

**UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS**

ESCUELA DE AGRONOMÍA

MEMORIA DE TÍTULO

**EFFECTO DEL pH Y CONCENTRACIÓN DE ANHÍDRIDO SULFUROSO SOBRE  
EL DESARROLLO DE LEVADURAS BRETTANOMYCES SPP. EN VINO TINTO**

**VIVIANA ALEJANDRA FONSECA SILVA**

SANTIAGO, CHILE

2007



**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS**  
ESCUELA DE AGRONOMÍA

MEMORIA DE TÍTULO

**EFFECTO DEL pH Y LA CONCENTRACIÓN DE ANHÍDRIDO SULFUROSO SOBRE  
EL DESARROLLO DE LEVADURAS BRETTANOMYCES SPP. EN VINO TINTO**

**EFFECT OF pH AND SULPHURE ANHYDRIDE CONCENTRATION ON THE  
DEVELOPMENT OF THE YEAST BRETTANOMYCES SPP. IN RED WINE**

**VIVIANA ALEJANDRA FONSECA SILVA**

SANTIAGO, CHILE

2007

**UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS  
ESCUELA DE AGRONOMÍA**

**EFEECTO DEL pH Y CONCENTRACIÓN DE ANHÍDRIDO SULFUROSO SOBRE EL  
DESARROLLO DE LEVADURAS BRETTANOMYCES SPP. EN VINO TINTO**

Memoria para optar al título profesional  
De Ingeniero Agrónomo  
Mención: Enología y Vitivinicultura

**VIVIANA ALEJANDRA FONSECA SILVA**

Calificaciones

Profesor Guía:  
Eduardo Loyola M.  
Ingeniero Agrónomo – Enólogo, Dr.

Profesor Evaluador:  
Alfredo Luchsinger L.  
Ingeniero Agrónomo, Dr.

Profesor Colaborador:  
Carlos Silva P.  
Químico Farmacéutico

Santiago, Chile

2007

**AGRADECIMIENTOS**

*Agradezco a todas las personas que me ayudaron en esta etapa, especialmente a la Rosita y sus atenciones. A mi eterna y querida compañera de tesis “sapito” y, en general, a todos mis compañeros por haber hecho de estos años de Universidad una experiencia querida e inolvidable...*

*A mi familia...*

## ÍNDICE

1.	Resumen	7
	Palabras claves	7
2.	Abstract	8
	Key words	8
3.	Introducción	9
	Hipótesis y Objetivo	10
4.	Materiales y Método	11
	Lugar de trabajo	11
	Materiales	11
	Materia prima	11
	Levadura	11
	Medio de cultivo	11
	Otros materiales	11
	Método	12
	Caracterización química del vino	12
	Evaluación de la esterilidad	12
	Corrección del vino	12
	Inoculación de los tratamientos	13
	Análisis microbiológico	13
	Variables a medir	13
	Diseño experimental y análisis estadístico	14
5.	Resultados y discusión	15
	Resultados del análisis del vino	15
	Resultados del ensayo	15
	Análisis estadístico de los datos	16
	Análisis descriptivo de las poblaciones	17
	Efecto del factor pH	18
	Efecto del anhídrido sulfuroso libre molecular	21
6.	Conclusiones	23
7.	Bibliografía	24

## RESUMEN

El propósito de este estudio fue investigar el efecto del anhídrido sulfuroso molecular a diferentes pH y la acción conjunta de ambos factores sobre el crecimiento de *Brettanomyces bruxellensis* en el vino.

El ensayo se realizó en un vino tinto de la variedad Cabernet sauvignon previamente esterilizado por filtración. Se trabajó con tres niveles de pH (3,4; 3,7 y 3,9), y cuatro concentraciones de anhídrido sulfuroso molecular (0; 0,6; 0,75 y 0,9 (mgL<sup>-1</sup>)). El ensayo se estableció de acuerdo a un diseño completamente al azar con estructura factorial y cuatro repeticiones para cada uno de los doce tratamientos.

El efecto de los factores se evaluó sobre la cepa *Brettanomyces bruxellensis* inoculada en cada tratamiento en una población inicial 1000 (UFCmL<sup>-1</sup>) tomada a partir de un cultivo en activo crecimiento preparado con anterioridad. La evolución de las poblaciones se determinó mediante recuentos periódicos en placas por un periodo de tres meses.

Los resultados obtenidos nos permiten afirmar que los tres niveles de pH estudiados tienen un efecto represivo sobre el desarrollo de *Brettanomyces bruxellensis* e impiden que esta cepa se desarrolle en el tiempo y, más bien, la destruyen. Específicamente es el nivel más bajo el que presenta el mayor efecto represivo. Con respecto al anhídrido sulfuroso molecular puede afirmarse lo mismo, es decir, todas las concentraciones en estudio, especialmente 0,9 (mgL<sup>-1</sup>), reprimen el desarrollo de la levadura hasta que la hacen desaparecer.

Puede también señalarse que en esta investigación no pudo determinarse una interacción entre los factores estudiados. La acción de ellos sobre *Brettanomyces bruxellensis* se ejerce de manera individual en todas las fechas de muestreo.

Palabras claves:

- *Dekkera spp.*
- Dióxido de azufre
- Concentración de ión hidrógeno
- 4-etilfenol
- 4-etilguayacol

## EFFECT OF pH AND SULPHURE ANHYDRIDE CONCENTRATION ON THE DEVELOPMENT OF THE YEAST *BRETTANOMYCES* SPP. IN RED WINE

### ABSTRACT

The purpose of this study was to investigate the effect of free molecular anhydride sulphur to different pH and the joint operation from both factors on the growth of *Brettanomyces bruxellensis* in a wine.

The test was made with a red wine of the variety Cabernet Sauvignon, sterilized by means of filtration by membrane. The work was with three concentrations of pH (3,4; 3,7 and 3,9), and four free molecular anhydride sulphur levels (0; 0,6; 0,75 and 0,9 (mgL<sup>-1</sup>)). The test was established according to a design at random with factorial structure and four repetitions for each one of the twelve treatments.

The effect of the factors was evaluated on the strain *Brettanomyces bruxellensis* inoculated in each treatment with an initial population of 1000 (UFCmL<sup>-1</sup>) taken from a culture in active growth previously prepared. The evolution of the populations was determined by periodic counts in plates in a period of three months.

The obtained results allowed us to affirm that the three studied levels of pH have a repressive effect on the development of *Brettanomyces bruxellensis* and prevent that this strain is developed in time, rather, they destroy it. Specifically it is the lowest concentration that displays the greater repressive effect. With respect to free molecular anhydride sulphur, it can be affirm the same, that is to say, all the concentrations in the study, specially 0,9 (mgL<sup>-1</sup>), repress the development of the yeast until they make it disappear.

It can also be determinated that these factors do not act in a joint way, but that they do it individually in all the dates of sampling.

#### Key words

- *Dekkera spp.*
- Dioxide of sulfur
- Hydrogen ion concentration
- 4-ethylphenol
- 4-ethylguayacol



## INTRODUCCIÓN

Debido al alto contenido inicial de azúcar, un bajo pH, condiciones anaeróbicas de fermentación y concentraciones altas de alcohol hacia el final de la fermentación, sólo unas pocas levaduras y bacterias son capaces de sobrevivir a las fuertes presiones de selección en la fermentación de las uvas y el vino (Du Toit y Pretorius, 2000). Si no se controla la actividad metabólica de estos microorganismos antes, durante y después de la fermentación, se puede alterar la composición química del vino, y con ello, afectar adversamente las propiedades sensoriales (apariciencia, aroma y sabor) del producto final. Dos de los microorganismos que pueden persistir a través de la elaboración del vino son las bacterias acéticas y *Brettanomyces ssp.* (Heresztyn, 1986).

La levadura *Brettanomyces* es sinónimo de enfermedad en el vino. Las secuelas que este microorganismo puede dejar en los vinos en que se desarrolla causan grandes problemas a los enólogos de todo el mundo, debido a que su desarrollo es impredecible y su control muy complicado. Sin embargo, algunos expertos consideran que un “toque de brett” hace que muchos vinos ganen complejidad y sean mejor valorados por algunos consumidores, aunque esto va depender, según la comunidad mundial de enólogos, del tipo de cepas, del tiempo de contacto de *Brettanomyces ssp.* con el vino y de las poblaciones totales alcanzadas (Alguacil, 2001).

Las levaduras *Brettanomyces/Dekkera* existen en dos formas: *Brettanomyces ssp.* la asexual (forma no esporulada) y *Dekkera ssp.* la sexual (forma esporulada). Estas levaduras pertenecen a los Ascomycetes, uno de los phylum en que se clasifican los hongos y tiene cuatro especies que lo representan. De estas cuatro, fundamentalmente *Brettanomyces/Dekkera bruxellensis* es la que más frecuentemente se ha identificado en los vinos con “brett” y, por lo tanto, la que interesa desde el punto de vista enológico (Alguacil, 2001).

*Brettanomyces bruxellensis* ha sido históricamente responsable de la pérdida de millones de dólares anualmente en la industria del vino (Fugelsang, 1997). Es conocida por fermentar pequeñas concentraciones de azúcar y etanol (Kurtzman y Fell, 1998), produciendo un amplio rango de metabolitos, incluyendo fenoles volátiles (Chatonnet y Boidron, 1988; Chatonnet *et al.*, 1992, 1995; Dubois y Dekimpe, 1982) y ácidos grasos de cadena media (octanoico, dodecanoico, isobutirico, isovalerico y 2-metilbutirico). (Fugelsang, 1997). Otros componentes activos producidos por *Brettanomyces ssp.* incluye 2-feniletanol, alcohol isoamilico, cis-2-nonenal trans-2-nonenal, betadamascenone y decanoato de etilo. Licker (1999, citado por Fugelsang y Zoecklin 2003) señala que de todos estos, los principales compuestos asociados con *Brettanomyces ssp.* son los fenoles volátiles 4-etilfenol y 4-etilguayacol (Chatonnet *et al.*, 1992, 1995), el ácido isoaléxico y ciertamente las hidropiridinas (Heresztyn, 1986). En estudios recientes Coulter *et al.*, 2004 (citado por Du Toit *et al.*, 2005) encontró que 4-etilfenol y 4-etilguayacol se asocian a los malos olores en los vinos tintos. El 4-etilfenol se asocia con aromas medicinales, fenólicos y pungentes que han sido descritos con un umbral de percepción de 0,23 mgL<sup>-1</sup>. El 4-etilguayacol, por su parte, es responsable de otorgar aromas descritos como tocino y humo, cuyo umbral de percepción es de 0,047 mgL<sup>-1</sup> (Chatonnet *et al.*,

1990). Individual o colectivamente estos compuestos podrían afectar las características sensoriales del vino. (Fugelsang y Zoecklein, 2003).

Todo esto ha obligado a muchos enólogos a revisar las prácticas de elaboración meticulosamente para encontrar las mejores técnicas de control de esta alteración microbiológica. Mejores prácticas incluyen medidas como el uso de uva sana, la aplicación de prácticas de limpieza y sanitización de lagares, control y manejo de la temperatura, oxígeno y exposición a los nutrientes residuales (glucosa, fructosa y nitrógeno) en vinos terminados, un mejor manejo de las barricas, uso de barricas nuevas por sobre las viejas, sanitización de barricas, pH y dosis adecuadas de anhídrido sulfuroso, etc. (Du Toit *et al.*, 2005)

Con respecto al anhídrido sulfuroso se ha demostrado que la incorporación de éste por parte de *Brettanomyces bruxellensis* es rápida, ya que concentraciones de anhídrido sulfuroso molecular de 0,25 (mgL<sup>-1</sup>), consideradas bajas, bastan para hacer perder completamente a las células su viabilidad y culturabilidad a los 330 minutos de exposición (Du Toit *et al.*, 2005). Por su parte, la concentración de ion hidrógeno determina si los microorganismos crecerán en el vino, qué especies lo harán y a qué velocidad, así como la cantidad de metabolitos producidos por éstos durante el ciclo de crecimiento (Zoecklin *et al.*, 2001). Es sabido que las levaduras prefieren medios más bien neutros o poco ácidos y es por esto que el mantenimiento de un bajo pH en el vino es de importancia crítica para el enólogo, ya que, además, un mayor porcentaje del anhídrido sulfuroso libre estará en la forma molecular en estas condiciones (Chatonnet, 2005).

### Hipótesis

Diferentes concentraciones de anhídrido sulfuroso molecular a diferentes valores de pH afectan el desarrollo de *Brettanomyces bruxellensis* en vinos tintos

### Objetivo

Determinar el efecto del anhídrido sulfuroso molecular a diferentes pH y la acción conjunta de ambos factores sobre el crecimiento de *Brettanomyces bruxellensis* en un vino Cabernet Sauvignon.

## MATERIALES Y MÉTODO

### Lugar de trabajo

Los análisis químicos y microbiológicos se realizaron en los laboratorios de Enología y Microbiología del Departamento de Agroindustria y Enología de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Chile.

### Materiales

- Vino Cabernet Sauvignon, 2005, valle de Colchagua, aportado por la viña Bosques del Maule.
- Levadura CECT 1015: *Dekkera bruxellensis*, van der Walt. Anam: *Brettanomyces bruxellensis*. Colección Universidad de Valencia, España.
- Medio de cultivo YEPD descrito por la A.T.C.C. formulado con:

Glucosa	: 2 %
Peptona	: 2 %
Extracto de levadura	: 1%
Agar	: 1,5%

Además el medio de cultivo llevó en su preparación 1% de difenilo al 5% y 25 ( $\text{mgL}^{-1}$ ) de tetraciclina 0,5 (ppm) con el fin de reducir el riesgo de contaminación de las placas con hongos y bacterias respectivamente.

Otros materiales son:

- Solución de Metabisulfito de Potasio al 1%
- Yodo 50 N
- Almidón 1%
- $\text{H}_2\text{SO}_4$  (1/3)
- Bicarbonato de Sodio
- NaOH 4N
- HCl 20% p/v
- Placas Petri desechables
- Pipetas graduadas
- Pipetas Pasteur
- Membranas filtrantes 0,65 ( $\mu\text{m}$ )

- Alcohol
- Esferas de vidrio

### Método

**Caracterización química del vino.** El vino fue previamente analizado para contar con una caracterización química de él en cuanto a su:

- Acidez de titulación : expresada en ( $\text{gL}^{-1}$  de ácido tartárico) y usando NaOH 1 N como indicador
- Acidez volátil : expresada en ( $\text{gL}^{-1}$  de ácido acético) y usando el Método de Blarez
- Azúcares reductores : expresada en ( $\text{gL}^{-1}$  de glucosa) y a través del Licor de Fehling
- Alcohol etílico : usando el método densimétrico
- pH : usando pH-metro marca HANNA 211
- Anhídrido Sulfuroso : expresado en ( $\text{mgL}^{-1}$ ) y a través del método de Ripper (Zoecklein *et al.*, 2001)

**Evaluación de esterilidad.** Antes de comenzar se evaluó la total ausencia de levaduras mediante la filtración de 50 (mL) de vino a través de una membrana de 0,65 ( $\mu\text{m}$ ). Estas membranas fueron cultivadas en placas que contenían medio YEPD y mantenidas por 10 días en una estufa a 28°C para facilitar el crecimiento microbiano. Pasado este tiempo y una vez comprobada la ausencia de microorganismos se procedió a establecer los distintos tratamientos del ensayo.

**Corrección del vino.** El vino fue corregido con el nivel de pH y anhídrido sulfuroso molecular que cada tratamiento requería. El pH se corrigió al alza con una solución de NaOH 4N y a la baja con una solución de HCl 20% p/v. En cada caso se fueron agregando al vino gotas de las soluciones hasta que el pH-metro mostrara el nivel de pH requerido.

La concentración de anhídrido sulfuroso por su parte se corrigió utilizando una solución de Metabisulfito de Potasio al 1% p/v que fue agregada al vino en la cantidad que los cálculos previos así indicaban, permitiéndose una desviación de  $\pm 0,1$  ( $\text{mgL}^{-1}$ ) de anhídrido sulfuroso libre. El programa utilizado para calcular el anhídrido sulfuroso molecular a los pH que el estudio requería fue Sulphite Calculator 3.0. Copyright 2001-2002. Robert Tyrie.

En la tabla 1 se presentan los niveles de pH y concentraciones de anhídrido sulfuroso libre y molecular de cada tratamiento.

Tabla 1: Estructura de los tratamientos.

Tratamiento	pH	SO <sub>2</sub> molecular (mgL <sup>-1</sup> )	SO <sub>2</sub> libre (mgL <sup>-1</sup> )
T1	3,4	0	0
T2	3,4	0,6	24,5 ± 0,1
T3	3,4	0,75	30,6 ± 0,1
T4	3,4	0,9	36,7 ± 0,1
T5	3,7	0	0
T6	3,7	0,6	48,3 ± 0,1
T7	3,7	0,75	60,3 ± 0,1
T8	3,7	0,9	72,4 ± 0,1
T9	3,9	0	0
T10	3,9	0,6	76,1 ± 0,1
T11	3,9	0,75	95,1 ± 0,1
T12	3,9	0,9	114,2 ± 0,1

**Inoculación de los tratamientos.** Después que ambos factores fueron ajustados a la necesidad de cada tratamiento se procedió a sembrar en cada unidad experimental una población de *Brettanomyces bruxellensis* de 1000 (UFCmL<sup>-1</sup>) aproximadamente obtenidas de una solución en activo crecimiento preparada con anterioridad.

**Análisis microbiológico.** La evolución de la población de levaduras se siguió semanalmente mediante cultivos en placas en un medio YEPD modificado. La forma de sembrar varió según el número de células contadas previamente en la cámara Neubauer. De esta manera se sembró en forma diluida, directa y concentrada a medida que avanzaba el tiempo e iba disminuyendo el número de células determinadas en los recuentos.

La primera semana se hizo una siembra en placas el primer día (día de la inoculación) y luego día por medio. Para la segunda, tercera y cuarta semana la siembra se realizó una vez cada semana. Durante el segundo y tercer mes las siembras se realizaron de manera quincenal y el cuarto mes, se sembró sólo una vez.

Además de esto, a la mitad y al término del proceso se midieron nuevamente el pH y el anhídrido sulfuroso libre, siendo necesario según los resultados obtenidos, corregir nuevamente para mantener los niveles que cada tratamiento requería. Esto sólo a la mitad del proceso.

#### Variables a medir

- Recuento de células vivas a través de Unidades Formadoras de Colonia (UFC)
- pH
- Anhídrido sulfuroso molecular

### Diseño experimental y Análisis Estadístico

En el análisis microbiológico se usó un diseño experimental completamente al azar con estructura factorial 4x3 (cuatro concentraciones de anhídrido sulfuroso molecular y tres niveles de pH), con doce tratamientos y cuatro repeticiones. Cada una de estas repeticiones tuvo a su vez una muestra y una contra muestra. La unidad experimental fue una botella de 375 (mL).

En la tabla 2 se presentan los doce tratamientos y su respectiva combinación de pH y anhídrido sulfuroso molecular

Tabla 2: Esquema de tratamientos

pH	Anhídrido sulfuroso molecular (mgL <sup>-1</sup> )			
	0	0,6	0,75	0,9
3,4	T1	T2	T3	T4
3,7	T5	T6	T7	T8
3,9	T9	T10	T11	T12

Los resultados obtenidos se analizaron estadísticamente mediante un análisis de varianza a un nivel de significancia de 5% y para ver las diferencias entre las muestras se usó el Método de Comparación Múltiple DUNCAN. Los datos registrados de los recuentos poblacionales se tabularon y fueron segmentados de acuerdo al factor restrictivo para efectuar el Análisis de Varianza. El software utilizado fue StatGraphics 5.1 para Windows.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Resultados del análisis del vino.

En la tabla 3 se presentan las características químicas del vino

Tabla 3: Características químicas del vino utilizado en el estudio

Análisis	Vino
Grado alcohólico (% v/v)	13,9
pH	3,7
Azúcares reductores (gL <sup>-1</sup> de glucosa)	3
Acidez total (g de ácido tartárico L <sup>-1</sup> )	4,7
Acidez volátil (g de ácido acético L <sup>-1</sup> )	0,6
Anhídrido sulfuroso libre (mgL <sup>-1</sup> )	0,6
Anhídrido sulfuroso total (mgL <sup>-1</sup> )	2

Los bajos niveles de anhídrido sulfuroso libre y total se deben a que el vino, por no haber hecho la fermentación maloláctica, no había sido corregido con el antiséptico. Los valores detectados corresponden a lo residual de la fermentación.

La concentración de azúcar residual es levemente superior a la de un vino considerado seco y la acidez volátil es correcta para un vino tinto, aunque levemente elevada, ya que Ribereau-Gayon (1961, citado por Zoecklin *et al.*, 2001) considera que un vino seco y sano debería tener valores entre 0,2 y 0,4 (gL<sup>-1</sup>) de ácido acético.

### Resultados del ensayo.

Los resultados del ensayo serán presentados de dos formas, una a través del análisis estadístico de los datos y otra que incorpora el análisis descriptivo mediante curvas que representan la evolución poblacional. Para el análisis estadístico y para graficar la evolución poblacional se tomaron en cuenta los resultados hasta el día 27, ya que las siguientes fechas (día 41, 55 y 73) no presentan crecimiento alguno y, por lo tanto, sus logaritmos no pueden graficarse.

**Análisis estadístico de los datos.**

En la tabla 4 se muestran los resultados obtenidos del análisis estadístico al que fueron sometidos los datos. Como se puede ver las diferencias en un nivel de pH entre las diferentes concentraciones de anhídrido sulfuroso molecular se hacen significativas en las fechas 6 y 13 para el pH 3,4; en la fecha 4 para el pH 3,7 y en las fechas 4, 6 y 13 para el pH 3,9. Además, las diferencias entre los niveles de pH dentro de una misma concentración de anhídrido sulfuroso molecular son significativas en las fechas 6 y 13 para el pH 3,4 y 3,7 con 0 (mgL<sup>-1</sup>) de anhídrido sulfuroso molecular; en la fecha 4 para el pH 3,7 y 3,9 con 0,6 (mgL<sup>-1</sup>) de anhídrido sulfuroso molecular; en las fechas 6 y 13 para el pH 3,4 y 3,7 con 0,75(mgL<sup>-1</sup>) de anhídrido sulfuroso molecular y finalmente en la fecha 4 para el pH 3,7 y en las fechas 4 y 6 para el pH 3,9 con 0,9 (mgL<sup>-1</sup>) de anhídrido sulfuroso molecular.

Con respecto al anhídrido sulfuroso molecular se puede afirmar que existen diferencias significativas entre las concentraciones en los días 2, 4, 6, 13 y 20 para el nivel de pH 3,4, en los días 2, 4, 6 y 13 para el pH 3,7 y sólo en el día 2 para el pH 3,9. Dentro de una concentración en diferentes niveles de pH las diferencias son significativas los días 2, 4, 6, 13 y 20 para 0, 0,6 y 0,75(mgL<sup>-1</sup>) de anhídrido sulfuroso molecular. La concentración 0,9 (mgL<sup>-1</sup>) de anhídrido sulfuroso molecular no presenta diferencias significativas al ser comparada en cada nivel de pH en todas las fechas.



Tabla 4. Promedios de los recuentos por tratamiento (celmL<sup>-1</sup>)

pH	Días	Anhídrido sulfuroso molecular (mgL <sup>-1</sup> )			
		0	0,6	0,75	0,9
3,4	0	7500 Aa	8500 Aa	8000 Aa	7000 Aa
	2	7000 Ca	4500 Ba	5250 BCa	2000 Aa
	4	3750 Ba	1750 Aa	1300 Aa	750 Aa
	6	1100 Cab	700 BCa	475 ABab	175 Aa
	13	62,5 Bab	67,5 Ba	62,5 Bab	17,5 Aa
	20	2,875 Ba	3,125 Ba	4 Ba	0,5 Aa
	27	0,5 Aa	0,125 Aa	0,25 Aa	0 Aa
3,7	0	8750 Aa	6500 Aa	7750 Aa	5250 Aa
	2	7750 Ca	5250 ABa	5500 BCa	3000 Aa
	4	3750 Ba	3750 Bab	3250 ABa	2250 Ab
	6	425 Ba	525 Ba	150 Aa	175 Aa
	13	30 ABa	50 Ba	7,5 Aa	7,5 Aa
	20	10 Aa	17,5 Aa	5 Aa	7,5 Aa
	27	5 Aa	7,5 Aa	2,5 Aa	2,5 Aa
3,9	0	8000 Aa	6750 Aa	7250 Aa	5750 Aa
	2	5750 Ba	3500 Aa	4500 ABa	3500 Aa
	4	3500 Aa	4500 Ab	3250 Aa	2750 Ab
	6	1333,33 Ab	1325 Aa	950 Ab	1125 Ab
	13	110 Ab	107,5 Aa	105 Ab	37,5 Aa
	20	17,5 Aa	30 Aa	12,5 Aa	2,5 Aa
	27	2,5 Aa	5 Aa	7,5 Aa	0 Aa

Promedios seguidos de letras iguales en filas y columnas, no difieren significativamente ( $p < 0,05$ ).

#### Análisis descriptivo de las poblaciones.

Debido a que el análisis estadístico de los datos no arrojó interacciones entre los factores, los resultados obtenidos se presentan a través de un análisis descriptivo de los datos de manera separada, es decir, considerando en un caso sólo el efecto del pH y luego el efecto del anhídrido sulfuroso molecular. Esta forma de analizar los resultados pueden ser de interés en la práctica de las bodegas.

**Efecto del pH sobre la evolución poblacional de *Brettanomyces spp.* en el vino:** Las figuras que se presentan a continuación muestran la evolución de las poblacionales de *Brettanomyces bruxellensis*, para cada nivel de pH en las distintas concentraciones de anhídrido sulfuroso molecular.

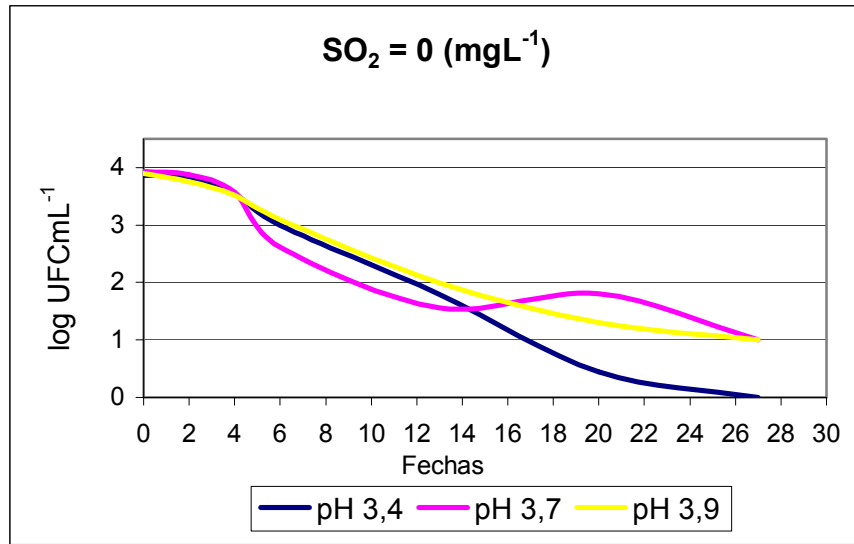


Figura 1. Efecto del pH sobre el desarrollo de *Brettanomyces bruxellensis* a 0 (mgL<sup>-1</sup>) de anhídrido sulfuroso molecular.

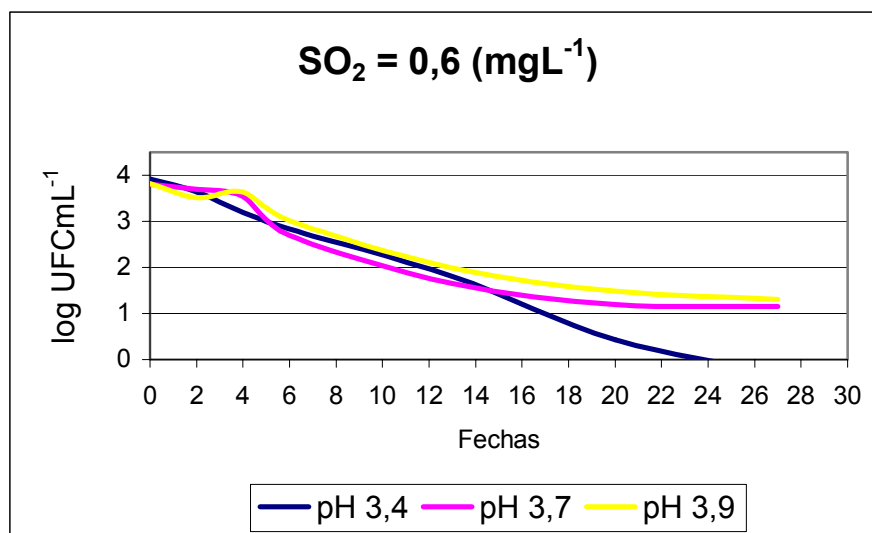


Figura 2. Efecto del pH sobre el desarrollo de *Brettanomyces bruxellensis* a 0,6 (mgL<sup>-1</sup>) de anhídrido sulfuroso molecular.

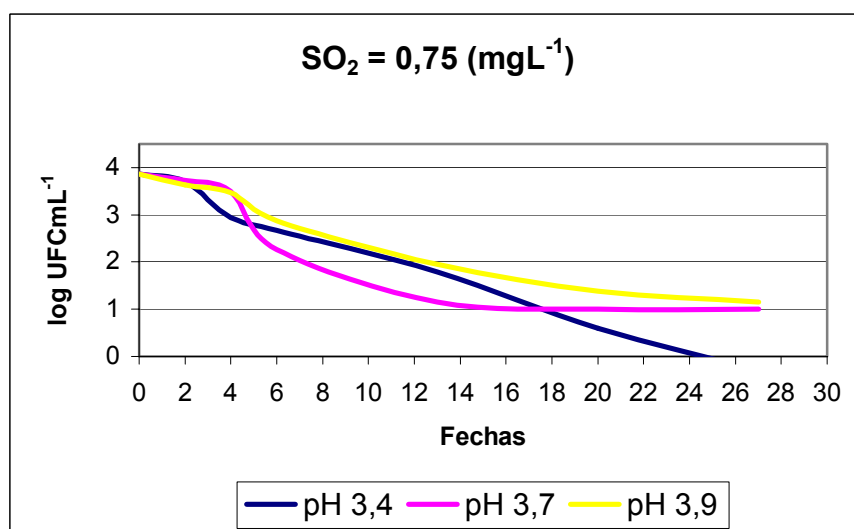


Figura 3. Efecto del pH sobre el desarrollo de *Brettanomyces bruxellensis* a 0,75 (mgL<sup>-1</sup>) de anhídrido sulfuroso molecular

En las figuras 1, 2 y 3 que presentan el efecto de los diferentes pH bajo concentraciones de 0 (mgL<sup>-1</sup>), 0,6 (mgL<sup>-1</sup>) y 0,75 (mgL<sup>-1</sup>) de anhídrido sulfuroso molecular se puede apreciar el efecto del factor pH sobre el desarrollo de la cepa en estudio. En las figuras señaladas queda claro que la acidez real, en sus tres niveles, afecta de manera adversa el crecimiento de

*Brettanomyces bruxellensis* y no permite que esta levadura se desarrolle, por el contrario, a medida que pasa el tiempo su efecto se va acentuando hasta llegar a destruirla.

Si bien queda claro el efecto represor de los tres niveles de pH a lo largo de todo el ensayo, éste se acentúa a medida que la concentración de  $\text{SO}_2$  molecular es mayor. Por otra parte no queda claro hasta el día 13, el mayor efecto de uno u otro, ya que hasta esa fecha las curvas se entremezclan y no permiten determinar un orden de efectividad de los niveles en estudio. Sin embargo, a partir de ese día sí se logra diferenciar el mayor efecto represor del pH 3,4 por sobre el 3,7 y 3,9, ya que es en este punto donde estos dos últimos valores de pH cambian la tendencia con la que venían, produciéndose de aquí en adelante, un menor efecto en la destrucción de los microorganismos y, por lo tanto, la sobrevivencia de ellos por más tiempo.

En la figura 4 se observa que los tres niveles de pH son más restrictivos en esta concentración de anhídrido sulfuroso molecular que en las anteriores, ya que durante todo el ensayo mantienen más baja la población de levaduras viables. Esto es notorio desde la primera fecha de muestreo, llegando al segundo día, a niveles poblacionales que en las condiciones menos restrictivas de anhídrido sulfuroso molecular, se presentaron solo a partir del cuarto día.

Al igual que en las concentraciones menores de  $\text{SO}_2$  molecular el efecto se torna diferente respecto del pH a partir del día 13 de la inoculación. El efecto del pH 3,7 y 3,9 pareciera estar invertido ya que mayores pH deberían favorecer o más bien ser menos restrictivos para el desarrollo de los microorganismos, lo que aquí no se observa.

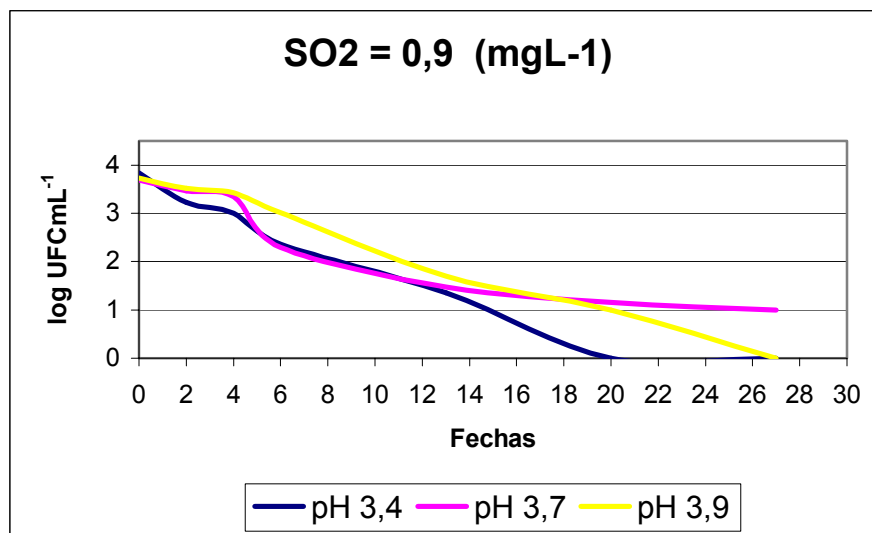


Figura 4. Efecto del pH sobre el desarrollo de *Brettanomyces bruxellensis* a  $0,9 \text{ (mgL}^{-1}\text{)}$  de anhídrido sulfuroso molecular

**Efecto del anhídrido sulfuroso molecular sobre la evolución poblacional de *Brettanomyces spp.* en el vino:** En las siguientes figuras se presenta la evolución de las poblaciones considerando el efecto de las distintas concentraciones de anhídrido sulfuroso molecular para cada uno de los valores de pH estudiados.

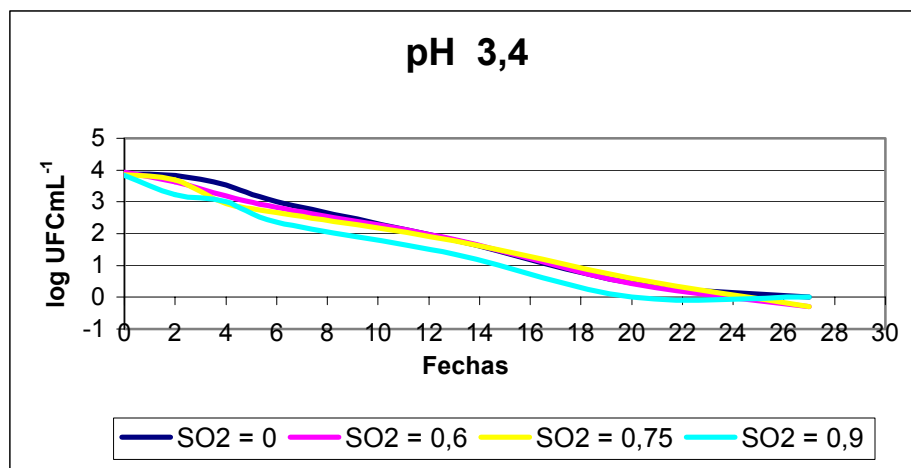


Figura 5. Efecto del anhídrido sulfuroso molecular sobre el desarrollo de *Brettanomyces bruxellensis* a pH 3,4.

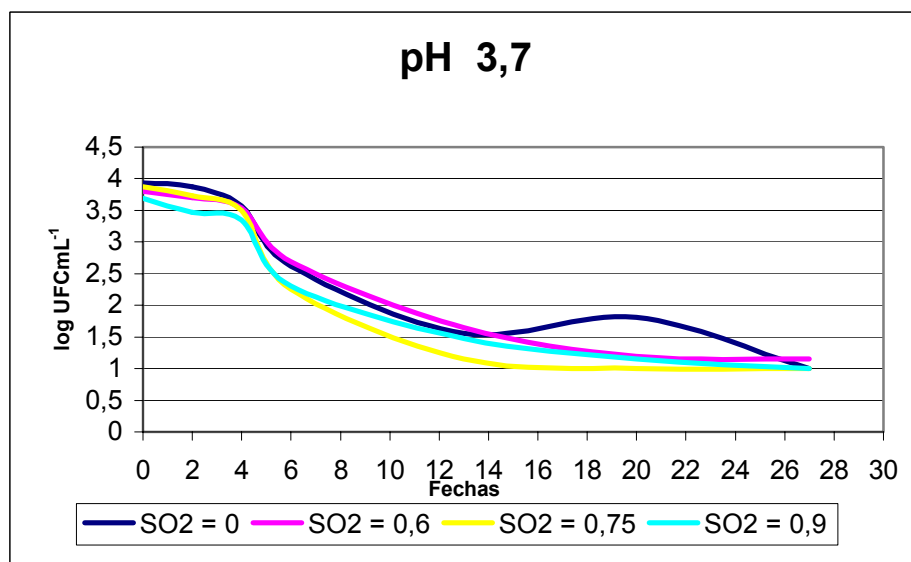


Figura 6. Efecto del anhídrido sulfuroso molecular sobre el desarrollo de *Brettanomyces bruxellensis* a pH 3,7.

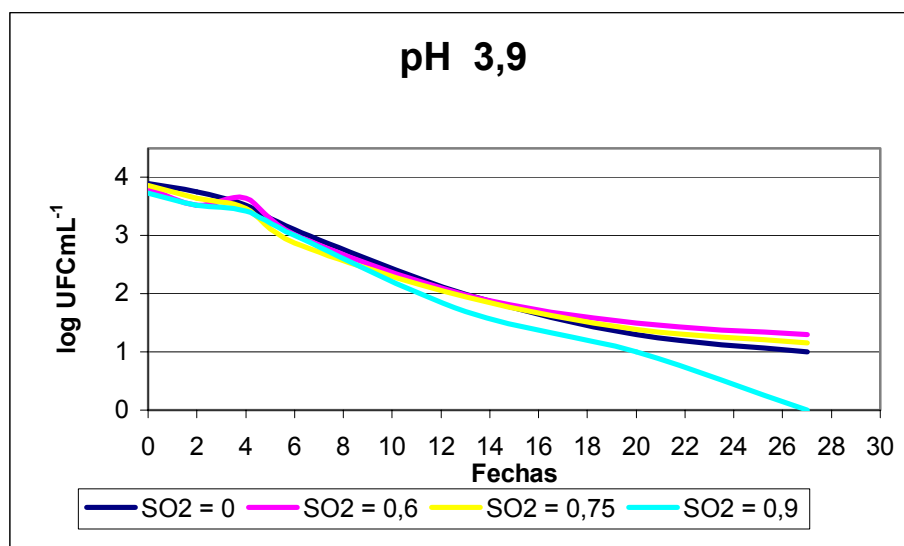


Figura 7. Efecto del anhídrido sulfuroso molecular sobre el desarrollo de *Brettanomyces bruxellensis* a pH 3,9.

Como se aprecia en las figuras 5, 6 y 7 el efecto de las diferentes concentraciones de anhídrido sulfuroso molecular para cada uno de los valores de pH no es claro. Sólo la mayor concentración de anhídrido sulfuroso molecular, 0,9 (mgL<sup>-1</sup>), muestra un claro efecto represivo en el desarrollo de la levadura, ya que mantiene más bajas las poblaciones durante todo el periodo del ensayo. Esto a excepción del pH 3,7, donde a partir del día 13 de ensayo se produce un cambio en la tendencia que venía observándose y pasa a ser la concentración 0,75 (mgL<sup>-1</sup>) la que tiene un mayor efecto represivo.

Del análisis global de los resultados se puede señalar que es la combinación de pH 3,4 y anhídrido sulfuroso molecular 0,9 (mgL<sup>-1</sup>) la que presenta el mayor efecto restrictivo para el desarrollo de la levadura, ya que logra un efecto más rápido en la destrucción de *Brettanomyces bruxellensis*.

Es necesario tener en cuenta que estos valores son difíciles de encontrar en vinos tintos, ya que acideces tan altas como la mencionada afectan la percepción sensorial del vino por parte de los consumidores y porque el anhídrido sulfuroso molecular, a los valores normales de pH del vino, requiere de sulfurosos libres y totales demasiado elevados, que también afectan las características sensoriales del vino y su normal evolución.

## CONCLUSIONES

- Los factores en estudio no actúan de manera conjunta, sino que más bien lo hacen de manera separada, sin presentar interacción entre ellos.
- Un pH más ácido en cualquier de las concentraciones de SO<sub>2</sub> molecular estudiadas es más restrictivo para el desarrollo de *Brettanomyces bruxellensis*.
- La concentración de anhídrido sulfuroso molecular igual a 0,9 (mgL<sup>-1</sup>) es, por lo general, más restrictiva para el desarrollo de *Brettanomyces bruxellensis* en los niveles de pH estudiados. Las otras tres concentraciones no presentan una tendencia en su comportamiento, de manera tal que éste no puede establecerse.

## BIBLIOGRAFIA

Alguacil, M. 2001. El “Brett”, gran enemigo de los vinos de calidad. Elvino.com. Disponible en: [www.elmundo.es](http://www.elmundo.es) Leído el 20 de Agosto del 2006.

Chatonnet, P., J.N. Boidron. 1988. Dosage de phénols volatils dans les vins par chromatographic en phase gazeuse. *Sci.Aliment.*8: 479-488

Chatonnet, P., J.N. Boidron, and M. Pons. 1990. Elevage des vins rouges en fûts de chêne: évolution de certains composé volatils et de leur impact aromatique. *Sci.Aliment.* 10: 656-587

Chatonnet, P., J. Dubourdieu, J.N. Boidron, and M. Pons. 1992. Synthesis of volatile phenols by *Saccharomyces cerevisiae* in wines. *J. Sci. Food Agric.* 62: 191 – 202

Chatonnet, P. 2005. II Encuentro enológico para la fundación de la cultura del vino. *Rev. Dossier* 11 : 24-30

Chatonnet, P., J. Dubourdieu, J.N. Boidron. 1995. The influence of *Brettanomyces/Dekkera sp.* yeast and lactic acid bacteria on the ethylphenol content of red wines. *Am J. Enol.Vitic.*, 46:463-468.

Dubois, P. y J. Dekimpe. 1982. Constituans volatils odorants des vins de Bourgogne elevés en futs de chene neufs. *Rev. Fr .Oenol.* 88:51-53

Du Toit, W.J. and I.S. Pretorius, 2000. Microbial spoilage and preservation of wine: using weapons from nature’s own arsenal – a review. *S.A. J. Enol. Vitic.*, 21: 74 – 96.

Du Toit, W.J., I.S. Pretorius and A. Lonvaud-Funel. 2005. The effect of sulphur dioxide and oxygen on the viability and culturability of strain of *Acetobacter pasteurians* and a strain of *Brettanomyces bruxellensis* isolated from wine. *J. Ap. Mic.*, 98: 862 – 871.

Fugelsang, K.C. 1997. *Wine microbiology*. Chapman and Hall, New York.

Fugelsang, K.C. and B. Zoecklein. 2003. Population dynamics and effects of *Brettanomyces bruxellensis* strains on pinot noir (*Vitis vinifera L.*) wines. *Am. J. Enol. Vitic.*, 54 (4): 294 – 300.

Heresztyn, T. 1986. Formation of substituted tetrahydropyridines by species of *Brettanomyces* and *Lactobacillus* isolated from mousy wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 37: 127-132

Kurtzman, C.P. and J.W. Fell. 1998. *The yeast: A taxonomic study*. 4<sup>th</sup> ed. Elsevier Press, Amsterdam



Zoecklein, B., K. Fugelsang, B. Gump, and F. Nury. 2001. Análisis y producción de vino. 289 – 312. Editorial Acribia, Zaragoza, España. 611p.

