



Paisaje de La Rioja Alavesa

## Graves consecuencias sensoriales

I. Hernández y F. Barbero  
Departamento Técnico Guserbiot S.L.

# Brettanomyces bruxellensis en la bodega

*Brettanomyces/Dekkera bruxellensis* es una levadura contaminante con graves consecuencias sensoriales en vinos de alta calidad. En este artículo se describe brevemente su metabolismo y su ecología en las bodegas. Igualmente se comparan las técnicas utilizadas en los laboratorios para su detección y cuales son las limitaciones de los diferentes métodos. Finalmente se analizan las estrategias desarrolladas para su eliminación de las bodegas y se dan una serie de recomendaciones para su control.

El vino es un producto fermentado que se elabora a partir de materia prima sin tratar, se consume crudo y tiene un tiempo de almacenamiento prolongado, con el riesgo de sufrir contaminaciones microbiológicas, alterantes de su aroma y sabor.

La microflora presente en la uva está presente se mantiene al comenzar la vinificación, de tal manera que las levaduras *S. cerevisiae* que tiene la uva en

*S. cerevisiae* y *B. bruxellensis* tienen metabolismos similares, muy adaptados a las condiciones de vinificación

origen participan, junto con las añadidas en el cultivo iniciador, en la transformación del mosto en vino. Sin embargo, debemos ser conscientes de que junto con las levaduras beneficiosas también permanecen microorganismos que pueden perjudicar al vino.

El etanol producido durante la fermentación alcohólica impide el crecimiento de casi todas estas levaduras “indeseadas”. Sin embargo, *Brettanomyces/Dekkera bruxellensis* es capaz de resistir esta purga, siendo la causa de las mayores pérdidas en vinos envejecidos en barrica. Este artículo intenta aclarar algunos puntos sobre esta levadura, sobre su metabolismo y mostrar algunos de los pasos que se dan para combatirla.

### Taxonomía de *Brettanomyces*

La taxonomía científica sobre *Brettanomyces* ha cambiado en los últimos años. *Brettanomyces* está clasificado dentro de la misma familia que *Saccharomyces* (familia *Saccharomycetaceae*). Actualmente, dentro del género *Brettanomyces*, se aceptan cinco especies diferentes (*B. bruxellensis*, *B. anomalus*, *B. custersianus*, *B. nanas* y *B. naardensis*) (1). Las técnicas de biología molecular han demostrado que *B. inter-*

*medius*, *B. lambicus*, *B. custerseii* o *D. intermedia* son sinónimos de *B. bruxellensis* (2), por lo que estas denominaciones han quedado en desuso.

Los microorganismos de este género presentan dos formas, una capaz de reproducirse sexualmente (*Dekkera*) y otra que lo hace asexualmente (*Brettanomyces*). También se llaman, respectivamente, forma perfecta y forma imperfecta. En algunos casos, la forma perfecta y la imperfecta reciben nombres diferentes, como ocurre con *B. anomalus* y *D. anomala*. En otros casos el nombre es similar, como las pertenecientes a la especie *bruxellensis*, que pueden aparecer como *D. bruxellensis*, como *B. bruxellensis* o como *Dekkera/Brettanomyces bruxellensis*. A efectos prácticos en la bodega, estos dos estados son similares.

Cuando vemos referencias a *Brettanomyces* como contaminante, en la mayor parte de los casos se refieren a *Dekkera/Brettanomyces bruxellensis*, ya

**Tabla 1. Relación de los principales azúcares que pueden utilizar diferentes cepas de *B. bruxellensis* (3) y su concentración media en vino tinto (13).**

Fuente de carbono	<i>B. bruxellensis</i>	En vino(g/L)
Arabinosa	*	0,30
Citrato	*	0,20
Lactosa	*	Detc.
Manitol	*	0,21
Rafinosa	*	<0,5
Etanol	**	130,00
Glicerol	**	5,90
Lactato	**	3,10
Succinato	**	0,55
Malato	**	5,20
Galactosa	***	0,13
Celobiosa	***	Detc.
Maltosa	***	Trazas
Trealosa	***	0,30
Sacarosa	***	Trazas

\* Utilizable por entre 10-25 % de las cepas; \*\* Utilizable por entre 25-75 % de las cepas; \*\*\* Utilizable por entre 75-100 % de las cepas. Detc.: Detectados en vino.

## EN SÍNTESIS...

1. Brettanomyces/Dekkera bruxellensis puede sobrevivir y crecer tras la fermentación alcohólica, cuando no tiene competidores.
2. Algunas cepas de *B. bruxellensis* generan altas concentraciones de etil fenoles que aportan olores desagradables al vino
3. En la actualidad, tenemos técnicas moleculares que permiten detectarlo en el vino en pocas horas
4. Los estudios muestran que los focos de contaminación son diversos, aunque sería conveniente ampliar el estudio a otras añadas
5. La limpieza y la desinfección de instalaciones y unas correctas prácticas enológicas son las claves para prevenir el problema

que este es el responsable de las alteraciones en el vino.

### Características fisiológicas

*S. cerevisiae* y *B. bruxellensis* tienen metabolismos similares, muy adaptados a las condiciones de vinificación.

Tras la fermentación alcohólica, *S. cerevisiae* es la levadura mayoritaria debido a que las condiciones nutricionales del vino son muy estrictas (altas concentraciones de etanol y bajas concentraciones de nutrientes). En este momento, *Brettanomyces* continúa creciendo gracias a que utiliza nutrientes que *S. cerevisiae* no ha podido consumir, sobre todo algunos azúcares y fuentes de nitrógeno.

Una de las características que diferencia a *Brettanomyces* es la gran diversidad de azúcares que puede fermentar. Como se puede ver en la tabla 1, la mayoría de las cepas pueden crecer utilizando trealosa y celobiosa, azúcares

presentes en el vino y no consumibles por *S. cerevisiae* (3).

Otra de las ventajas que presenta frente a *S. cerevisiae* (y frente a la mayoría de las levaduras) es que puede utilizar los nitratos como fuente de nitrógeno (3). Debido a que *S. cerevisiae* sólo uti-

**Brettanomyces debe alcanzar una concentración mínima (denominada población crítica) de 103 UFC/mL para comenzar a liberar etil fenoles**

liza el nitrógeno amoniacal y los aminoácidos libres, estos se consumen con relativa rapidez. Al final de la fermentación el nitrógeno amoniacal es escaso y se favorece el crecimiento de las levaduras que pueden utilizar otras fuentes de nitrógeno. Además, *Brettanomyces* puede crecer con concentraciones de fosfato diamónico tan bajas como 0,5g/l, o a partir de diversos aminoácidos (3).

En resumen, *B. bruxellensis* crece más despacio que *S. cerevisiae*, es resistente a concentraciones altas de alcohol, puede utilizar otros azúcares como fuentes de energía y nitrato como fuente de nitrógeno. Esto explica que pueda reproducirse cuando la fermentación alcohólica ha terminado, a partir de nutrientes no consumibles por *S. cerevisiae* y cuando no tiene competidores.

### Producción de compuestos alterantes

Desde hace mucho tiempo se ha asociado la presencia de *Brettanomyces* con la aparición de olores extraños en el vino. La mayoría de los catadores definen estos olores como "a cuadra" o "a caballo". Generalmente, estos olores son atribuidos a etil fenoles derivados del metabolismo de *Brettanomyces*, como el 4-etilfenol (4-EP), 4-etilguaiacol (4-EG) o el 4-etilcatecol (4-EC). Las consecuencias de la presencia de estos compuestos dependen en gran medida de su

concentración en el vino. Por ejemplo, se detecta un defecto en el aroma si la concentración de 4-EP supera los 620 µg/l, pero este compuesto aporta notas favorables al aroma si su concentración es cercana a 400 µg/l. Son los denominados límites de tolerancia.

En vino, podemos detectar *Brettanomyces* en horas (mediante PCR) cuando la población está cercana a la población crítica para la producción de etil fenoles ( $10^3$  UFC/mL)

Cuando se comparan diferentes cepas de *Brettanomyces* se observan grandes diferencias en la producción de etil fenoles, por lo que podemos encontrar vinos con tasas altas de *Brettanomyces* pero que no presentan defectos sensoriales. Hay que señalar que *Brettanomyces* debe alcanzar una concentración mínima (denominada población crítica) de  $10^3$  UFC/ml para comenzar a liberar etil fenoles. Por debajo de esta concentración la levadura sería metabolitamente activa pero no produciría compuestos alterantes a niveles detectables.

### Ecología de *B. bruxellensis*

En la mayoría de los estudios se ha buscado *Brettanomyces* en el producto final (el vino), y son pocos los informes sobre el origen de la contaminación.

Los estudios sobre *Brettanomyces* en uva son escasos, pero, en general, los investigadores señalan que *Brettanomyces* está presente desde los estadios iniciales de la maduración de la uva, que su proporción respecto al total de microorganismos es pequeña y que se incrementa en casos donde la uva está dañada. Estudiando cuatro tipos de uva diferentes en tres bodegas, Reunouf y cols (4) no han encontrado relación entre el tipo de uva, la bodega y la presencia de *Brettanomyces* en uva.

Ya dentro de la bodega, Renouf y cols (4) han encontrado *Dekkera/Brettanomyces* en toda la cadena de elaboración, empezando en la uva, pasando por la maquinaria, los tanques de fermentación y acabando en el vino embotellado. Igualmente, las cubas de envejecimiento se han demostrado ser una fuente de contaminación importante, ya que son muy difíciles de limpiar y se utilizan de forma repetitiva, contaminando todos los

vinos que pasan por la cuba. Durante el envejecimiento del vino, las poblaciones de *Brettanomyces* serían máximas entre cinco y siete meses tras la vinificación. Finalmente, cuando se lavan las cubas tras retirar el vino, incluso el agua residual y las cañerías de desagüe contienen *Brettanomyces* (4).

El problema de *Brettanomyces* no es un problema que se da sólo en los vinos actuales. Analizando 20 añadas (entre 1909 y 2003) de cinco denominaciones diferentes de vinos franceses, en todas ellas se ha encontrado *Brettanomyces*. El tratamiento de *Brettanomyces* una vez que ha aparecido es complejo e implica una serie de riesgos para la calidad final del vino (*Brettanomyces* (4)).

### Métodos de detección

Los sistemas de detección más clásicos se basan en el aislamiento y cultivo de los microorganismos en medios selectivos o semi-selectivos, seguido de pruebas bioquímicas que confirmen la identidad de los microorganismos aislados. Se han desarrollado diversos medios de cultivo que tienen etanol como única fuente de carbono y p-cumárico para detectar la presencia de *Brettanomyces*, comprobando así la capacidad de producir 4-EP (5,6). Algunos autores han descrito protocolos que se basan en la inoculación directamente con vino de un medio de cultivo semi-selectivo (6). En la tabla 2

se describen las ventajas e inconvenientes de este tipo de métodos.

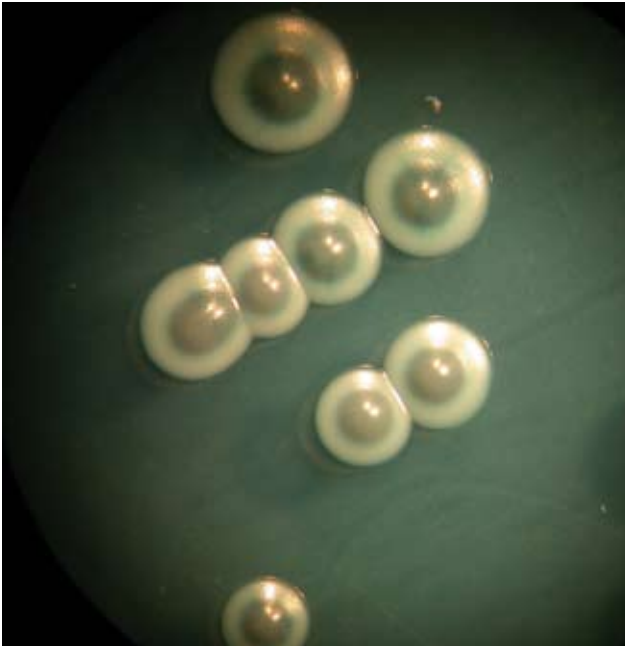
Actualmente, para identificar y diferenciar entre las especies de *Brettanomyces*, se utilizan las técnicas de biología molecular de forma rutinaria. Las más extendidas se centran en diferencias en la secuencia de RNA ribosómico (4, 7), pero también se han puesto a punto técnicas como el cariotipado, la secuenciación genética, RFLP, RAPD-PCR, intron-PCR o AFLP. La mayoría de los casos se requiere partir de cepas aisladas y crecidas en placa. Algunos autores han descrito protocolos de PCR que permiten identificar *Brettanomyces* en muestras de vino sin tener que aislar y crecer los microorganismos (4, 8). Estas técnicas sobre vino tienen límites de detección de aproximadamente  $10^3$  CFU/ml. Viendo en conjunto el límite de detección de las técnicas descritas, observamos que, en vino, podemos detectar *Brettanomyces* en horas (mediante PCR) cuando la población está cercana a la población crítica para la producción de etil fenoles ( $10^3$  UFC/ml). Sin embargo, necesitamos días (cultivos en placa) para poder detectarlo a concentraciones menores, en las que todavía no producen etil fenoles. La tabla 2 resume las ventajas e inconvenientes de cada metodología.

### Prevención y control de *Brettanomyces*

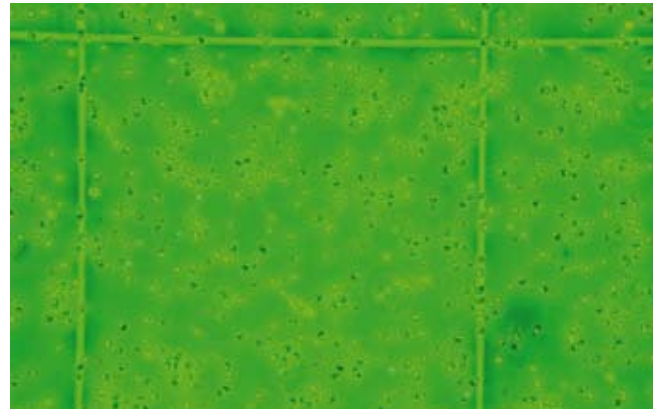
Uno de los grandes problemas con *Brettanomyces* es que es resistente a la

**Tabla 2. Análisis de algunos métodos para detectar *B. bruxellensis***

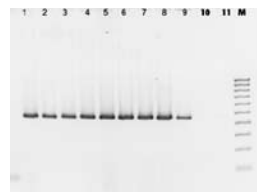
TÉCNICAS DE CULTIVO	TÉCNICAS DE PCR
A favor	A favor
-Fácil de interpretar	-Rápido (horas)
-No necesita personal especializado	-Específico
-Precio bajo	-Detecta VNC
-Cuantitativo	
En contra	En contra
-Tiempo hasta los resultados largo	-Requiere personal especializado y material costoso
-Posible contaminación	-No cuantifica
-No cuantifica VNC	-No diferencia vivas-muertas
	-Numero de células mínimo alto
VNC: microorganismos viables pero no cultivables	



Colonias de Brett en medio específico



Brettanomyces al microscopio (x400)



Identificación de Brettanomyces mediante PCR. Líneas 1-9: colonias aisladas de *B. bruxellensis*. Línea 10: *S. cerevisiae*. Línea 11: Agua. M: Marcador de tamaño (EZ Load 100 bp Molecular Ruler, Bio-Rad)

mayoría de los tratamientos de control microbiológico habituales en bodega, y que, al tener un metabolismo similar a *S. cerevisiae*, cualquier tratamiento tendiente a eliminar *Brettanomyces* afectará a la viabilidad de esta.

Conterno y cols. (3) estudiaron las características fisiológicas de 35 cepas de *B. bruxellensis*, encontrando que todas

### El tratamiento de Brettanomyces una vez que ha aparecido es complejo e implica riesgos para la calidad final del vino

podían reproducirse en medios con 10% de alcohol, el 94% crecían a pH=2.0 y el 30% pueden crecer a 10 °C. Tampoco se ven afectadas por el sulfitado, ya que el 49 % de las cepas crecían con concentraciones mayores de 30 mg SO<sub>2</sub>/l a pH=3.4, llegando incluso a 50 mg/l. Además, las cepas resistentes al SO<sub>2</sub> eran las mayores productoras de 4-EP y 4-EG. Ya que pueden reproducirse en el vino, hace falta un número muy pequeño de levaduras inicial para desencadenar el problema.

Ante esta situación, caben dos actitudes complementarias: la prevención para evitar el problema y el tratamiento cuando este ya ha aparecido. Los puntos clave para la prevención serían:

-La limpieza y desinfección de las instalaciones, incluyendo maquinaria,

depósitos, barricas, botellas y demás elementos de las bodegas. Una de las propiedades que hacen de *Brettanomyces* una levadura difícil de eliminar es su capacidad para formar biofilms. Los biofilms son agrupaciones de microorganismos que se fijan a las superficies, generando una intrincada red que sirve de "refugio" ante "agresiones" como los tratamientos de desinfección. Lucky Joseph y colaboradores (9) testaron diferentes agentes limpiadores con cepas de *Brettanomyces*, observando que los detergentes alcalinos y los basados en amonio cuaternario eran los preparados utilizables en bodega más efectivos para eliminar las células adheridas a la superficie. Estos investigadores sugieren que su uso frecuente puede evitar la formación de biofilms. También se han obtenido resultados esperanzadores para el control de *Brettanomyces* en barricas tratándolas con ozono (10). Se debe prestar especial atención al adecuado mantenimiento de las barricas, ya que son una fuente importante de contaminación y están mucho tiempo en contacto con el vino.

-Las uvas también pueden estar contaminadas con *Brettanomyces*. Sin embargo, la utilización de uva en buenas condiciones higiénicas reduciría parte del problema, porque ya hemos visto que la población es mayor en uva dañada que en uva sana.

-Se deben vigilar los niveles de azúcar residual en los vinos, ya que es mucho más fácil que aparezcan las levaduras alterantes en vinos con altos niveles de azúcares. Junto con la obtención de un vino "seco", el uso adecuado del SO<sub>2</sub> puede ayudarnos a la estabilización microbiológica de los vinos.

El tratamiento de *Brettanomyces* una vez que ha aparecido es complejo e implica una serie de riesgos para la calidad final del vino. Las condiciones que debería cumplir un tratamiento para ser considerado apropiado se pueden resumir en:

-Debe ser específico, ya que no debe eliminar las bacterias responsables de la fermentación maloláctica (o estas deben de ser sembradas a posteriori).

-Debe ser eficaz eliminando concentraciones muy pequeñas de *Brettanomyces*, para impedir que proliferen durante los largos tiempos de crianza.

-No debe modificar las características del mosto/vino. Esto descarta tratamientos donde se incrementa en exceso la temperatura o modifica el pH.

-Debe ser escalable con facilidad a nivel industrial, tener un costo razonable y no ser un tratamiento difícil de aplicar. Además, es de lógica que no debe ser tóxico para los consumidores y que debe de estar de acuerdo con la legislación. Bien por una legislación que los prohíbe o por cuestiones de imagen, añadir otros conser-

vantes/fungicidas químicos al vino (además del sulfitado) no es una opción real.

En un medio con tanto etanol como el vino, la sensibilidad de los microorganismos a la temperatura es muy alta. Por esta razón, Couto y col. (11) estudiaron la sensibilidad de *B. bruxellensis* y *B. anomalus* al calor, demostrando que en vinos modelo bastaba con menos de un segundo a 42 °C para eliminar el 99.9% de las células viables. En la misma línea de tratamientos físicos del vino está la tecnología de pulsos eléctricos de alto voltaje (PEAV), que se basa en aplicar al mosto campos eléctricos de alto voltaje de forma intermitente. Los campos eléctricos distorsionan la membrana externa de los microorganismos, reduciendo su viabilidad. Esta técnica ha sido probada con éxito para eliminar *D. anomala* en mosto comercial, pero también tiene puntos negros, ya que eliminaría de igual manera al resto de los microorganismos

que intervienen en la fermentación secundaria, en la fermentación maloláctica o en los procesos de envejecimiento.

La filtración a través de membranas de poro pequeño es otro de los recursos que se utilizan para eliminar *Brettanomyces* en los vinos, pero tiene el inconveniente de que el filtro puede retener compuestos que contribuyen a la calidad sensorial del vino. Además, durante la filtración se pueden perder parte de la fase volátil del vino. Por último, recordar que de nada vale filtrar si el depósito donde almacenamos el vino filtrado está contaminado con *Brettanomyces*.

Finalmente, el estudio del genoma de *Brettanomyces*, del cual conocemos casi la mitad de la secuencia completa (12), permitirá conocer mejor el metabolismo de esta levadura contaminante, y desarrollar nuevas armas específicas contra ella. Los resultados aportados hasta ahora son muy interesantes, explicando

algunas de las características fisiológicas de *Brettanomyces*, como la supervivencia en medios con poco nitrógeno asimilable o las rutas de degradación de azúcares diferentes a la glucosa. Cuanto más sepamos, más fácil nos será combatirla.

En general, el mundo enológico se ha dado cuenta de las dimensiones del problema que representa *Brettanomyces*, tanto por las pérdidas económicas que supone como por el daño en la imagen de la bodega. Las prácticas de prevención aquí descritas pueden reducir su incidencia, pero se antoja necesaria la implantación de un plan de control microbiológico de *Brettanomyces* antes y durante la elaboración del vino, así como previo al embotellado, para poder detectar y evitar los problemas antes de que sea tarde. **VTC**

#### >> Referencia bibliográfica de autores

La bibliografía completa de este artículo puede ser solicitada en [vinoteq@rbi.es](mailto:vinoteq@rbi.es)