

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
ESCUELA DE AGRONOMÍA

DETERMINACIÓN DE LEVADURAS *Brettanomyces spp* EN VINOS CHILENOS A TRAVÉS DE PRUEBAS MOLECULARES

Memoria para optar al Título Profesional de Ingeniero Agrónomo Mención: Enología y Vitivinicultura

GABRIELA ANDREA HUMERES VALLEJOS.

PROFESOR GUÍA Sra. Carmen Prieto D. Ingeniero Agrónomo, M. Sc.
SANTIAGO, CHILE. 2006

PROFESORES EVALUADORES Sr. Eduardo Loyola M. Ingeniero Agrónomo Enólogo, Dr. Sra.
Gladys Fernández H. Ingeniero Agrónomo, M. Sc. COLABORADOR Sr. Jaime Romero O.
Bioquímico, Dr.

..	1
AGRADECIMIENTOS .	3
RESUMEN .	5
ABSTRACT .	7
INTRODUCCIÓN .	9
MATERIALES Y MÉTODO .	13
Materiales . .	13
Lugar del estudio . .	13
Muestras de Vinos . .	13
Metodología . .	14
Muestras de Vino . .	14
Extracción de ADN .	15
Reacción de PCR y Digestión de ADN de la región 5.8S-ITS (RFLP) .	15
Análisis estadístico . .	16
RESULTADOS Y DISCUSIÓN .	17
Pruebas moleculares .	17
Extracción de ADN .	18
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para ADN extraído desde vino . .	18
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para ADN extraído desde colonias .	19
Fragmentos de Res tricción . .	21
Composición química básica de los vinos . .	28
Anhídrido sulfuroso libre y total .	30
pH y acidez total .	30
Acidez volátil .	31
Azúcar residual .	31
Grado alcohólico .	32

Análisis Discriminante .	32
CONCLUSIONES . .	37
BIBLIOGRAFÍA .	39
ANEXOS .	43
Protocolo de Extracción DNA de levaduras .	43

A mis padres

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a mi profesora guía, Sra. Carmen Prieto, por la paciencia, confianza y el gran apoyo brindado para la realización de esta investigación.

Agradezco a mis profesores evaluadores, Sr. Eduardo Loyola y Sra. Gladys Fernández, por el tiempo dedicado a esta tesis y por sus valiosas sugerencias brindadas.

Quiero agradecer al Sr. Jaime Romero del Laboratorio de Biotecnología del INTA, por su amistad, sus conocimientos y tiempo entregados.

Quiero agradecer a Rosita Figueroa por su constante apoyo, disposición y amistad en el trabajo de laboratorio.

A todos aquellos amigos que hice durante estos años de universidad, que de una u otra forma me dieron su apoyo y colaboración durante el transcurso de esta memoria.

Finalmente y en forma muy especial quiero agradecer a mis padres, por la formación y apoyo entregados a lo largo de todos estos años. A mi hermana y familia por haber estado siempre presentes en todo momento. A mi esposo, por su incondicional cariño, apoyo y eterna paciencia, pues sin ellos hubiera sido difícil terminar esta tesis.

RESUMEN

Brettanomyces es considerado un agente de deterioro importante, encontrado en diferentes vinos de distintas zonas geográficas del mundo.

Los objetivos del presente trabajo consistieron en determinar la presencia de levaduras *Brettanomyces* en vinos chilenos con carácter “Brett”, a través de métodos moleculares como PCR y RFLP, además de establecer una relación entre las características químicas de los vinos y la presencia de dicha levadura.

Para esto, se analizaron veintidós muestras de vinos provenientes de dieciséis viñas diferentes, las cuales evidenciaban un notable deterioro debido a la presencia de aromas generalmente atribuidos por los enólogos a la actividad de levaduras del género *Brettanomyces spp.*.

Las muestras de vino fueron sembradas en placas con medio selectivo para *Brettanomyces spp.*, con el subsiguiente desarrollo de colonias en dieciséis de las veintidós muestras. De estas colonias se extrajo ADN para realizar una caracterización molecular de las levaduras obtenidas, la que consistió en la amplificación por PCR de la región 5.8S-ITS del rRNA y la subsiguiente digestión de los amplificados utilizando dos enzimas de restricción *HaeIII* y *HinfI*. La correspondiente identificación de los perfiles obtenidos se realizó utilizando cepas conocidas de *Brettanomyces spp.* y la clasificación de especies de Esteve-Zarzoso *et al.*, (1999).

A través de la aplicación de estos métodos moleculares, fue posible la identificación del género *Brettanomyces spp.* en el 45,5% de las muestras analizadas. Identificándose la presencia de *Brettanomyces bruxellensis*. En esta especie se observó un tipo de polimorfismo presente en el 50% de las muestras, fenómeno que puede ser atribuido a mutaciones. Además fue posible identificar levaduras del género *Candida spp.*, no siendo posible la determinación de la especie.

Por otro lado, se llevaron a cabo los análisis químicos básicos para cada muestra evaluada resultados que fueron utilizados para llevar a cabo un análisis multivariante de tipo discriminante, con el cual fue posible la agrupación de las muestras de vino en relación a las especies del género *Brettanomyces spp.* encontradas.

Por los resultados obtenidos se puede concluir que existe evidencia de levaduras *Brettanomyces spp.* en vinos chilenos con carácter “Brett”, confirmándose que la técnica de PCR es una herramienta rápida para su correcta identificación, permitiendo distinguir entre levaduras de diferente géneros o de diferentes especies del género *Brettanomyces spp.*

Palabras clave: PCR-RFLP, Región 5.8S-ITS, Identificación molecular, Levaduras deteriorantes, *Brettanomyces spp.*

ABSTRACT

DETERMINATION OF *Brettanomyces spp* IN CHILEAN WINES USING MOLECULAR METHODS.

The aims of this work were to determine the presence of yeasts *Brettanomyces* in Chilean wines with character "Brett", by using PCR and RFLP analysis, and to establish a relation between the chemical characteristics of the wines and the presence of this yeast.

Twenty two samples were examined including wines from 16 different wineries, which were presenting aromas typical of the activity *Brettanomyces*.

Samples were plated in selective medium and 16 rendered colonies. For the molecular characterization of yeasts restriction patterns using *HaeIII* and *HinfI* were generated from the region spanning the internal transcribed spacers (ITS1 and ITS4) and the 5.8S rRNA gene. The identification was realized according to the classification of species of Esteve-Zarzoso *et al.*, (1999).

Forty five percent of the samples were identified as *Brettanomyces bruxellensis* and twenty seven percent were identified as *Candida spp*.

Discriminant analysis applied to chemical basic analysis for every sample, grouped the samples of wine in relation to the species that were found.

We conclude that the use of this molecular approach is very useful as a new rapid and easy method of routine yeast identification. It provide evidence for the occurrence of *Brettanomyces spp*. in Chilean wines with character "Brett".

Key words: PCR-RFLP, 5.8S-ITS region, Molecular identification, Spoilage yeast, *Brettanomyces spp*.

INTRODUCCIÓN

Brettanomyces ha sido identificada como una levadura deteriorante en todas las áreas de producción de vino en el mundo (Heresztyn, 1986), aun así se discute si su actividad debiera de considerarse como positiva, negativa o indiferente, ya que mucho de lo que se conoce o cree sobre ella se basa en los cambios sensoriales que se detectan en el vino (Fugelsang, 1997).

Brettanomyces spp. presenta una forma esporulada (perfecta) que se denomina *Dekkera spp.* (Ibeas *et al.*, 1996; Fugelsang, 1997 y Alguacil, 2001), estas se diferencian en la producción de ascosporas (Zoecklein *et al.*, 1995). Estos géneros fueron inicialmente descritos por Claussen en 1903 en la producción de cerveza (Gilliland, 1961, citado por Lonvaud-Funel *et al.*, 2004).

Van der Walt (1970) describió siete especies de *Brettanomyces spp.* y dos especies de *Dekkera spp.* Posteriormente Van der Walt (1984, citado por Fugelsang, 1997), amplió *Brettanomyces* para incluir nueve especies, mientras que el género *Dekkera* permaneció sin cambiar.

Sus células vegetativas se describen como de forma ojival, aunque esto es más frecuente de encontrar en poblaciones viejas (Zoecklein *et al.*, 1995). La forma de la célula cumple un rol muy importante en la identificación, aunque depende de la edad, medio de cultivo y estrés medioambiental (Degré *et al.*, 1989 y Fugelsang, 1997).

Brettanomyces y *Dekkera* son de lento crecimiento, pudiendo pasar desapercibida hasta que el vino esté fuertemente afectado (Zoecklein *et al.*, 1995). *Brettanomyces spp.*

en vino en barricas siguen un patrón de crecimiento acampanado, alcanzando una máxima densidad de población 5-7 meses luego de la vinificación (Fugelsang, 1997 y Chatonnet, 1995 citado por Cocolin *et al.*, 2003).

Son muchos los descriptores que se han utilizado para caracterizar el aroma que *Brettanomyces/Dekkera* produce en los vinos, pues en cierto momento la contaminación de esta levadura puede ser descrita como aroma a especie, animal o medicinal, mientras que en otro, la actividad de esta levadura genera aromas que recuerdan a roedores (Fugelsang, 1997). Los fenoles son los componentes que dan este carácter a los vinos, de los cuales los etilfenoles otorgan el olor fenólico animal, como olor a corral y establo a altas concentraciones, mientras que el vinilfenol puede ser responsable de fuertes olores farmacéuticos (Chatonnet *et al.*, 1995).

Por esta razón se debe ser riguroso en validar la evaluación sensorial con pruebas de laboratorio que aseguren la existencia de esta levadura. Por ejemplo el olor a ratón se usa para describir la actividad de *Brettanomyces spp.*, pero este tipo de aroma también se produce por el desarrollo de bacterias lácticas heterofermentativas (Craig y Heresztyn, 1984).

El contenido de etilfenol y la intensidad del carácter fenólico en el vino producido por *Brettanomyces/Dekkera* son directamente proporcionales a las poblaciones viables de las mismas (Chatonnet *et al.*, 1995).

El defecto “Brett” puede aparecer en el vino en distintas etapas de su producción y del proceso de crianza. Sin embargo, en general, este tipo de alteración ocurre durante la crianza antes del embotellado, especialmente cuando los vinos son mantenidos en barricas, sobre todo de maderas viejas raramente o nunca aseadas (Chatonnet *et al.*, 1995 y Olsen, 2001).

Como la mayoría de las especies de levaduras no pueden ser distinguidas e identificadas por métodos microbiológicos clásicos, se han utilizado técnicas moleculares (Querol y Ramón, 1996). En los últimos años, se han realizado muchos estudios describiendo la aplicación de herramientas de biología molecular para la diferenciación y caracterización de levaduras usadas en la fermentación industrial (Esteve-Zarzoso *et al.*, 1999). Siendo una de las técnicas más utilizadas para este propósito, la reacción en cadena de la polimerasa (conocida como PCR, por sus siglas en inglés, “Polymerase Chain Reaction”) (Mesas y Alegre, 1999).

Esta metodología fue desarrollada por el químico Kary B. Mullis en 1985 (Satz y Kornblihtt, 1993), la cual puede amplificar un segmento de ADN en un billón de copias idénticas (Nelson y Cox, 2004). Una vez amplificado dicho ADN puede ser analizado mediante electroforesis en gel de agarosa (Mesas y Alegre, 1999).

La amplificación por PCR permite la detección específica de secuencias de ADN y así posibilita la detección de microorganismos contaminantes (Ibeas *et al.*, 1996). Consta de tres grandes pasos básicos, los cuales son: desnaturalización, apareamiento y extensión (Luque y Herráez, 2001). Estos constituyen un ciclo, y son repetidos por 30 o 40 veces y dan como resultado la copia de una porción de la molécula de ADN de doble cadena para producir dos cadenas ADN hijas (Auger, 2002). Luego de dos ciclos habrá 4 copias, etc., siendo este un aumento exponencial del número de copias. Esto se realiza

en un termociclador automatizado, que puede calentar y enfriar los tubos con la mezcla de la reacción en un tiempo muy corto (Vierstraete, 1999). De acuerdo a esto, unos pocos nanogramos de ADN pueden ser amplificados millones de veces en un ensayo con PCR (Auger, 2002).

Esteve-Zarzoso *et al.*, (1999) señalan que la aplicación de técnicas de biología molecular, en especial la PCR, es un método rápido y fácil para la identificación de levaduras vínicas, ya que mediante esta técnica se logró la identificación 132 especies de levaduras pertenecientes a 25 géneros diferentes.

Con este propósito la presente investigación se basa en la hipótesis que el carácter “Brett” en los vinos chilenos se debe a la presencia de levaduras del género *Brettanomyces spp.*

La existencia de un indicador confiable sobre la presencia de levaduras *Brettanomyces spp.* en la bodega, permitirá comprobar si la evaluación sensorial realmente refleja la presencia de la levadura en el vino, por lo que en la presente investigación se plantean como objetivos:

- Determinar la presencia de levaduras *Brettanomyces* en vinos chilenos con carácter “Brett”, a través de la aplicación de la técnica PCR (reacción en cadena de la polimerasa) y RFLP (fragmentos de restricción de longitud polimórfica).
- Establecer la relación entre las características químicas de los vinos y la presencia de *Brettanomyces*.

MATERIALES Y MÉTODO

Materiales

Lugar del estudio

El trabajo de investigación se realizó en los laboratorios de Enología y Microbiología del Departamento de Agroindustria y Enología de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Chile y en el laboratorio de Biotecnología del Campus Sur, Mecesup en dependencias del Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos (INTA), Universidad de Chile.

Muestras de Vinos

Veintidós muestras de vinos con carácter “Brett” fueron obtenidas de dieciséis viñas diferentes.

Se utilizó un medio de cultivo señalado por la literatura como adecuado para lograr el desarrollo de *Brettanomyces spp.* Este correspondió a agar carbonato de calcio descrito por la A.T.C.C. (American Type Culture Collection, 1998), que en su formulación consta

DETERMINACIÓN DE LEVADURAS *Brettanomyces* spp EN VINOS CHILENOS A TRAVÉS DE PRUEBAS MOLECULARES

de glucosa (1%), extracto de levadura (1%), peptona (1%), carbonato de calcio (2%) y agar (2%) (Catalán, 2003 y Martínez, 2002).

Se incorporó al medio de cultivo el antibiótico cicloheximida en una dosis de 50 mg/L, el cual fue incluido como un inhibidor selectivo, que impide el crecimiento de organismos numéricamente superior como es *Saccharomyces* (sensible a cicloheximida) (Ibeas *et al.*, 1996). Junto a bifenil en donde se agregaron 5 mL para una preparación de 500 mL de medio de cultivo.

En la técnica de PCR se utilizaron: “primers” o partidores que son secuencias específicas complementarias que se añaden a la reacción y que amplifican en forma selectiva una secuencia usándose “primers” ITS1 y ITS4 (espaciadores transcritos internos) (Esteve-Zarzoso *et al.*, 1999); la enzima Taq ADN polimerasa, la cual es termoestable; nucleótidos; endonucleasas de restricción *HaeIII* y *HinfI* y otros materiales necesarios para realizar PCR.

Se utilizaron geles de agarosa 1% para observar la presencia de ADN y minigeles de acrilamida al 8% para ver amplificados y los fragmentos de las digestiones. La fotografía se visualizó mediante la tinción con bromuro de etidio para el caso de los geles de agarosa, y con tinción mediante nitrato de plata (AgNO_3) para geles de acrilamida (Romero *et al.*, 2002).

Metodología

Muestras de Vino

Se recolectaron veintidós muestras (1500 mL) las cuales fueron obtenidas de dieciséis bodegas de vino diferentes, los cuales presentaban evidente presencia sensorial de *Brettanomyces*, carácter que fue evaluado por el enólogo de cada bodega, mediante la detección de aromas típicos a sudor de caballo, lana mojada, moho, medicinal, ratón, etc.

La caracterización enológica de los vinos muestreados se realizó mediante los análisis químicos básicos que se detallan en el cuadro 1.

Cuadro 1. Análisis químicos de los vinos con carácter “Brett”.

Análisis	Unidad	Método
Acidez total	g ácido sulfúrico/L	Titulación con NaOH 0,1N
Grado alcohólico	° G.L.	Densimétrico
Azúcares reductores	g/L	Fehling
Acidez volátil	g ácido acético/L	Blarez
SO ₂ libre (SO ₂ _L)	mg/L	Ripper
SO ₂ total (SO ₂ _T)	mg/L	Ripper doble
pH		Potenciométrico
Fuente: Bordeu y Scarpa (2000)		

Siembra en placas: Se realizaron dos tipos de siembras:

- Siembra por extensión: donde se dispusieron 0,1mL de vino muestra sobre el medio de cultivo.
- Siembra por filtración: se filtraron 50 mL de vino muestra a través de una membrana de nitrocelulosa estéril de 0,45 μm de porosidad. Esta membrana se depositó sobre el medio de cultivo.

Todas las placas de petri sembradas fueron incubadas en una estufa de cultivo (Memmert, alemana) a una temperatura de 24-26°C para favorecer el desarrollo de colonias, por alrededor de 6 a 10 días.

De las placas obtenidas se seleccionaron las que presentaba colonias aisladas, se escogió una colonia de cada muestra de vino, según morfología.

Extracción de ADN

Se extrajo ADN directamente de las colonias obtenidas de las placas. Usando un protocolo

de extracción, el cual consistió en la centrifugación (Eppendorf, 5804 R, Estados Unidos) de la colonia suspendida en agua destilada (200 μl) por 2 min. a 10.000 rpm. Se añadió solución Tampón 1 (sorbitol 0,9 M, EDTA 0,1 M, pH 7,5), además de una solución de zymoliasa 60000 (1,5 mg en 1300 μl de T1), se incubó la muestra a 37° C por 20 min. en baño termoregulado, se agregó la solución Tampón 2 (Tris 50 mM pH 7,4, EDTA 20mM), y 13 μl de dodecilsulfato de sodio (SDS)10%, se incubó a 65° C por 5 min., se agregó acetato de potasio 5M, se incubó en hielo 15 min. Se centrifugó y se añadió isopropanol a temperatura ambiente. Finalmente se agregó etanol 70%, para con esto lograr un “pellet” que contenga solamente ADN.

Además el protocolo desarrollado fue también utilizado para obtener ADN directamente de la muestra de vino sospechosa, con una previa centrifugación a 10.000 rpm por 2 minutos.

Reacción de PCR y Digestión de ADN de la región 5.8S-ITS (RFLP)

Para la identificación de levaduras mediante la técnica de PCR, se usó el análisis del gen 5.8S rRNA y sus regiones espaciadoras transcritas internas, comúnmente llamado como 5.8S-ITS (Esteve-Zarzoso *et al.*, 1999). La amplificación de este fragmento y su posterior digestión con enzimas de restricción generó perfiles (RFLP) distinguibles que permitieron identificar diferentes especies de levaduras según reportó Esteve-Zarzoso *et al.*, 1999.

El ADN obtenido desde las colonias fue suspendido en 40 μl de una mezcla de reacción de PCR (reacción “mix”) que contenía agua, 0,3 μl de enzima Taq polimerasa (Bioaxis, Chile), buffer de la enzima 10X, magnesio (1,5 mM de MgCl_2), nucleótidos (10 μM) y primers (0,5 μM). Las secuencias de los primers (ITS1:

5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3' y ITS4: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') estaban basadas en la región del ADN que codifica para el ARN ribosómico 5.8S y amplifican así específicamente una región del ADN de las levaduras.

La suspensión fue llevada a un termociclador (Thermo, **Px2, Estados Unidos**) , donde las condiciones de PCR fueron las siguientes: desnaturalización inicial 5 minutos a 95°C, desnaturalización de 1 minuto a 94°C, apareamiento de 55,5°C por 2 minutos y extensión a 72°C por 2 minutos, extensión final de 10 minutos a 72°C.

Una cantidad de 5µl del producto amplificado fue digerido con las endonucleasas de restricción *HaeIII* y *HinfI* (Bioaxis, Chile), incubando la preparación durante 4 horas a 37°C. En cada una, se conocía la secuencia de corte específica de nucleótidos.

El producto amplificado y los fragmentos de restricción se observaron a través de electroforesis en minigel de acrilamida al 8% (1,5 mm de espesor), respectivamente con buffer (TBE 1x) (Romero *et al.*, 2002). Los tamaños de las bandas fueron estimados mediante la comparación de la migración electroforética de cada fragmento de restricción con la migración de un ADN estándar con un rango de tamaño de 100-1500pb (100 pb ladder).

Los productos amplificados y de los fragmentos de digestión fueron separados durante 35 minutos a 150 volts y 60 minutos a 150 volts respectivamente utilizando una fuente de poder (Polyscience 500, Estados Unidos).

Luego de la electroforesis los geles fueron teñidos y fotografiados.

Análisis estadístico

Este análisis busca encontrar una o varias funciones discriminantes, derivadas por combinación lineal de las variables originales, que permitan separar los grupos si es que son realmente diferentes, según las variables estudiadas (Salgado, 2003).

Si se obtiene más de una función discriminante, es posible representar los coeficientes que adquiere cada muestra frente a esas funciones discriminantes y observar gráficamente los distintos grupos. Si la distancia entre dos observaciones o muestras aparecen muy cercanos en la representación, significa que tienen un comportamiento parecido en las variables originales que dan lugar a las funciones discriminantes.

Se realizó un análisis discriminante sobre todas las muestras, cuyo objetivo fue determinar si los grupos establecidos dentro de un conjunto de datos (variables químicas básicas de las muestras de vinos con carácter "Brett") son estadísticamente diferentes, de acuerdo a las variables estudiadas (resultados de pruebas moleculares), que son las que definen esos datos.

El análisis estadístico se llevo a cabo con el programa Statgraphics Plus Versión 5.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El trabajo se discute de acuerdo a tres partes principales: resultados de pruebas moleculares basado en el análisis del tamaño del amplificado y análisis de restricción del ARN ribosomal, resultados de la composición química básica de los vinos muestreados y análisis estadístico a través de análisis multivariante de tipo discriminante.

Pruebas moleculares

Veintidós muestras de vino sospechosas de estar deterioradas por *Brettanomyces spp.* fueron sembradas en medio de cultivo carbonato de calcio, de las cuales dieciséis desarrollaron colonias bajo las condiciones proporcionadas. El detalle del crecimiento de colonias de las respectivas muestras de vinos, se detallan en el cuadro 2.

Cuadro 2. Detalle del crecimiento de colonias para cada vino con carácter “Brett”.

Muestras de Vino	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
Con Crecimiento			*	*	*		*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*		*		
Sin Crecimiento	*	*				*													*		*	*

Junto a estas muestras con carácter “Brett” fueron incluidas dos muestras bajo el concepto de control, es decir, se incluyó una siembra de *Saccharomyces cerevisiae*(Sc) y una de *Brettanomyces bruxellensis* (Bt) obtenidas de CECT (Colección Española de Cepas Tipo), con el objetivo de comparar los resultados.

Las seis muestras restantes no exhibieron crecimiento en placa. Esto podría ser explicado de varias maneras. Una de ellas es la no presencia de células de levaduras *Brettanomyces* en las muestras de vinos o que estas se encuentren muertas. Otra posibilidad es que según Millet y Lonvaud-Funel (2000) quienes describen la existencia de células no capaces de producir colonias, definiéndolas como VBNC (viables pero no cultivables), este estado se produciría por el proceso de sulfitación o por la privación de oxígeno, recuperándose la condición viable y cultivable cuando las condiciones se reponen. Estos autores además demostraron que células de *Brettanomyces spp.* en este estado pueden presentar tamaños celulares heterogéneos, otorgándoles la posibilidad de pasar a través de membranas de filtración de 0,45 μm . Esto revelaría el porque de la ausencia de colonias de levaduras al momento de sembrar directamente 0,1 mL de vino muestra y además la ausencia en la incubación de la membrana de filtración en el medio de cultivo.

Extracción de ADN

El ADN de las muestras sospechosas se obtuvo desde colonias desarrolladas y directamente desde los vinos como se indicó en Materiales y Métodos.

Ibeas *et al.*, (1996) señala que estos microorganismos crecen muy lentamente en medio de cultivo corrientes, y el rápido crecimiento de otras levaduras hacen que la etapa de aislamiento sea difícil. Por lo que al incluir el antibiótico cicloheximida el trabajo de obtener colonias aisladas es menos laborioso, todo esto acompañado de un medio selectivo, favorecedor de *Brettanomyces spp.*

La extracción de ADN desde colonias fue fácil utilizando el protocolo señalado, otorgando siempre un “pellet” limpio para ser utilizado en la técnica de PCR. No así en la extracción de ADN directamente desde muestras de vino, en donde los “pellets” obtenidos siempre fueron de color rosado o café claro, lo que indicaría según Cocolin *et al.*, (2003) que la pureza de los ácidos nucleicos obtenidos era pobre.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para ADN extraído desde vino

Los resultados del PCR para el caso de ADN extraído directamente desde vino fueron infructuosos, esto se explica debido a la posible presencia de sustancias inhibitorias que estarían presentes en la preparación de ácidos nucleicos y que no fueron completamente removidos con el protocolo específico de extracción. Estas sustancias interfirieron con la etapa de amplificación, inhibiendo la acción de la enzima ADN polimerasa (Taq) por la presencia de componentes del vino, como son polisacáridos y polifenoles (Cocolin *et al.*,

2003).

Otros autores han informado una diferencia sustancial en el límite de detección para células de *Brettanomyces/Dekkera* cuando la técnica PCR fue realizada con DNA extraído directamente desde vino (Ibeas *et al.*, 1996). Lonvaud-Funel y Delaherche (2004) declaran que la detección límite en vino fue de 10^4 CFU/mL para *B. bruxellensis* para PCR en tiempo real ("real time PCR"). En cambio Ibeas *et al.* (1996) detectó *Dekkera/Brettanomyces* en vinos deteriorados por "nested PCR" solamente cuando las poblaciones fueron más altas que 10^4 CFU/mL.

Basado en lo anterior, sería recomendable realizar la extracción de ADN directa desde vino utilizando mayores volúmenes de vinos sospechosos con el fin de poder coleccionar más células y procesarlas según el protocolo específico, ya que es de sospechar que la cantidad de unidades formadoras de colonias de *Brettanomyces spp.* en el vino sean menores que 10^4 UFC/mL.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para ADN extraído desde colonias

Los primers ITS1 y ITS4 fueron usados para amplificar la región 5.8S-ITS que fue previamente descrita por Esteve-Zarzoso *et al.*, (1999).

Se utilizaron controles negativos en cada reacción para testear la presencia de contaminación en los reactivos y de esta manera poder hacer más confiables los resultados.

Los amplificadores se obtuvieron con el uso de ADN extraído de dieciséis colonias provenientes de los vinos sospechosos y desde controles positivos (colonias conocidas de *Saccharomyces cerevisiae* y *Brettanomyces bruxellensis*), los resultados se muestran en las figuras 1 y 2.

DETERMINACIÓN DE LEVADURAS *Brettanomyces* spp EN VINOS CHILENOS A TRAVÉS DE PRUEBAS MOLECULARES

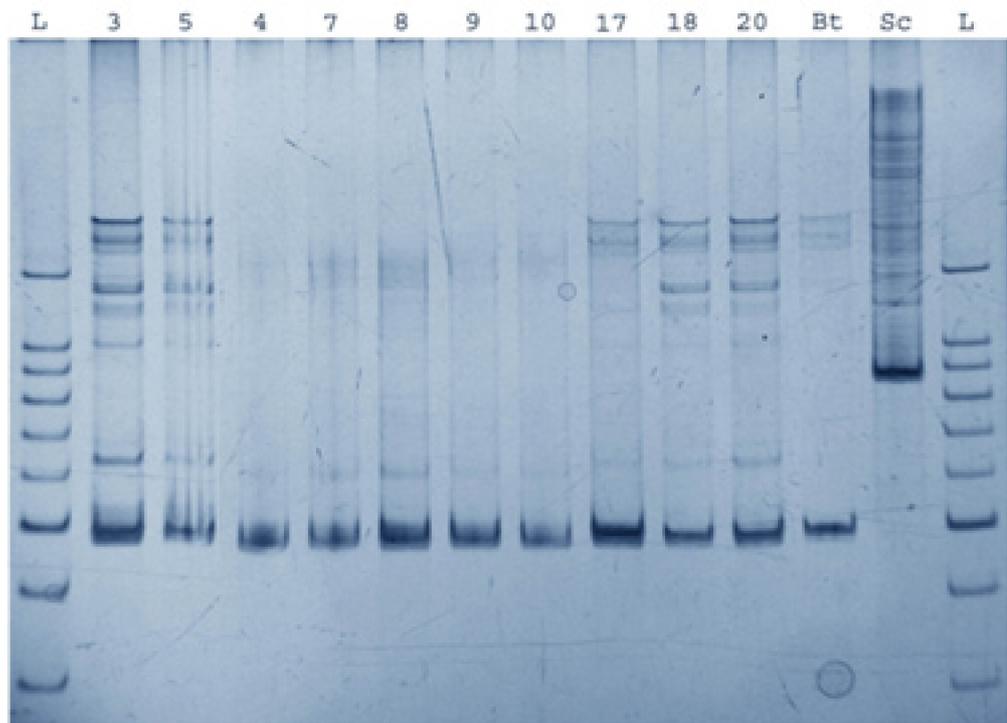


Figura 1. Electroforesis en minigel de poliacrilamida (8%) de los amplificados por PCR de la región 5.8S-ITS del ADN extraído de las colonias aisladas (Carriles: 3, 5, 4, 7, 8, 9, 10, 17, 18, 20). Carril L: marcador de peso molecular 100 pb (1500, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300). Carril Bt: *Brettanomyces bruxellensis*. Carril Sc: *Saccharomyces cerevisiae*.

En la figura 1, se puede observar que todos los tamaños de los productos de amplificación de las muestras analizadas, desde el carril 3 al 20, presentaron similar migración de bandas, coincidiendo con el amplificado de *Brettanomyces bruxellensis* (Esteve-Zarzoso *et al.*, 1999). El tamaño de estos amplificados es de aproximadamente de 485 pb. Destacándose la

diferencia con el amplificado proveniente de *Saccharomyces cerevisiae*, cuyo tamaño es de alrededor de 880 pb.

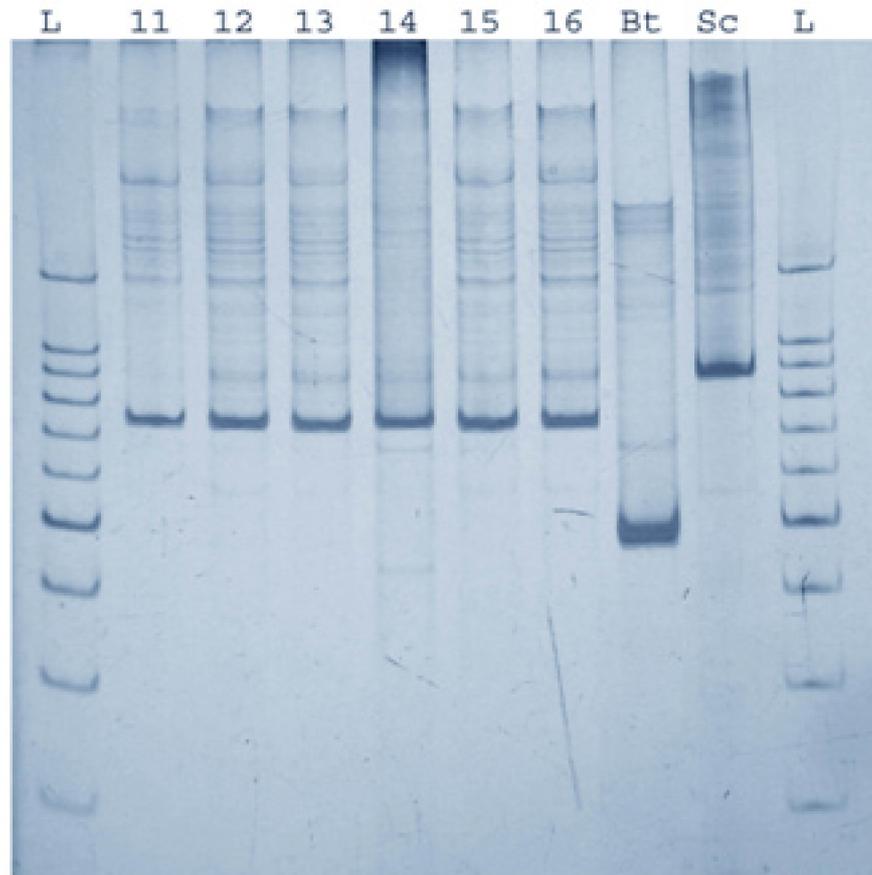


Figura 2. Electroforesis en gel de poliacrilamida (8%) de los amplificadores por PCR de la región 5.8S-ITS del DNA extraído de las colonias aisladas (Carriles: 11, 12, 13, 14, 15, 16). Carril L: marcador de peso molecular 100 pb (1500, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200). Carril Bt: *Brettanomyces bruxellensis*. Carril Sc: *Saccharomyces cerevisiae*.

En la figura 2, se puede apreciar que se repite el mismo parámetro de la figura 1, todos los amplificadores del ADN de las muestras de vino migran a una distancia similar, pero en este caso la longitud de las bandas para los carriles 11 al 16 son cercanas a 750 pb, no concordando con el tamaño del amplificador desarrollado para *Brettanomyces bruxellensis* (485 pb), ni para *Saccharomyces cerevisiae* (880 pb), lo que presume que correspondería a otro género o a otra especie de levadura.

Fragmentos de Restricción

Para la identificación de levaduras, los amplificadores fueron digeridos con dos enzimas de restricción (*HaeIII* y *HinfI*). En algunos casos el uso de estas fue clave para discriminar entre especies.

Los resultados de los perfiles de restricción mediante el uso de la endonucleasa

HaeIII se muestran en las figuras 3 y 4.

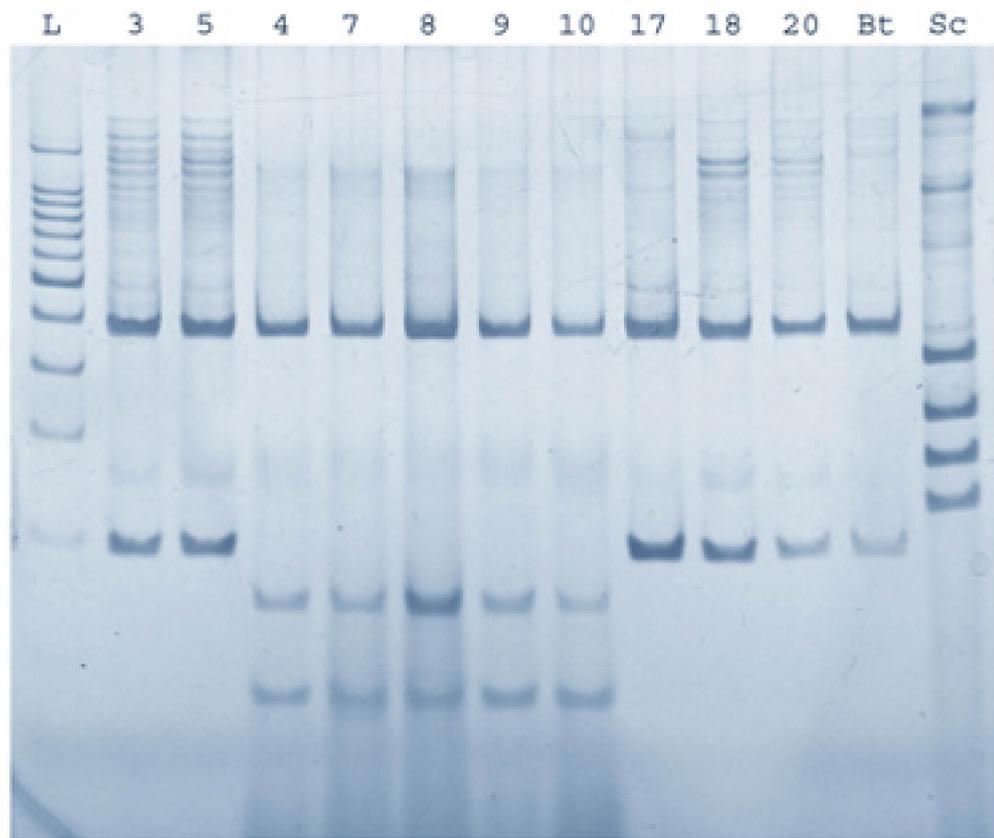


Figura 3. Perfil de restricción de los amplificadores de la región 5.8S-ITS digeridos con *HaeIII*. Carril L: marcador de peso molecular 100 pb (1500, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100). Carril Bt: *Brettanomyces bruxellensis*. Carril Sc: *Saccharomyces cerevisiae*.

En la mayoría de los casos, los tamaños de los perfiles de restricción obtenidos con la endonucleasa *HaeIII* fueron semejantes. *Saccharomyces cerevisiae* desarrolló 4 bandas de 320, 230, 180 y 150 pb aproximadamente. *Brettanomyces bruxellensis* presento un perfil compuesto por fragmentos de 375 y de 95 pb aproximadamente, bandas de iguales dimensiones se expresaron para las muestras 3, 5, 17, 18 y 20 lo que daría un primer indicio que corresponderían a la misma especie de levadura. Las diferentes especies de levaduras difieren en la posición de los sitios de reconocimiento de las enzimas de restricción, lo cual genera perfiles diferentes que permiten su diferenciación y determinación.

Para el caso de las muestras 4, 7, 8, 9 y 10 se visualizan 3 bandas, la primera banda corresponde aproximadamente a 375 pb la cual coincide en migración con el perfil de *Brettanomyces bruxellensis*. Las otras dos bandas restantes migran a la zona bajo 100 pb. El tamaño estimado para estas dos bandas es de 75 y 20 pb respectivamente, que sumados corresponderían a la segunda banda del perfil de *Brettanomyces bruxellensis*.

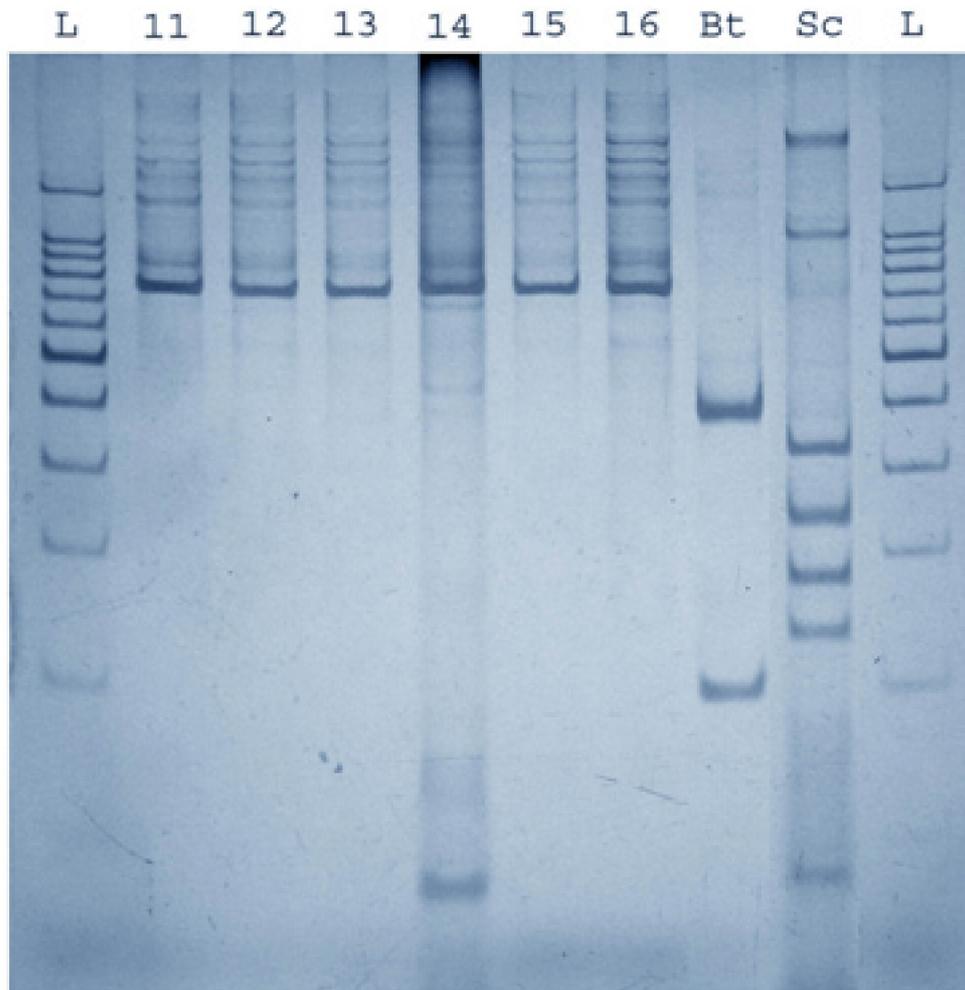


Figura 4. Perfil de restricción de los amplificadores de la región 5.8S-ITS digeridos con *HaeIII*. Carril L: marcador de peso molecular 100 pb (1500, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100).

Los carriles 11 al 16, muestra un único fragmento cercano a 750 pb, que es semejante al tamaño del amplificado de las muestras.

Como explica Luque y Herráez (2001), cada enzima de restricción reconoce una secuencia específica de corte, y en el caso de los carriles 11-16 no se observa el corte, se asume que esa secuencia no se encontraba presente en el amplificado, quedando intacto. De este modo, en estos casos, el uso de la enzima *HaeIII* no es resolutivo para determinar la especie, lo que hace imprescindible el uso de la enzima *Hinfl*.

Los resultados de los perfiles de restricción mediante el uso de la endonucleasas *Hinfl* se muestran en las figuras 5 y 6.

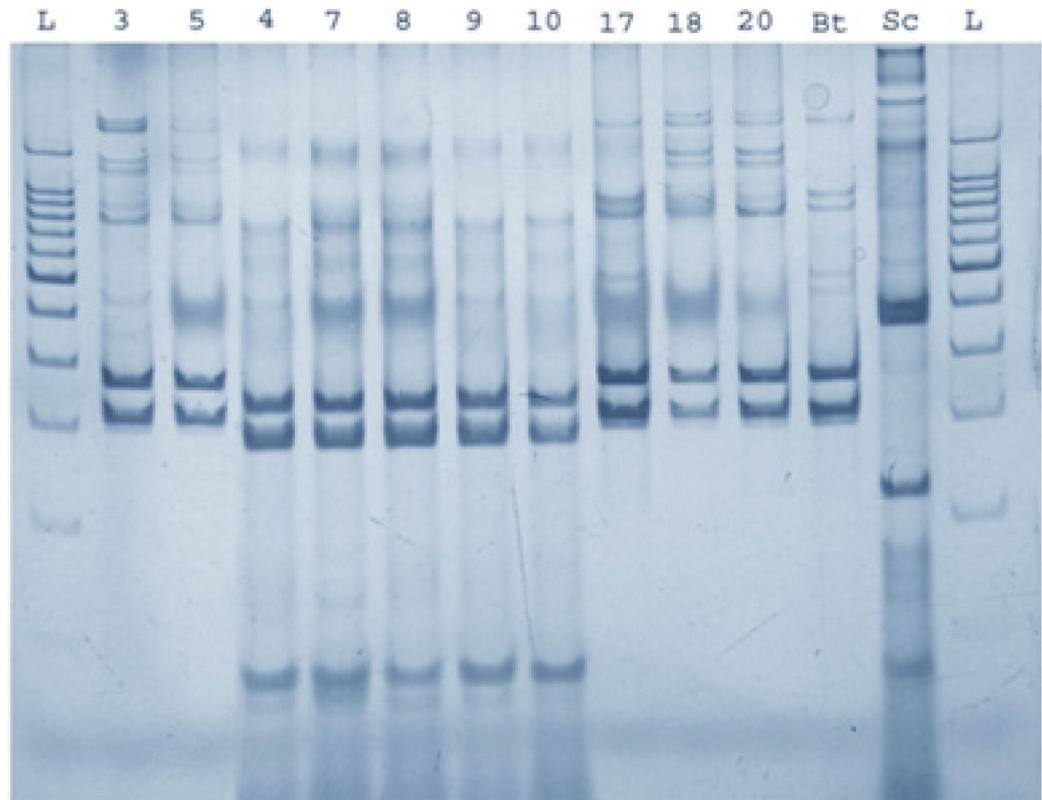


Figura 5. Perfil de restricción de los amplificadores de la región 5.8S-ITS digeridos con *HinfI*. Carril L: marcador de peso molecular 100 pb (1500, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100).

Con el uso de la endonucleasa *HinfI* se puede observar que para el caso de *Saccharomyces cerevisiae* corta en tres sectores, generando 4 bandas las cuales son de 365, 360, 155 y 35 pb aproximadamente. En el carril de *Brettanomyces bruxellensis* los fragmentos son de 270 y 215 pb. En tanto que las muestras 3, 5, 17, 18 y 20 presentaron bandas similares lo que apuntaría a concluir que son la misma especie de levadura.

En el caso de las muestras 4, 7, 8, 9 y 10, se visualizan tres bandas resultantes del corte de la enzima, las que tienen un largo de fragmentos de aproximadamente 255, 195 y una banda pequeña bajo las 100 pb (35 pb).

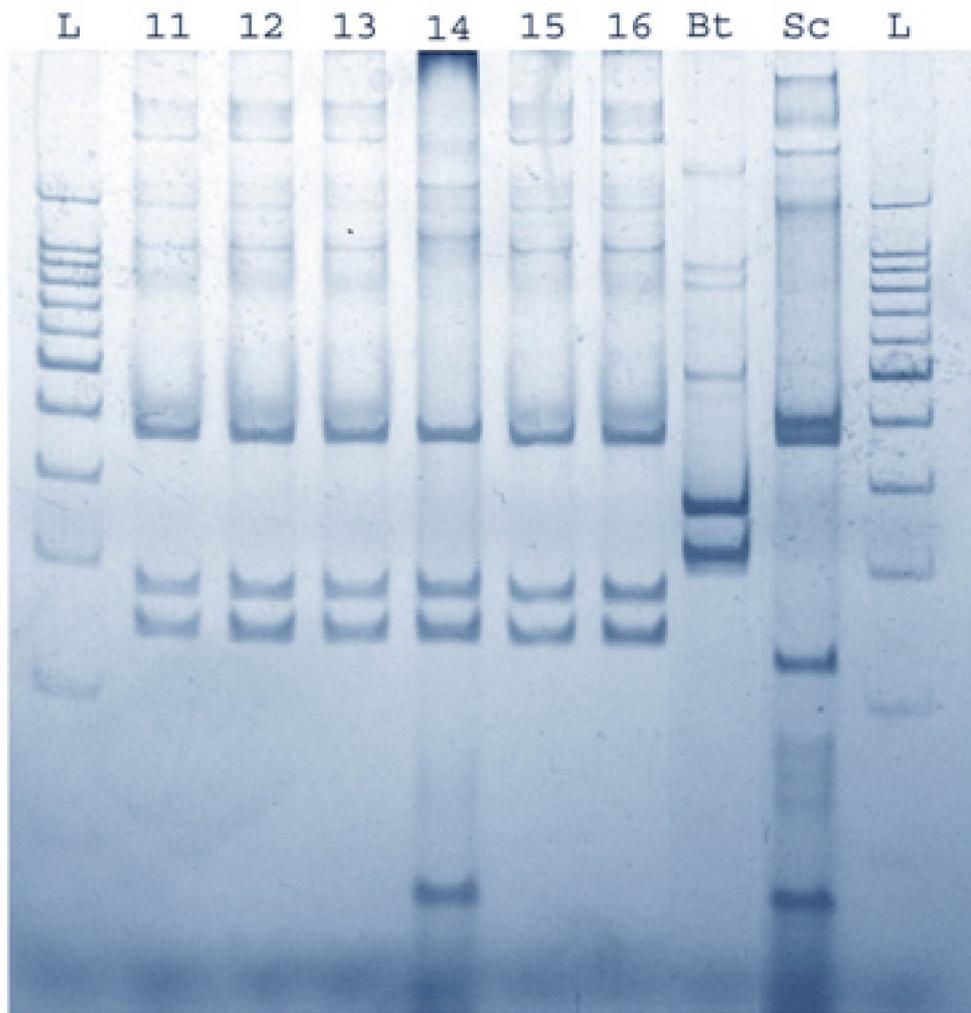


Figura 6. Perfil de restricción de los amplificadores de la región 5.8S-ITS digeridos con *Hinfl*. Carril L: marcador de peso molecular 100 pb (1500, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100).

En los carriles 11 al 16 se aprecian tres bandas, las cuales tienen unos tamaños aproximados de 360, 190 y 160, que no coinciden con el perfil de *Brettanomyces bruxellensis* ni con *Saccharomyces cerevisiae*.

Los tamaños aproximados en pb de los amplificadores y de los diferentes fragmentos de restricción obtenidos con el uso de las endonucleasas *HaeIII* y *Hinfl* se resumen en el cuadro 3.

Cuadro 3. Tamaño en pares de bases (pb) de los amplificadores y de los fragmentos de restricción obtenidos.

DETERMINACIÓN DE LEVADURAS *Brettanomyces* spp EN VINOS CHILENOS A TRAVÉS DE PRUEBAS MOLECULARES

Nº Muestra	Producto PCR	<i>HaeIII</i>	<i>Hinfl</i>
3	485	375+95	270+215
4	485	375+75+20	255+195+35
5	485	375+95	270+215
7	485	375+75+20	255+195+35
8	485	375+75+20	255+195+35
9	485	375+75+20	255+195+35
10	485	375+75+20	255+195+35
11	750	750	360+190+160
12	750	750	360+190+160
13	750	750	360+190+160
14	750	750+35	360+190+160+35
15	750	750	360+190+160
16	750	750	360+190+160
17	485	375+95	270+215
18	485	375+95	270+215
20	485	375+95	270+215
Sc	880	320+230+180+150	365+360+155+35
Bt	485	375+95	270+215

La identificación de las levaduras fue de acuerdo a la comparación del modelo obtenido en el estudio de Esteve-Zarzoso *et al.*, (1999), el cual se señala en el cuadro 4.

Cuadro 4. Productos amplificados y fragmentos de restricción *HaeIII* y *Hinfl* obtenidos por Esteve-Zarzoso *et al.*, (1999) para las especies sospechosas incluidas especies de *Brettanomyces* spp. y la especie *Saccharomyces cerevisiae*.

Especie	Producto amplificado	<i>HaeIII</i>	<i>Hinfl</i>
<i>Dekkera anomala</i>	800	800	360+190+160+80
<i>Dekkera bruxellensis</i>	485	375+95	270+215
<i>S. cerevisiae</i>	880	320+230+180+150	365+155
<i>Candida apicola</i>	750	730	390+195+160
<i>Candida boidinii</i>	750	700	390+190+160
<i>Pichia angophorae</i>	750	750	410+340

Cabe señalar que en el trabajo de Esteve-Zarzoso *et al.*, (1999) los fragmentos menores que 50 pb no pudieron ser reproduciblemente visualizados y no se incluyeron en las tablas ya que emplearon geles de agarosa de 1-3%. En cambio, para este estudio, los fragmentos pequeños pudieron ser visualizados gracias a la sensibilidad de la tinción de plata (20 veces más que bromuro de etidio) y al menor tamaño de poro de los geles de acrilamida que permitió separarlos y estimar su tamaño (Vélez, 1994).

Para lograr la identificación de las levaduras, los tamaños de los amplificados y de los fragmentos de restricción fueron comparados con las tablas obtenidas por Esteve-Zarzoso *et al.*, (1999). Los resultados se muestran en el cuadro 5.

Cuadro 5. Identificación de levaduras lograda por el tamaño de los fragmentos obtenidos por PCR y RFLP.

Muestras de vinos sospechosas	Especie de levadura
3	<i>Brettanomyces bruxellensis</i>
4	<i>Brettanomyces bruxellensis</i> (*)
5	<i>Brettanomyces bruxellensis</i>
7	<i>Brettanomyces bruxellensis</i> (*)
8	<i>Brettanomyces bruxellensis</i> (*)
9	<i>Brettanomyces bruxellensis</i> (*)
10	<i>Brettanomyces bruxellensis</i> (*)
11	<i>Candida spp.</i>
12	<i>Candida spp.</i>
13	<i>Candida spp.</i>
14	<i>Candida spp.</i>
15	<i>Candida spp.</i>
16	<i>Candida spp.</i>
17	<i>Brettanomyces bruxellensis</i>
18	<i>Brettanomyces bruxellensis</i>
20	<i>Brettanomyces bruxellensis</i>
Sc	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Bt	<i>Brettanomyces bruxellensis</i>

(*): Presencia de una banda extra o polimorfismo.

Los polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) consisten en la variación de los tamaños de fragmentos de restricción entre individuos, cepas, especies, etc. y que pueden ser originados por una mutación en un sitio de corte de la enzima. Las mutaciones, deleciones o inserciones pueden crear un nuevo sitio de restricción dentro de la región de interés, por consiguiente se detectan dos bandas más pequeñas en el gel en reemplazo de la banda original. (IPGRI y Comel University, 2003) Alternativamente estos mecanismos también pueden generar la desaparición de sitios de corte y ampliar las diferencias de los perfiles, es decir, ampliar los polimorfismos.

Es así como, el análisis de RFLP mostró coincidencia en los tamaños de los fragmentos en las muestras 3, 5, 17, 18, y 20 con la cepa control *Brettanomyces bruxellensis*, lo cual coincide a su vez con los tamaños reportados por Esteve-Zarzoso *et al.*, (1999). Esto sugiere fuertemente que estas colonias corresponden a la especie *Brettanomyces bruxellensis*.

En el caso de las muestras 4, 7, 8, 9 y 10, la coincidencia del tamaño del amplificado (485 pb) y del fragmento mayor generado por la digestión con *HaeIII*, sugiere que estas colonias están relacionadas o corresponden a *Brettanomyces bruxellensis*. La diferencia en la banda menor (95 pb) del perfil de *Brettanomyces bruxellensis*, que en estas muestras (4, 7, 8, 9 y 10) se presenta como dos bandas adicionales de 75 y 20 pb puede explicarse por la presencia de un polimorfismo generado por una mutación en estas colonias que creó un sitio de corte para *HaeIII*. Estas mismas muestras presentan un perfil no coincidente pero sin duda similar a *Brettanomyces bruxellensis* cuando se usó *Hinfl*, no obstante, esto puede explicarse debido a que mecanismos de mutación o

inserción-delección hayan provocado cambios en la región espaciadora. Todo esto daría a suponer una variación en la secuencia del ADN de *Brettanomyces bruxellensis* aisladas en Chile en comparación con otras reportadas, modificándose el sitio de anclaje para las enzimas. Se recomienda que para determinar la real existencia del polimorfismo estos productos amplificados sean secuenciados a través del proceso de secuenciación el cual permite establecer las secuencias de nucleótidos completa y su comparación en las bases de datos de genes (genbank).

En las muestras 11, 12, 13, 15 y 16 la ausencia de una banda de aproximadamente 80 pb en los fragmentos de restricción descartaría la presencia de la levadura *Brettanomyces anomala*, dándole cabida a especies del género *Candida* spp. Esto toma más fuerza si se considera el tamaño del amplificado, pues *Brettanomyces anomala* presenta un tamaño de región espaciadora de 800 pb (Esteve-Zarzoso *et al.*, 1999), en contraste con los aislados que presentan 750 pb. Esto se acerca a la sugerencia de que estos aislados corresponden a las especies *Candida apicola* o *Candida boidinii*, sin embargo, no se puede determinar certeramente cual de los dos porque los perfiles de restricción con ambas enzimas son muy coincidentes, lo cual fue reportado también por Esteve-Zarzoso *et al.*, (1999).

Cabe señalar, que según Navascués *et al.*, (2001) las levaduras del género *Candida* spp. han sido implicadas en la producción de un determinado compuesto responsable del gusto a corcho. Esto puede haber generado la confusión con vinos atacados por "Brett". Además cabe señalar que según la literatura (Wikipedia Foundation, 2006), algunas veces los compuestos responsables del aroma "Brett" han sido incorrectamente confundidos e identificados como gusto a corcho.

A través de PCR se identificó correctamente las levaduras control, Bt (*Brettanomyces bruxellensis*) y Sc (*Saccharomyces cerevisiae*). Lo que demuestra que la metodología de PCR-RFLP permite amplificar selectivamente fragmentos de ARN ribosomal y es útil para diferenciar entre diferentes géneros y especies de levaduras que forman parte del vino.

La caracterización molecular de las veintidós muestras, permitió establecer la presencia de la levadura *Brettanomyces bruxellensis* en diez de ellas y de la levadura *Candida* spp. en seis de los casos.

En cinco de los casos donde *Brettanomyces bruxellensis* fue identificada se evidenció un polimorfismo genético que puede ser atribuido a una mutación o a inserción-delección. Esto puede deberse a una adaptación para mejorar la resistencia del microorganismo a cambios en el medioambiente enológico, como procesos de sulfitación, cambios de pH, etc. dificultando aun más la lucha del enólogo contra él.

Composición química básica de los vinos

Las características enológicas de los vinos muestreados se pueden evaluar de acuerdo a los valores de los análisis químicos que se presentan en el cuadro 6.

Cuadro 6. Valores de los análisis químicos básicos de las 22 muestras de vino sospechosas.

Muestras	Análisis químicos						
	SO ₂ libre	SO ₂ total	pH	Ac. Total	A. Volátil	Az. Residual	G. Alcohol.
	(mg/L)	(mg/L)		(g acido sulfuric/L)	g acido acético/L	mg/L	°G.L.
1	19.2	44.8	3.72	3.7	0.744	2.48	13.2
2	32.0	160.0	3.62	4.4	0.948	3.65	11.8
3 (B)	19.2	28.8	3.63	3.6	0.372	2.18	13.0
4 (B)	25.6	51.2	3.54	3.4	0.588	2.02	13.4
5 (B)	44.8	51.2	3.62	3.3	0.372	2.18	13.8
6	51.2	57.6	3.55	3.7	0.672	2.37	14.1
7 (B)	25.6	32.0	3.54	3.4	0.372	2.18	12.7
8 (B)	25.6	32.0	3.46	3.5	0.444	2.04	13.4
9 (B)	19.2	32.0	3.58	4.0	1.160	2.95	13.7
10 (B)	25.6	44.8	3.59	3.4	0.552	2.52	13.3
11 (C)	25.6	38.4	3.63	3.6	0.420	3.06	15.1
12 (C)	25.6	38.4	3.73	3.3	0.432	2.40	13.4
13 (C)	25.6	35.2	3.80	3.5	0.498	1.99	13.9
14 (C)	19.2	32.0	3.77	3.1	0.498	2.22	15.2
15 (C)	25.6	38.4	3.69	3.4	0.378	2.44	14.3
16 (C)	19.2	32.0	3.70	3.6	0.330	1.58	13.3
17 (B)	16.0	32.0	3.51	3.8	0.492	2.02	14.1
18 (B)	22.4	38.4	3.71	3.5	0.534	2.39	13.4
19	25.6	32.0	3.57	3.5	0.642	2.44	14.0
20 (B)	28.8	32.0	3.72	3.2	0.762	1.79	13.4
21	16.0	38.4	3.64	3.7	0.666	3.50	13.4
22	19.2	41.6	3.53	4.0	0.594	2.96	13.9

(B): Muestra con *Brettanomyces bruxellensis*

(C): Muestra con *Candida* spp.

En el cuadro 7 se aprecian los valores correspondientes a las medias ordenadas para cada análisis a nivel de género de levadura resultante de las pruebas moleculares.

Cuadro 7. Medias de los análisis químicos ordenados de acuerdo a resultados de identificación de levaduras.

DETERMINACIÓN DE LEVADURAS *Brettanomyces spp* EN VINOS CHILENOS A TRAVÉS DE PRUEBAS MOLECULARES

Medias	<i>Candida spp.</i>	<i>Brettanomyces spp.</i>	Sin colonias	Total
SO ₂ libre	23,47	25,28	27,20	25,31
SO ₂ total	35,73	37,44	62,40	43,78
pH	3,72	3,59	3,61	3,63
Acidez total	3,42	3,51	3,83	3,57
Acidez volátil	0,43	0,57	0,71	0,57
Azúcar residual	2,29	2,23	2,90	2,43
Grado alcohólico	14,20	13,42	13,40	13,63

Anhídrido sulfuroso libre y total

Los valores medios totales de SO₂ total y libre de las veintidós muestras de vinos son respectivamente de 43,78 y 25,31 mg/L, señalando la baja concentración de anhídrido sulfuroso que presentaban las muestras. Exceptuándose la muestra 2 que destaca por tener valores de anhídrido sulfuroso total más elevados (160mg/L) en comparación al resto.

Los vinos que mostraron estar contaminados por levaduras del género *Brettanomyces spp.* presentaron niveles medios de SO₂ total de 37,44 mg/L y de SO₂ libre de 25,28 mg/l los cuales son insuficientes como para mantener controlada las poblaciones de esta levadura. Se debe tener presente que las condiciones del pH tienden a afectar la sensibilidad del efecto del anhídrido sulfuroso.

Harrop (2003), afirma que los niveles de anhídrido sulfuroso libre en conjunto con el pH del vino podrían ser perjudiciales para el crecimiento de las especies del género *Brettanomyces spp.* Es así como este pensamiento coincide con la ausencia de estas levaduras en las muestras que tiene los mayores niveles de SO₂ libre, es el caso de las muestras 6 (51,2 mg/L de SO₂ libre) y muestra 2 (160mg/l de SO₂ total). Cabe señalar, que Makewine (2002) citado por Colil (2005) indica que de esta manera se retardaría la polimeración de fenoles y la crianza del vino se haría más prolongada.

Las muestras que no desarrollaron colonias presentan valores medios de SO₂ total y libre de 62,4 y 27,2 mg/L, mayores en comparación al resto de las muestras que estaban contaminadas con *Brettanomyces spp.* y *Candida spp.*

pH y acidez total

Son valores normales de pH los que oscilan entre 2,8 y 3,7 en vino. Los valores de pH encontrados en las muestras de vino son en general superior a 3,5, siendo la media 3,63. Según Catalán (2003) existe una gran posibilidad de desarrollo de microorganismos indeseables en mostos y vinos con pH superior a 3,5 por lo cual existe una gran posibilidad de que *Brettanomyces spp.* se desarrolle sin ningún problema y también otras especies de géneros deteriorantes. Los vinos contaminados por levaduras de los géneros *Brettanomyces spp.* y *Candida spp.* presentan valores medios de pH de 3,59 y 3,72 respectivamente, lo que demuestra el alto valor de pH de los vinos muestreados, y la susceptibilidad de estos a un potencial ataque microbiológico.

Los valores medios de acidez total para *Brettanomyces spp* son de 3,51 g ácido sulfúrico/L y para *Candida spp.* de 3,41 g ácido sulfúrico/L y 3,83 g ácido sulfúrico/L para las muestras sin colonias.

Acidez volátil

Zoecklein *et al.*(1995) señala que los contenidos de ácidos volátiles al final de la fermentación producto del metabolismo de la levadura (*S. cerevisiae*) pueden variar de 0,2 a 0,4 g/L de ácido acético, cuando los valores sobrepasan los 0,7-0,8 g/L es un índice de una alteración microbiológica perjudicial. Los valores obtenidos en ciertos casos evidencian valores de acidez volátil sobre lo normal y muy cercanos a índices que se asocian a una alteración microbiológica importante como para afectar la calidad del vino, especialmente en el caso de la muestra N° 2, la cual presenta valores de 0,948 g/L de ácido acético. Aunque Zoecklein *et al.*, (1995) y Fugelsang (1997) señalan que las especies del género *Brettanomyces spp.* poseen una fuerte capacidad de producir ácido acético, siendo una herramienta importante para poder identificarlas y clasificarlas, esta muestra no desarrolló colonias. De esta manera se puede atribuir la alta cantidad de ácido acético a bacterias acéticas que pueden contaminar vinos produciendo ácido acético a través de la oxidación del etanol otorgando el carácter de avinagrado (Flanzy, 2000). De esta manera se puede insinuar, al presentar altos niveles de anhídrido sulfuroso y alta acidez volátil, que este vino fue atacado por bacterias acéticas y fue sulfitado para frenar este ataque. Aunque también se puede presumir que este vino sufrió un ataque de levaduras *Brettanomyces spp.* las cuales murieron frente a la fuerte aplicación de anhídrido sulfuroso.

Paralelo a esto, la muestra 9, contiene altos niveles de acidez volátil (1,16 g/L de ácido acético) y desarrollo colonias que correspondían a *Brettanomyces bruxellensis*, por lo que se sospecharía que los altos niveles de ácido acético se deberían al poder acetificante de *Brettanomyces spp.*

Por el contrario, las muestras 3, 5 y 7 presentan niveles de 0,372 g/L de ácido acético los cuales son los más bajos respecto al resto de las muestras y desarrollaron colonias pertenecientes a *Brettanomyces bruxellensis*. Para este caso no se cumple la regla general de la fuerte producción de ácido acético por *Brettanomyces spp.*, esto es debido y explicado por la capacidad de estas levaduras a actuar como facultativas, necesitando tener oxígeno para poder oxidar el etanol, si no disponen de él no pueden producir altos niveles de ácido acético¹, dependiendo esta cualidad de la conservación y almacenamiento de los vinos en la bodega.

Azúcar residual

Los contenidos de azúcares encontrados en las muestras de vino son en general cercanos a 2 g/L, siendo el valor de la media total de 2,43 g/L. La muestra 2 presenta los niveles más altos respecto al resto (3,65 g/L) seguidas por las muestras 21 (3,5g/L) y 11

¹ Carmen Prieto, Ing. Agrónomo, M, Sc., Universidad de Chile, 2006, "Comunicación personal".

(3,06 g/L), estas tres muestras no desarrollaron colonias pertenecientes a *Brettanomyces spp*. Opuesto a esto, las muestras 13 (1,99 g/L), 20 (1,79 g/L) y 16 (1,58 g/L) presentan los valores más bajos, destacándose el desarrollo de colonias de *Brettanomyces spp* en la muestra 20. Contrarrestando esto a los valores medios de azúcar residual para *Brettanomyces* (2,23 mg/L) se puede llegar a la conclusión que los niveles de azúcar residual alto no son decisivos al momento de determinar la presencia o ausencia de levaduras *Brettanomyces spp* en un vino, no siendo una característica diferenciadora entre vinos con y sin contaminación. Cabe mencionar que según Fugelsang (1997) la presencia de azúcares fermentables estimularía el crecimiento de *Brettanomyces spp*. para esto el vino debió haberse encontrado desprotegido higiénicamente, dándose las condiciones que posibilitaran la contaminación de un vino con alta cantidad de azúcar residual con levaduras *Brettanomyces spp*.

Según Colil (2005) estas levaduras utilizan el disacárido celobiosa presente en las barricas como base nutritiva, la cual se origina durante el tostado de la madera, de esta manera, se podrían desarrollar levaduras *Brettanomyces spp* en vino en barricas con bajos valores de azúcares residuales, aunque hay que señalar que para que este fenómeno se lleve a cabo el vino contaminado debe estar en contacto con madera tostada de barricas prácticamente nuevas, ya que con los sucesivos usos (dos o tres) la cantidad de celobiosa es mínima².

Grado alcohólico

El valor medio total para los vinos analizados fue de 13,63° G.L. mientras que el valor medio para los vinos contaminados con levaduras *Brettanomyces spp*. fue de 13,42° G.L. concordando con la literatura donde Fugelsang (1997), Oelofse y Du Toit (2006) y Catalán (2003) describen al género *Brettanomyces spp*. como uno de los géneros de levaduras que puede resistir la toxicidad de los altos niveles de etanol (13°G.L.). Zoecklein *et al.* (1995) señala que la concentración de alcohol condiciona los microorganismos que se pueden encontrar presentes en las diferentes etapas de la producción del vino, constituyéndose en una herramienta de selección, esto demuestra que varias de las levaduras aisladas de las diferentes bodegas presentan tolerancia al etanol, pues provienen de vinos relativamente alcohólicos donde fueron capaces de crecer, siendo una característica bastante importante de considerar debido a que el etanol no ejercería una condición totalmente restrictiva al desarrollo de *Brettanomyces spp*.

Análisis Discriminante

El análisis discriminante es la técnica estadística multidimensional más adecuada para el estudio de variables analizadas en diferentes muestras agrupadas en dos o varios grupos

² Eduardo Loyola, Ing. Agrónomo Enólogo, Dr., Universidad de Chile, 2006, "Comunicación Personal"

previamente definidos en una forma precisa; la discriminación determina si ciertas variables analizadas, permiten clasificar cada muestra de acuerdo a su grupo (Guedes, 1993, citado por Berlanga *et al.*, 2004).

Con este propósito se creó la variable cualitativa “Resultados de las Pruebas Moleculares”, la que enfrenta a todas las otras variables cuantitativas para realizar el análisis.

Las 7 variables cuantitativas utilizadas para el análisis (SO_2 libre, SO_2 total, pH, acidez total, acidez volátil, azúcar residual y grado alcohólico), dan origen a 2 funciones discriminantes, las cuales aparecen ordenadas en la primera columna del cuadro 8.

Cuadro 8. Análisis discriminante de las variables químicas básicas de los vinos con carácter “Brett”, de acuerdo a los resultados obtenidos de las pruebas moleculares.

Función	Valor	Porcentaje	Correlación
Discriminante	Específico	Relativo	Canónica
1	2,49431	77,57	0,84488
2	0,721071	22,43	0,64728

Funciones	Wilks	Chi-cuadrado	GL	p-Valor
Derivadas	Lambda			
1	0,16628	28,7053	14	0,0115
2	0,581033	8,6872	6	0,192

En la segunda columna del cuadro 8 aparece el valor específico, que representa la varianza total de los datos y que explica cada una de las funciones discriminantes. En la tercera columna se encuentra el porcentaje relativo de la varianza respecto al total de los valores específicos, es decir, la suma de las varianzas de cada función discriminante. El modelo se evalúa a partir de unas funciones derivadas y unos test de ajuste, como el de Wilks-Lambda y el de Chi-cuadrado.

De acuerdo a los grados de libertad (GL) se establece el nivel de significación (p) de cada una de las funciones discriminantes, el cual se presenta en la cuarta columna de la tabla. Para considerar estadísticamente significativas cada función con una probabilidad del 95%, el valor de significación (p) debe ser menor o igual a 0,05.

Para este caso, sólo la primera función discriminante tiene un nivel de significación superior al 95%, ya que posee un valor para p menor a 0,05.

Cuadro 9. Tabla de clasificación. Porcentaje de casos correctamente clasificados: 86,36%.

DETERMINACIÓN DE LEVADURAS *Brettanomyces* spp EN VINOS CHILENOS A TRAVÉS DE PRUEBAS MOLECULARES

Actual	Grupo	Pronosticados Especie		
Especie	Tamaño	<i>Candida</i> spp.	<i>B.bruxellensis</i>	Sin colonias
<i>Candida</i> spp.	6	6	0	0
		100,00%	0,00%	0,00%
<i>B. bruxellensis</i>	10	1	8	1
		10,00%	80,00%	10,00%
Sin colonias	6	0	1	5
		0,00%	16,67%	83,33%

En el cuadro 9 se presenta el contraste realizado para verificar el modelo de análisis discriminante. Las funciones discriminantes anteriormente obtenidas se aplican a los datos experimentales, y se comprueba si estas funciones son capaces de asignar cada una de las muestras al grupo real al que pertenecen. En este caso el modelo permite clasificar las muestras con un 86,36% de acierto. Este resultado permite afirmar que las muestras de vinos de los resultados de las pruebas moleculares se pueden diferenciar entre si de acuerdo a las variables aquí utilizadas.

Como se observa en el cuadro 8, la primera función discriminante explica el 77,57% de las diferencias presentes entre todas las muestras. Por otra parte, la segunda función discriminante explica el 22,43 de las diferencias (si bien dicha variable no es significativa al nivel de p utilizado para el análisis). En función de estos porcentajes se puede decir que al representar las dos primeras funciones discriminantes, se observa el 100% de la variabilidad de las muestras.

Los valores de las funciones discriminantes obtenidas y el agrupamiento de las muestras analizadas son mostrados en la figura 7.

Gráfico de Funciones Discriminantes

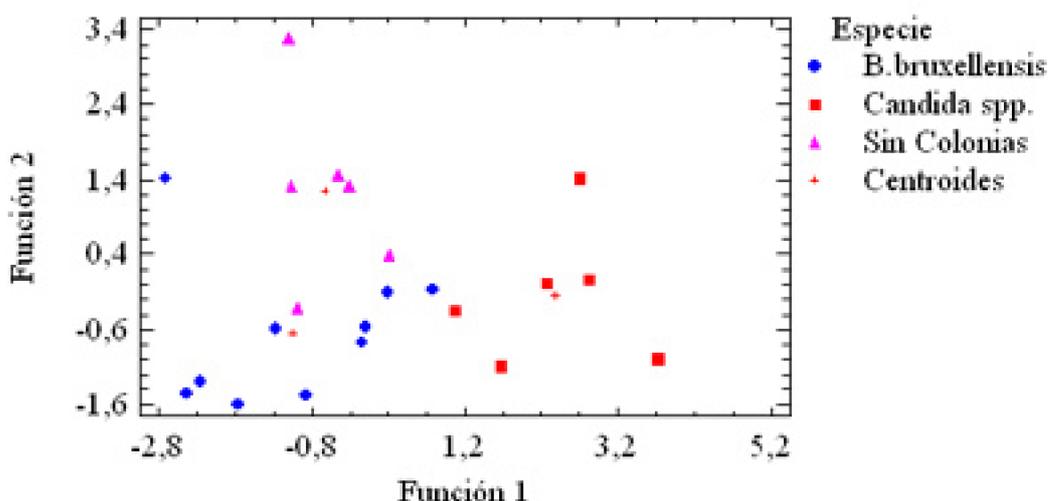


Figura 7. Representación de los resultados de las pruebas moleculares frente a las dos funciones discriminantes.

En la figura 7, se representan todas las muestras, agrupadas respecto a la primera función discriminante. En general, se aprecia una baja dispersión de las muestras en

relación a su respectivo centroide, lo que indicaría similitud entre las mismas en relación a las variables utilizadas.

Respecto a la primera función discriminante el análisis es capaz de separar claramente los dos géneros de levaduras, *Brettanomyces spp.* de *Candida spp.* Además es capaz de dividir la especie *Brettanomyces bruxellensis* de las muestras que no desarrollaron colonias.

Claramente al análisis multivariante es capaz de agrupar los tres grupos generados a partir de los resultados de la identificación de levaduras a través de las pruebas moleculares. Otorgando agrupaciones bien definidas, para las veintidós muestras, respecto a los valores entregados por los siete análisis básicos efectuados (SO_2 libre, SO_2 total, pH, acidez total, acidez volátil, azúcar residual y grado alcohólico). Esto podría generar una potencial utilización respecto a predicción y clasificación de muestras de vino con carácter "Brett".

CONCLUSIONES

Los métodos moleculares de PCR y RFLP aplicados a marcadores genéticos que presentan polimorfismo como la región 5.8S-ITS, permiten identificar y confirmar la presencia de levaduras *Brettanomyces spp.* en vinos chilenos con carácter “Brett”. De los veintidós vinos muestreados, 10 de ellos presentan levaduras de la especie *Brettanomyces bruxellensis*.

El método propuesto (PCR y RFLP), resulta eficaz en la identificación y amigable en su ejecución, resultando mucho más rápido que los métodos de clasificación tradicional basados en propiedades fisiológicas. Esto lo hace propicio para hacer frente a la fuerte demanda, ya que permite procesar grandes números de muestras en momentos que existe mucho interés lograr una identificación rápida y segura del género *Brettanomyces spp.* por potencial deterioro en los vinos.

El análisis multivariante, permite discriminar claramente los vinos con levaduras *Brettanomyces spp.* del resto de los vinos analizados, respecto a la primera función discriminante. Del resto de las muestras, el análisis discriminante logra separar las muestras que presentaban *Candida spp.* de las muestras que no desarrollaron colonias, creando una agrupación clara de cada uno de los grupos. Esto permite relacionar estrechamente las características químicas del vino con el efecto del desarrollo microbiano en el vino.

BIBLIOGRAFÍA

- Alguacil, M. 2001. El “Brett”, gran enemigo de los vinos de calidad. Disponible en: http://elmundovino.elmundo.es/elmundovino/noticia.html?vi_seccion=4&vs_fecha=200103&vs_noti. Leído el 19 de noviembre de 2004.
- American Type Culture Collection 1998. Catalogo A.T.C.C (en línea). Disponible en <http://www.atcc.org>. Leído el 13 de enero 2005.
- Auger, J. 2002. Guía 9, Virus Fitopatógenos. Cátedra Fitopatología General, Departamento de Sanidad Vegetal, Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile. 12 p.
- Berlanga, T., Peinado, R., Millán, C. and Ortega, J. 2004. Discriminant analysis of sherry wine during biological aging. *American Journal of Enology and Viticulture* 55(4):407-411.
- Bordeu, E. y J. Scarpa. 2000. Análisis químico del vino. Ediciones Universidad Católica de Chile, Santiago. 253p.
- Catalán, L. 2003. Aislamiento e identificación de levaduras *Brettanomyces spp* en vinos de bodegas chilenas. Memoria Ingeniero Agrónomo. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agronómicas. Santiago, Chile. 30p.
- Cocolin, L., K. Rantsiou, L. Iacumin, R. Zironi and G. Comi. 2003. Molecular detection and identification of *Brettanomyces/Dekkera bruxellensis* and *Brettanomyces/Dekkera anomalus* in spoiled wines. *Applied and Environmental Microbiology* 70(3):1347-1355.

- Colil, G. 2005. Efectos del uso de ozono en barricas de roble para el control de *Brettanomyces* spp. Memoria Ingeniero Agrónomo. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agronómicas. Santiago, Chile. 44p.
- Craig, J. T. and T. Heresztyn. 1984. 2-Ethyl-3,4,5,6-Tetrahidropiridina. An assessment of this possible contribution to the mousy off-flavor of wines. *American Journal of Enology and Viticulture* 35(1):46-48.
- Chatonnet, P., D. Dubourdieu and J.N. Boidron. 1995. The influence of *Brettanomyces/Dekkera* spp. yeast and lactic acid bacteria on the ethylphenol content of red wines. *American Journal of Enology and Viticulture*. 46(4): 463-468.
- Degré, R., D. Thomas, J. Ash, K. Mailhot, A. Morin, and C. Dubord. 1989. Wine yeast strain identification. *American Journal of Enology and Viticulture*. 40(4):309-315.
- Esteve-Zarzoso, B., C. Belloch, F. Uruburu and A. Querol. 1999. Identification of yeast by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and two ribosomal internal transcribed spacers. *International Journal of Systematic Bacteriology* 49:329-337.
- Flanzy, C. 2000. *Fundamentos Científicos y Tecnológicos*. Mundi Prensa, España. 783p.
- Fugelsang, K. 1997. Yeast and Molds. pp.68-116. *In*: Fugelsang, K (ed). *Wine Microbiology*. Chapman and Hall, New York. 245p.
- Harrop, S. 2003. The role of *Brettanomyces* in the production of high quality syrah-based wines. Masters of wine thesis. UK. 34p.
- Heresztyn, T. 1986. Formation of substituted tetrahydropiridinas by species of *Brettanomyces* and *Lactobacillus* isolated from mousy wines. *American Journal of Enology and Viticulture* 37(2):127-132.
- Ibeas, J., I. Lozano, F. Perdígones, and J. Jiménez. 1996. Detection of *Dekkera-Brettanomyces* strains in sherry by a nested PCR method. *Applied Environmental Microbiology* 62(3):998-1003.
- IPGRI y Comell University. 2003. Tecnologías basadas en el AND, Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción. Disponible en: http://www.ipgri.cgiar.org/Training/Unit10-1/MolMarkers_es/PDF/VOL1/III_2.pdf Leída el 19 de julio de 2006.
- Lonvaud-Funel, A., A. Delaherche and O. Claisse. 2004. Detection and quantification of *Brettanomyces bruxellensis* and "ropy" *Pediococcus damnosus* strains in wine by real-time polymerase chain reaction. *Journal of Applied Microbiology* 97:910-915.
- Luque, J. y A. Herráez. 2001. *Texto Ilustrado de Biología Molecular e Ingeniería Genética*, Ediciones Hardcourt, Madrid.469p.
- Martínez, J. 2002. Factores de desarrollo de *Brettanomyces* spp. y su efecto sobre las características sensoriales de vinos Cabernet sauvignon. Memoria Ingeniero Agrónomo. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agronómicas. Santiago, Chile. 52p.
- Mesas, J. M. y M. T. Alegre. 1999. El papel de los microorganismos en la elaboración del vino. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*. 2(4):174-183.
- Millet, V. and A. Lonvaud-Funel. 2000. The viable but non-culturable state of wine micro-organisms during storage. *Letters in Applied Microbiology* 30:136-141.

-
- Nelson, D. and M. Cox. 2004. Lehninger Principles of Biochemistry. Chapter 9: DNA-Based information technologies, polymerase chain reaction. Disponible en: <http://bcs.whfreeman.com/lehninger/> . Leído el 13 de noviembre de 2004.
- Navascués, E., F. Calderón y J.A. Suárez. 2001. El metabolismo microbiano en el binomio corcho-vino. ACE revista de enología. Disponible en: http://www.acenologia.com/ciencia54_1.htm . Leído el 13 de mayo de 2006.
- Oelofse, A. y M. du Toit. 2006. *Brettanomyces/Dekkera* during winemaking. (Part 1). What the winemaker should know. Wynboer 198: 65-67.
- Olsen, E. 2001. *Brettanomyces*: ocurrence, flavour effects and control. Disponible en: <http://www.makewine.com/makewine/brett.html> . Leído el 15 de noviembre del 2004.
- Querol, A and D. Ramón. 1996. The application of molecular techniques in wine microbiology. Trends in food Science and Technology. 7:73-78.
- Romero, J., M. García-Varela, J.P. Laclette and R.T. Espejo. 2002. Bacterial 16S rRNA gene analysis revealed that bacteria related to *Arcobacter spp* constitute an abundant and common component of the oyster microbiota (*Tiostrea chilensis*). Microbial Ecology, 44:365-371.
- Salgado, R. 2003. Caracterización de la composición fenólica de vinos del cv. Carménère provenientes de cinco valles de Chile. Memoria Ingeniero Agrónomo. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agronómicas. Santiago, Chile. 72p.
- Satz, M. L. y A. R. Kornblihtt. 1993. La reacción en cadena de las polimeras. El método y sus aplicaciones. Ciencia Hoy. 4(23).
- Van Der Walt, J.P. 1970. In the yeast, a taxonomic study. Lodder, J. (Ed.). Nort-Holland Publishing C.O, Amsterdam. 863p.
- Vélez, A. 1994. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida. Introducción y técnica básica. Disponible en: <http://www.uprm.edu/biology/profs/velez/poli.htm> Leído el 3 enero de 2006.
- Vierstraete, A. 1999. Principles of the PCR. Disponible en: <http://allserv.rug.ac.be/~avierstr/principles/pcr.html> . Leído el 24 de noviembre de 2004.
- Wikimedia Foundation, Inc. 2006. Brettanomyces. Disponible en: <http://en.wikipedia.org/wiki/Brettanomyces> Leído el 6 de agosto de 2006.
- Zoecklein, B., K. Fugelsang, B. Gump and F. Nury. 1995. Wine analysis and production. Chapman and Hall, New York. 621p.

ANEXOS

Protocolo de Extracción DNA de levaduras

- Suspender colonias en 200µl de agua estéril. 1.
- Centrifugar 2 min. a 10.000 rpm a 18°C. Eliminar sobrenadante. 2.
- Limpiaar con 1,2 ml de agua (agitar con vortex). 3.
- Centrifugar 2 min. a 10.000 rpm. Eliminar sobrenadante. 4.
- Añadir 500µl de Tampón 1 (sorbitol 0,9 M, EDTA 0,1 M, pH 7,5), y resuspender las células, pipeteando con cuidado. 5.
- Añadir 30µl de solución de liticasa 60 000 (1,5 mg en 1300 µl de T1). 6.
- Incubar la suspensión a 37°C durante 20 min. 7.
- Centrifugar 2 min. a 10.000 rpm a 18°C. Eliminar sobrenadante. 8.
- Resuspender las células en 500 µl de Tampón 2 (Tris 50 mM pH 7,4, EDTA 20 mM). 9.
- Añadir 13µl de SDS 10% y agitar. 10.
- Incubar 65°C durante 5 min. 11.
- Añadir 200 µl de Acetato de potasio 5M y agitar bien. Incubar en hielo 15 min. 12.

DETERMINACIÓN DE LEVADURAS *Brettanomyces spp* EN VINOS CHILENOS A TRAVÉS DE PRUEBAS MOLECULARES

- Centrifugar en frío (4°C) 10 min. a 12.000 rpm (para precipitar bien el SDS). 13.
- Transferir el sobrenadante a otro Eppendorff con cuidado de no tomar nada de precipitado, añadir 700 µl de Isopropanol e incubar a T° ambiente durante 5 min. 14.
- centrifugar 10 min. a 12.000 rpm a 18°C y eliminar sobrenadante. 15.
- Añadir 500 µl de etanol 70% 16.
- Centrifugar 5 min. a 12.000 rpm y eliminar el sobrenadante. 17.
- Secar el pellet al vacío hasta que se vea transparente. 18.
- Resuspender el pellet en 20µl de TE (Tris 10 mM, EDTA 1mM pH 7,4). 19.