4-etilfenol. En contraste, Godoy y colaboradores (2009), quienes analizaron 12 aislados de *D. bruxellensis* procedentes de diferentes países (Chile, Argentina y España), encontraron que todas las cepas analizadas mostraron actividad CD, pero sólo el 30 % mostraron actividad VR.

5.4.2. Producción de fenoles volátiles en medio simil-vino

En la tabla 5 se muestran las concentraciones iniciales y finales de los AHCs y etilfenoles de las 5 cepas de *D. bruxellensis* y los respectivos cálculos de la eficiencia de conversión. Se observó que la cepa CH29 fue la que dejó menor concentración de ácido *p*-cumárico residual, mientras que la cepa LA17 fue la que dejó la mayor concentración de ácido *p*-cumárico al final del ensayo. No se observó diferencia significativa en la concentración final de fenoles volátiles entre las cepas evaluadas a pesar de que algunas de ellas presentaban diferencias significativas en la actividad VR. La eficiencia de conversión del ácido *p*-cumárico en 4-etilfenol fue del 63 al 66 % y la del ácido ferúlico a 4-etilguayacol fue de 28 a 40 % dependiendo de la cepa en ambos casos.

Uno de los hallazgos más significativos de nuestro estudio fue que las diferentes concentraciones de etilfenoles producidos por las cepas en medio de cultivo rico (ensayo enzimático), no se reprodujeron en condiciones de simul-vino. En este último caso, no se encontraron diferencias estadísticas en los niveles de fenoles volátiles producidos por las diferentes cepas estudiadas. Las condiciones de crecimiento pueden jugar un rol esencial. Resultados similares han sido observados por Oelofse y colaboradores (2009), quienes encontraron diferencias entre los medios sintéticos y el vino con respecto a la producción máxima de 4-etilfenol y 4-etilguayacol por 8 cepas de *D. bruxellensis*. En coincidencia con nuestros resultados, Curtin y colaboradores (2013) demostraron que tres cepas de *D. bruxellensis* procedentes de vinos australianos produjeron concentraciones de 4-etilfenol y 4-etilguayacol iguales en un medio de vino modelo bajo condiciones de oxígeno limitantes. En contraste, Conterno y colaboradores (2006) analizaron 47 aislados de *D. bruxellensis* de diferentes áreas geográficas de todo el mundo y demostraron que la producción de 4-etilfenol y 4-etilguayacol fue muy variable entre los aislados ensayados en vino blanco.

Se puede observar que las concentraciones de precursores reales medidas por HPLC en medio de cultivo el día 0 del ensayo (luego de la inoculación con las levaduras) fueron levemente inferiores a las adicionadas, este hecho puede ser atribuido a la adsorción de los AHCs a las paredes de las levaduras como ha sido sugerido por Salameh y colaboradores (2008), por lo tanto para el cálculo de la eficiencia de conversión se utilizaron los valores de AHCs reales medidos en el medio simul-vino. En este estudio, las cinco cepas de *D. bruxellensis* fueron capaces de metabolizar el ácido *p*-cumárico y ferúlico con la producción de sus respectivos fenoles volátiles, pero la tasa de conversión de ácido ferúlico fue menor que la del ácido *p*-cumárico.

Tabla 5. Concentraciones de ácidos hidroxicinámicos y fenoles volátiles finales cuantificados en el medio simil-vino inoculado con las diferentes cepas de *D. bruxellensis*.

Cepas/ Compuestos precursores y volátiles (µg/L)	Cepas/				
	B11	VC20	CH29	PM14	LA17
Ac. <i>p</i> -cumárico inicial	4471 ± 177	4471 ± 177	4471 ± 177	4471 ± 177	4471 ± 177
Ac. ferúlico inicial	704 ± 297	704 ± 297	704 ± 297	704 ± 297	704 ± 297
Ac. <i>p</i> -cumárico final	743 ± 46 ^{ab}	853 ± 76 ^{bc}	646 ± 48 ^a	813 ± 106 ^{bc}	871 ± 38 ^c
Ac. ferúlico final	ND	ND	ND	ND	ND
4-etilfenol	2092 ± 499 ^a	2193 ± 49 ^a	2154 ± 419 ^a	2229 ± 226 ^a	2122 ± 202 ^a
4-etilguayacol	153 ± 11 ^a	222 ± 31 ^a	184 ± 136 ^a	210 ± 3 ^a	212 ± 31 ^a
Fenoles volátiles totales	2325 ± 510 ^a	2415 ± 80 ^a	2338 ± 555 ^a	2439 ± 229 ^a	2334 ± 233 ^a
Relación EF/EG	14	10	12	11	10
Eficiencia conversión EF (%)	63	66	65	67	64
Eficiencia conversión EG (%)	28	40	33	38	38

Letras diferentes entre columnas indican diferencias significativas entre las cepas (Test de Fisher $p \leq 0.05$).
ND: No detectado.

La detección del ácido *p*-cumárico se realiza comúnmente mediante métodos cromatográficos. Medawar (2003) mostró una discrepancia entre la concentración inicial de ácido *p*-cumárico añadido al medio de fermentación y el análisis mediante HPLC inmediatamente después de la adición del ácido. Esta misma situación fue observada en nuestros ensayos, cuando se evaluó la bioconversión del ácido *p*-cumárico en fenoles volátiles. La suma de vinilfenol, etilfenol y el ácido *p*-cumárico residual medidos al final del ensayo fue inferior a la concentración inicial de ácido *p*-cumárico cuantificada al inicio del ensayo. La esterificación del ácido *p*-cumárico con etanol, como han sugerido Salameh y colaboradores (2008), podría explicar la falta de estequiometría de la reacción enzimática. Estos hechos también pueden explicar la relativamente baja eficiencia de conversión de los AHCs en etilfenoles observada en nuestro estudio, que fueron inferiores a los reportados en otros estudios, que superaban el 90 % (Dias y col, 2003b; Harris y col., 2008). Una posible explicación es que estos autores trabajaron con concentraciones de ácido *p*-cumárico 20 veces más altas que en nuestro estudio, y por lo tanto los niveles de etilfenoles estaban claramente dentro del límite de detección de las técnicas empleadas.

Nuestro ensayo es el primero que informa resultados obtenidos simulando las condiciones reales de los vinos de nuestro país, evaluando la conversión del ácido *p*-cumárico y ácido ferúlico en las concentración y proporciones (8:1) promedio que se encuentran naturalmente en los vinos.

5.5. Relación entre la concentración de ácidos hicroxicinámicos precursores y la producción de etilfenoles en medio simil-vino

Con el objeto de conocer si la concentración de AHCs inicial influye en la concentración final de etilfenoles producidos en condiciones simil-vino se realizó un ensayo con 3 cepas nativas de *D. bruxellensis* que presentaban diferente actividad vinilfenol reductasa, de mayor a menor: CH29, VC20 y B11 (sección 5.4.1.).

Las concentraciones de vinil y etilfenoles encontradas en los medios aumentaron a medida que aumentó la concentración de precursores en el mismo, mostrando diferencias significativas entre las cepas sólo en el medio con la mayor concentración de precursores (Tabla 6). La cepa B11, presentó una menor eficiencia en la transformación en el medio con la mayor concentración de precursores. En este medio los precursores no fueron totalmente transformados en etilfenoles, encontrando aún concentraciones de vinilfenoles (compuestos intermediarios) al final del ensayo (Tabla 6).

Tabla 6. Concentraciones de ácidos hidroxicinámicos y fenoles volátiles finales cuantificados en el medio simil-vino inoculado con las diferentes cepas de *D. bruxellensis*.

Cepas/ Compuestos precursores y volátiles (µg/L)	<i>D. bruxellensis</i> B11			<i>D. bruxellensis</i> VC20			<i>D. bruxellensis</i> CH29		
	C 2,5	C 6	C 10	C 2,5	C 6	C 10	C 2,5	C 6	C 10
Ac. <i>p</i> -cumárico inicial	1890	4360	7190	1890	4360	7190	1890	4360	7190
Ac. ferúlico inicial	220	450	880	220	450	880	220	450	880
Ac. <i>p</i> -cumárico final	129 ± 34 ^a	518 ± 33 ^b	3021 ± 2300 ^b	466 ± 268 ^a	325 ± 240 ^{ab}	738 ± 378 ^{ab}	193 ± 156 ^a	135 ± 5 ^a	870 ± 22 ^a
Ac. ferúlico final	37 ± 13 ^a	156 ± 20 ^b	473 ± 211 ^b	46 ± 3 ^a	47 ± 31 ^a	77 ± 39 ^a	55 ± 0 ^a	67 ± 8 ^a	87 ± 15 ^a
4-vinilfenol	trazas	57 ± 1 ^a	107 ± 26 ^a	7 ± 3 ^a	27 ± 22 ^a	55 ± 22 ^a	117 ± 41 ^a	104 ± 85 ^a	174 ± 163 ^a
4-vinilguayacol	5 ± 3 ^a	26 ± 5 ^a	21 ± 14 ^a	7 ± 2 ^a	13 ± 3 ^a	23 ± 7 ^a	13 ± 2 ^a	21 ± 19 ^a	35 ± 26 ^a
4-etilfenol	1308 ± 51 ^a	2798 ± 153 ^a	1668 ± 990 ^a	1452 ± 128 ^a	3278 ± 518 ^a	4320 ± 320 ^b	1393 ± 588 ^a	1838 ± 999 ^{ab}	3026 ± 936 ^{ab}
4-etilguayacol	132 ± 14 ^a	290 ± 29 ^a	305 ± 237 ^a	114 ± 12 ^a	356 ± 56 ^a	533 ± 1 ^a	124 ± 45 ^a	238 ± 118 ^a	444 ± 110 ^a
Fenoles volátiles totales	1446 ± 118 ^a	3171 ± 187 ^a	2102 ± 1267 ^a	1580 ± 145 ^a	3675 ± 599 ^a	4932 ± 350 ^a	1647 ± 676 ^a	2201 ± 1221 ^a	3679 ± 1236 ^a
Relación EF/EG	10	10	6	13	9	8	11	8	7
Eficiencia conversión EF (%)	90	85	30	100	100	78	96	56	55
Eficiencia conversión EG (%)	75	72	44	65	89	77	71	59	64

Letras diferentes indican diferencias significativas entre cepas para una misma concentración de precursores (Test de Fisher $p \leq 0.05$).

A pesar de que las cepas fueron seleccionadas por su diferente actividad VR en medio de cultivo, estas diferencias no se evidenciaron en el medio simil-vino, ya que las concentraciones de vinilfenoles detectadas no presentaron diferencia significativa entre las cepas, y estuvieron más relacionadas con las concentraciones iniciales de precursores presentes en el medio. La presencia de estos compuestos intermediarios puede deberse a que el ensayo fue finalizado a los 45 días donde probablemente la transformación a etilfenoles aún no había finalizado. En general, no se observó una relación estequiométrica entre la concentración de precursores y la producción de fenoles volátiles en medio simil-vino, donde la eficiencia de conversión de ácido *p*-cumárico a 4-etilfenol fue de un 30 % a un 100 % dependiendo de la cepa y de la concentración inicial de precursores. La eficiencia de conversión de ácido ferúlico a 4-etilguayacol fue menor y estuvo comprendida entre un 44 a 89 %, nuevamente podríamos inferir que este bajo nivel de conversión puede deberse a las muy bajas concentraciones de compuestos con que se trabajó, los cuales pueden ser inferiores al límite de detección de la técnica.

Con el objeto de confirmar la viabilidad de las cepas durante todo el ensayo, las poblaciones viables de *D. bruxellensis* fueron monitoreadas (Figura 14). Los resultados mostraron que las cepas evaluadas se comportaron de manera diferente según las concentraciones de precursores ensayadas. Los efectos se observaron sólo durante los primeros días del ensayo debido a que luego los AHCs habrían sido probablemente metabolizados. Transcurrido este tiempo inicial las poblaciones se comportarían de un modo similar alcanzando poblaciones superiores a 10^6 UFC/mL dependiendo de la cepa. La reducción de la viabilidad de la cepa B11 durante los primeros días de ensayo observada en el medio con mayor concentración de precursores, podría explicar el hecho de que esta cepa dejara cantidades significativamente mayores de precursores que las otras cepas. En el momento en el cual se detuvo el ensayo (45 días) la cepa B11 aun no había finalizado el metabolismo de los AHCs (Figura 14).

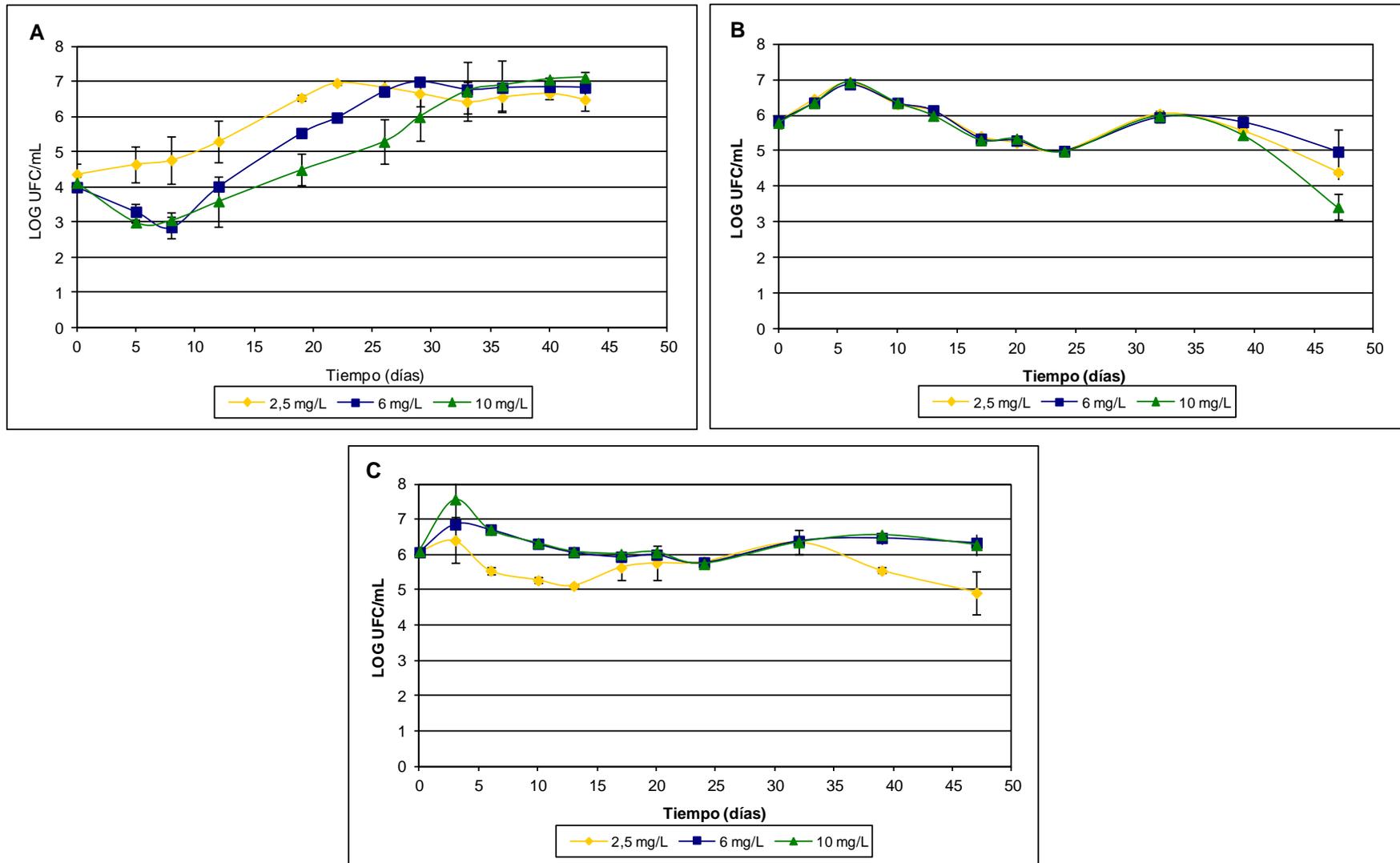


Figura 14. Poblaciones viables de las cepas nativas de *D. bruxellensis* B11 (A), V20 (B) y CH29 (C) en medio simil-vino con diferentes concentraciones de ácidos hidroxicinámicos.

5.6. Determinación de la etapa del crecimiento de *D. bruxellensis* donde se sintetizan los fenoles volátiles en condiciones simil-vino

Para estudiar el metabolismo de *D. bruxellensis* durante el proceso de elaboración del vino resulta esencial elegir las condiciones experimentales apropiadas, el uso de un medio simil-vino puede resultar adecuado para este propósito (Vigentini y col., 2008). Estos tipos de medios de cultivo tienen una composición química bien definida, lo que permite un análisis realista de los sustratos utilizados y de los productos formados en condiciones simil-vino. Estas condiciones deben incluir un ambiente ácido, una cantidad adecuada de etanol (al menos 10 %), la presencia de fuentes de carbono que eventualmente aparecen en el vino (como fructosa residual y diversos ácidos carboxílicos, incluyendo trazas de AHCs), una cantidad limitada de oxígeno y un largo período de incubación (Vigentini y col., 2008).

Con el objeto de conocer el momento durante el crecimiento de *D. bruxellensis* en el cual los AHCs son transformados en los respectivos fenoles volátiles en condiciones simil-vino, se realizó un ensayo con las 5 cepas nativas previamente descritas. Se utilizó el medio de cultivo simil-vino B al cual se le agregó una concentración de precursores de 6 mg/L (*p*-cumárico:ferúlico 8:1) y se mantuvo a 28 °C durante 60 días en condiciones de oxígeno limitante. Durante todo el ensayo las poblaciones totales (D.O.) y las viables (UFC/mL) fueron monitoreadas. Paralelamente en cada punto de muestreo se determinaron los AHCs precursores, los fenoles volátiles producidos, los azúcares, ácidos orgánicos y alcoholes.

Los resultados mostraron que en general todas las cepas tuvieron un comportamiento similar. Las cepas inoculadas en elevadas poblaciones ($5,6 \pm 1,7 \times 10^5$ UFC/mL) fueron capaces de desarrollar rápidamente en el medio simil-vino aumentando su población alrededor de un logaritmo antes de entrar a la fase estacionaria. Las curvas de crecimiento mostraron dos fases. El primer ciclo de crecimiento se observó durante los primeros 20-25 días de ensayo alcanzando poblaciones máximas de 6×10^6 UFC/mL, las cuales luego de una fase estacionaria disminuyeron levemente. Posteriormente se produjo un segundo ciclo de crecimiento comprendido entre los 27 y 39 días de ensayo, donde el incremento de las poblaciones fue menor que para el primer ciclo y se observó una población máxima de 1×10^6 UFC/mL. Luego de este segundo incremento de la población, la viabilidad de las poblaciones decreció gradualmente a distintas velocidades

dependiendo de la cepa (Figura 15). Es importante remarcar que este tipo de curva con dos ciclos de crecimiento ya se había observado para la cepa nativa B11 crecida en el medio D, el cual era básicamente un vino diluido (sección 5.3.) y también en 2 de las 3 cepas evaluadas en el medio simil-vino con diferentes concentraciones de precursores (sección 5.5.).

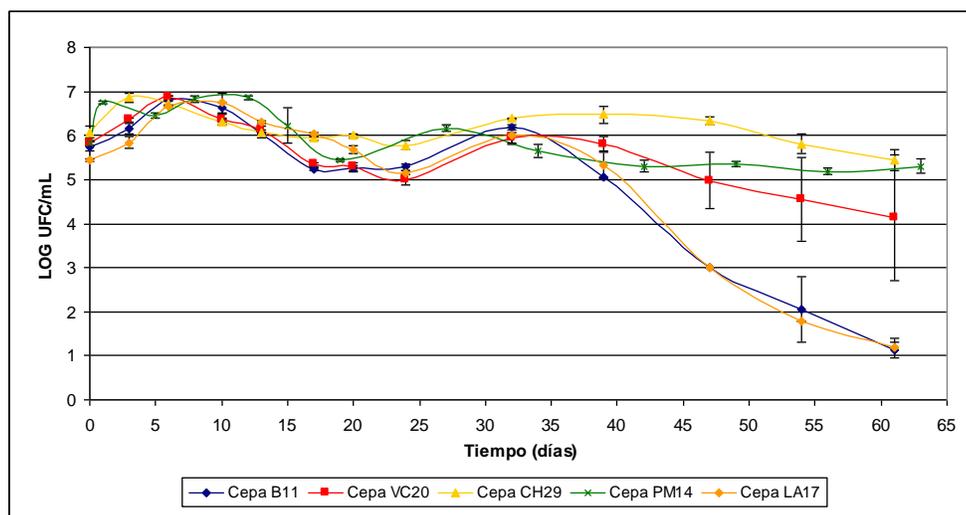


Figura 15. Poblaciones viables de las 5 cepas nativas de *D. bruxellensis* en medio simil-vino con 6 mg/L de ácidos hidroxicinámicos durante 60 días.

El crecimiento de *D. bruxellensis* ha sido ampliamente estudiado con resultados variables (Dias y col., 2003b; Barata y col., 2008b; Vigentini y col., 2008; Curtin y col., 2013). Las curvas de crecimiento de *D. bruxellensis* presentan diferencias en los distintos estudios, lo cual podría atribuirse a las condiciones de ensayo particulares utilizadas en cada uno (Barata y col., 2008b). Vigentini y colaboradores (2008) sugirieron que la etapa de adaptación mediante un pre-cultivo en un medio que contenía 10 % de etanol produjo diferentes respuestas en el crecimiento de las diferentes cepas analizadas. Fugelsang y Zoecklein (2003) describieron dos tipos de ciclos de crecimiento para *D. bruxellensis* en vino Pinot Noir. Uno de ellos mostró una curva en forma de campana, y el otro mostró una segunda fase de crecimiento, lo cual es similar a nuestras observaciones. Nuestros resultados concuerdan con Coulon y colaboradores (2010) quienes observaron una curva de crecimiento bifásico (similar a las nuestras) de las poblaciones viables de varias cepas *D. bruxellensis* que crecieron en vinos embotellados. La habilidad de reanudar el crecimiento después de un descenso de las poblaciones viables parece ser típico de *D. bruxellensis* (Barata y col., 2008a), pero este comportamiento sólo se ha informado cuando la levadura crece en vinos o en condiciones simil-vino y cuando la observación ha

sido realizada por un tiempo suficientemente largo para ser evidenciado (más de 30 días). Aguilar Uscanga y colaboradores (2000) propusieron la hipótesis de que la supervivencia de *D. bruxellensis* es el resultado de su excepcional resistencia a condiciones nutricionales mínimas.

Por otro lado, la reducción de la población evidenciada en el recuento de células viables en nuestro ensayo podría también ser explicada mediante la hipótesis de que las células, una vez agotados los nutrientes y metabolizados los AHCs, podrían haber entrado en un estado viable pero no cultivable (VBNC) para luego recuperarse mostrando un segundo incremento de sus poblaciones viables. El fenotipo viable pero no cultivable (VBNC), el cual se caracteriza por la incapacidad de la célula de multiplicarse en medios de cultivo, a pesar de que está viva y mantiene su actividad metabólica, ha sido ampliamente observado en bacterias y levaduras, incluyendo a *D. bruxellensis* (Kell y col., 1998; Cocolin y Mills, 2003; Serpaggi y col., 2012). Estudios recientes han mostrado que el dióxido de azufre induce el estado VBNC en esta especie de levadura (Du Toit y col., 2005; Agnolucci y col., 2010). Sin embargo, la inducción de un estado VBNC en *Dekkera* a través de otros productos químicos o factores ambientales, incluyendo el agotamiento de nutrientes o las concentraciones de oxígeno limitantes, nunca se ha demostrado que exista de manera concluyente, a diferencia de estudios realizados en ciertas bacterias (Oliver, 2010).

Para tratar de interpretar más profundamente las curvas de crecimiento observadas para las distintas cepas de *Dekkera* en medio simil-vino, se monitorearon las concentraciones de azúcares (fructosa, glucosa y trehalosa) y los posibles compuestos productos del metabolismo como son los ácidos orgánicos (ácidos cítrico, málico, láctico, succínico y acético) y los alcoholes (glicerol y etanol).

Todas las cepas presentaron un comportamiento similar respecto al consumo de fuentes de carbono y producción de compuestos orgánicos (Figuras 16 A, B, C, D y E). Durante el primer ciclo de crecimiento de las levaduras, se evidenció el consumo de todos los azúcares presentes en el medio simil-vino, con excepción de una cepa (CH29) la cual completó la degradación de la trehalosa a los 60 días (Figura 16 C). En general, las cepas consumieron completamente la glucosa en 3-5 días, la fructosa en 10-12 días y la trehalosa en 19-20 días. Paralelamente se registró un incremento leve y gradual del ácido succínico, mientras las concentraciones de etanol, glicerol y ácido acético se mantuvieron

Resultados y Discusión

estables durante todo el ensayo. No se registraron concentraciones de ácido cítrico, málico y láctico (Figuras 16 A, B, C, D y E).

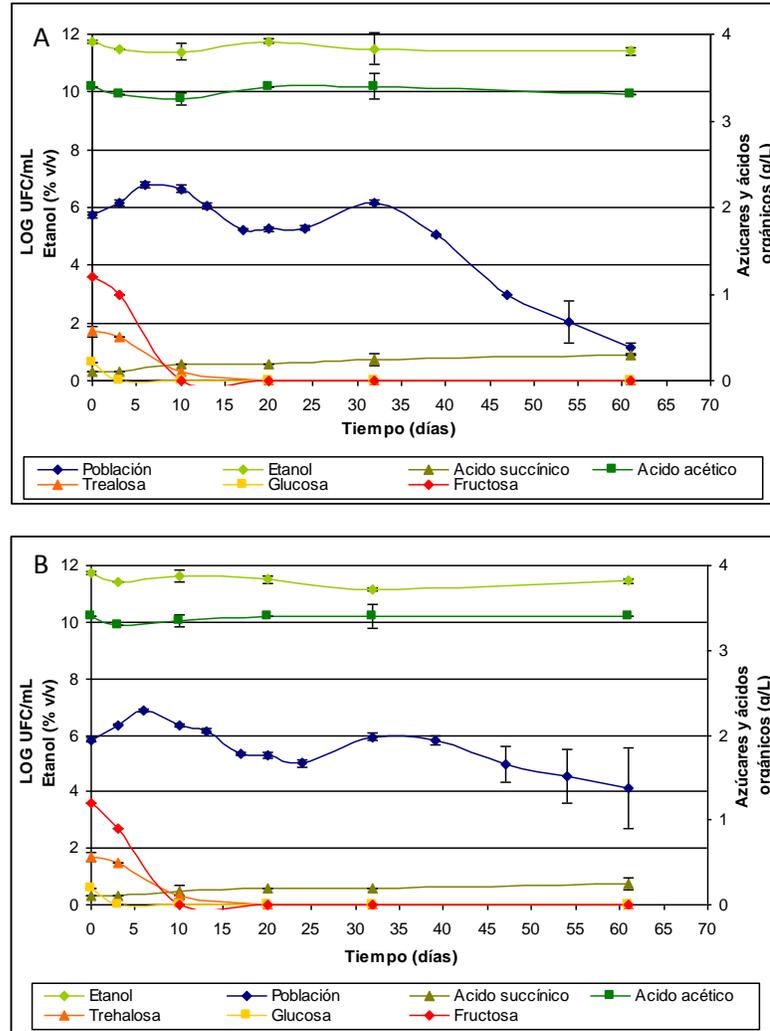


Figura 16. Seguimiento de las poblaciones viables de *D. bruxellensis* y concentraciones de azúcares, ácidos orgánicos y etanol en medio simil-vino de las cepas B11 (A), VC20 (B), CH29 (C), PM14 (D) y LA17 (E).

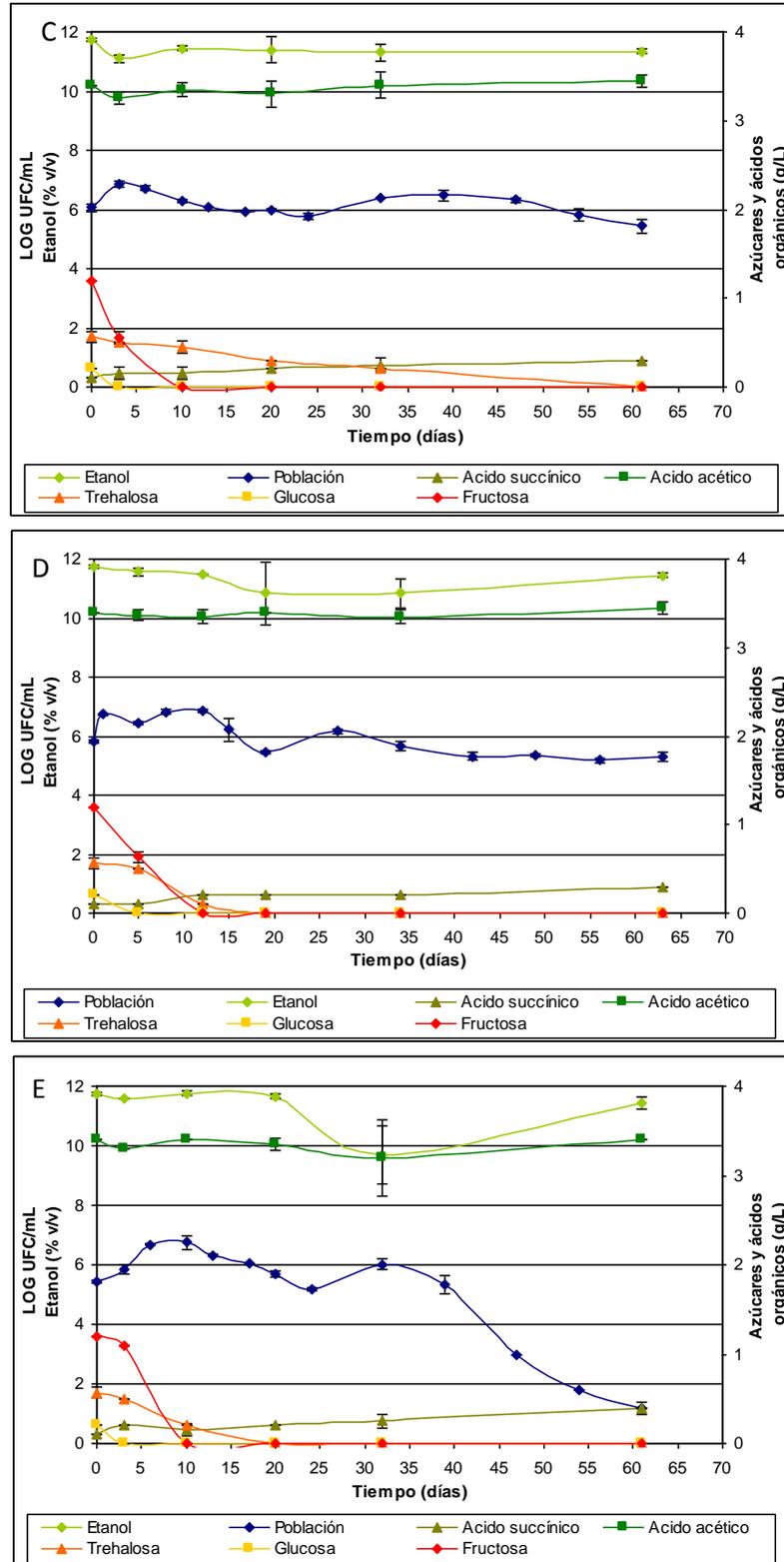


Figura 16 (continuación). Seguimiento de las poblaciones viables de *D. bruxellensis* y concentraciones de azúcares, ácidos orgánicos y etanol en medio simil-vino de las cepas B11 (A), VC20 (B), CH29 (C), PM14 (D) y LA17 (E).

Estos resultados sugieren que las dos fases del crecimiento observadas anteriormente, no podrían ser atribuidas a un crecimiento diáuxico, en el cual el segundo incremento en la población se relacionaría al consumo de azúcares residuales como la trehalosa, ya que en general todos los azúcares disponibles en el medio se consumieron durante el primer ciclo de crecimiento. Por lo tanto, la reducción de la población asociada a un estado VBNC de las células parece ser la hipótesis más acertada.

Nuestros resultados coincidieron con Barata y colaboradores (2008b) quienes observaron que el consumo de las fuentes de carbono presentes en el medio de cultivo (glucosa y fructosa) fueron consumidas durante el crecimiento activo de la levadura. Por otro lado, Chatonnet y colaboradores (1995) analizaron el rol de los azúcares (glucosa, fructosa, galactosa y trehalosa) en el crecimiento y la producción de etilfenoles por *D. bruxellensis* y concluyeron que 275 mg/L de azúcares residuales contenían el suficiente carbono para apoyar el desarrollo de esta levadura y, consecuentemente, la producción fenoles volátiles. En concordancia con esto, nuestros resultados mostraron que 210 mg/L de azúcares residuales (glucosa, fructosa y trehalosa) fueron suficientes para permitir el crecimiento de *D. bruxellensis*. Los azúcares fueron completamente consumidos durante la primera fase de crecimiento, pero el consumo de glucosa y fructosa fue más rápido que el de trehalosa. Sólo unos pocos estudios han informado sobre la cinética de utilización de la fructosa y de la trehalosa por *Dekkera/Brettanomyces* en presencia de etanol y otras fuentes de carbono y/o bajo otras condiciones de estrés. Nuestros hallazgos son similares a los reportados por Dias y colaboradores (2003b) quienes encontraron que la velocidad de consumo de trehalosa por *D. bruxellesis* fue mucho menor que la de la glucosa en condiciones enológicas. Por otra parte, Vigentini y colaboradores (2008) encontraron que *D. bruxellensis* prefirió el uso de la fructosa como fuente de carbono en un medio sintético con una alta concentración de etanol.

Estudios recientes han demostrado que en condiciones de oxígeno limitantes, como las utilizadas en nuestros ensayos, la producción de ácido acético es significativamente menor que en condiciones aeróbicas (Curtin y col., 2013). En nuestro ensayo ninguna de las cepas produjo un incremento significativo del ácido acético lo cual concuerda con la bibliografía mencionada.

Para conocer en qué etapa del crecimiento de *D. bruxellensis* se produce la transformación de los AHCs precursores a fenoles volátiles, se monitorearon las

concentraciones de ácido *p*-cumárico/ferúlico y los vinil/etilfenoles durante el transcurso de todo el ensayo.

Los resultados mostraron que todas las cepas se comportaron de manera similar. Durante el primer ciclo de crecimiento de la levadura se produjo la completa transformación de los precursores hidroxicinámicos a fenoles volátiles. A partir del tercer día se evidenció una rápida degradación del ácido *p*-cumárico y ferúlico, donde entre el 65 y 83 % de la concentración inicial fue transformada en los primeros 10 días de ensayo. En este mismo periodo, se observó la mayor producción de etilfenoles, la cual se evidenció a partir del tercer día. El 63–77 % de la concentración final de etilfenoles fue producida en los primeros 10 días. Los resultados mostraron que la máxima producción de etilfenoles ocurrió en la fase exponencial tardía y estacionaria temprana de la curva de crecimiento de la levadura. Los compuestos intermediarios (vinilfenoles) no fueron detectados, indicando que la transformación a etilfenoles se produciría de manera inmediata para estos niveles de población (Figuras 17 A, B, C, D y E).

Nuestros resultados son consistentes con estudios que muestran que la transformación de AHCs en etilfenoles se produce durante el crecimiento activo de la levadura *D. bruxellensis* (Harris y col., 2008; Benito y col., 2009; Oelofse y col., 2009; Coulon y col., 2010; Joseph y col., 2013), y disienten con otros autores que sugieren que debe ocurrir un crecimiento acumulativo de esta levadura para que se comience a producir el defecto (Fugelsang y Zoecklein, 2003).

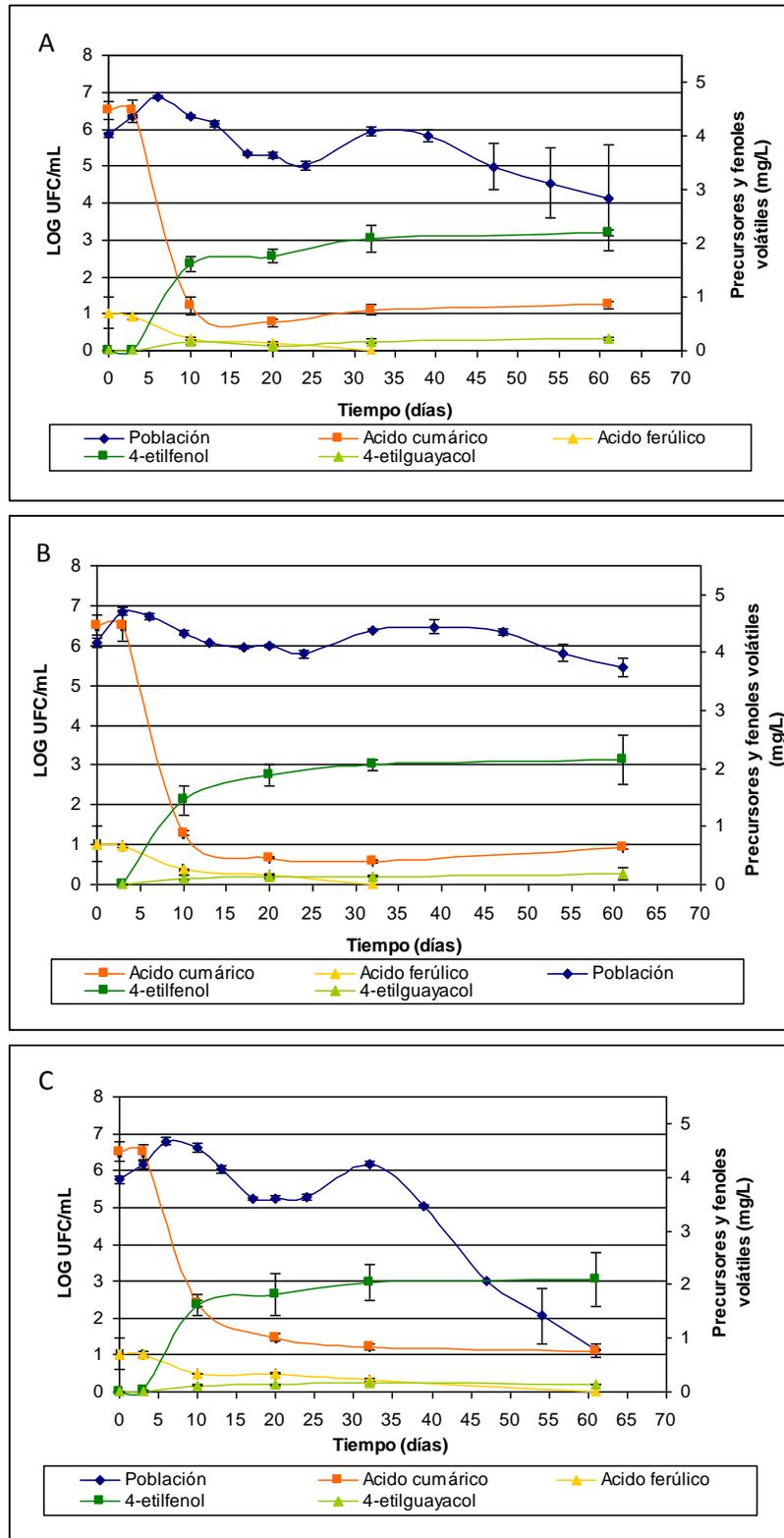


Figura 17. Seguimiento de las poblaciones viables de *D. bruxellensis* y concentraciones de precursores y fenoles volátiles en medio simil-vino de las cepas B11 (A), VC20 (B), CH29 (C), PM14 (D) y LA17 (E).

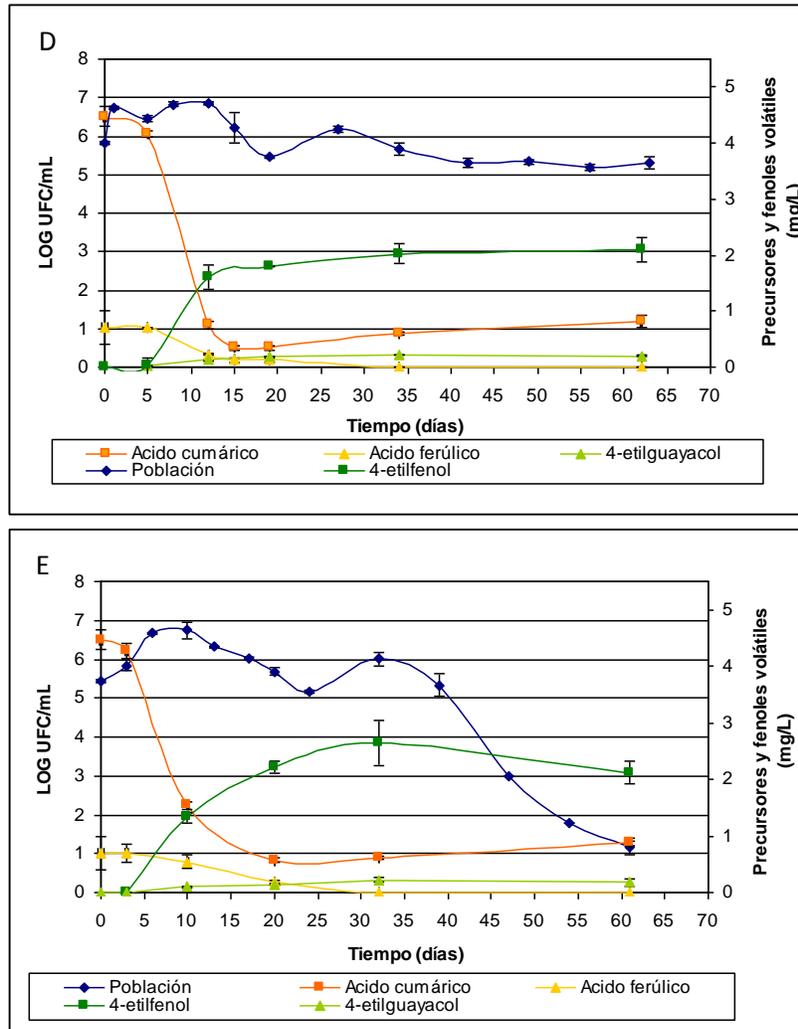


Figura 17 (continuación). Seguimiento de las poblaciones viables de *D. bruxellensis* y concentraciones de precursores y fenólos volátiles en medio simil-vino de las cepas B11 (A), VC20 (B), CH29 (C), PM14 (D) y LA17 (E).

Nuestros resultados muestran que el consumo de los ácidos *p*-cumárico y ferúlico se realizó de manera simultánea en todas las cepas evaluadas (Figuras 17 A, B, C, D y E). Este resultado difiere de lo encontrado por Oelofse y colaboradores (2009) quienes sugirieron que diferentes cepas de *D. bruxellensis* cultivadas en vino adicionado con cantidades similares de ambos compuestos (100 mg/L) prefirieron la vía de conversión de ácido ferúlico que la del ácido *p*-cumárico. Este hecho podría explicarse debido a que el ácido ferúlico es ligeramente más tóxico para la levadura que el ácido *p*-cumárico, y consecuentemente, la absorción y la tasa de conversión fue más rápida en un intento de la levadura de detoxificar el medio ambiente. Esta tendencia no se observó en nuestro

estudio, principalmente debido a la baja concentración de ácido ferúlico ($0,7 \pm 0,3$ mg/L) añadido al medio; 8 veces menor que de ácido *p*-cumárico.

Nuestro trabajo refleja una relación entre el estado fisiológico de *D. bruxellensis* y su capacidad para producir etilfenoles. Las poblaciones cultivables parecerían de hecho ser capaces de sintetizar las mayores cantidades de etilfenoles. En concordancia con esto, Serpaggi y colaboradores (2012) sugirieron que las poblaciones cultivables producen mayores concentraciones de etilfenoles que las células viables pero no cultivables.

Basado en la demostración del vínculo existente entre las células en crecimiento y la producción elevada de etilfenoles, se plantea la construcción de un modelo predictivo de crecimiento/no crecimiento de *D. bruxellensis* en medio simil-vino ya que inhibiendo el desarrollo de la levadura se evitaría la producción de defecto.

5.7. Contrucción de modelo probabilístico de crecimiento/no crecimiento de *D. bruxellensis* en condiciones simil-vino

Para la construcción del modelo se analizaron un total de 756 casos (189 en cada nivel de la variable *dummy*), con una distribución total entre datos de crecimiento/no crecimiento de 321/435, respectivamente. Para todos los pocillos seleccionados al azar (38), la suposición de crecimiento/no crecimiento fue confirmada satisfactoriamente en medio agar YPD. Esta tarea se llevó a cabo mediante la comparación de los recuentos en los diferentes tiempos de muestreo con respecto al nivel de inóculo inicial. Se introdujo la variable *dummy* en el modelo global en lugar de generar distintos modelos para cada valor de tiempo específico, debido a que los patrones de inhibición en las interfaces de crecimiento/no crecimiento fueron similares para los diferentes valores de tiempo, los cuales sólo mostraban un desplazamiento paralelo (datos no mostrados). En esta circunstancia, un modelo con el tiempo como variable *dummy* resultó ser más simple que varios modelos para cada valor de tiempo. Las unidades utilizadas para el desarrollo del modelo se adaptaron a la terminología utilizada por los productores de vino.

5.7.1. Modelo logístico global

El modelo probabilístico global presentó un buen ajuste a los datos como se evidencia en las siguientes pruebas estadísticas: Rho-cuadrado de McFadden, 0,629; R^2 de Nagelkerke 0,774; prueba de razón de verosimilitud $2*(LL(N)-LL(0))=648,648$, $p<0,0001$ (8 df); test de Chi-cuadrado de Hosmer y Lemeshow =10,209, $p=0,251$ (8 df). Además, el porcentaje total de éxitos fue de 88,4 %, con una sensibilidad del 86,3 % y una especificidad del 89,9 %. Se obtuvieron a partir de la ecuación las proporciones de falsos positivos y falsos negativos, 15,2 % y 11,2 % respectivamente.

En la tabla 7 se muestran los coeficientes significativos ($p=0,05$) retenidos en el modelo, después del procedimiento de selección. De este modo, se obtuvo la ecuación final:

$$\text{Logit (p)} = \text{Ln (p/(1-p))} = 67,18 -12,76*[\text{pH}] -5,11*[\text{Et}] -1,48*[\text{SO}_2 \text{ libre}] +1,05*[\text{Et*pH}] +0,35*[\text{SO}_2 \text{ libre*pH}] +t \quad (4)$$

La variable *dummy* toma los valores de $t=-3,09$ para el primer nivel ($t=1$, 7 días), $t=-1,05$ para el segundo nivel ($t=2$, 14 días), y $t=-0,53$ para el tercer nivel ($t=3$, 21 días), mientras que $t=0,00$ se toma como el valor de referencia ($t=4$, 30 días). El valor *dummy* 1 (-3,09) significa una disminución en el logit (p) desde el momento de referencia (30 días) cuando se desplaza de éste al primer periodo de muestreo (7 días). Interpretaciones similares se pueden dar para el resto de los valores *dummy*. Por otra parte, los valores de probabilidad obtenidos con *dummy* 1, *dummy* 2 y *dummy* 3 indicaron que estos valores, que representan la probabilidad que un evento ocurra /probabilidad de que no ocurra, disminuyeron en un factor de 0,05, 0,35 o 0,59, cuando se observó crecimiento a 7, 14 o 21 días, respectivamente (Tabla 7). En otras palabras, esto significa que la probabilidad de crecimiento aumentó a medida que pasaba el tiempo, aunque no hubo diferencias significativas entre el tercero y cuarto nivel de la variable *dummy* (21 y 30 días) (Tabla 7). La interpretación de los otros coeficientes no es tan sencilla porque sus interacciones también fueron significativas. Por lo tanto los efectos de las variables y sus interacciones se podrían interpretar más fácilmente de un modo gráfico como se muestra a las secciones sucesivas.

Tabla 7. Coeficientes del modelo logístico global ($p \leq 0,05$) con sus respectivas razones de probabilidad y valores estandarizados.

Parámetros	Coeficientes estimados	Error estandar	Razón de probabilidad ("odds ratio")	Error estandar	Coeficientes estandarizados	Error estandar	Wald Chi-cuadrado
Constante	67,182	20,300	-	-	-	-	-
pH	-12,756	5,263	0,000	0,000	-2,231	1,094	4,157
Etanol	-5,112	1,426	0,006	0,009	-7,021	2,431	8,339
SO ₂ libre	-1,484	0,227	0,227	0,051	-13,712	2,878	22,705
<i>Dummy 1</i>	-3,098	0,427	0,045	0,019	0,878	0,162	29,045
<i>Dummy 2</i>	-1,050	0,370	0,350	0,130	0,529	0,140	14,346
<i>Dummy 3</i>	-0,532	0,367	0,588	0,215	0,479	0,144	11,106
[†] <i>Dummy 4</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	-
Etanol*pH	1,047	0,369	2,850	1,053	6,071	2,591	5,491
SO ₂ libre*pH	0,348	0,058	1,416	0,082	11,907	2,872	17,191

[†]*Dummy 4* (30 días) usado como valor de referencia.

5.7.2. Superficies de crecimiento/no crecimiento 3D

Se obtuvieron las superficies de crecimiento/no crecimiento en cada tiempo de muestreo en función de las tres variables cuantitativas fijando un nivel de probabilidad en la ecuación (4) y graficando el valor resultante en un eje 3D. Esta presentación es conveniente para estudiar simultáneamente el efecto de las variables y sus interacciones. La figura 18 muestra los gráficos para 7 (t=1), 14 (t=2), 21 (t=3) y 30 (t=4) días para una probabilidad de crecimiento seleccionada de 0,01. Como se puede deducir, las superficies siempre tuvieron un buen ajuste general con este valor de probabilidad, y los círculos (condiciones donde creció la levadura) estuvieron siempre por debajo de la superficie, que delimita claramente la región de inhibición (por encima de la superficie no se evidenció crecimiento). Se encontraron diferencias significativas entre los resultados obtenidos en el tiempo t=1 respecto a los obtenidos en los otros períodos de tiempo evaluados. Los resultados obtenidos en t=2 fueron significativamente diferentes de los obtenidos en t=3 y t=4, pero los resultados en t=3 y t=4 fueron similares (Tabla 7). Esto indica que la respuesta de crecimiento de *D. bruxellensis* fue diferente en el tiempo y la interfaz inhibidora se desplazó con el mismo, mostrando un número considerablemente mayor de los círculos de crecimiento en t=3 y t=4 que en t=1 y t=2. Las superficies 3D obtenidas en los diferentes tiempos de muestreo (Figura 19) se pueden utilizar para determinar diferentes combinaciones de las variables cuantitativas que podrían preservar adecuadamente ($p=0,01$) el vino de 7 a 30 días. Sin embargo, es difícil calcular estos valores directamente a partir de la figura 18, así como determinar la importancia de cada variable individual, por lo tanto otras representaciones gráficas pueden ser más explicativas y útiles desde un punto de vista práctico como se mostrará en las secciones siguientes.

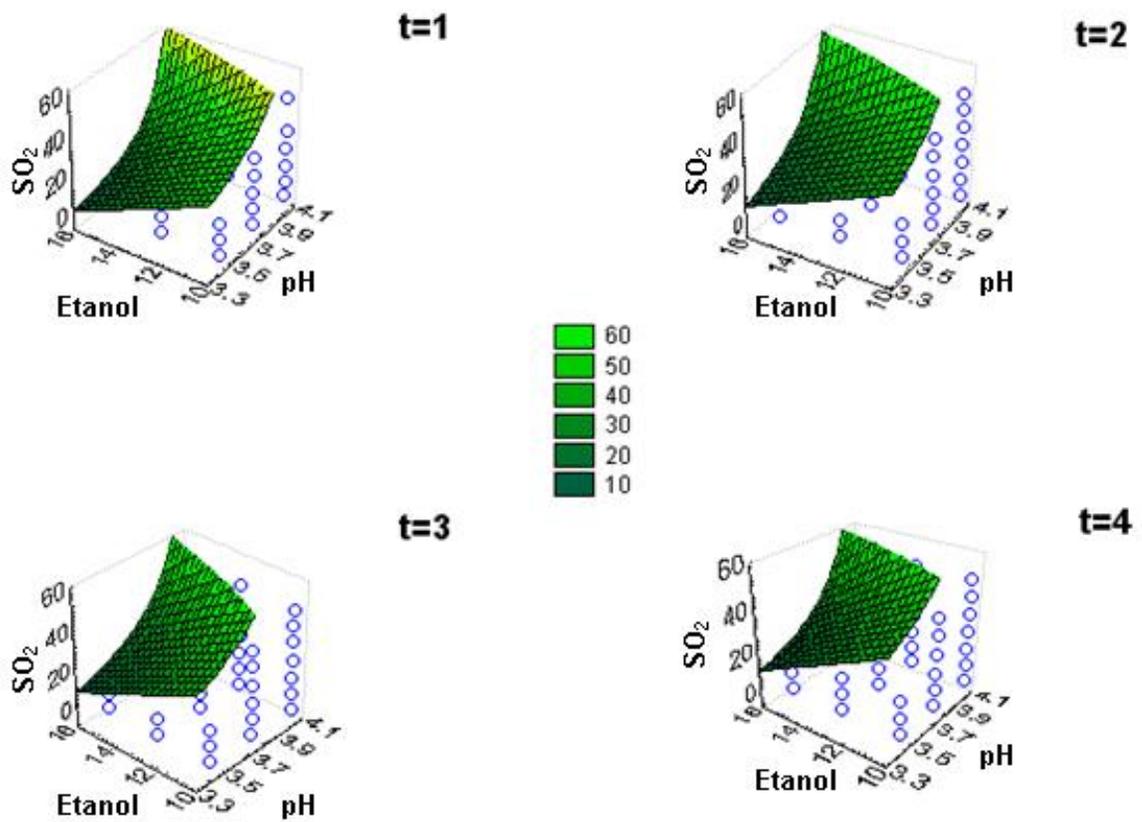


Figura 18. Interfaces de crecimiento/no crecimiento 3D para un nivel de probabilidad de 0,01 en función del pH, del etanol (% v/v) y del SO₂ libre (mg/L) para los 4 períodos de tiempo estudiados (t=1, 7 días; t=2, 14 días; t=3, 21 días; t=4, 30 días). Los círculos abiertos muestran las condiciones donde la levadura *D. bruxellensis* CH29 fue capaz de crecer.

5.7.3. Perfiles de inhibición de crecimiento para cada factor individual

Los perfiles (cambios en las probabilidades de crecimiento) en función de cada factor inhibidor se pueden calcular fácilmente de la ecuación (4), utilizando la siguiente ecuación general:

$$p = \frac{1}{1 + e^{-((67.182) - 12.756 \cdot pH - 5.112 \cdot Et - 1.484 \cdot SO_2 + 1.047 \cdot Et \cdot pH + 0.348 \cdot SO_2 \cdot pH + t)}} \quad (5)$$

A partir de esta ecuación, la probabilidad de crecimiento para cada variable específica se puede determinar, fijando los niveles de las otras dos variables. Los gráficos que se obtienen representan los perfiles inhibitorios de cada variable cuantitativa en función de su concentración.

Los cambios en la probabilidad de crecimiento en función del pH para $t=1$ y $t=4$ para las diferentes concentraciones de etanol ensayadas se muestran en la figura 19. A partir del gráfico podemos observar por ejemplo que: las concentraciones de 50 mg/L de SO_2 libre fueron siempre inhibitorias, sin importar el nivel de pH ensayado. Mientras que para las otras concentraciones de SO_2 libre evaluadas, la probabilidad de crecimiento se incrementó cuando el pH aumentó. Además, el perfil de probabilidad fue fuertemente afectado por la presencia de etanol. De este modo, en ausencia de SO_2 libre, no hubo prácticamente inhibición cuando el contenido de etanol fue de 10,0 o 12,5 %, pero la probabilidad disminuyó considerablemente cuando el nivel de etanol aumentó hasta 15 %. A esta concentración de etanol, los perfiles para los periodos de tiempo $t=1$ y $t=4$ fueron marcadamente diferentes, mientras que para 10,0 y 12,5 % fueron muy similares (Figura 19). El aumento de SO_2 libre disminuyó notablemente la probabilidad de crecimiento, independientemente del pH o el período de tiempo. También se observó que para los mismos niveles de las variables cuantitativas, la probabilidad de crecimiento aumentó con el tiempo (probabilidad de crecimiento para $t=4$ fue mayor que para $t=1$), excepto para el nivel más alto de SO_2 libre.

En la figura 20 se muestra el perfil de probabilidad en función de la concentración de etanol para los tiempos $t=1$ y $t=4$ y para diversos niveles de pH. Se puede observar

que con 50 mg/L de SO₂ libre, no hubo crecimiento, independientemente de los niveles de los demás variables estudiadas. Con respecto a la concentración de etanol, la probabilidad de crecimiento se redujo cuando la presencia de este compuesto aumentó. Una vez más, cuando el período de tiempo aumentó (a partir de t=1 a t=4), la probabilidad de crecimiento también aumentó.

La figura 21 muestra la probabilidad de crecimiento en función de la concentración de SO₂ libre, para t=1 y t=4 y para los diversos niveles de pH y etanol. Como se puede observar, la probabilidad de crecimiento se redujo considerablemente cuando la concentración de SO₂ libre aumentó, mostrando un efecto más marcado en el nivel de pH más bajo. A un pH de 3,4 y por encima de 50 mg/L de SO₂ libre, no hubo crecimiento independientemente de la concentración de etanol o del período de tiempo evaluado. Sin embargo, cuando el pH aumentó el efecto inhibitor del SO₂ libre disminuyó. Por lo tanto, a pH=3,7, la concentración requerida de SO₂ libre para alcanzar una probabilidad de crecimiento de 0,01 estuvo ligeramente fuera de la región experimental utilizada en este estudio (50 mg/L) a 10 % de etanol, mientras que a la misma concentración de etanol y a pH 4,0 la probabilidad de crecimiento estuvo comprendida entre 0,3 y 0,9 para 50 mg/L de SO₂ libre.

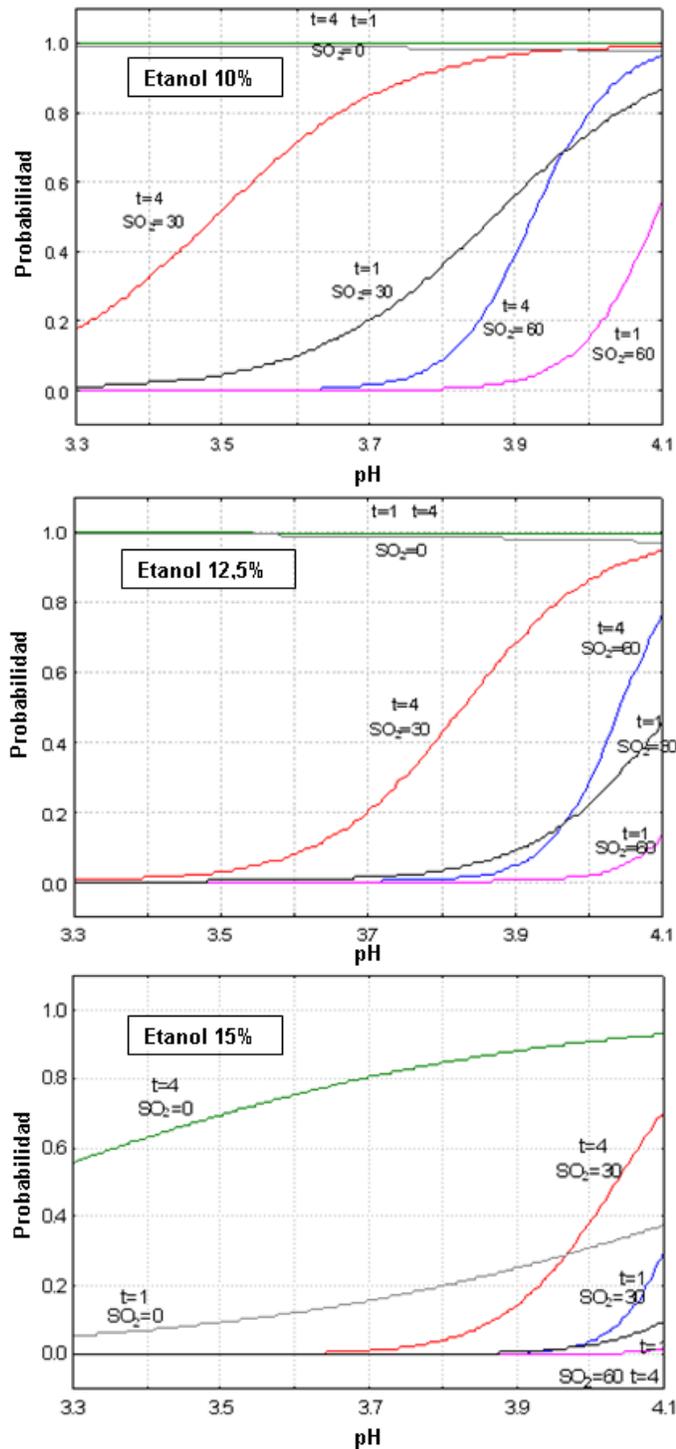


Figura 19. Perfiles de probabilidad de crecimiento en función del pH, manteniendo fijos los niveles de etanol en 10; 12,5 y 15 % (v/v), y los niveles de SO₂ libre en 0, 30 y 50 mg/L para t=1 (7 días) y t=4 (30 días).

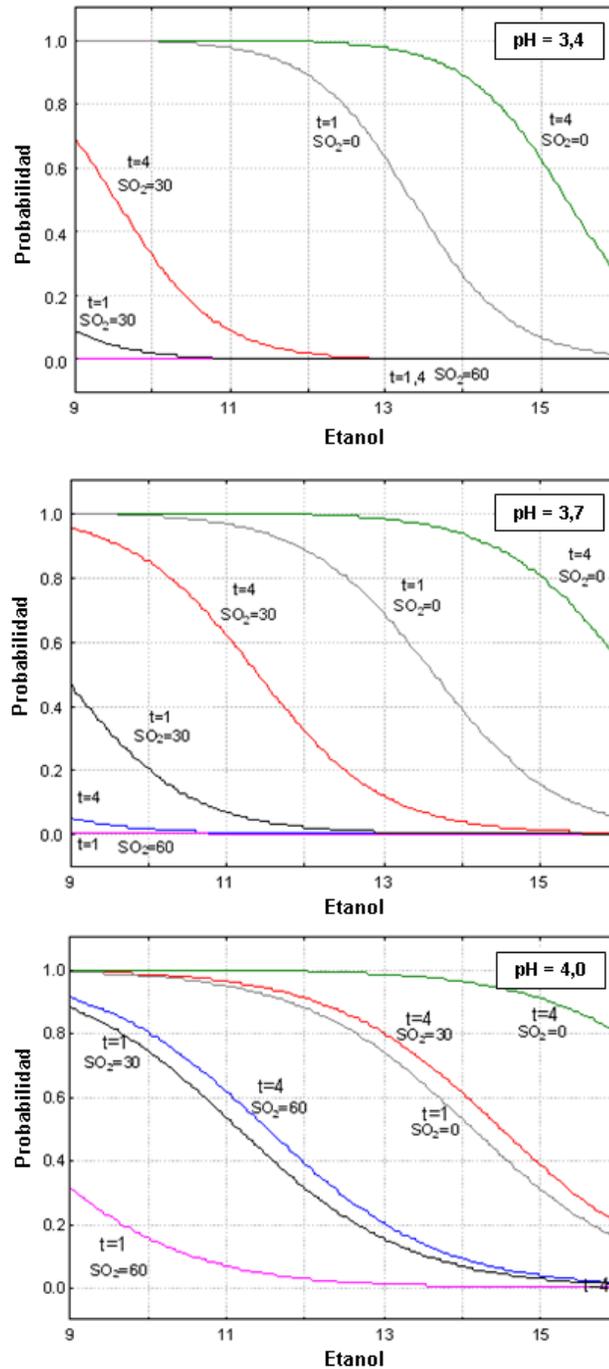


Figura 20. Perfiles de probabilidad de crecimiento en función de la concentración de etanol (% v/v), manteniendo fijos los niveles de pH en 3,4; 3,7 y 4,0, y los niveles de SO₂ libre en 0, 30 y 50 mg/L para t=1 (7 días) y t=4 (30 días).

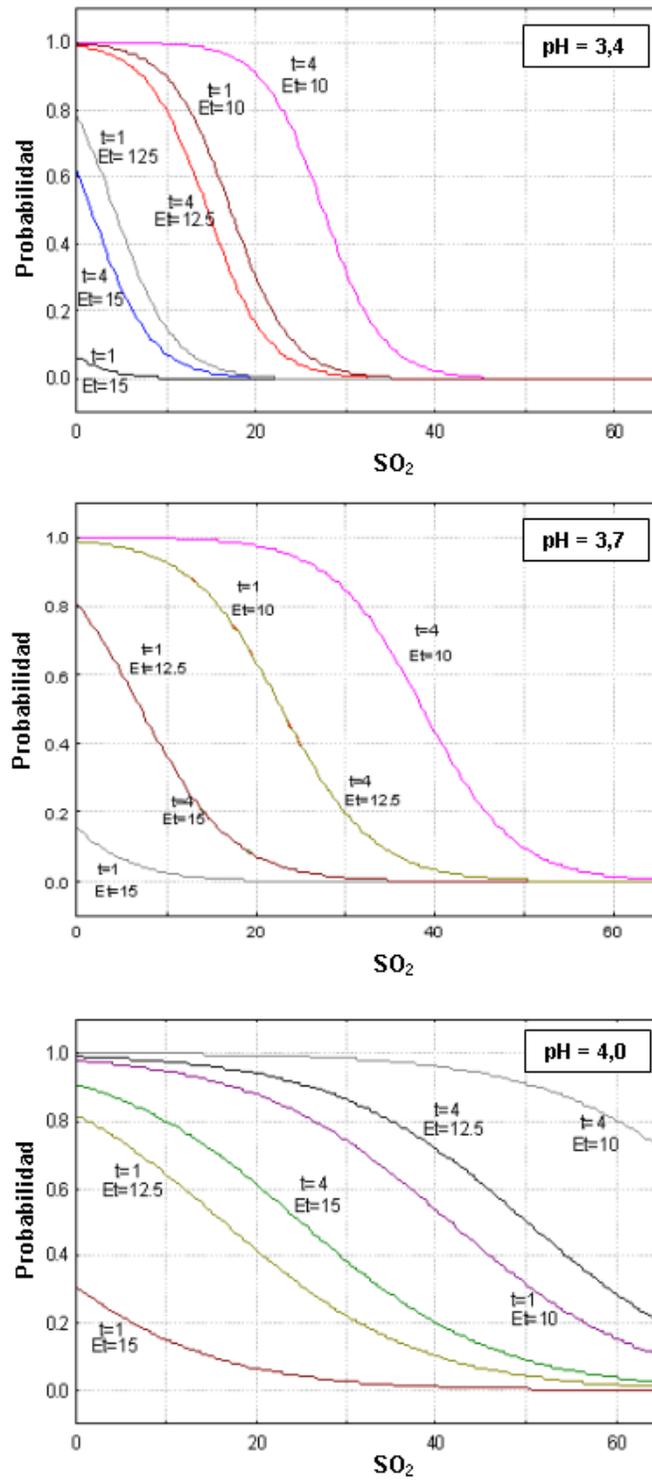


Figura 21. Perfiles de probabilidad de crecimiento en función de la concentración de SO₂ libre (mg/L), manteniendo fijos los niveles de pH en 3,4; 3,7 y 4,0, y los niveles de etanol en 10; 12,5 and 15 % (v/v) para t=1 (7 días) y t=4 (30 días).

5.7.4. Interfaces de crecimiento/no crecimiento en función de dos variables

La figura 22 muestra las interfaces de crecimiento/no crecimiento 2D de *D. bruxellensis* para una probabilidad de crecimiento de 0,01 en función del pH y del SO₂ libre para los diversos niveles de etanol. La ventaja de usar estas interfaces es que el etanol no es una variable que puede ser fácilmente manipulada en vinos, ya que sus niveles están sujetos al proceso fermentativo. Por lo tanto, para lograr la inhibición de levadura la industria podría deducir fácilmente a partir de tales gráficos la concentración requerida de SO₂ libre o las modificaciones en el pH a realizar a través de la adición de ácido tartárico. En cualquier caso, también es posible calcular otras interfaces de crecimiento/no crecimiento a partir de la ecuación general para cualquier probabilidad de crecimiento dada.

Se puede concluir a partir de la figura 22 que cuando la concentración de etanol aumentó, las interfaces se desplazaron hacia la izquierda, lo que indica un claro efecto inhibitorio de este compuesto en el crecimiento de la levadura. Las interfaces 2D generadas demostraron que la inhibición por un corto período de tiempo ($t=1$) se logró con un pH más bajo y concentraciones de SO₂ libre más altas para el mismo nivel de etanol. Cuando el tiempo aumentó, las interfaces se movieron hacia la derecha. Por lo tanto, la concentración de SO₂ libre requerida para preservar un vino con 10 % de etanol durante un período de tiempo de 7 días a pH 3,4 fue de aproximadamente 33 mg/L, pero para alcanzar una inhibición durante 30 días la concentración de SO₂ libre necesaria fue de 43 mg/L. Sin embargo, cuando la concentración de etanol aumentó a 15 %, la preservación del vino durante 7 días se logró con sólo 7 mg/L de SO₂ libre, y fueron necesarios 17 mg/L para preservarlo durante 30 días. De la misma manera, con 12,5 % de etanol y a pH 3,7 para una probabilidad de crecimiento de 0,01, se requiere la adición de 30 mg/L de SO₂ libre para inhibir el crecimiento de la levadura durante 7 días. Sin embargo, la concentración de SO₂ libre debe aumentar hasta 48 mg/L para obtener la misma probabilidad de crecimiento (0,01) por 30 días en las mismas condiciones del vino. Se pueden determinar otras combinaciones de las variables ambientales a partir del modelo matemático en función de las necesidades de la industria. Como se deduce de la figura 22, la conservación durante períodos más largos de tiempo necesita una mayor concentración de SO₂ libre y de etanol, y niveles de pH más bajos. De acuerdo con estas interfaces, cuando los valores de pH aumentaron el efecto inhibitorio de las otras variables

disminuyó. A pH=3,8-3,9 la inhibición por un período de tiempo de 30 días sólo se puede lograr con concentraciones de etanol y SO₂ libre en los niveles máximos utilizados en este estudio.

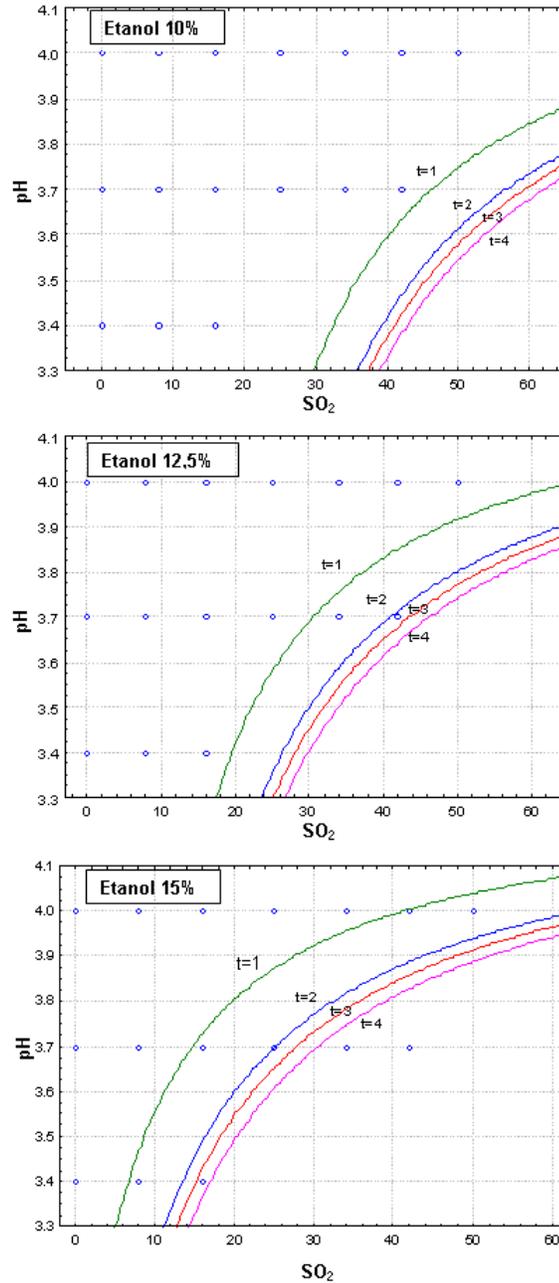


Figura 22. Interfaces de crecimiento/no crecimiento 2D en función del pH y del SO₂ libre (mg/L) para diferentes niveles de etanol (10; 12,5 and 15 %, v/v) y períodos de tiempo (t=1, 7 días; t=2, 14 días; t=3, 21 días; t=4, 30 días). Probabilidad de crecimiento fijada en p=0,01. Los círculos abiertos muestran las condiciones donde la levadura *D. bruxellensis* CH29 fue capaz de crecer.

El SO₂ es un importante compuesto utilizado en la industria del vino por su actividad inhibitoria del crecimiento de levaduras (Stratford, 2006). Con respecto al efecto inhibitor del SO₂ sobre la levadura *D. bruxellensis* diversos estudios muestran resultados variables considerando a este microorganismo más o menos sensible. Es sabido que la resistencia de las levaduras a los sulfitos no siempre se encuentra en todas las cepas de una especie individual y este hecho puede justificar la variabilidad en los resultados. Algunos autores demostraron que a bajas concentraciones de SO₂ molecular (0,1 mg/L) la viabilidad de las células *D. bruxellensis* no se ve afectada, pero a concentraciones mayores de SO₂ molecular (0,8 mg/L) no se observa crecimiento de células viables en las placas de agar (Du Toit y col., 2005; Oelofse y col., 2008). En general se recomienda el uso de 0,5 a 0,8 mg/L de SO₂ molecular para controlar a *Dekkera* spp. en vinos (Oelofse y col., 2008). Sin embargo, alcanzar este nivel podría ser difícil en los vinos con un pH alto teniendo en cuenta que la liberación de SO₂ molecular es dependiente de este factor. En vinos con elevados pH la cantidad de SO₂ total que debería adicionarse para alcanzar el valor de SO₂ molecular requerido superaría los límites máximos de adición de SO₂ permitidos por la OIV que son de 150 a 300 mg/L de SO₂ total (OIV, 1998).

El etanol se ha utilizado ampliamente como conservante en alimentos. El grado de protección al deterioro conferido por el etanol depende de la concentración utilizada y de las especies de levadura involucradas, pero en general el deterioro es reducido en concentraciones superiores a 15 % (v/v) y es eliminado completamente con concentraciones mayores a 22 % de etanol (Stratford, 2006). Las diferentes levaduras no tienen la misma sensibilidad o resistencia al etanol. Las especies de levaduras más resistentes al etanol son aquellas especies fermentativas que producen etanol en concentraciones elevadas. Estas incluyen *D. anomala* y *D. bruxellensis*, *S. cerevisiae* y *Saccharomyces bayanus*, *S. ludwigii* y *Zygosaccharomyces bailii* (Stratford, 2006; Arroyo-López y col., 2010). Algunas cepas de *D. bruxellensis* han demostrado incluso tener una mayor tolerancia al etanol en comparación con *S. cerevisiae* (Phowchinda y col., 1997). Dias y colaboradores (2003b) informaron que el crecimiento de *D. bruxellensis* y la producción de 4-etilfenol disminuyeron al aumentar la concentración de etanol, y fueron totalmente inhibidas con 13 % (v/v) en un medio de mosto de uva sintético. En nuestro trabajo, la cepa *D. bruxellensis* CH29 fue capaz de crecer con 15 % de etanol en ausencia de SO₂ libre en el nivel de pH más alto (4,0). Sin embargo, cuando los demás factores se

hicieron más restrictivos, la tolerancia al etanol disminuyó. De este modo, a pH 3,4 y 30 mg/L de SO₂ libre, la probabilidad de crecimiento de *D. bruxellensis* se redujo drásticamente en la concentración de etanol más baja ensayada (10 % v/v). Este hecho indica un posible efecto sinérgico entre ambos factores para limitar el crecimiento de la levadura.

Las levaduras están adaptadas a desarrollar en alimentos relativamente ácidos, por lo tanto un pH bajo no parece ser por sí solo un inhibidor de levaduras u hongos filamentosos. En general, el crecimiento de levaduras sólo se ve disminuido cuando el pH cae por debajo de 3,0 donde el estrés producido por los bajos pH se evidencia en un crecimiento más lento de las células (Stratford, 2006). Sin embargo, un pH bajo tiene un efecto drástico en la conservación de alimentos en presencia de otros conservantes, tales como SO₂. Como se mencionó anteriormente, la acción antimicrobiana del SO₂ está fuertemente influenciada por el pH. Las especies de *Dekkera* son capaces de crecer en condiciones ácidas, en un rango de pH 3,0 a 4,5, sin embargo el crecimiento es menor a un pH de 2,5 en jugo de uva (Gilis, 1999).

En general, los resultados mostraron que las variables ambientales en los niveles evaluados tuvieron un considerable efecto inhibitorio sobre el crecimiento de la levadura, así como las interacciones entre etanol*pH y SO₂ libre*pH.

Por otro lado, los resultados del presente trabajo evidencian que el tiempo es un factor importante a considerar cuando se deben definir las concentraciones o niveles de los factores limitantes del crecimiento. Se ha demostrado que el crecimiento de *D. bruxellensis* CH29 y las interfaces inhibitorias fueron diferentes en el tiempo. Para inhibir el crecimiento de *Dekkera* durante 30 días fueron necesarias condiciones iniciales más restrictivas que para inhibirlo durante 7 días. Esto podría estar relacionado tanto a la adaptación de las cepas de *D. bruxellensis* a condiciones de estrés, como a la disminución de los niveles de etanol y de SO₂ libre durante el ensayo. En nuestro trabajo, debido al uso de placas de microtitulación, el volumen pequeño de cada pocillo podría permitir la disolución de oxígeno, estimulando el crecimiento y disminuyendo las concentraciones de SO₂ libre en un corto período de tiempo. Este hecho, junto con la evaporación del etanol, podría explicar por qué las probabilidades de crecimiento aumentaron a medida que transcurrió el tiempo. Sin embargo la reducción de los niveles

de SO₂ es un hecho que se observa frecuentemente durante la conservación del vino. Por lo tanto, este factor debe ser controlado periódicamente, especialmente en vinos con añejamiento en barricas de madera para asegurar que se mantenga la protección contra *Dekkera* (Benito y col., 2009).

En los últimos años se ha comenzado a utilizar la microbiología predictiva para la predicción del comportamiento de diferentes levaduras contaminantes de vinos. Recientemente Chandra y colaboradores (2015) evaluaron el efecto del SO₂, la concentración de etanol y de glucosa sobre el crecimiento de *Z. bailii*, *Schizosaccharomyces pombe*, *S. ludwigii* y *S. cerevisiae* en vinos. Dos trabajos recientes han utilizado la microbiología predictiva como herramienta para caracterizar el crecimiento de *D. bruxellensis* en distintos sustratos (Aguilar Uscanga y col., 2011; Chandra y col., 2014) Sin embargo es importante destacar que el diseño experimental resulta fundamental en relación al objetivo que se pretende alcanzar, ya que en el trabajo de Aguilar Uscanga y colaboradores (2011) se modela el crecimiento de *D. bruxellensis* en un medio de cultivo con diferentes concentraciones de glucosa, sin etanol e incubado en condiciones aeróbicas, evaluando la producción de biomasa y etanol, variables útiles para caracterizar el crecimiento de esta levadura pero con escaso valor para extrapolar a la producción de vino. Por el contrario, en el trabajo de Chandra y colaboradores (2014) se utiliza la metodología de superficie de respuesta para modelar el crecimiento de *D. bruxellensis* y producción de etilfenoles en un blend de vinos tintos modificando las variables concentración de glucosa, etanol y SO₂ total. En este trabajo los autores muestran que sólo el SO₂ produce una respuesta lineal negativa sobre el crecimiento y la producción de etilfenoles en los primeros 15 días de incubación a 25 °C. Este efecto va disminuyendo con el tiempo debido a la combinación del SO₂ con los componentes del vino perdiendo su actividad antimicrobiana. A diferencia de nuestro trabajo los autores no observaron un efecto sinérgico entre el SO₂ y el etanol sobre el crecimiento de la levadura, pero si sobre la producción de etilfenoles. Es importante destacar que los niveles de la variable SO₂ evaluadas por Chandra y colaboradores (2014) están por debajo de los niveles incluidos en nuestro trabajo principalmente debido que los autores utilizan concentraciones de SO₂ total y nosotros concentraciones de SO₂ libre. Estas diferencias, entre otras como el sustrato utilizado, la cepa de *D. bruxellensis*, etc., podrían justificar los diferentes resultados obtenidos y nuevamente evidenciar la importancia de la

elección de las condiciones experimentales en la interpretación y extrapolación de los resultados obtenidos.

5.8. Validación del modelo predictivo

La validación es un paso esencial en el proceso de modelado. Los modelos no pueden ser aplicados sin un proceso de validación previo, el cual generalmente consiste en confirmar experimentalmente las predicciones del modelo (Dym 2004).

La mayoría de los estudios publicados de microbiología predictiva se han realizado utilizando medios de cultivo artificiales, es decir, medios con una composición química definida la cual pretende imitar las características del alimento. Esto permite una reducción de la variabilidad en los resultados y la construcción de un modelo más preciso (Pérez-Rodríguez y Valero 2013).

Sin embargo, en la microbiología predictiva, el análisis experimental del crecimiento en el alimento es la base de la validación del modelo: datos de crecimiento experimental (es decir, las observaciones) se comparan con las predicciones del modelo (Pin y col. 1999).

5.8.1. Validación del modelo con diferentes cepas de *D. bruxellensis* en medio de cultivo simil-vino

Los valores experimentales de crecimiento obtenidos para las dos cepas nativas de *D. bruxellensis* coincidieron en un 87,5 % con las probabilidades de crecimiento predichas por el modelo (Tabla 8). Es importante destacar que el 12,5 % (3/24) de las muestras que no coincidieron con valor predicho, se trataron de muestras que no presentaron crecimiento cuando el modelo predijo probabilidad de crecimiento. Es decir que el modelo fue capaz de predecir por exceso el crecimiento de la levadura, ya que el 12,5 % de muestras que presentaban probabilidad de crecimiento, experimentalmente no lo hicieron (Tabla 8). En el caso 2 (Tabla 8) donde la probabilidad de crecimiento predicha por el modelo fue elevada (77 %) solo una de las cepas fue capaz de desarrollar, indicando que el modelo puede ser aplicado con un amplio margen de seguridad en

contaminaciones con diversas cepas de *D. bruxellensis*. En el caso 3 donde la probabilidad predicha por el modelo fue baja (4 %) ninguna de las cepas nativas fue capaz de desarrollar en estas condiciones durante 30 días, indicando nuevamente el margen de seguridad con el cual fue construido el modelo.

En esta etapa de validación el modelo predijo correctamente el 100 % de los casos ensayados.

Tabla 8. Valores experimentales y valores predichos por el modelo para dos cepas de *D. bruxellensis* en medio simil-vino.

Nº	Variables			Valores experimentales		Predicción del modelo	
	pH	Etanol (% v/v)	SO ₂ libre (mg/L)	B11	VC20	Valor predicho	Probabilidad
1	4	10	0	creció	creció	crece	1,00
2	4	15	16	no creció	creció	crece	0,77
3	3,8	15	34	no creció	no creció	crece	0,04
4	3,7	10	25	creció	creció	crece	0,96
5	3,7	12,5	25	creció	creció	crece	0,51
6	3,7	12,5	25	creció	creció	crece	0,51
7	3,7	12,5	25	creció	creció	crece	0,51
8	3,7	12,5	50	no creció	no creció	no crece	0,01
9	3,6	15	34	no creció	no creció	no crece	0,00
10	3,4	15	50	no creció	no creció	no crece	0,00
11	3,5	10	50	no creció	no creció	no crece	0,01
12	3,6	12,5	42	no creció	no creció	no crece	0,01

5.8.2. Validación del modelo en vino estéril inoculado con la cepa CH29

En esta etapa se incluyeron 26 vinos que representaban 13 variedades de uvas diferentes e incluían un amplio rango de valores de las variables modeladas (Tabla 9).

El 61,5 % (16/26) de los valores experimentales obtenidos fueron coincidentes con el valor predicho por el modelo. En las 10 muestras restantes, 8 de ellas (31 %) estuvieron representadas por muestras donde *D. bruxellensis* no creció a pesar de que el modelo indicaba probabilidad de crecimiento (falsos positivos), y sólo en dos muestras (7,5 %) se observó crecimiento cuando el modelo predecía una probabilidad de crecimiento del 1 % (falsos negativos).

En general, podemos observar que el error asociado al modelo está más sesgado hacia el lado de los falsos positivos, indicando nuevamente que el modelo en general es capaz de predecir por exceso el crecimiento de la levadura.

Es importante considerar que en este ensayo donde se evaluaron mostos de diferentes variedades de uvas representa una matriz compleja que puede contener variables que no fueron incluidas en el modelo. A pesar de esto, si consideramos los aciertos y los falsos positivos predichos por el modelo podríamos considerar una predicción exitosa del 92,5 %.

Tabla 9. Valores experimentales y valores predichos por el modelo para la cepa *D. bruxellensis* CH29 en diferentes vinos ésteriles.

Nº	Variedad	Variables			Valor experimental	Predicción del modelo	
		pH	Etanol (% v/v)	SO ₂ libre (mg/L)		Valor predicho	Probabilidad
1	Caladoc	3,85	15,50	69,12	no creció	no crece	0,00
2	Corvina	3,49	14,30	32,00	no creció	no crece	0,00
3	Rondinella	3,50	14,30	17,92	no creció	crece	0,07
4	Mourvedre	3,69	14,45	25,60	no creció	crece	0,07
	Touriga						
5	Nacional	4,05	15,10	23,04	no creció	crece	0,75
6	Nebbiolo	3,89	14,70	23,04	no creció	crece	0,44
7	Grenache	3,77	14,90	25,60	no creció	crece	0,10
8	Croatina	3,19	15,30	10,24	no creció	crece	0,02
9	Nero d'avola	3,27	14,20	10,24	creció	crece	0,14
10	Merlot 1	3,59	15,80	07,68	creció	crece	0,18
11	Merlot 2	3,57	14,10	07,68	creció	crece	0,66
12	Malbec 1	3,54	13,60	17,92	creció	crece	0,22
13	Malbec 2	3,50	13,40	20,48	creció	crece	0,13
14	Malbec 3	3,60	14,85	21,76	creció	crece	0,04
15	Malbec 4	3,56	14,20	29,44	creció	no crece	0,01
16	Malbec 5	3,80	15,50	15,36	creció	crece	0,27
17	Malbec 6	3,20	15,60	10,24	creció	no crece	0,01
18	Malbec 7	3,56	13,80	15,36	creció	crece	0,32
19	Malbec 8	3,74	14,90	16,64	creció	crece	0,27
20	Malbec 9	3,77	13,20	10,24	creció	crece	0,90
21	Malbec 10	3,42	14,00	8,96	creció	crece	0,44
22	Bonarda 1	3,56	12,70	10,24	creció	crece	0,87
23	Bonarda 2	3,63	13,20	12,80	creció	crece	0,74
24	Bonarda 3	3,22	14,35	11,52	creció	crece	0,06
25	Pinot Noir 1	3,69	15,30	08,96	no creció	crece	0,38
26	Pinot Noir 2	3,87	12,70	17,92	no creció	crece	0,91

5.8.3. Validación del modelo en vinos naturalmente contaminados con *Dekkera spp.*

Para esta etapa de validación se consideraron 12 vinos tintos comerciales que llegaron al Laboratorio para su análisis de *Dekkera* y dieron recuentos positivos. En todos los vinos el modelo predijo que esta levadura era capaz de desarrollar con diferentes probabilidades, por lo tanto en esta etapa de validación el modelo predijo correctamente el 100 % de los casos en vinos naturalmente contaminados con la levadura. En estos vinos el modelo predijo entre un 10 a un 91 % de probabilidad de crecimiento de *Dekkera*, que puede estar relacionado con los bajos niveles de SO₂ libre presentes en los vinos evaluados (Tabla 10).

Tabla 10. Valores experimentales y valores predichos por el modelo diferentes vinos naturalmente contaminados con *Dekkera*.

Nº	Vinos	Variables			Valor		
		pH	Etanol (% v/v)	SO ₂ libre (mg/L)	experimental	Predicción del modelo	
					Recuento	Predicción	Probabilidad
1	Malbec Rva 2013	3,46	14,70	6,40	creció	crece	0,40
2	C. Franc PNº 44,7	3,56	14,80	5,12	creció	crece	0,56
3	C. Franc 15/01/14	3,56	14,50	2,56	creció	crece	0,78
4	Lote Cabernet 3/12	3,46	14,30	6,40	creció	crece	0,55
5	SMB-1308-DPCS2	3,69	15,00	8,32	creció	crece	0,50
6	SMB-1319-PV(V)	3,51	15,30	6,40	creció	crece	0,27
7	SMB 1312-DP	3,69	13,60	6,40	creció	crece	0,89
8	SMB 1322-DP-LI	3,55	14,90	3,20	creció	crece	0,63
9	SMB-1323-C4	3,40	15,40	7,68	creció	crece	0,10
10	SMB-1324-J	3,60	15,70	3,84	creció	crece	0,38
11	SCS-1338-VA	3,44	15,00	5,12	creció	crece	0,36
12	2012 T 27- 13/148	3,52	13,40	3,84	creció	crece	0,91

En nuestro trabajo el modelo predijo en general por exceso el crecimiento de la levadura, otorgando un óptimo margen de seguridad tanto en medio simil-vino con otras cepas de *D. bruxellensis* como en el sustrato natural (vino).

El desarrollo de este modelo predictivo presenta un elevado potencial para ser aplicado por las bodegas, brindando una herramienta de base científica para el control y la prevención de los defectos atribuibles a *D. bruxellensis* en vinos tintos.

6. CONCLUSIONES

Dekkera bruxellensis es la única especie de *Dekkera* descrita en vinos tintos de Mendoza, Argentina.

El diseño y uso de un medio simil-vino permite la obtención de resultados reproducibles en condiciones controladas que pueden ser exitosamente extrapolados al vino.

Las actividades cumarato decarboxilasa y vinilfenol reductasa propias de cada cepa de *D. bruxellensis* no son indicadoras de la capacidad de la cepa para producir fenoles volátiles en condiciones simil-vino.

Mayor concentración de ácidos hidroxicinámicos precursores permite una mayor síntesis de fenoles volátiles por *D. bruxellensis* en condiciones simil-vino, independientemente de la cepa involucrada.

La síntesis de fenoles volátiles se produce durante el crecimiento activo de *D. bruxellensis* en condiciones simil-vino.

Los diferentes niveles de SO₂ libre, etanol y pH evaluados, así como las interacciones entre SO₂ libre*pH y etanol*pH presentan un efecto inhibitor sobre el crecimiento de *D. bruxellesis* en condiciones simil-vino.

El tiempo es un factor importante a ser considerado cuando se deben definir las concentraciones o niveles de los factores limitantes del crecimiento de *D. bruxellensis*.

El modelo predictivo desarrollado permite estimar la probabilidad de crecimiento de *D. bruxellensis* en un vino con determinadas características (pH, etanol y SO₂ libre) y posibilita conocer los niveles de estas variables que inhiben su desarrollo.

7. PROYECCIONES

El presente trabajo ha permitido caracterizar el crecimiento y la producción de fenoles volátiles de cepas nativas de *D. bruxellensis* en condiciones simil-vino, sentando las bases científicas que permitieron la posterior construcción de un modelo probabilístico para la prevención de la aparición de defectos en vinos relacionados a esta especie de levadura. Resulta estratégico continuar trabajando en la mejora de este modelo, para que el mismo pueda ser aplicado eficientemente por los enólogos y esté disponible de una forma fácil y accesible.

Las proyecciones del presente trabajo son:

i) Mejora del modelo predictivo que incluyan:

- Correlación entre la probabilidad de crecimiento calculada por el modelo y el tiempo para que el defecto se haga perceptible en los vinos.
- Correlación entre la probabilidad de crecimiento calculada por el modelo y las poblaciones viables de *Dekkera* inicialmente presentes en el vino.
- Validación del modelo en diferentes temperaturas.

ii) Diseño de un plan de muestreo y control para vinos con diferentes probabilidades de crecimiento de *Dekkera*.

iii) Construcción de una herramienta informática interactiva que pueda ser utilizada desde la página web de INTA con acceso libre y gratuito.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Abbott, D., Hynes, S., Ingledew, W., (2005). Growth rates of *Dekkera/Brettanomyces* yeasts hinder their ability to compete with *Saccharomyces cerevisiae* in bath corn mash fermentations. *Applied Microbiology and Biotechnology* 66, 641-647.
- Agnolucci, M., Rea, F., Sbrana, C., Cristani, C., Fracassetti, D., Tirelli, A., Nuti, M., (2010). Sulphur dioxide affects culturability and volatile phenol production by *Brettanomyces/Dekkera bruxellensis*. *International Journal of Food Microbiology* 143, 76-80.
- Aguilar Uscanga, M.G., Delia, M.L., Strehaiano, P., (2000). Nutritional requirements of *Brettanomyces bruxellensis*: growth and physiology in batch and chemostat cultures. *Canadian Journal of Microbiology* 46, 1046-50.
- Aguilar Uscanga, M.G., Delia, M., Strehaiano P., (2003). *Brettanomyces bruxellensis*: effect of oxygen on growth and acetic acid production. *Applied Microbiology and Biotechnology* 61, 157-162.
- Aguilar Uscanga, M.G., Garcia-Alvarado, Y., Gómez-Rodríguez, J., Phister, T., Delia, M.L., Strehaiano, P., (2011). Modelling the growth and ethanol production of *Brettanomyces bruxellensis* at different glucose concentrations. *Letters in Applied Microbiology* 53, 141-149.
- Arroyo-López, F.N., Salvadó, Z., Tronchoni, J., Guillamon, J.M., Barrio, E., Querol, A., (2010). Susceptibility and resistance to ethanol in *Saccharomyces* strains isolated from wild and fermentative environments. *Yeast* 27, 1005-1015.
- Arroyo-López, F.N., Bautista-Gallego, J., Romero-Gil, V., Rodríguez-Gómez, F., Garrido-Fernández, A., (2012). Growth/no growth interfaces of table olive related yeasts for natamycin, citric acid and sodium chloride. *International Journal of Food Microbiology* 155, 257-262.
- Barata, A., Caldeira, J., Botelho, R., Pagliara, D., Malfeito-Ferreira, M., Loureiro, V., (2008a). Survival patterns of *Dekkera bruxellensis* in wines and inhibitory effect of sulphur dioxide. *International Journal of Food Microbiology* 121, 201-207.
- Barata, A., Pagliara, D., Piccinino, T., Tarantino, F., Ciardulli, W., Malfeito-Ferreira, M., Loureiro, V., (2008b). The effect of sugar concentration and temperature on growth and volatile phenol production by *Dekkera bruxellensis* in wine. *FEMS Yeast Research* 8, 1097-1102.

- Benito, S., Palomero, F., Morata, A., Calderón, F., Suárez-Lepe, J.A., (2009). A method for estimating *Dekkera/Brettanomyces* populations in wines. *Journal of Applied Microbiology* 106, 1743-1751.
- Boekhout, T., Kurtzman, C., O'Donnell, K., Smith, M.T., (1994). Phylogeny of the yeast genera *Hanseniaspora* (anamorph *Kloeckera*), *Dekkera* (anamorph *Brettanomyces*), and *Eeniella* as inferred from partial 26S ribosomal DNA nucleotide sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology* 44, 781-786.
- Boulton, R.B., Singleton, V., Bisson, L.F., Kunkee, R., (Eds.) (1996). *Principles and Practices of Winemaking*. Chapman & Hall Publishers: New York, USA.
- Campos, F.M., Couto, J.A., Hogg, T.A., (2003). Influence of phenolic acids on growth and inactivation of *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus hilgardii*. *Journal of Applied Microbiology* 94, 167-174.
- Chandra, M., Barata, A., Ferreira-Dias, S., Malfeito-Ferreira, M., Loureiro, V., (2014). A response surface methodology study on the role of factors affecting growth and volatile phenol production by *Brettanomyces bruxellensis* ISA 2211 in wine. *Food Microbiology* 42, 40-46.
- Chandra, M., Oro, I., Ferreira-Dias, S., Malfeito-Ferreira, M., (2015). Effect of ethanol, sulfur dioxide and glucose on the growth of wine spoilage yeasts using response surface methodology. *PLoS ONE* 10(6), 1-15.
- Chatonnet, P., Dubourdieu, D., Boidron, J., Pons, M., (1992). The origin of ethylphenols in wines. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 60, 165-178.
- Chatonnet, P., Dubordeau, D., Boidron, J., (1995). The influence of *Brettanomyces/Dekkera* sp. yeasts and lactic acid bacteria on the ethylphenol content of red wines. *American Journal of Enology and Viticulture* 46, 463-68.
- Chatonnet, P., Viala, C., Dubourdieu, D., (1997). Influence of polyphenol components of red wines on the microbial synthesis of volatile phenols. *American Journal of Enology and Viticulture* 48, 443-447.
- Cocolin, L., Mills, D.A., (2003). Wine yeast inhibition by sulfur dioxide: a comparison of culture-dependent and independent methods. *American Journal of Enology and Viticulture* 54, 125-130.
- Cocolin, L., Rantsiou, K., Iacumin, L., Zironi, R., Comi, G., (2004). Molecular detection and identification of *Brettanomyces/Dekkera bruxellensis* and *Brettanomyces/Dekkera*

- anomalus* in spoiled wines. Applied and Environmental Microbiology 70, 1347-1355.
- Cocolin, L., Alessandria, V., Dolci, P., Gorra, R., Rantsiou, K., (2013). Culture independent methods to assess the diversity and dynamics of microbiota during food fermentation. International Journal of Food Microbiology 167, 29-43.
- Combina, M., Mercado, L., Borgo, P., Elia, A., Jofre, V., Ganga, A., Martinez, C., Catania, C., (2005). Yeasts associated to Malbec grape berries from Mendoza, Argentina. Journal of Applied Microbiology 98, 1055-1061.
- Conterno, L., Joseph, C., Arvik, T., Henick-Kling, T., Bisson, L., (2006). Genetic and physiological characterization of *Brettanomyces bruxellensis* strains isolated from wines. American Journal of Enology and Viticulture 57, 139-147.
- Coulon, J., Perello, M.C., Lonvaud-Funel, A., De Revel, G., Renouf, V., (2010). *Brettanomyces bruxellensis* evolution and volatile phenols production in red wines during storage in bottles. Journal of Applied Microbiology 108, 1450-1458.
- Curtin, C.D., Langhans, G., Henschke, P.A., Grbin, P.R., (2013). Impact of Australian *Dekkera bruxellensis* strains grown under oxygen-limited conditions on model wine composition and aroma. Food Microbiology 36, 241-247.
- Custers, M.T.J., (1940). Onderzoekingen over het gistgeslacht *Brettanomyces*. PhD Thesis, Delft University Delft, The Netherlands.
- Deák, T. (Ed.) (2008). Yeasts in Specific Types of Foods. En: Handbook of Food Spoilage Yeasts. Chapter 7. Second Edition. CRC Press: Boca Raton, USA. Pp. 135-144.
- Dias, L., Dias, S., Sancho, T., Stender, H., Querol, A., Malfeito-Ferreira, M., Loureiro, V., (2003a). Identification of yeasts isolated from wine-related environments and capable of producing 4-ethylphenol. Food Microbiology 20, 567-574.
- Dias, L., Pereira-da-Silva, S., Tavares, M., Malfeito-Ferreira, M., Loureiro, V., (2003b). Factors affecting the production of 4-ethylphenol by yeast *Dekkera bruxellensis* in enological conditions. Food Microbiology 20, 377-384.
- Dubois, C., Manginot, C., Roustan, J., Sablayrolles, J. and Barre, P., (1996). Effect of variety, year, and grape maturity on the kinetics of alcoholic fermentation. American Journal of Enology and Viticulture 47, 363-368.
- Dugelay, I., Gunata, Z., Sapis, J.C., Baumes, R., Bayonove, C., (1993). Role of cinnamoyl esterase activities from enzyme preparations on the formation of volatile phenols during winemaking. Journal of Agricultural and Food Chemistry 41, 2092-2096.

- Du Toit, W., Pretorius, I., Lonvaud-Funel, A., (2005). The effect of sulfur 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.
- Dym, C.L. (Ed.) (2004). *Principles of mathematical modeling*. Second Edition. Elsevier Academic Press: San Diego CA, USA.
- Edlin, D.A.N., Narbad, A., Dickinson, J.R., Lloyd, D., (1995). The biotransformation of simple phenolic compounds by *Brettanomyces anomalus*. *FEMS Microbiology Letters* 125, 311-316.
- Esteve-Zarzoso, B., Gostín-car, A., Bobet, R., Uruburu, F., Querol, A., (2001). Selection and molecular characterization of wine yeasts isolated from the “El Penedès” area (Spain). *Food Microbiology* 17, 553-562.
- Falconi, P., Díaz Quirós, C., Sturm, M.E., Rojo, M.C., Mercado, L., Combina, M., (2011). Calidad microbiológica de vinos embotellados en Mendoza, Argentina. XIII Congreso Latinoamericano de Viticultura y Enología. Santiago de Chile, Chile.
- Fanzone, M., Zamora, F., Jofré, V., Assof, M., Gómez-Cordovés, C., Peña-Neira, A., (2012). Phenolic characterisation of red wines from different grape varieties cultivated in Mendoza province (Argentina). *Journal of Science of Food and Agriculture* 92, 704-718.
- Fernández-Espinar, M.T., Barrio, E. y Querol, A., (2005). Identificación y caracterización molecular de levaduras vínicas. En: Carrascosa, A.V., Muñoz, R. y González, R. (Eds.) *Microbiología del vino*. Primera edición. Capítulo 5. AMV Ediciones: Madrid, España. Pp. 148-184.
- Ferreira, V., Petka, J., Cacha, J., (2006). Intensity and persistence profiles of flavor compounds in synthetic solutions – Simple model for explaining the intensity and persistence of their after-smell. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54, 489-496.
- Flanzy, C., (Ed.) (2000). Tablas de composición. En: *Enología: Fundamentos científicos y tecnológicos*. AMV Ediciones: Madrid, España. Pp. 218-226.
- Freer, S.N., (2002). Acetic acid production by *Dekkera/Brettanomyces* yeasts. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 18, 271-275.

- Freer, S.N., Dien, B., Matsuda, S., (2003). Production of acetic acid by *Dekkera/Brettanomyces* yeasts under conditions of constant pH. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 19, 101-105.
- Fugelsang, K.C., Osborn, M.M., Muller, C.J., (1993). *Brettanomyces* and *Dekkera*. Implications in winemaking. En: Gump, B.H. (Ed). *Beer and wine production: analysis, characterization and technological advances*. American Chemical Society: Washington DC, USA. Pp. 110-131.
- Fugelsang, K.C., (Ed.) (1997). *Wine Microbiology*. Springer Verlag Science: New York, USA.
- Fugelsang, K.C., Zoecklein, B.W., (2003). Population dynamics and effects of *Brettanomyces bruxellensis* strains on Pinot Noir (*Vitis vinifera* L.) wines. *American Journal of Enology and Viticulture* 54, 294-300.
- Fugelsang, K.C., Edwards, C.G., (Eds.) (2007). *Wine Microbiology-Practical Applications and Procedures*. Second Edition. Springer: New York, USA.
- Gadaga, T.H., Mutukumira, A.N., Narvhus, J.A., (2002). Identification of yeasts isolated from Zimbabwean traditional fermented milk. *International Dairy Journal* 10, 459-466.
- Gao, C., Fleet G.H., (1988). The effects of temperature and pH on the ethanol tolerance of the wine yeasts, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida stellata* and *Kloeckera apiculata*. *Journal of Applied Bacteriology* 65, 405-410.
- Garde-Cerdán, T., Lorenzo, C., Carot, J.M., Jabaloyes, J.M., Esteve, M.D., Salinas, M.R., (2008). Statistical differentiation of wines of different geographic origin and aged in barrel according to some volatile components and ethylphenols. *Food Chemistry* 111, 1025-1031.
- Genigeorgis, C.A., (1981). Factors affecting the probability of growth of pathogenic microorganisms in foods. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 179, 1410-1417.
- Gerbaux, V., Vincent, B., Bertrand, A., (2002). Influence of maceration, temperature and enzymes on the content of volatile phenols in Pinot noir wines. *American Journal of Enology and Viticulture* 53, 131-137.
- Gilis, J.F., (1999). Etude des contaminations de fermentations alcooliques industrielles par les levures *Brettanomyces*. Thèse Nouveau Doctorat. Institut National Polytechnique de Toulouse. Toulouse, France. Pp: 1-150.

- Gilis, J.-F., Barbin, P., Strehaiano, P., Taillandier, P., (2008). Presencia de la levadura *Brettanomyces* en las bayas de uva: Influencia de los factores de la viña. *Revista Enología* 1, 1-8.
- Gilliland, R.B., (1961). *Brettanomyces* I. Occurrence, characteristics, and effects on beer flavour. *Journal of the Institute of Brewing* 67, 257-261.
- Godoy, L., Martinez, C., Carrasco, N., Ganga, M.A., (2008). Purification and characterization of a p-cumarate decarboxylase and a vinylphenol reductase from *Brettanomyces bruxellensis*. *International Journal of Food Microbiology* 127, 6-11.
- Godoy, L., Garrido, D., Martinez, C., Saavedra, J., Combina, M., Ganga, M.A., (2009). Study of the cumarate decarboxylase and vinylphenol reductase activities of *Dekkera bruxellensis* (anamorph *Brettanomyces bruxellensis*) isolates. *Letters in Applied Microbiology* 48, 452-457.
- Gordon, R.A., (Ed.) (2012). *Applied Statistic for the Social and Health Sciences*. Routledge: New York, USA.
- Guerzoni, E., Marchetti, R., (1987). Analysis of yeast flora associated with grape sour rot and of the chemical disease markers. *Applied and Environmental Microbiology* 53, 571-576.
- Harris, V., Ford, C., Jiranek, V., Grbin, P., (2008). *Dekkera* and *Brettanomyces* growth and utilisation of hydroxycinnamic acids in synthetic media. *Applied Microbiology and Biotechnology* 78, 997-1006.
- Harris, V., Ford, C., Jiranek, V., Grbin, P., (2009). Survey of enzyme activity responsible for phenolic off-flavour production by *Dekkera* and *Brettanomyces* yeast. *Applied Microbiology and Biotechnology* 81, 1117-1127.
- Harris, V., Jiranek, V., Ford, C.M., Grbin, P.R., (2010). Inhibitory effect of hidroxycinnamic acids on *Dekkera* spp. *Applied Microbiology and Biotechnology* 86, 721-729.
- Heard, G.M., Fleet, G.H., (1988). The effects of temperature and pH on the growth of yeast species during the fermentation of grape juice. *Journal of Applied Bacteriology* 65, 23-28.
- Henschke, P., Curtin, C., Grbin, P., (2007). Molecular characterization of the wine spoilage yeast *Dekkera (Brettanomyces) bruxellensis*. *Microbiology Australia* 28, 76-78.
- Heresztyn, T., (1986). Formation of substituted tetrahydropyridines by species of *Brettanomyces* and *Lactobacillus* isolated from mousy wines. *American Journal of Enology and Viticulture* 37, 127-132.

- Hesford, F., Schneider, K., Porret, N.A., Gafner, J., (2004). Identification and analysis of 4-ethylcatechol in wine tainted by *Brettanomyces* off-flavor. Abstract. American Journal of Enology and Viticulture 55: 304A.
- Hixson, J.L., Sleep, N.R., Capone, D.L., Elsey, G.M., Curtin, C.D., Sefton, M.A., Taylor, D.K., (2012). Hydroxycinnamic acid ethyl esters as precursors to ethylphenols in wine. Journal of Agricultural and Food Chemistry 60, 2293-2298.
- Hoffman, C.S., Wiston, F.A., (1987). A ten minute preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *E. coli*. Gene 57,267-272.
- Hosmer, D.W., Lemeshow, S., (Eds.) (2000). Applied Logistic Regression. Second Edition. John Wiley & Sons: New York, USA.
- INV. Situación de la vitivinicultura en Argentina. <http://www.inv.gov.ar/index.php/men-inv-investigacion/men-invest-dev/2-uncategorised/81-vitivinicultura-argentina>
- Ivey, M.L., Phister, T.G., (2011). Detection and identification of microorganisms in wine: a review of molecular techniques. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 38,1619-1634.
- James, S.A., Cai, J., Roberts, I.N., Collins, M.D., (1997). A phylogenetic analysis of the genus *Saccharomyces* based on 18S rRNA gene sequences: description of *Saccharomyces kunashirensis* sp. nov. and *Saccharomyces martiniae* sp. nov. International Journal of Systematic Bacteriology 47, 453-460.
- Jolly, N.P., Augustyn, O.P.H., Pretorius, I.S., (2003). The occurrence of non-*Saccharomyces cerevisiae* yeast species over three vintages in four vineyards and grape musts from production regions of the Western Cape, South Africa. South African Journal of Enology and Viticulture 24, 35-42.
- Joseph, C.M.L., Gorton, L.W., Ebeler, S.E., Bisson, L.F., (2013). Production of volatile compounds by wine strains of *Brettanomyces bruxellensis* grown in the presence of different precursor substrates. American Journal of Enology and Viticulture 64 (2), 231-240.
- Kalathenos, P., Sutherland, J., Roberts, T., (1995). Resistance of some wine spoilage yeasts to combinations of ethanol and acids present in wine. Journal of Applied Bacteriology 78, 245-250.
- Kell, D.B., Kaprelyants, A.S., Weichart, D.H., Harwood, C.L., Barer, M.R., (1998). Viability and activity in readily culturable bacteria: a review and discussion of the practical issues. Antonie Van Leeuwenhoek 73, 169-187.

- Kosse, D., Seiler, H., Amann, R., Ludwig, W., Scherer, S., (1997). Identification of yogurt-spoiling yeasts with 18S rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Systematic and Applied Microbiology* 20, 468-480.
- Kumara, H., Verachert, H., (1991). Identification of lambic superattenuating microorganisms by the use of selective antibiotics. *Journal of the Institute of Brewing* 97, 181-185.
- Kurtzman, C.P., Robnett, C.J., (1998). Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie van Leeuwenhoek* 73, 331-371.
- Kurtzman, C.P., Fell, J.W., (Eds.) (2000). *The yeasts. A taxonomic study. Fourth Edition Revised.* Elsevier Science Publisher BV: Amsterdam, The Netherlands.
- Lachance, M.A., (1995). Yeast communities in natural tequila fermentation. *Antonie van Leeuwenhoek* 68, 151-165.
- Laforge, R., Lonvaud-Funel, A., (2012). Hydroxycinnamic acid decarboxylase activity of *Brettanomyces bruxellensis* involved in volatile phenol production: relationship with cell viability. *Food Microbiology* 32, 230-234.
- Licker, J.L., Acree, T.E., Henick-Kling, T., (1998). What is "Brett" (*Brettanomyces*) flavour? A preliminary investigation. En: Waterhouse, A.L. & Ebeler, S.E. (Eds). *Chemistry of wine flavour.* ACS Symposium Series - Journal of the American Chemical Society: Washington, USA. Pp. 96-115.
- Longo, E., Cansado, J., Agrelo, D., Villa, T., (1991). Effect of climatic conditions on yeast diversity in grape musts from Northwest Spain. *American Journal of Enology and Viticulture* 42, 141-144.
- Loureiro, V., Querol, A., (1999). The prevalence and control of spoilage yeasts in foods and beverages. *Trends in Food Science and Technology* 10-11, 356-365.
- Loureiro, V., Malfeito-Ferreira, M., (2003). Spoilage yeast in the wine industry. *International Journal of Food Microbiology* 86, 23-50.
- Loureiro, V., Malfeito-Ferreira, M., (2006). *Dekkera/Brettanomyces* spp. En: Blackburn, C. de W. (Ed). *Food spoilage microorganisms.* Chapter 13. Woodhead Publishing Ltd: Cambridge, UK. Pp. 353-398.
- Loyola, E., Fonseca, V., (2007). Efecto del pH y concentración de anhídrido sulfuroso sobre el desarrollo de *Brettanomyces bruxellensis* en vino tinto. XI Congreso Latinoamericano de Viticultura y Enología, Mendoza, Argentina. Pp. 1-5.

- Loyola, E., Rey, A., (2007). Efecto del grado alcohólico y concentración de azúcar sobre el desarrollo de *Brettanomyces bruxellensis* en vino tinto. XI Congreso Latinoamericano de Viticultura y Enología. Mendoza, Argentina. Pp. 1-5.
- Malfeito-Ferreira, M., (2005). Avances recientes en el control de *Brettanomyces/Dekkera bruxellensis* en vinos. En: Enotour 2005. Agrovin: Zaragoza, España.
- Malfeito-Ferreira, M., (2011). Yeasts and wine off-flavours: a technological perspective. *Annals of Microbiology* 61, 95-102.
- Mansfield, A. K., Zoecklein, B. W., Whiton, R. S., (2002). Quantification of glycosidase activity in selected strains of *Brettanomyces bruxellensis* and *Oenococcus oeni*. *American Journal of Enology and Viticulture* 53, 303-307.
- McMeekin, T.A., Ross, T., (2002). Predictive microbiology: providing a knowledge-based framework for change management. *International Journal of Food Microbiology* 78, 133-153.
- Medawar, W., (2003). Etude physiologique et cinétique des levures du genre *Brettanomyces* dans un contexte oenologique. Thèse de doctorat de l'Institute polytechnique de Toulouse et Université Saint Joseph de Beyrouth. Toulouse, France.
- Mercado, L., Dalcero, A., Masuelli, R., Combina M., (2007). Diversity of *Saccharomyces* strains on grapes and winery surfaces: Analysis of their contribution to fermentative flora of Malbec wine from Mendoza (Argentina) during two consecutive years. *Food Microbiology* 24, 403-412.
- Monagas, M., Suarez, R., Gómez-Cordovés, C., Bartolomé, B., (2005). Simultaneous determination of nonanthocyanin phenolic compounds in red wines by HPLC-DAD/ESI-MS. *American Journal of Enology and Viticulture* 56, 139-147.
- Nissen, T., Schulze, U., Nielsen, J., Villadsen, J., (1997). Flux distribution in anaerobic, glucose-limited continuous cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* 143, 203-218.
- Oelofse, A., Pretorius, I.S., Du Toit, M., (2008). Significance of *Brettanomyces* and *Dekkera* during winemaking: a synoptic review. *South African Journal of Enology and Viticulture* 29, 128-144.
- Oelofse, A., Lonvaud-Funel, A., Du Toit, M., (2009). Molecular identification of *Brettanomyces bruxellensis* strains isolated from red wines and volatile phenol production. *Food Microbiology* 26, 377-385.

- OIV (Organisation Internationale de la Vigne et du Vin), (1998). Resolution Oeno 9/98 (Oeno/Secal/97/68). Limit of Sulphur Dioxide in Wines.
- OIV (Organisation Internationale de la Vigne et du Vin), (2009). Compendium of International Methods of Wine and Must Analysis, Vol. 1 and 2. OIV Editions: Paris, France.
- Oliver, J.D., (2010). Recent findings on the viable but non culturable state in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* 34, 415-25.
- Ou, S., Kwok, K.C., (2004). Ferulic acid: pharmaceutical functions, preparation and applications in foods. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 84, 1261-1269.
- Pastorkova, E., Zakova, T., Landa, P., Novakova, J., Vadlejch, J. y Kokoska, L., (2013). Growth inhibitory effect of grape phenolics against wine spoilage yeasts and acetic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology* 161, 209-213.
- Pérez-Rodríguez, F., Valero, A., (Eds.) (2013). *Predictive Microbiology in Foods*. En: *Predictive Microbiology in Foods*. Chapter 1. Springer: New York, USA. Pp. 1-10.
- PEVI (Plan Estratégico Vitivinícola 2020), (2004). SAGPyA Gobierno Nacional, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Instituto Nacional de Vitivinicultura, Gobierno de la Provincia de Mendoza y San Juan, Bodegas de Argentina, otros.
- Phister, T.G., Mills, D.A., (2003). Real-Time PCR assay for the detection and enumeration of *Dekkera bruxellensis* in wine. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 7430-7434.
- Phowchinda, O., Aguilar Uscanga, M.G., Delia, M.L., Vidal, F., Strehaiano, P., (1997). Rôle de l'acide acétique dans la concurrence entre deux genres levuriens en fermentation industrielle. En: *Génie de la Réaction en Microbiologie et Biochimie, Proceedings. 6th Congrès Française de Génie des Procédés*. Bimbenet, J.J., Muratet, G. (Eds.) Paris: Collection Récents Progrès en Génie des Procédés. Pp. 476, 24–26.
- Pin, C., Sutherland, J., Baranyi, J., (1999). Validating predictive models of food spoilage organisms. *Journal of Applied Microbiology* 87, 491-499.
- Pollnitz, A.P., Pardon, K.H., Sefton, M.A., (2000). Quantitative analysis of 4-ethylphenol and 4-ethylguaiacol in red wine. *Journal of Chromatography A* 874, 101-109.

- Prakitchaiwattana, C., Fleet, G.H., Heard, G.M., (2004). Application and evaluation of denaturing gradient gel electrophoresis to analyse the yeast ecology of wine grapes. *FEMS Yeast Research* 4, 865-877.
- Pretorius, I.S., Van der Westhuizen, T.J., Augustyn, O.P.H., (1999). Yeast biodiversity in vineyards and wineries and its importance to the South African wine industry. *South African Journal of Enology and Viticulture* 20, 61-74.
- Pretorius, I. S., (2000). Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast* 16, 675-729.
- Querol, A., Jiménez, M., Huerta, T., (1990). Microbiological and enological parameters during fermentation of musts from poor and normal grape harvests in the region of Alicante, Spain. *Journal of Food Science* 55, 1603-1606.
- Querol, A., Fleet, G., (Eds.) (2006). *Yeasts in Food and Beverages*. Springer-Verlag: Berlin, Germany.
- Ravn. H., Andary, C., Kovacs, G., Moelgaard, O., (1989). Caffeic acid esters as in vitro inhibitors of plant pathogenic bacteria and fungi. *Biochemical Systematics and Ecology* 17, 175-184.
- Ratkowsky, D.A., Ross, T., (1995). Modelling the bacterial growth/no growth interface. *Letters in Applied Microbiology* 20, 29-33.
- Reguant, C., Bordons, A., Arola, L., Rozès, N., (2000). Influence of phenolic compounds on the physiology of *Oenococcus oeni* from wine. *Journal of Applied Microbiology* 88, 1065-1071.
- Renouf, V., Lonvaud-Funel, A., (2006). Development of an enrichment medium to detect *Dekkera/Brettanomyces bruxellensis*, a spoilage wine yeast, on the surface of grape berries. *Microbiological Research* 162, 154-167.
- Renouf, V., Perello, M.C., Strehaiano, P., Lonvaud Funel, A., (2006). Global survey of the microbial ecosystem during alcoholic fermentation in winemaking. *Journal International Science Vigne Vin* 40, 101-106.
- Renouf, V., Strehaiano, P., Lonvaud-Funel, A., (2007). Effectiveness of dimethyldicarbonate to prevent *Brettanomyces bruxellensis* growth in wine. *Food Control* 19, 208-216.
- Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B., Lonvaud, A., (Eds.) (2006). *Handbook of Enology: The Microbiology of Wine and Vinifications*. Volume 1 and 2. Second Edition. John Wiley & Sons: London, UK.

- Roberts, T.A., Gibson, A.M., Robinson, A., (1981). Prediction of toxin production by *Clostridium botulinum* in pasteurised pork slurry. *Journal of Food Technology* 16, 337-355.
- Roccató, A., Daguerre, C., Mercado, L., Catania, C., Combina, M., (2001). Detección de *Dekkera/Bretanomyces* en uva, mostos y vinos. Metodología y primeros resultados. Trabajo en extenso. VIII Congreso Latinoamericano Viticultura y Enología. Montevideo, Uruguay. Pp. 1-7.
- Rodrigues, N., Gonçalves, G., Pereira-da-Silva, S., Malfeito-Ferreira, M., Loureiro, V., (2001). Development and use of a new medium to detect yeast of the genera *Dekkera/Brettanomyces* sp. *Journal of Applied Microbiology* 90, 588-599.
- Romano, P., Capece, A., Jespersen, L., (2006). Taxonomic and Ecological Diversity of Food and Beverage Yeasts. En: Querol, A., Fleet, G.H., (Eds.). *The Yeast Handbook -Volume 2: Yeasts in Food and Beverages*. Chapter 2. Springer-Verlag: Berlin, Germany. Pp. 13-54.
- Rousseau, S., Doneche, B., (2001). Effect of water activity (a_w) on the growth of some epiphytic microorganisms isolated from grape berry. *Vitis* 40, 75-78.
- Saez, J. S., Lopes, C. A., Caballero, A., Sangorrín, M. P., (2007). Detección de *Dekkera/Brettanomyces* en vinos alterados del Alto Valle de Río Negro. XI Congreso Latinoamericano de Viticultura y Enología. Mendoza, Argentina. Pp.1-5.
- Salameh, D., Brandam, C., Medawar, W., Lteif, R., Strehaiano, P., (2008). Highlight on the problems generated by *p*-coumaric acid analysis in wine fermentations. *Food Chemistry* 107, 1661-1667.
- Salter, M.A., Ross, T., Ratkowsky, D.A., McMeekin, T.A., (2000). Modelling the combined temperature and salt (NaCl) limits for growth of a pathogenic *Escherichia coli* strain using generalised nonlinear regression. *International Journal of Food Microbiology* 61, 159-167.
- Sangorrín, M.P., García, V., Lopes, C.A., Saez, J.S., Martínez, C., Ganga, M.A., (2013). Molecular and physiological comparison of spoilage wine yeasts. *Journal of Applied Microbiology* 114,1066-1074.
- Salameh, D., Brandam, C., Medawar, W., Lteif, R., Strehaiano, P., (2007). Highlight on the problems generated by *p*-coumaric acid analysis in wine fermentations. *Food Chemistry* 107, 1661-1667.

- Scheffers, W. A., (1966). Stimulation of fermentation in yeast by acetoin and oxygen. *Nature* 210, 533-534.
- Serpaggi, V., Remize, F., Recorbet, G., Gaudot-Dumas, E., Sequeira-Le Grand, A., Hervé, A., (2012). Characterization of the “viable but nonculturable” (VBNC) state in the wine spoilage yeast *Brettanomyces*. *Food Microbiology* 30, 438-447.
- Shinohara, T., Kubodera, S., Yanagida, F., (2000). Distribution of phenolic yeasts and production of phenolic off-flavors in wine fermentation. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 90, 90-97.
- Silva, P., Cardoso, H., Gerós, H., (2004). Studies on the wine spoilage capacity of *Brettanomyces/Dekkera* spp. *American Journal of Enology and Viticulture* 55, 65-72.
- Snowdon, E.M., Bowyer, M.C., Grbin, P.R., Bowyer, P.K. (2006). Mousy off-flavor: a review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54, 6465-6474.
- Stead, D., (1993). The effect of hydroxycinnamic acids on the growth of wine-spoilage lactic acid bacteria. *Journal of Applied Bacteriology* 75, 135-141.
- Stratford, M., (2006). Food and beverage spoilage yeasts. En: Querol, A., Fleet, G. (Eds). *Yeasts in Food and Beverages*. Chapter 11. Springer-Verlag: Berlin, Germany. Pp. 335-380.
- Sturm, M.E., Arroyo-López, F.N., Garrido-Fernández, A., Querol, A., Mercado, L.A., Ramirez, M.L., Combina, M., (2014). Probabilistic model for the spoilage wine yeast *Dekkera bruxellensis* as a function of pH, ethanol and free SO₂ using time as a *dummy* variable. *International Journal of Food Microbiology* 170, 83-90.
- Suárez, R., Suárez-Lepe, J.A., Morata, A., Calderón, F., (2007). The production of ethylphenols in wine by yeasts of the genera *Brettanomyces* and *Dekkera*. *Food Chemistry* 102, 10-21.
- Taillandier, P., Ramon Portugal, F., Fuster, A., Strehaiano, P., (2007). Effect of ammonium concentration on alcoholic fermentation kinetics by wine yeasts for high sugar content. *Food Microbiology* 24, 95-100.
- Teoh, A.L., Heard, G., Cox, J., (2004). Yeast ecology of Kombucha fermentation. *International Journal of Food Microbiology* 95, 119-126.
- Valero, A., Rodríguez, M., Carrasco, E., Pérez-Rodríguez, F., García-Gimeno, R.M., Zurera, G., (2010). Studying the growth boundary and subsequent time to growth

- of pathogenic *Escherichia coli* serotypes by turbidity measurements. *Food Microbiology* 27, 819-828.
- Van der Walt, J.P., Van Kerken, A.E., (1958). The wine yeast of the Cape. Part I. A taxonomical survey of the yeasts causing turbidity in South African table wines. *Antonie van Leeuwenhoek* 24, 239-252.
- Van der Walt, J.P., (1964). *Dekkera*, a new genus of the *Saccharomycetaceae*. *Antonie van Leeuwenhoek* 30, 273-280.
- Van de Water, L., (2004). *Dekkera/Brettanomyces*. Technical Seminar. 12th Australian Wine Industry Technical Conference. Melbourne, Australia.
- Van Sumere, C.F., Cottenie, J., De Gref. J., Kint, J., (1971). Biochemical studies in relation to the possible germination regulatory role of naturally occurring coumarin and phenolics. *Recent Advances in Phytochemistry* 4, 165-221.
- Vigentini, I., Romano, A., Compagno, C., Merico, A., Molinari, F., Tirelli, A., (2008). Physiological and oenological traits of different *Dekkera/Brettanomyces bruxellensis* strains under wine-model conditions. *FEMS Yeast Research* 8, 1087-1096.
- Walker, T.S., Bais, H.P., Halligan, K.M., Stermitz, F.R., Vivanco, J.M., (2003). Metabolic profiling of root exudates of *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51, 2548-2554.
- Wedral, D., Shewfelt, R., Frank, J. (2010). The challenge of *Brettanomyces* in wine. *Food Science and Technology* 43, 1474-1479.
- Wijsman, M.R., Van Dijken, J.P., Van Kleef, B., Scheffers, A., (1984). Inhibition of fermentation and growth in batch cultures of the yeast *Brettanomyces intermedius* upon a shift from aerobic to anaerobic conditions (Custers effect). *Antonie van Leeuwenhoek* 50, 183-192.

Los resultados obtenidos durante la realización de este trabajo de tesis, han permitido la publicación de dos trabajos científicos, que a continuación se citan y adjuntan.

Sturm, M.E., Arroyo-López, F.N., Garrido-Fernández, A., Querol, A., Mercado, L.A., Ramirez, M.L., Combina, M. (2014). A probabilistic model for the spoilage wine yeast *Dekkera bruxellensis* as a function of pH, ethanol and free SO₂ using time as *dummy variable*. International Journal of Food Microbiology 170, 83–90.

Sturm, M.E., Assof, M., Fanzone, M., Martinez, C., Ganga, M.A., Jofré, V., Ramirez, M.L., Combina, M. (2015). Relation between coumarate decarboxylase and vinylphenol reductase activity with regard to the production of volatile phenols by native *Dekkera bruxellensis* strains under 'wine-like' conditions. International Journal of Food Microbiology 206, 51–55.