

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS

ESCUELA DE AGRONOMÍA

MEMORIA DE TÍTULO

DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DE LEVADURAS
***Brettanomyces spp.* Y *Candida spp.* EN VINOS CHILENOS Y SU**
RELACIÓN CON CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS

VICTOR HUGO VÁSQUEZ LEPE

SANTIAGO – CHILE
2009

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
ESCUELA DE AGRONOMÍA

MEMORIA DE TÍTULO

**DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DE LEVADURAS *Brettanomyces spp.* Y
Candida spp. EN VINOS CHILENOS Y SU RELACIÓN CON CARACTERÍSTICAS
ORGANOLÉPTICAS**

**DETERMINATION OF *Brettanomyces spp.* AND *Candida spp.* YEASTS IN
CHILEAN WINES AND ITS RELATION WITH ORGANOLEPTIC
CHARACTERISTICS**

VICTOR HUGO VÁSQUEZ LEPE

SANTIAGO – CHILE
2009

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
ESCUELA DE AGRONOMÍA

**DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DE LEVADURAS *Brettanomyces spp.* y
Candida spp. EN VINOS CHILENOS Y SU RELACIÓN CON CARACTERÍSTICAS
ORGANOLÉPTICAS**

Memoria para optar al Título
Profesional de Ingeniero Agrónomo

VICTOR HUGO VÁSQUEZ LEPE

PROFESOR GUÍA	Calificaciones
Sra. Carmen Prieto D. Ingeniero Agrónomo, M. Sc.	6,6
PROFESORES EVALUADORES	
Sr. Elías Obreque S. Ingeniero Agrónomo, M. Sc.	6,4
Sra. Carmen Saenz H. Químico Farmacéutico, Dr.	6,0
COLABORADOR	
Sr. Jaime Romero O. Bioquímico, Dr.	

SANTIAGO, CHILE
2009

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
Palabras clave.....	1
ABSTRACT.....	2
Key Words.....	2
INTRODUCCIÓN.....	3
MATERIALES Y MÉTODOS.....	6
Materiales.....	6
Lugar de estudio.....	6
Muestras de Vino.....	6
Medios de cultivo.....	6
Extracción de ADN.....	7
Amplificación PCR y Digestión RFLP.....	7
Evaluación Sensorial.....	7
Metodología.....	8
Muestras de Vinos.....	8
Siembra de Muestras.....	8
Siembra por extensión.....	8
Siembra por filtración.....	8
Extracción de ADN.....	9
Reacción PCR de la región 5.8S-ITS del ADN.....	9
Digestión (RFLP) de la región 5.8s-ITS del ADN.....	10
Análisis Sensorial.....	10
Análisis Estadístico.....	11
RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	12
Pruebas moleculares.....	12
Cultivo en placas.....	12
Extracción de ADN.....	14

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) del ADN extraído de las colonias.....	14
Fragmentos de Restricción (RFLP)	16
Evaluación Sensorial.....	19
CONCLUSIONES.....	26
BIBLIOGRAFÍA.....	27
ANEXO I.....	30
Extracción de ADN de Levaduras.....	30
ANEXO II.....	31
Pauta no estructurada de degustación.....	31
ANEXO III.....	32

RESUMEN

Las levaduras del género *Brettanomyces* son consideradas como agentes deteriorantes en vinos en distintas partes del mundo. Comúnmente su presencia en los vinos es detectada por características olfativas específicas (olor animal a tempera y medicinal).

Basado en los resultados de Humeres (2006), se demostró que estas mismas características sensoriales pueden ser encontradas en vinos contaminados con levaduras del género *Candida spp.*

Los objetivos de esta investigación fueron comprobar la existencia de levaduras *Brettanomyces spp.* o *Candida spp.* en muestras de vinos con caracteres organolépticos “Brett” y correlacionar el microorganismo encontrado en la muestra, con un carácter sensorial definido (olor animal a tempera y medicinal), atribuido a *Brettanomyces spp.*

Con este fin, se recolectaron 15 muestras de vinos, de diferentes cepas (*Cabernet Sauvignon, Merlot, Petit Verdot, Carménère* y *Syrah*) y de diferentes viñas. Cada muestra de vino fue sensorialmente reconocida con carácter “Brett” por el enólogo de su respectiva bodega.

Las muestras de vino fueron sembradas en placas con medio selectivo para *Brettanomyces spp.*, generándose desarrollo de colonias en todas las muestras de vino. 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 las enzimas de restricción *HaeIII* y *HinfI*. La identificación de los perfiles se realizó mediante la comparación con cepas conocidas de *Brettanomyces spp.* y la clasificación de especies de Esteve-Zarzo *et al.* (1999).

A través de estos métodos fue posible la identificación de la cepa *Brettanomyces bruxellensis* en un 100% de las muestras de vino analizadas, sin detectarse la presencia de *Candida spp.*

A través del análisis sensorial se pudo determinar que la intensidad de los descriptores aromáticos de “Brett”, varían de acuerdo con las distintas cepas de vinos.

Con esta investigación se puede concluir que levaduras del género *Brettanomyces spp.* son causantes de la característica sensorial “Brett” y que el parámetro sensorial reconocido comúnmente en todas la variedades de vinos estudiadas fue el olor medicinal.

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

ABSTRACT

DETERMINATION OF *Brettanomyces* spp. AND *Candida* spp. YEASTS IN CHILEAN WINES AND ITS RELATION WITH ORGANOLEPTIC CHARACTERISTICS

The yeasts from the *Brettanomyces* genre are considered as deteriorative agents in different parts of the world. Commonly their presence in wines is detected by specific sensorial characteristics (animal smell, paint smell, medicinal smell).

Experiences from previous studies proved that those same sensorial characteristics can be found in wines contaminated with yeasts from the *Candida* spp. genre.

The objectives of this investigation were verifying the existence of *Brettanomyces* spp. or *Candida* spp. yeasts in wine samples with organoleptic “Brett” characteristics and to correlate the microorganism found in the sample, with a defined character (animal smell, paint smell, medicinal smell) attributed to *Brettanomyces* spp.

For this purpose, 15 wine samples were collected, from different strains (*Cabernet Sauvignon*, *Merlot*, *Petit Verdot*, *Carménère* and *Syrah*) and from different vineyards. Every sample was sensory recognized with “Brett” character by the winemaker of its respective cellar.

The wine samples were plated with selective medium for *Brettanomyces* spp., generating a development of colonies in all the wine samples. From these colonies DNA was extracted to carry out a molecular characterization of the obtained yeast, which consisted in the amplification by PCR of the region 5.8S-ITS of the rRNA and the subsequent digestion of the amplifications using the restriction enzymes *HaeIII* and *HinfI*. The identification of the profiles was realized through the comparison with known strains of *Brettanomyces* spp. and the species classification of Esteve-Zarzoso *et al.* (1999).

Through these methods the identification of the *Brettanomyces bruxellensis* strain was possible in 100% of the wine samples that were analyzed, without detecting the presence of *Candida* spp.

Through the sensorial analysis it was determined that the intensity of the aromatic descriptor of “Brett”, varies according to the different strains of wine.

With this investigation it can be concluded that the yeasts of the *Brettanomyces* spp. genre are the cause of the sensorial characteristic “Brett” and that the sensorial parameter commonly recognized in all the studied varieties of wine was the medicinal smell.

Key words: PCR-RFLP, 5.8s-ITS, deteriorant yeasts, *Brettanomyces* spp., *Candida* spp.

INTRODUCCIÓN

El proceso de fermentación alcohólica en los mostos es llevado a cabo principalmente por la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, debido a su óptima capacidad de transformar los azúcares del mosto en alcohol y aportar otras características sensoriales positivas a los vinos resultantes (Zoecklein *et al.*, 2001). Sin embargo, el proceso de vinificación incluye múltiples etapas en las cuales puede producirse un crecimiento microbiano no deseado, alterando la calidad organoléptica del vino. Los principales microorganismos alterantes incluyen levaduras no-*Saccharomyces* pertenecientes a los géneros *Brettanomyces/Dekkera*, *Candida*, *Hanseniaspora/Kloeckera*, *Pichia*, *Saccharomycodes*, *Schizosaccharomyces* y *Zygosaccharomyces* (Cocolin *et al.*, 2003 y Carrascosa *et al.*, 2005).

Mucho se ha discutido acerca del papel de las levaduras del género *Brettanomyces*, en el proceso de vinificación, en cuanto a si su actividad debiera considerarse como positiva, negativa o indiferente dependiendo de varios factores, que van desde el estilo de vino que se desea realizar, hasta la capacidad o incapacidad de los encargados de la vinificación de efectuar el control de este microorganismo, que puede alcanzar una proliferación incontrolada en la bodega (Fugelsang, 1997 y Navascues, 2007).

El género *Brettanomyces* (o su forma esporógena *Dekkera*) es un género de levaduras que pertenece a los Ascomycetes, y son algunas de las levaduras más problemáticas que crecen en el mosto y en el vino (Ibeas *et al.*, 1996 y Fugelsang, 1997). La diferencia entre los géneros *Brettanomyces* y *Dekkera* radica en que las levaduras *Brettanomyces* son denominadas “imperfectas” donde en los cultivos no se observan ascosporas, mientras que en otros como *Dekkera* los cultivos pueden parecer idénticos excepto en que producen ascosporas en medios especiales (Zoecklein *et al.*, 2001).

Brettanomyces y *Dekkera* son de lento crecimiento, pudiendo pasar desapercibidas hasta que el vino esté fuertemente afectado (Zoecklein *et al.*, 2001), esto porque el patrón de crecimiento de la población, el cual es de tipo acampanado, comienza a observarse generalmente en vinos ya terminados, 5 a 7 meses luego de la vinificación en etapa de guarda en barricas (especialmente si esta etapa se realizó en barricas viejas o mal higienizadas) o incluso en vinos ya embotellados, con grado alcohólico entre 12 a 15 °G.L., condiciones en las cuales la mayoría de las levaduras no pueden subsistir y no presentan competencia en su crecimiento (Chatonnet *et al.*, 1995 y Fugelsang, 1997).

Brettanomyces y *Dekkera* pueden producir una alteración en los vinos llamada “olor de ratón” ó “olor a sudor de caballo”, que durante mucho tiempo fue atribuída a la acetamida, pero en 1984-1986 el investigador australiano, Heresztyn (1986), aisló cepas de *Brettanomyces spp.* e identificó los compuestos responsables del “olor a ratón” también conocido como “mousy” y corresponden al 2-acetil 1,4,5,6-tetrahidropiridina y 2-acetil-

3,4,5,6-tetrahidropiridina. En la producción de estas sustancias también parece intervenir la lisina (Craig y Hersztyn, 1984; Ibeas *et al.*, 1996 y Fugelsang, 1997).

Otros compuestos culpables del defecto aromático “Brett”, nacen de la transformación de los ácidos cinámicos del vino, de carácter inodoro, en otras sustancias conocidas como etilfenoles, específicamente el 4-etilfenol y el 4-etilguayacol, que dependiendo de su concentración en el vino aportan notas aromáticas a “olor a sudor de caballo” o de tipo animal, olores “medicinales” y olores a “tintas” (temperas). Estos compuestos son estables y no sufren modificaciones a lo largo del tiempo (Chatonnet *et al.*, 1992; Conterno *et al.*, 2006 y Oelofse *et al.*, 2009).

Otras levaduras deteriorantes en los vinos corresponden a las del género *Candida*, destacando entre ellas, *Candida vini*, antiguamente llamada *Candida mycoderma*, las que en la superficie de un medio líquido forman un velo de aspecto seco y rizado, de color blanquecino o amarillento, que cuando espesa puede irse al fondo del estanque (Flanzy, 2000 y Hidalgo, 2003). Estas levaduras son responsables de la alteración conocida como “flor de los vinos”, desarrollándose un velo en la superficie en contacto con el aire, produciéndose una degradación de los ácidos fijos del vino, formándose ácido acético y acetaldehído (Hidalgo, 2003).

Las células vegetativas de *Brettanomyces* se describen como de forma ojival, aunque esto es más frecuente de encontrar en poblaciones viejas (Zoecklein *et al.*, 2001). La forma de la célula cumple un rol muy importante en su identificación por técnicas morfológicas, aunque esto depende de la edad del microorganismo, medio de cultivo y stress medio ambiental lo cual convierte esta técnica en poco confiable (Degré *et al.*, 1989; Fugelsang, 1997; Renouf y Lonvaud-Funel, 2007).

La taxonomía de levaduras ha estado soportada en técnicas convencionales, basadas en la descripción morfológica y fisiológica de especies y géneros, pero estas dependen de las condiciones de cultivo de las cepas, por lo que han introducido errores en la ubicación taxonómica y dieron origen al fenómeno de la dualidad de la nomenclatura. Además, la identificación en base a las características morfológicas y fisiológicas requiere la realización de unas 100 pruebas, lo cual es laborioso, complejo, requiere tiempo y sólo permiten la identificación hasta nivel de género (Ratón, 2004).

Estas dificultades se han solucionado con la aplicación de las técnicas moleculares, basadas en el análisis de fragmentos de las moléculas de ácidos nucleicos (Ratón, 2004).

En los últimos 10 años, se han realizado muchos estudios describiendo la aplicación de herramientas de biología molecular para la diferenciación y caracterización de levaduras utilizadas 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 (Polymerase Chain Reaction, PCR) (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 poliacrilamida o agarosa (Mesas y Alegre, 1999).

La amplificación por PCR permite la detección específica de secuencias de ADN y así posibilita la identificación de microorganismos contaminantes (Ibeas *et al.*, 1996 y Suarez *et al.*, 2007). Esta técnica consta de tres pasos básicos: Desnaturalización, apareamiento, y extensión (Luque y Herráez, 2001). Estos constituyen un ciclo, y son repetidos de 30 a 40 veces dando como resultado la copia de una porción de la molécula de ADN de doble cadena para producir dos cadenas ADN hijas, luego de dos ciclos habrá 4 copias, etc., siendo este un aumento exponencial en el número de copias (Auger, 2002).

Otra técnica molecular utilizada en la identificación de microorganismos es la determinación del polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción (restriction fragment length polymorphism, RFLP) (Suarez *et al.*, 2007), que consiste en la diferenciación de los organismos por el análisis de los patrones de ruptura que se generan en un sitio específico del genoma del microorganismo, cuando es cortado por enzimas de restricción o endonucleasas y luego son comparados en gel por medio de electroforesis. Estos fragmentos polimórficos aparecen debido a que los organismos de diferentes especies, e incluso cepas, difieren en la distancia de los sitios de clivaje para cada enzima de restricción. (Ratón, 2004).

Basado en estudios anteriores sobre la detección de levaduras *Brettanomyces* por pruebas moleculares PCR-RFLP en muestras de vinos chilenos, se pudo detectar que muchas muestras reconocidas por los enólogos con carácter sensorial “Brett”, estaban en realidad contaminados con la levadura *Candida spp.* (Humeres, 2006).

Esto se debe a que el carácter sensorial “Brett” atribuido a levaduras del género *Brettanomyces*, involucra una amplia gama de olores (olor animal, tempera y medicinal), los cuales también pueden ser sintetizados en el vino por levaduras *Candida spp.* (Humeres, 2006).

Es por esto que la hipótesis de esta memoria plantea lo siguiente: Las características organolépticas tipificadas como “Brett” se deben a la presencia de levaduras *Brettanomyces spp.* o *Candida spp.*

Para satisfacer esta hipótesis se plantean los siguientes objetivos:

- Comprobar la existencia de levaduras *Brettanomyces spp.* o *Candida spp.* en muestras de vinos con caracteres organolépticos “Brett”.
- Correlacionar el microorganismo encontrado en la muestra, con un carácter sensorial definido (olor animal, medicinal y a tempera), atribuido a *Brettanomyces spp.*

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Lugar del estudio

El trabajo de investigación se realizó en los laboratorios de Enología, Microbiología y Evaluación Sensorial 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

Se recolectaron 15 muestras de vinos, de diferentes cepas (*Cabernet Sauvignon*, *Merlot*, *Petit Verdot*, *Carménère* y *Syrah*), diferentes años de cosechas y de diferentes viñas, ubicadas en diferentes valles de Chile entre las regiones quinta y séptima. Cada muestra de vino se recolectó desde la bodega de origen y fue sensorialmente reconocida con carácter “Brett” por el enólogo de su respectiva bodega.

Medios de cultivo

Para la obtención de colonias de microorganismos desde las muestras de vino se utilizó el medio de cultivo agar carbonato de calcio descrito por la American Type Culture Collection (1998), que en su formulación consta de glucosa (2% p/v), extracto de levadura (1%, p/v), peptona (1% p/v), carbonato de calcio (2% p/v) y agar (2% p/v) (Martínez, 2002 y Catalán, 2003).

Se incorporó directamente en el medio de cultivo el antibiótico cicloheximida en una dosis de 30 y 50 mg/L, dependiendo del tipo de siembra en placa, como inhibidor selectivo, que impide el crecimiento de organismos numéricamente superiores como es el caso del género *Saccharomyces* (Ibeas *et al*, 1996). También se aplica Bifenil (1% p/v en alcohol) al medio de cultivo en una concentración del 1% v/v para prevenir la contaminación de hongos y el antibiótico ampicilina en una concentración de 5,2 % p/v para inhibir el desarrollo bacteriano.

Para el crecimiento en medio líquido previo a la extracción de ADN, se utilizó medio de cultivo YEPD que en su formulación consta de glucosa (2% p/v), extracto de levadura (2% p/v), peptona (1% p/v).

Extracción de ADN

En la extracción de ADN se utilizaron soluciones tampones; Tampón 1 (Sorbitol 0,9 M, EDTA 0,1 M, pH 7,5), Tampón 2 (Tris 50 mM, EDTA 20 mM, pH 7,4). Además de dodecilsulfato de sodio (SDS 10% p/v), acetato de potasio 5 M, isopropanol, etanol (70%), TE (Tris 10mM, EDTA 1mM, pH 7,4), y la enzima Liticasa (*Arthrobacter luteus*). Para cuantificar visualmente el ADN se realizó electroforesis en gel de agarosa (1% p/v) y la tinción se realizó con bromuro de etidio (Renouf y Lonvaud-Funel, 2007).

Amplificación PCR y Digestión RFLP

En la técnica PCR se utilizaron partidores, que son secuencias específicas complementarias que se añaden a la reacción y que amplifican en forma selectiva una secuencia de ADN. Los partidores utilizados correspondieron a ITS1 y ITS4 (espaciadores transcritos internos) (Esteve-Zarzoso *et al.*, 1999). Además, se utilizó la enzima Taq ADN polimerasa, buffer de la enzima, nucleótidos, cloruro de magnesio (MgCl₂), y agua libre de nucleasas.

Para las digestiones (RFLP), las endonucleasas de restricción ocupadas correspondieron a Hae III y Hinf I con sus respectivos buffers y agua libre de nucleasas. Además para el caso de la enzima Hinf I, se añadió proteinasa K.

Se utilizaron geles de poliacrilamida (8% p/v y 1,5 cm de espesor) para ver amplificados y los fragmentos de las digestiones, la tinción se realizó con nitrato de plata (AgNO₃) (Romero *et al.*, 2002).

Se utilizó un ADN estándar con un rango de tamaño de 100-1500pb (100pb ladder), levadura comercial *Sacharomyces cereviciae* y una muestra aislada de *Brettanomyces spp.*

Evaluación Sensorial

Para las evaluaciones sensoriales se utilizaron como patrones descriptores aromáticos de “Brett”, jarabe para la tos (olor medicinal), cuero seco y húmedo (olor animal), pintura de niños (olor a tempera).

También se utilizó una pauta no estructurada de evaluación sensorial para evaluar los tres parámetros analizados, descrita en la metodología.

Metodología

Muestras de vinos

Se recolectaron 15 muestras de vino de diferentes cepas y años (1500 mL por cada muestra), las cuales se obtuvieron de 9 distintas bodegas de vinos chilenas, ubicadas en 7 diferentes valles. Cada muestra presentaba evidente presencia sensorial de *Brettanomyces*, carácter que fue evaluado por el enólogo de su respectiva bodega, mediante la detección de olores de naturaleza animal en los vinos (sudor de caballo, ratón, cuero), olores medicinales (jarabe para la tos) y olores a temperas.

Siembra de muestras

Se utilizó medio carbonato de calcio para el establecimiento de las colonias desde las muestras de vino y el medio YEPD líquido, para el crecimiento en tubos de ensayo de las colonias ya aisladas, previo a la extracción de ADN.

Para asegurar el correcto desarrollo de las colonias de microorganismos en el medio de cultivo carbonato de calcio se realizó dos tipos de siembras en placas petri para cada muestra:

Siembra por extensión: Se sembró 0,1mL de cada muestra de vino sobre el medio de cultivo. En este tipo de siembra se ocuparon dos concentraciones distintas de cicloheximida en el medio, de 30 y 50 mg/L.

Siembra por filtración: Se filtró 50 mL de cada muestra de vino, a través de una membrana de nitrocelulosa estéril de 0,45 μm de porosidad, esta membrana luego se deposita en el medio de cultivo con una concentración de 30 mg/L de cicloheximida.

Todas las placas petri sembradas se incubaron en una estufa de cultivo a una temperatura de 24 a 26 °C, alrededor de 5 a 8 días para favorecer el desarrollo de colonias.

De las placas sembradas se seleccionaron las que presentaron colonias aisladas y se escogieron 6 colonias por cada muestra de vino, sumando un total de 90 colonias aisladas. Estas colonias fueron numeradas, resembradas y luego se realizó un cepario con las colonias obtenidas.

Una vez obtenidas las colonias, fueron sembradas en tubos de ensayo con medio YEPD líquido (5 mL de medio) e incubadas de 24 a 26 °C en estufa. Luego de dos días de crecimiento se tomó una alícuota de 1,5 μL de medio y se llevó a tubos Eppendorf previo a la extracción de ADN.

Extracción de ADN

Una vez que se establecieron los microorganismos en cada tubo de ensayo, este se agitó para mezclar el medio de cultivo con la colonia y luego se vertió una parte (1,5 mL de la mezcla) en tubo Eppendorf para la extracción de ADN.

La extracción de ADN se llevó a cabo usando un protocolo de extracción (Anexo I), el cual consistió en la centrifugación (Centrifuga Eppendorf 5804R, Alemana) de la colonia suspendida en el medio por 2 minutos a 10000 rpm, luego se lavó con agua destilada (200 µL) por 2 minutos a 10000 rpm. Se añadió una solución tampón 1, (sorbitol 0,9 M, EDTA 0,1 M, pH 7,5), además de una solución de Liticasa. Se incubó la muestra a 37°C por 20 minutos en baño termoregulado, se agregó la solución tampón 2 (Tris 50 mM, EDTA 20 mM, pH 7,4), y 13 µL de dodecilsulfato de sodio (SDS) (10% p/v), se incubó la muestra a 65 °C por 5 minutos, se agregó acetato de potasio 5 M, se incubó en hielo 15 minutos. Se centrifugó y se añadió isopropanol a temperatura ambiente. Finalmente se agregara etanol (70% p/v), para con esto lograr un “pellet” que contenga solamente ADN. Luego el “pellet” fue resuspendido en 30 µl de TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7,4).

Finalmente del “pellet” diluído en TE, se extrajo ADN directamente y también se sometió a 2 diluciones distintas con agua libre de nucleasas. La primera dilución fue 1:10 y la segunda 1:100.

Reacción PCR de la región 5.8S-ITS del ADN

Para la identificación de levaduras mediante la técnica de PCR, se utilizó 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 como reporto Esteve-Zarzoso *et al.* (1999).

Para la reacción PCR se realizó una mezcla de 40 µL, en donde 1 µL del ADN obtenido de las colonias, se suspendió en 39 µL de la mezcla de reacción de PCR, que contiene: 0,3 µL de la enzima Taq polimerasa (1,5 U), 5 µL de buffer de la enzima, 3 µL de magnesio (1,5 mM de MgCl₂), 1 µL de nucleótidos (10 µM) y 0,5 µL de partidores ITS-1 e ITS-4 (0,5 µM) y 28,7 µL de agua libre de nucleasas. Las secuencias de los partidores fueron: ITS1:5' - TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3' y ITS4:5' -TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'. (Esteve-Zarzoso *et al.*, 1999)

La suspensión se llevó a un termociclador (Eppendorf), donde las condiciones de PCR fueron las siguientes: Desnaturalización inicial por 5 minutos a 95°C, desnaturalización de 1 minuto a 94 °C, apareamiento por 2 minutos a 55°C, extensión por 2 minutos a 72 °C y extensión final de 10 minutos a 72 °C.

Digestión (RFLP) de la región 5.8S-ITS del ADN

Para la digestión (RFLP) de los amplificadores con las enzimas de restricción *Hae III* y *Hinf I*, se llevó a cabo una mezcla de 10 μL , compuesto de 1 μL del producto amplificado, 0,1 μL de la endonucleasa de restricción, 1 μL de buffer de la enzima, y agua libre de nucleasas para completar los 10 μL de mezcla. Luego se incubó la preparación durante 4 horas a 37 °C. en baño termostático. Para la mezcla realizada con *Hinf I* luego de las 4 horas en baño termostático fue necesario aplicar 1 μL de proteinasa K y luego dejar la mezcla 1 hora más en baño termostático.

Tanto en la reacción PCR como en la digestión RFLP, en cada una de las muestras se conoció la secuencia de corte específica de los nucleótidos. El producto amplificado y los fragmentos de restricción se observaron a través de electroforesis en minigel de poliacrilamida (8% p/v, 1,5 mm de espesor) con tinción de nitrato de plata (Romero *et al.*, 2002)

Los productos amplificados y los fragmentos de digestión fueron separados durante 30 minutos a 150 volts y 40 minutos a 150 volts respectivamente.

Los tamaños de las bandas fueron estimados mediante la comparación de la migración electroforética, con la migración de un ADN estándar con un rango de tamaño de 100-1500pb (100pb ladder).

Análisis Sensorial

El análisis sensorial se basó en caracterizar aromáticamente las quince muestras de vino, de acuerdo a tres descriptores aromáticos correspondientes de "Brett", los cuales fueron olor a tempera, olor animal y olor medicinal.

Ya que se enfocó el análisis sensorial en un parámetro definido (carácter sensorial "Brett"), se trabajó con un panel entrenado con experiencia en estas características, el cual fue conformado por enólogos y académicos, sumando un total de 10 personas.

La batería de degustación constó de 19 copas, de las cuales 15 fueron para las muestras de vino; de las otras cuatro, una para una muestra negativa (vino sin contaminación de "Brett") y las otras tres fueron utilizadas con parámetros estándares de "Brett"; tales como olor animal (trozos de cuero), olor medicinal (jarabe para la tos) y la última llevó tempera (tempera marca comercial Artel), esto con el fin de uniformar criterios sensoriales entre los panelistas participantes.

Se formuló una pauta de degustación no estructurada (Anexo II) donde cada panelista, analizó por separado los tres parámetros sensoriales (olor a tempera, animal y medicinal) en cada muestra de vino y los calificó en una escala de cero a quince, donde cero corresponde

a no encontrar el parámetro sensorial y quince corresponde a la máxima expresión aromática del parámetro analizado.

Análisis Estadístico

Todos los datos resultantes de las mediciones en las pautas no estructuradas, para cada parámetro sensorial en las quince muestras de vino, fueron analizados bajo el programa computacional Software Solutions For Sensory Analysis And Consumer Test (FIZZ).

Este programa se utilizó para establecer diferencias significativas entre las muestras de vinos y los parámetros sensoriales analizados mediante un test de ANDEVA. Este test se realizó en una primera instancia para todas las muestras de vino con los parámetros sensoriales y luego se separaron las muestras de vino por cepajes para analizar las mismas variables.

También se ocupó este programa utilizando DUNCAN y TUKEY, para comprobar si la respuesta de los evaluadores ante las muestras tuvo una respuesta uniforme.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Esta sección consta de tres partes principales: Resultados de las pruebas moleculares basadas en el análisis del tamaño de los amplificadores de ADN y los análisis de los fragmentos de restricción, resultados de la evaluación sensorial aromática de las muestras de vino y los análisis estadísticos de los datos obtenidos de las evaluaciones sensoriales mediante ANDEVA.

Pruebas moleculares

Cultivo en placas

De las quince muestras de vino sembradas en placas con medio de cultivo carbonato de calcio, todas presentaron crecimiento de colonias en ambas concentraciones del antibiótico cicloheximida y en ambos tipos de siembra (siembra por extensión y filtro de membrana de nitrocelulosa).

Como se ve en la Figura 1, el crecimiento de las colonias se observó en forma de colonias aisladas, de forma redondeada y de color blanquecino.

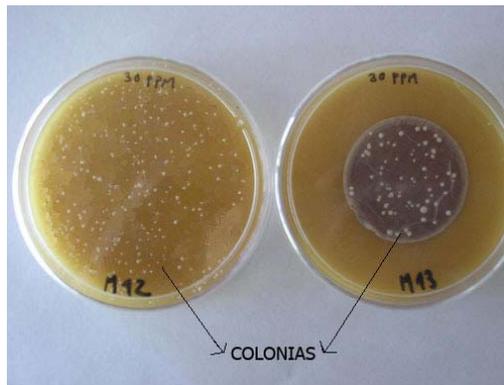


Figura 1. Placas con colonias de *Brettanomyces spp.* en agar carbonato de calcio, a la izquierda siembra por extensión y a la derecha siembra por filtración con membrana de nitrocelulosa.

Ibeas *et al.* (1996) señalan que *Brettanomyces spp.* es de muy lento crecimiento en medios de cultivos corrientes, ya que demoran entre una a dos semanas en observarse colonias, y que el rápido crecimiento de otras levaduras hacen que la etapa de aislación sea laboriosa.

En el caso de esta investigación el crecimiento de las colonias se observó a partir del quinto día después de la siembra y sin problemas de contaminaciones de otros microorganismos, esto se debió al uso de el medio de cultivo selectivo carbonato de calcio, a la aplicación del antibiótico cicloheximida, el antibacterial ampicilina y el antifúngico bifenil, al igual como lo utilizó Renouf y Lonvaud-Funel (2007).

Como lo observó Humeres (2006) y Renouf y Lonvaud-Funel (2007), estas condiciones de cultivo también permiten el crecimiento de otras levaduras deteriorantes como es el caso de *Candida spp.*

En las muestras de vino que posiblemente tenían menor población, el método de filtración logró aislar colonias que presentaron crecimiento al cabo de 5 días. En algunos casos el crecimiento de colonias en placas sembradas con filtro fue pobre, y nula en placas sembradas por extensión y sin embargo la característica sensorial a “Brett” en las muestras de vino estaba muy presente. Esto se puede deber a dos causas; la primera a la presencia de una menor concentración de la población de microorganismos en la muestra de vino y la segunda causa sería, como lo reportaron Millet y Lonvaud-Funel (2000), que exista una mayor concentración de células no capaces de producir colonias llamadas VBNC (viables pero no cultivables), estado que se produciría en las células de microorganismos por el proceso de sulfitación en los vinos o por privación de oxígeno, estado que se revertiría cuando la célula vuelve a encontrar sus condiciones naturales óptimas de vida.

De cada muestra de vino sembrada se eligieron 6 colonias aisladas, elegidas al azar, las cuales se separaron a una nueva placa con el mismo medio de cultivo, previo a la extracción de ADN, como se observa en la Figura 2.

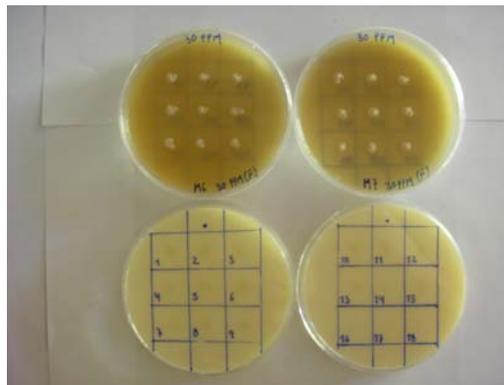


Figura 2. Colonias de *Brettanomyces spp.* aisladas en medio de cultivo carbonato de Calcio previo a su extracción de ADN.

Extracción de ADN

La extracción de ADN se realizó de las 90 colonias aisladas (correspondiente a 6 colonias por cada muestra de vino), utilizando el protocolo de extracción mencionado en los materiales y métodos (Anexo I).

Con este método de extracción desde las colonias, se facilita la obtención de “pellets” de ADN color transparente a diferencia de la extracción de ADN directa desde las muestras de vino con lo que se obtiene un “pellet” de color rosado o café claro como lo reportó Humeres (2006), lo que indicaría según Cocolin *et al.* (2003) que se trata de un “pellet” de baja pureza de ácidos nucleicos. Es por esto que esta técnica de extracción de ADN fue obviada en esta investigación.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) del ADN extraído de las colonias

Los partidores ITS-1 y ITS-4 se utilizaron para amplificar la región 5.8S-ITS del rADN que es una región codificadora, conservada y con una baja variabilidad intraespecífica que no permite la delimitación entre cepas de una misma especie, sin embargo la zona de los ITS, que es una región no codificadora e hipervariable, permite el reconocimiento interespecífico. A esta técnica se le ha dado un amplio uso en la identificación de levaduras de interés industrial, como lo señalan Esteve-Zarzoso (1999) y Ratón (2004).

La amplificación se realizó con los 90 ADNs extraídos de las 15 muestras de vinos sospechosas.

Los resultados se muestran en la Figura 3.

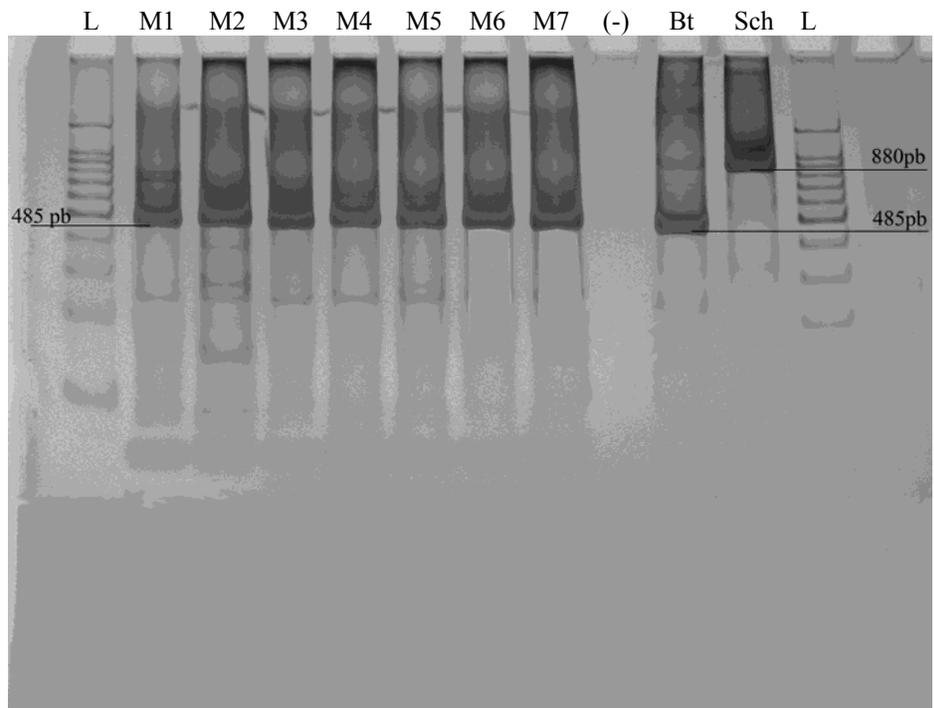


Figura 3. Minigel de poliacrilamida (8%) de los amplificadores por PCR de la región 5.8S-ITS del ADN extraído de las colonias aisladas, en carriles M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7. Carril L: Marcador de peso molecular 100 pb. Carril Bt: *Brettanomyces bruxelensis*. Carril Sch: *Saccharomyces cerevisiae*. Carril (-): Negativo.

En la Figura 3, se puede observar que todos los tamaños de los productos de amplificación de las muestras analizadas, desde el carril M1 al M7, presentan similar migración de bandas, coincidiendo con el amplificado de *Brettanomyces bruxelensis* (Esteve-Zarzoso *et al.*, 1999). El tamaño de los amplificadores es de aproximadamente de 485 pb, lo que no concuerda con el tamaño de amplificación de *Candida spp.* que según señala Esteve-Zarsoso *et al.*, (1999) es de 750 pb, ni tampoco con el amplificado correspondiente a *Saccharomyces cerevisiae*, cuyo tamaño de migración es de alrededor de 880 pb.

Los controles positivos correspondieron a levadura *Saccharomyces cerevisiae*, muestra de comercialización industrial y levadura *Brettanomyces bruxellensis*, muestra de ADN aislada en Chile que fue comparada mediante su secuenciación de nucleótidos con el banco de genes del National Center For Biotechnology Information (2009). (Anexo III).

De las 90 muestras analizadas en todas se observó el mismo amplificado, por lo que para la fotografía del gel de poliacrilamida se eligió una muestra representativa de ADN, sólo de las primeras siete muestras.

Fragmentos de Restricción (RFLP)

Para la identificación de levaduras, los amplificadores fueron digeridos con dos enzimas de restricción que correspondieron a *Hae III* y *Hinf I*.

Los resultados de los perfiles de restricción mediante el uso de la endonucleasa *Hae III* se muestran en la Figura 4.

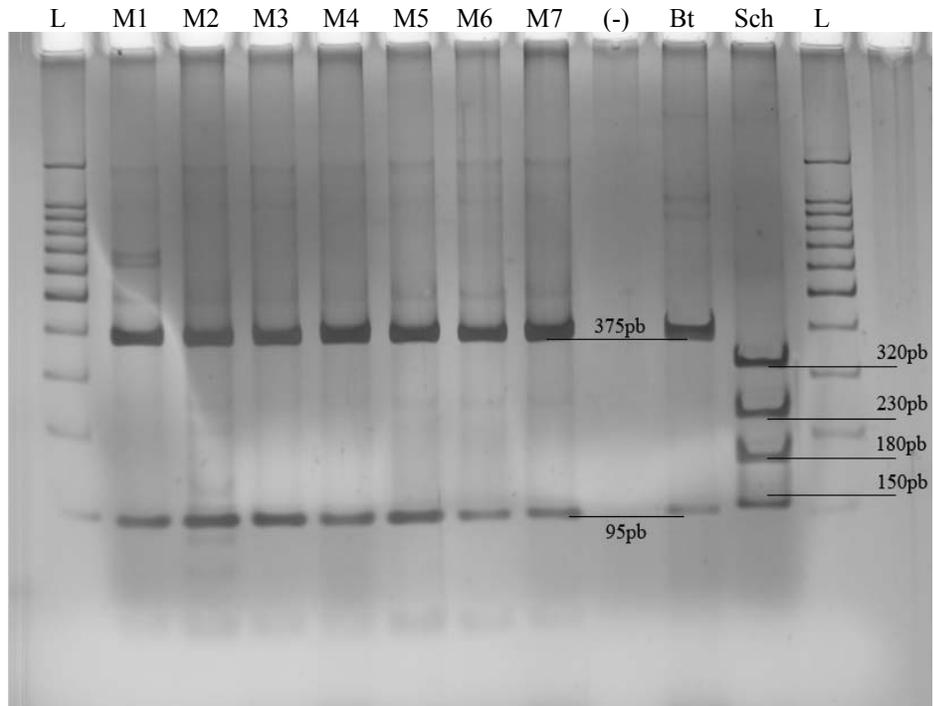


Figura 4. Minigel de poliacrilamida de los perfiles de restricción, de los amplificadores de la región 5.8S-ITS digeridos con *Hae III*. Carril L: Marcador de peso molecular 100 pb. Carril Bt: *Brettanomyces bruxelensis*. Carril Sch: *Saccharomyces cerevisiae*. Carril (-): Negativo.

Como se puede ver en la Figura 4, los fragmentos de restricción obtenidos con la endonucleasa *Hae III*, para las muestras analizadas, presentan el mismo perfil de migración, las cuales coinciden con el perfil de *Brettanomyces bruxelensis* y que corresponden aproximadamente a 375 y 95 pb, esto a diferencia del perfil obtenido por *Saccharomyces cerevisiae* que se presenta con cuatro bandas aproximadamente en los 320, 230, 180 y 150 pb, y lo cual tampoco coincide con el perfil de migración de *Candida spp.* que corresponde a 730 o 700 pb, dependiendo de la cepa, como lo que reportó Esteve-Zarsoso *et al.* (1999).

La digestión con *Hae III* se aplicó a las 90 muestras, de las cuales en todas se observó la misma migración.

Hasta esta etapa, los análisis moleculares PCR, y la digestión con la enzima *Hae III* muestran que todas las muestras de vino estaban contaminadas con la levadura *Brettanomyces bruxellensis*, pero se realizó una prueba complementaria de digestión con la endonucleasa de restricción *Hinf I*.

Los resultados de los perfiles de restricción mediante el uso de la endonucleasa *Hinf I* se muestran en la Figura 5.

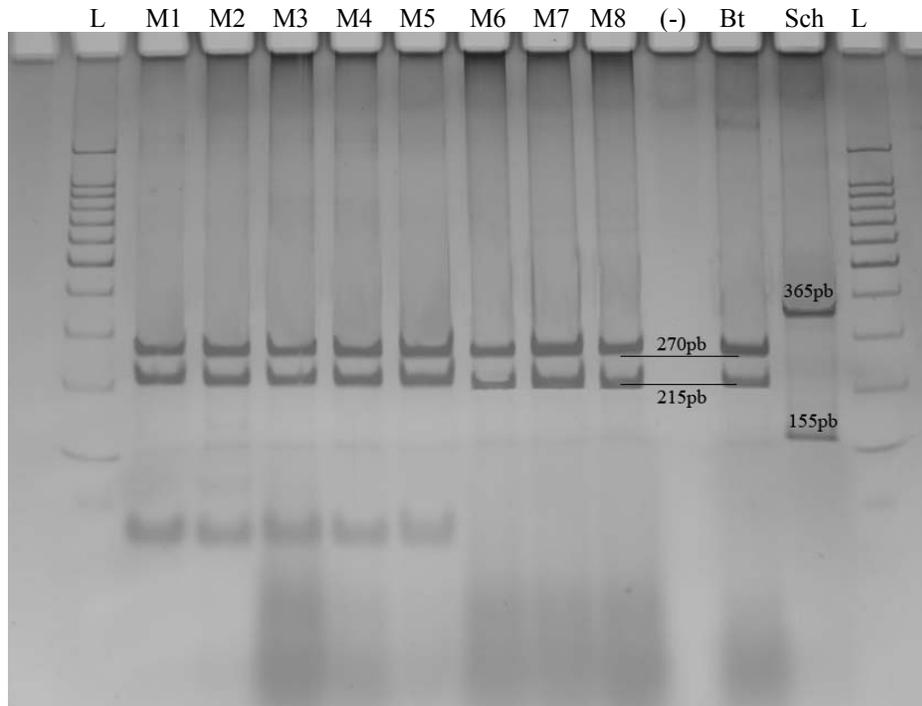


Figura 5. Minigel de poliacrilamida de los perfiles de restricción de los amplificadores de la región 5.8S-ITS digeridos con *Hinf I*. Carril L: Marcador de peso molecular 100 pb. Carril Bt: *Brettanomyces bruxellensis*. Carril Sch: *Saccharomyces cerevisiae*. Carril (-): Negativo.

Con el uso de la endonucleasa *Hinf I*, se generan perfiles de migración similares en todas las muestras y que a la vez concuerdan con el perfil de *Brettanomyces bruxellensis*, el cual corresponde a 270 y 215 pb. No se observan perfiles correspondientes a *Candida spp.* los cuales corresponden a 390, 190 ó 195 (dependiendo de la cepa) y 160 pb según reportó Esteve-Zarsoso *et al.* (1999), y tampoco se observan perfiles coincidentes con *Saccharomyces cerevisiae* que corresponden a 365 y 155 pb.

La digestión con *Hinf I* se aplicó a las 90 muestras, de las cuales en todas se observó la misma migración.

Los tamaños aproximados en pb de los amplificadores de ADN de las colonias extraídas de las muestras de vino y de sus diferentes fragmentos de restricción obtenidos con el uso de endonucleasas *Hae III* y *Hinf I* se resumen en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Tamaño en pares de bases (pb) de los amplificadores y de los fragmentos de restricción obtenidos.

Nº Muestra	Producto PCR	<i>Hae III</i>	<i>Hinf I</i>
M1 (6 colonias)	485	375 + 95	270 + 215
M2 (6 colonias)	485	375 + 95	270 + 215
M3 (6 colonias)	485	375 + 95	270 + 215
M4 (6 colonias)	485	375 + 95	270 + 215
M5 (6 colonias)	485	375 + 95	270 + 215
M6 (6 colonias)	485	375 + 95	270 + 215
M7 (6 colonias)	485	375 + 95	270 + 215
M8 (6 colonias)	485	375 + 95	270 + 215
M9 (6 colonias)	485	375 + 95	270 + 215
M10 (6 colonias)	485	375 + 95	270 + 215
M11 (6 colonias)	485	375 + 95	270 + 215
M12 (6 colonias)	485	375 + 95	270 + 215
M13 (6 colonias)	485	375 + 95	270 + 215
M14 (6 colonias)	485	375 + 95	270 + 215
M15 (6 colonias)	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 2.

Cuadro 2. Productos amplificados y fragmentos de restricción *Hae III* y *Hinf I* obtenidos por Esteve-Zarzoso *et al.* (1999) para especies sospechosas de alteraciones incluidas *Brettanomyces sp.*, *Candida spp.* y *Saccharomyces cerevisiae*.

Especie	Producto amplificado	<i>Hae III</i>	<i>Hinf I</i>
<i>Dekkera anomala</i>	800	800	360+190+160+80
<i>Brettanomyces bruxelensis</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

Analizando el Cuadro 1 de los productos amplificados (PCR) y fragmentos de restricción (RFLP) de las 15 muestras de vino, con el Cuadro 2, correspondiente a los posibles microorganismos contaminantes, se puede observar que el tamaño del producto amplificado de las muestras coincide con el de *Brettanomyces bruxelensis*, el cual corresponde a 485 pb, así mismo el tamaño de los fragmentos de restricción generado por las endonucleasas

HaeIII y *Hinf I* en las 15 muestras de vino, también coincide con los perfiles de restricción de *Brettanomyces bruxelensis*.

Todo esto indica que en el caso de esta investigación todas las muestras de vino recolectadas, que fueron reconocidas sensorialmente como “Brett” por los enólogos de las bodegas de origen, estaban contaminadas sólo con *Brettanomyces bruxelensis*, ya que en ningún caso se detectó la presencia de la levadura *Candida spp.* a diferencia de lo que reportó Humeres (2006).

Evaluación sensorial

Las quince muestras de vino fueron sometidas a la evaluación sensorial utilizando una pauta no estructurada (Anexo II), con escala de cero a quince, analizando los tres parámetros sensoriales aromáticos correspondientes de “Brett”, olor animal, tempera y medicinal.

Las evaluaciones sensoriales fueron llevadas a cabo por un panel de diez personas entrenadas, y especializadas en la característica sensorial aromática de “Brett”.

Las quince muestras de vino recolectadas para esta investigación correspondieron a diferentes cepas de vinos las cuales se detallan en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Cepas de vino de las quince muestras recolectadas.

Muestras	Cepas
M1	<i>Carménère</i>
M2	<i>Carménère</i>
M3	<i>Petit Verdot</i>
M4	<i>Petit Verdot</i>
M5	<i>Petit Verdot</i>
M6	<i>Petit Verdot</i>
M7	<i>Cabernet Sauvignon</i>
M8	<i>Cabernet Sauvignon</i>
M9	<i>Cabernet Sauvignon</i>
M10	<i>Syrah</i>
M11	<i>Merlot</i>
M12	<i>Merlot</i>
M13	<i>Merlot</i>
M14	<i>Merlot</i>
M15	<i>Merlot</i>

Las distintas cepas de las muestras de vino recolectadas, presentaron diferencias al ser analizados estadísticamente los resultados obtenidos de las evaluaciones sensoriales.

Los resultados de las evaluaciones sensoriales se pueden observar en la Figura 5.

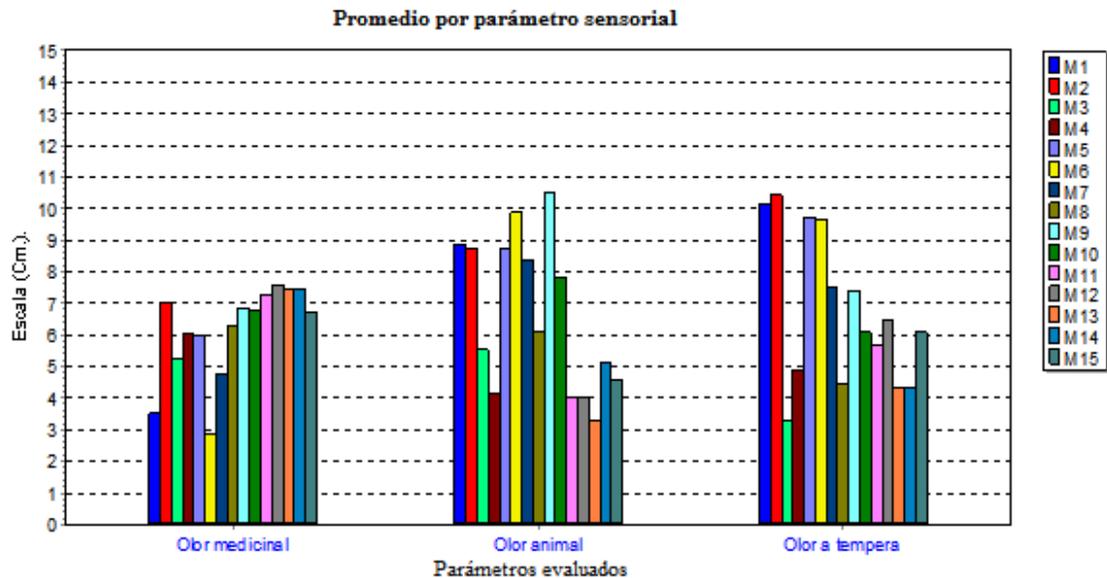


Figura 5. Gráfico de los promedios de cada muestra de vino para los tres parámetros sensoriales analizados, resultantes de la evaluación sensorial de las quince muestras de vino, evaluados en una escala de cero a quince cm.

Como se puede observar en la Figura 5, en términos generales el parámetro sensorial analizado en que los promedios son más homogéneos entre las muestras, son para el parámetro olor medicinal, a diferencia de los parámetros olor animal y a tempera en que los promedios de las muestras son muy dispares entre sí. Esto se verá reflejado en la Figura 6, donde los datos fueron analizados bajo análisis de varianza (ANDEVA).

Esto puede deberse a que el parámetro olor medicinal, es reconocido por los evaluadores como característica sensorial a “Brett” en todas las cepas de vinos analizadas en este estudio, en cambio para los parámetros olor animal y a tempera, las características propias aromáticas de cada cepa de vino, hagan cambiar la percepción sensorial de los evaluadores.

Cabe señalar que en la sección de la pauta de evaluación sensorial, para comentarios adicionales, seis de los diez evaluadores concordaron que las muestras M1, M5, M6, M8, M9, M11, M12, M13 y M15 tenían caracteres sensoriales de ácido acético y oxidación.

Brettanomyces bruxelensis, además de producir la formación de fenoles volátiles (4-etilfenol y 4-etilguayacol) y tetrahidropiridinas, es capaz de producir niveles elevados de

ácidos volátiles, entre 0,7 y 1,1 g/L, donde el 90% de los ácidos está constituido por el ácido acético, esta misma capacidad se ha descrito en *Candida spp.* (Carrascosa *et al.*, 2005).

Además, como reportaron Días *et al.* (2003), existen algunas cepas de *Candida spp.* capaces de convertir el ácido p-cumárico en 4-etilfenol, aunque no con la misma eficacia con que lo realiza *Brettanomyces bruxelensis*.

Estas dos condiciones (producción elevada de ácido acético y producción de 4-etilfenol), puede que sea la razón, en algunos casos, de la confusión sensorial aromática de vinos contaminados ya sea con *Brettanomyces spp.* o *Candida spp.*

En esta investigación sólo se reportó la presencia de *Brettanomyces bruxelensis*, pero en el caso de Humeres (2006), se reportó mediante pruebas moleculares la presencia de *Brettanomyces spp.* y *Candida spp.* cuando sensorialmente se reconoció los mismos parámetros aromáticos en las muestras de vino recolectadas.

En el análisis estadístico se buscó correlacionar el microorganismo identificado como contaminante en las quince muestras de vino recolectadas, que correspondió a *Brettanomyces bruxelensis*, con uno o más de los parámetros investigados reconocidos como patrones descriptores aromáticos de “Brett”, que fueron olor medicinal, tempera y animal.

Los diez evaluadores presentaron una respuesta uniforme ante la evaluación sensorial, lo que se vio reflejado al aplicar TUKEY y DUNCAN, por lo que las respuestas del panel fueron estadísticamente representativas.

Los resultados obtenidos en el análisis de varianza (ANDEVA), entre los datos recopilados en los análisis sensoriales de las muestras de vino y los patrones sensoriales analizados se muestran a continuación en la Figura 6.

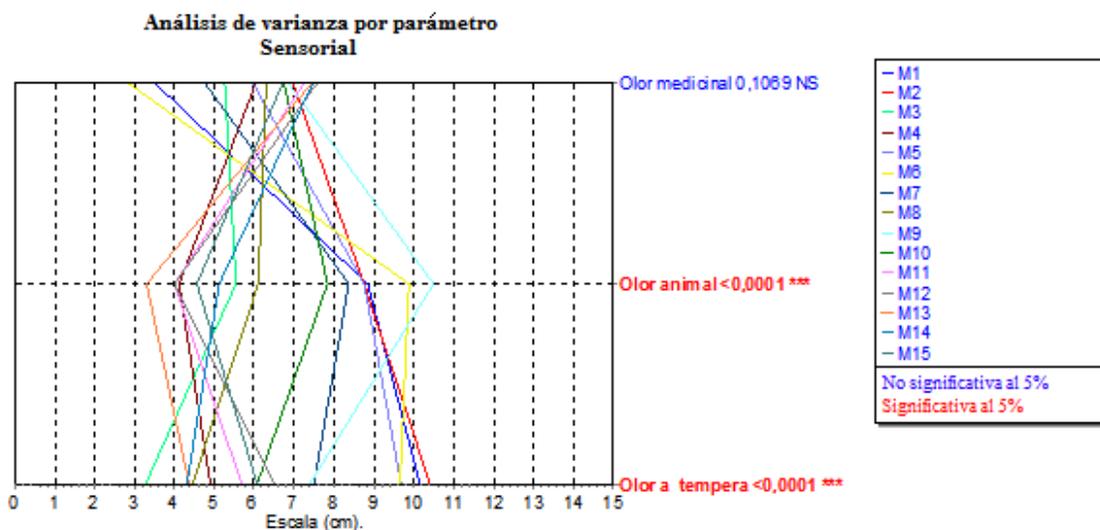


Figura 6. Análisis de varianza, entre los promedios obtenidos en los análisis sensoriales de las muestras de vino y los parámetros sensoriales analizados. Nivel de confianza del 5%. Escala de evaluación sensorial de cero a quince cm.

En la Figura 6, se muestra que para el análisis de varianza a un nivel de confianza de 5%, el único parámetro sensorial que no presenta diferencia significativa entre todas las muestras de vino correspondientes a diferentes cepajes, es el olor medicinal. Para los parámetros olor animal y olor a tempera existe diferencia significativa entre las muestras.

Lo anterior indica que el parámetro olor medicinal, aunque no presente los promedios más elevados en los resultados obtenidos de las evaluaciones sensoriales, fue el único reconocido por todos los panelistas en forma uniforme para todas las cepas de vinos recolectadas.

Si bien en el primer análisis de varianza se involucró los promedios de todas las cepas por igual, se pudo observar que cuando el mismo análisis de varianza se realizó, analizando los mismos parámetros sensoriales, pero separando las muestras de acuerdo a cepas iguales los resultados se uniformizaron en la mayoría de los casos como se muestran en las Figuras 7, 8, 9 y 10.

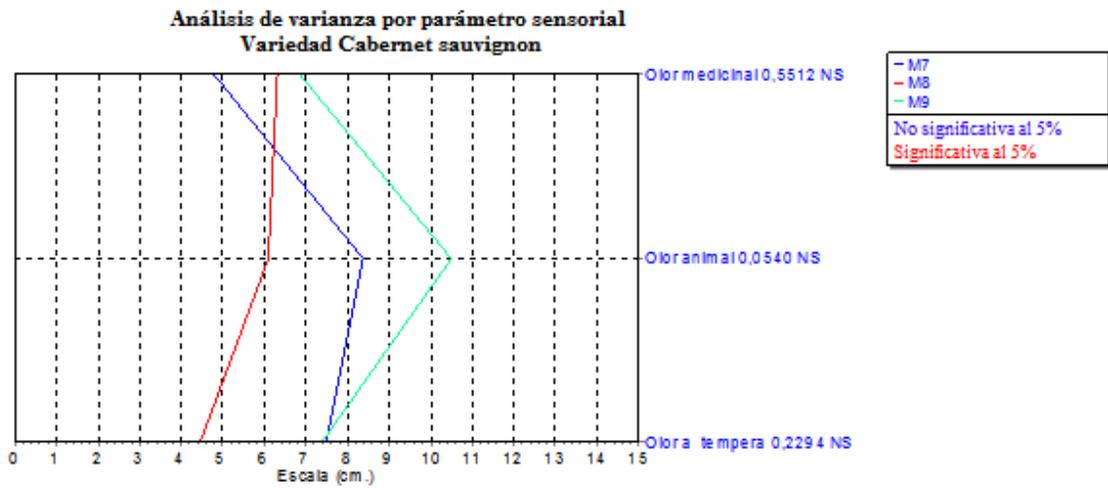


Figura 7. Análisis de varianza, entre los promedios obtenidos en los análisis sensoriales de las muestras de vino cepa *Cabernet sauvignon* y los parámetros sensoriales analizados. Nivel de confianza del 5%. Escala de evaluación sensorial de cero a quince cm.

Como se observa en la Figura 7, al realizar análisis de varianza entre los promedios de las muestras de la cepa *Cabernet Sauvignon* y los parámetros sensoriales analizados, no existen diferencias significativas.

Cabe destacar que el parámetro que obtuvo los mayores promedios en las muestras de esta cepa, fue el olor animal.

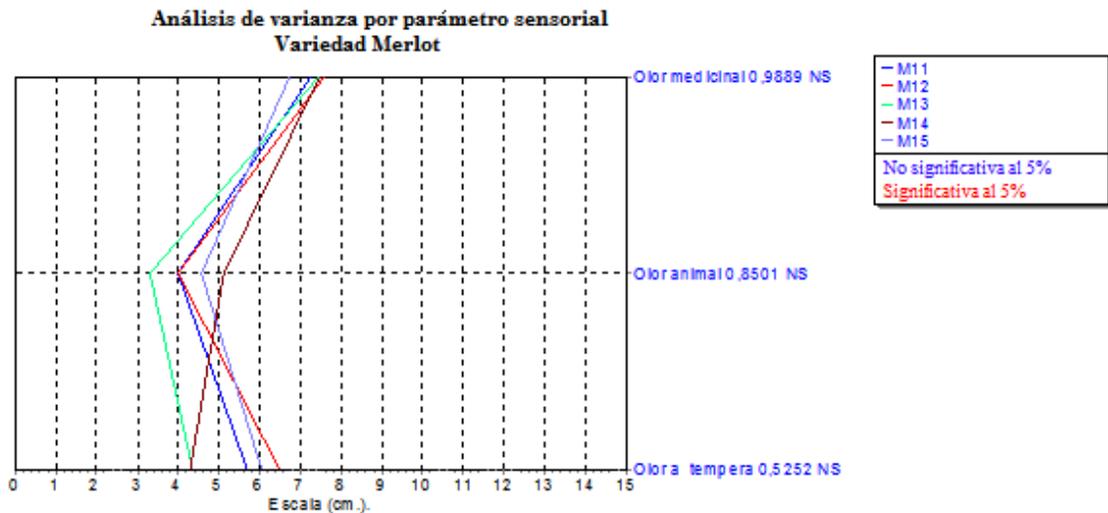


Figura 8. Análisis de varianza, entre los promedios obtenidos en los análisis sensoriales aromáticos de las muestras de vino cepa *Merlot* y los parámetros sensoriales analizados. Nivel de confianza del 5%. Escala de evaluación sensorial de cero a quince cm.

Como se observa en la Figura 8, al realizar análisis de varianza entre los promedios de las muestras de la cepa *Merlot* y los parámetros sensoriales analizados, no existen diferencias significativas.

Para esta cepa el parámetro que mostró los mayores valores fue el olor medicinal.

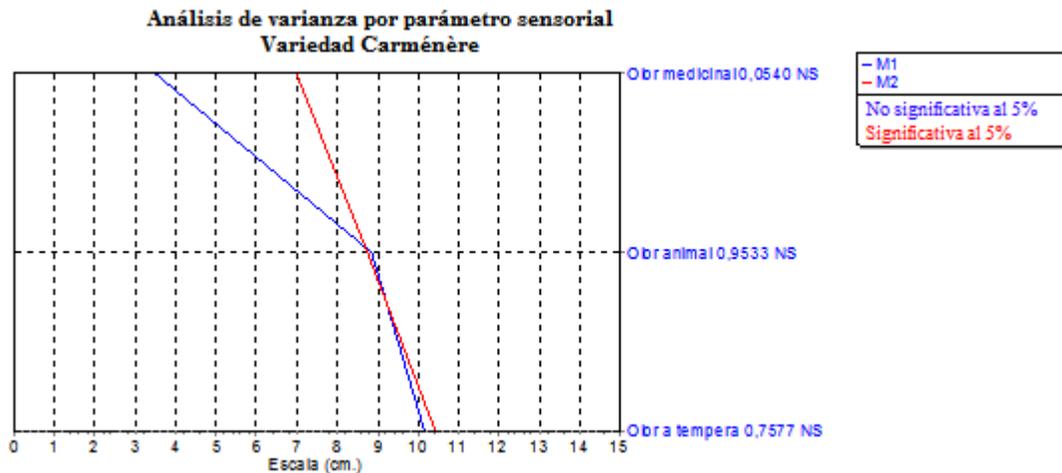


Figura 9. Análisis de varianza, entre los promedios obtenidos en los análisis sensoriales aromáticos de las muestras de vino cepa *Carménère* y los parámetros sensoriales analizados. Nivel de confianza del 5%. Escala de evaluación sensorial de cero a quince cm.

Como se observa en la Figura 9, al realizar análisis de varianza entre los promedios de las muestras de la cepa *Carménère* y los parámetros sensoriales analizados no existe diferencia significativa.

Para esta cepa el parámetro sensorial predominante fue el olor a tempera.

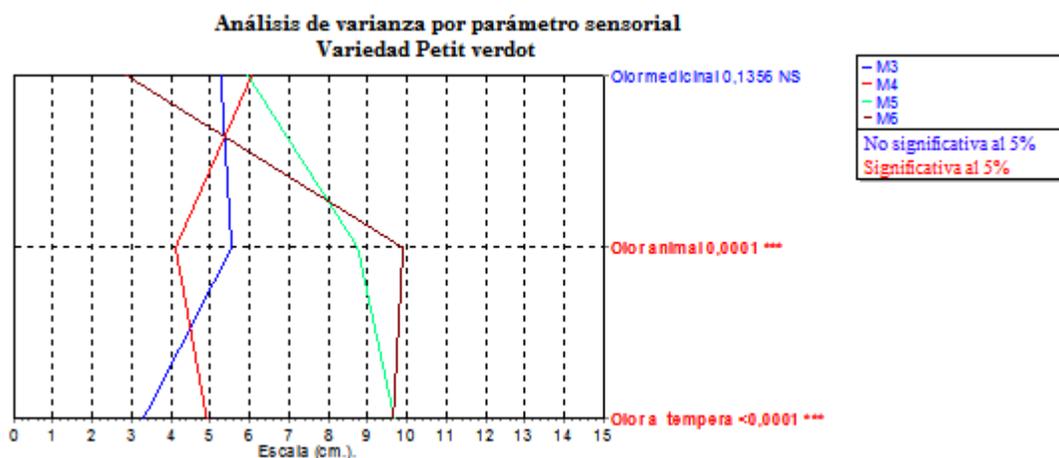


Figura 10. Análisis de varianza, entre los promedios obtenidos en los análisis sensoriales aromáticos de las muestras de vino cepa *Petit Verdote* y los parámetros sensoriales analizados. Nivel de confianza del 5%. Escala de evaluación sensorial de cero a quince cm.

En la Figura 10, se observa que al realizar análisis de varianza entre los promedios de las muestras de la cepa *Petit Verdote* y los parámetros sensoriales analizados no existe diferencia significativa solo para el parámetro olor medicinal, y para los parámetros olor a tempera y animal existe diferencia significativa. Este resultado pudo deberse a que la cepa *Petit Verdote*, es una cepa de muy poca vinificación en Chile y no es una cepa de amplio consumo, por lo cual los evaluadores pudieron no reconocer uniformemente los parámetros.

El análisis de varianza no se pudo llevar a cabo con la cepa *Syrah*, ya que solo se dispuso de una sola muestra.

Los resultados de los análisis de varianza mostrados anteriormente señalaron que a pesar de que todas las muestras estaban contaminadas con *Brettanomyces bruxelensis*, sólo se vio uniformidad de los tres parámetros sensoriales cuando estos se analizaron a nivel de cepas iguales de vino.

Para el caso de la cepa *Cabernet Sauvignon* el olor predominante reconocido fue el olor animal, para el caso de la cepa *Merlot* el olor predominante fue medicinal y para la cepa *Carménère* fue el olor a tempera, sólo la cepa *Petit Verdote* fue la excepción, tal como se explicó anteriormente.

Cuando se analizaron estadísticamente los mismos parámetros sensoriales evaluando todas las muestras de vino, el único parámetro que mostró uniformidad entre los promedios obtenidos en el análisis sensorial fue el olor medicinal.

CONCLUSIONES

Utilizando métodos moleculares PCR-RFLP, en muestras de vino recolectadas y reconocidas organolépticamente con caracteres sensoriales “Brett”, fue posible identificar que el microorganismo contaminante es *Brettanomyces bruxelensis*, siendo nula la presencia de *Candida spp.* en todas las muestras de vino.

Dentro de los descriptores aromáticos de “Brett” (olor a tempera, animal y medicinal), es difícil correlacionar solo uno de ellos con *Brettanomyces bruxelensis*, ya que esto está estrechamente relacionado con la cepa de vino que se encuentre contaminada, variando la percepción de la intensidad de cada descriptor aromático para cada cepa de vino, aunque sea el mismo microorganismo el causante del defecto.

Aunque la percepción del carácter sensorial “Brett” varíe con cada cepa de vino, el descriptor aromático olor medicinal, es reconocido como una componente constante en la composición aromática en las muestras de vino contaminadas, esto puede ser útil al momento de tratar de discriminar mediante parámetros aromáticos, el origen o la causa de muestras contaminadas de distintas cepas de vino.

Es posible que si se trata de distintas cepas de levaduras del género *Brettanomyces spp.*, probablemente también existan diferencias importantes en la percepción sensorial de las muestras contaminadas y ese es un tópico que se debería investigar.

BIBLIOGRAFIA

American Type Culture Collection 1998. Catalogo A.T.C.C. (en línea). Disponible en: <http://www.atcc.org>. Leído 2 agosto 2009.

Auger, J. 2002. Guía 9, Virus Fitopatógenos. Cátedra Fitopatología General, Departamento de Sanidad Vegetal, Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile. 12 p.

Carrascosa, A., R. González, R. Muñoz. 2005. Microbiología del Vino. A. Madrid Vicente Ediciones. Madrid, España. 398 p.

Catalán, L. 2003. Aislamiento y determinación 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 anomalous* in spoiled wines. Applied and Environmental Microbiology 70(3): 1347-1355.

Conterno, L., L. Joseph., T. Arvik., T. Henick-Kling and L. Bissom. 2006. Genetic and physiological characterization of *Brettanomyces bruxelensis* strains isolated from wines. American Journal of Enology and Viticulture 57(2):139-147.

Craig, J.T. and T. Heresztyn. 1984. 2-Ethyl-3,4,5,6-Tetrahidropiridina. And 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. Dubordieu, J. Boidron and M. Pons. 1992. The origin of ethylphenols in wines. Scientist Journal for Food and Agriculture 60:165-178.

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. Mailhiot, A. Morin, and C. Dubord. 1989. Wine yeast strain identification. American Journal of Enology and Viticulture 40(4):309-315.

Dias, L., S. Dias., T. Sancho., H. Stender., A. Querol., M. Malfeito-Ferreira, and V. Loureiro. 2003. Identification of yeasts isolated from wine-related environments and capable of producing 4-ethylphenol. Food Microbiology 20:567-574.

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. 783 p.

Fugelsang, K. 1997. Yeast and Molds. Pp.68-116. *In*: Fugelsang, K (ed). *Wine Microbiology*. Chapman and Hall, New York. 245p.

Heresztyn, T. 1986. Formation and substituted tetrahydropyridinas by species of *Brettanomyces* and *Lactobacillus* isolated from mousy wines. *American Journal of Enology and Viticulture* 37(2):127-132.

Hidalgo, J. 2003. *Tratado de Enología*. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, España. 1407 p.

Humeres, G. 2006. Determinación de levaduras *Brettanomyces spp* en vinos Chilenos a través de pruebas moleculares. Memoria Ingeniero Agrónomo. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agronómicas. Santiago, Chile. 32 p.

Ibeas, J., I. Lozano, F. Perdigones, and J. Jiménez. 1996. Detection of *Dekkera-Brettanomyces* strains in sherry by a nester PCR method. *Applied Environmental Microbiology*. 62(3):998-1003.

Luque, J. y A. Herráez. 2001. *Texto Ilustrado de Biología Molecular e Ingeniería Genética*, Ediciones Hardcourt, Madrid. 469 p.

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 win microorganisms during storage. *Letters in Applied Microbiology* 30:136-141.

National Center for Biotechnology Information. Gene Bank. Disponible en: <http://www.ncbi.com>. Leído el 10 de agosto 2009.

Navascues, E. 2007. Brettanomyces/Dekkera: Control y detección en bodegas. ACE revista de enología. Disponible en http://www.acenologia.com/ciencia78_2.htm. Leído el 4 de agosto.

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 28 de julio 2009

Oelofse, A., A, Lonvaud-Funel., M. Du Toit. 2009. Molecular identification of *Brettanomyces bruxelensis* strains isolated from red wines and volatile phenol production. Food Microbiology 26:377-385.

Ratón, T. 2004. Métodos Moleculares de identificación de levaduras de interés biotecnológico. Revista Iberoamericana de Micología 21:15-19.

Renouf, V. and A, Lonvaud-Funel. 2007. Development of an enrichment medium to detect *Dekkera/Brettanomyces bruxelensis*, a spoilage wine yeast, on the surface of grape berries. Microbiological research 162:154-167.

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 (*Triosterachilensis*). Microbial Ecology 44:365-371.

Satz, M.L. y A.R. Kornblihtt. 1993. La reacción en cadena de las polimeras. El método y sus aplicaciones. Ciencia Hoy 4(23).

Suárez, R., J.A, Suárez-Lepe., A, Morata., F. Calderon. 2007. The production of ethylphenols in wine by yeast of the genera *Brettanomyces* and *Dekkera*: A review. Food Chemistry 102:10-21.

Zoecklein, B., K. Fugelsang, B. Gump and F. Nury. 2001. Wine analysis and production. Chapman and Hall, New York. 621 p.

ANEXO I

Extracción de ADN de Levaduras

1. Inocular las levaduras (a partir de colonia) en un tubo de ensayo con 5 ml de YEPD
2. Incubar a 25°C durante 12h (o más si es necesario para un buen crecimiento)
3. Centrifugar 2 min. A 10.000 rpm. Eliminar sobrenadante.
4. Limpiar con 1,5 ml de agua (agitar con el vortex)
5. Centrifugar 2 min. A 10.000 rpm. Eliminar sobrenadante.
6. Añadir 500µl de **Tampón 1** (sorbitol 0,9 M, EDTA 0,1 M, pH 7,5), y resuspender las células, pipeteando con cuidado.
7. Añadir 30µl de solución de **Liticasa** (1,5 mg en 1300µl de T1)
8. Incubar la suspensión a 37° durante 20 min.
9. Centrifugar 2 min. A 10.000 rpm. Eliminar sobrenadante.
10. Resuspender las células en 500µl de **Tampón 2** (Tris 50mM pH 7,4, EDTA 20mM)
11. Añadir 13µl de **SDS 10%** y agitar.
12. Incubar 65°C durante 5 min.
13. Añadir 200µl de **Acetato de potasio 5M** y agitar bien. Incubar en hielo 15 min.
14. Centrifugar en frio 10 min. A 12.000 rpm (para precipitar bien el SDS)
15. Transferir el sobrenadante a otro Eppendorf con cuidado de no tomar nada de precipitado, añadir 700µl de **Isopropanol** e incubar a T° ambiente durante 5 min.
En este momento se puede parar la extracción y guardar los tubos a -20°C para continuar otro día.
16. Centrifugar 10 min. A 12.000 y eliminar el sobrenadante.
17. Añadir 500µl de **etanol 70%**
18. Centrifugar 5 min. A 12.000 rpm y eliminar el sobrenadante (se puede hacer un pulso con la centrífuga y eliminar el resto de sobrenadante con la punta de la pipeta)
19. Secar el pellet hasta que se vea transparente.
20. Resuspender el pellet en 30µl de **TE** (Tris 10mM, EDTA 1mM pH 7,4).

ANEXO II

Pauta no estructurada de degustación

Esta pauta fue desarrollada para describir el carácter organoléptico “Brett”, de acuerdo a tres parámetros sensoriales que corresponden a olor a tempera, olor animal y olor medicinal.

Evaluación sensorial aromática

Nombre: _____

Nº de muestra _____

Por favor, marcando con una línea vertical, la intensidad de su sensación para cada uno de los siguientes atributos:

Olores medicinales

| _____ |
| |
0 Sin olor Extremadamente intenso 15

Olores animales

| _____ |
| |
0 Sin olor Extremadamente intenso 15

Olores a tempera

| _____ |
| |
0 Sin olor Extremadamente intenso 15

