

“Estrategias microbiológicas para el control y detección rápida de *Brettanomyces*”

Felipe Palomero Rodríguez

Dpto Tecnología de Alimentos ETSIAUPM

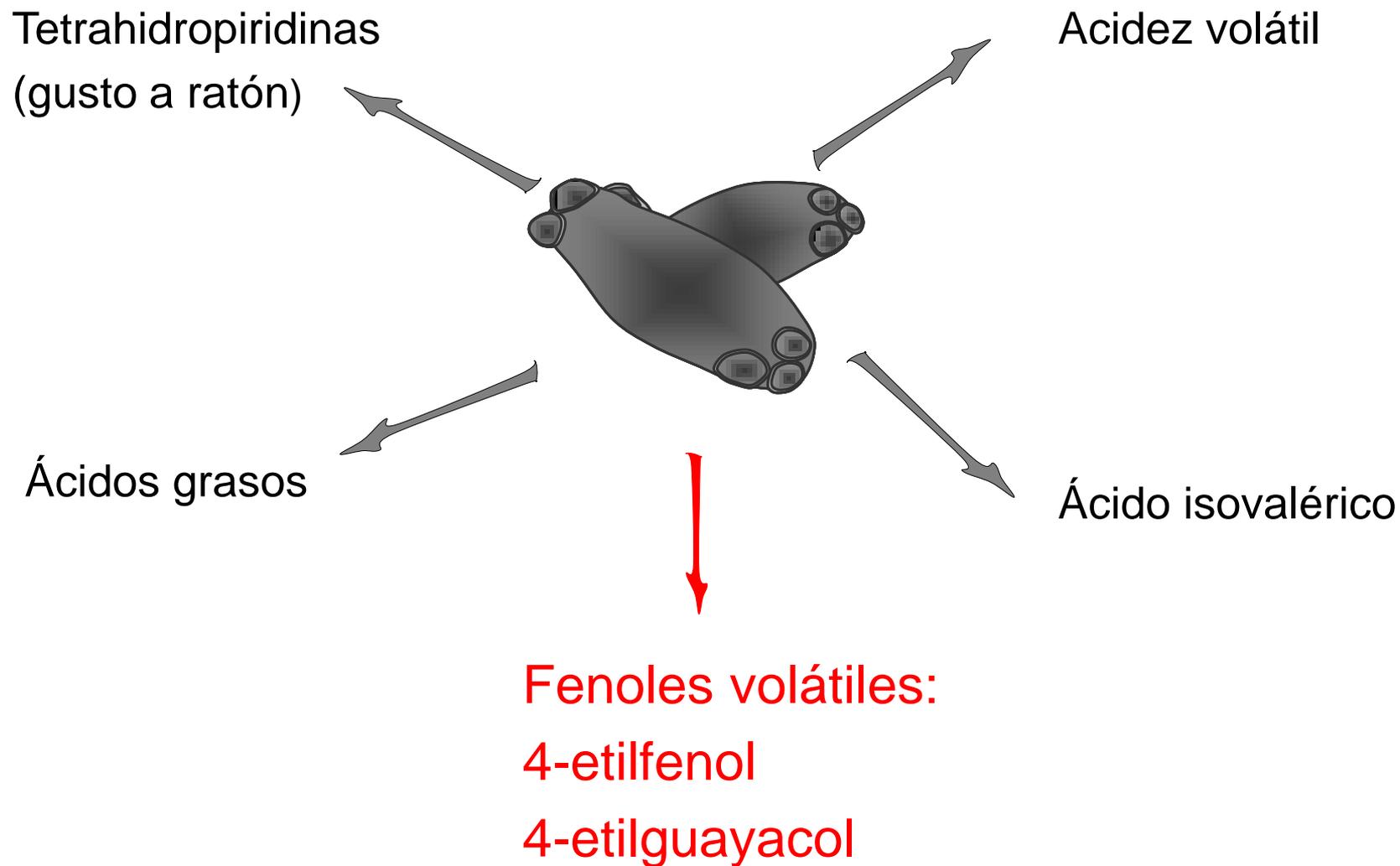
felipe.palomero@upm.es



PTV
PLATAFORMA
TECNOLÓGICA
DEL VINO



“Estrategias microbiológicas para el control y detección rápida de *Brettanomyces*”



Control de poblaciones de *Brettanomyces*

Estrategias preventivas

proteínas clarificantes

Gelatina

Filtraciones de membrana

Anhídrido sulfuroso

Dimetil carbonato (DMDC)

Chitosan

Presiones elevadas

DetECCIÓN DE POBLACIONES DE *BRETTANOMYCES*

Estrategias curativas

Membranas asociadas a osmosis inversa y adsorción

Carbón activo (30%)

PVPP (10 %)

Técnica de crianza sobre lías

Caseína o caseinato de potasio

Dilución con vino no alterado

Efectos colaterales

Reducción aromas

Reducción color

CONTROL

ESTRATEGIAS PREVENTIVAS

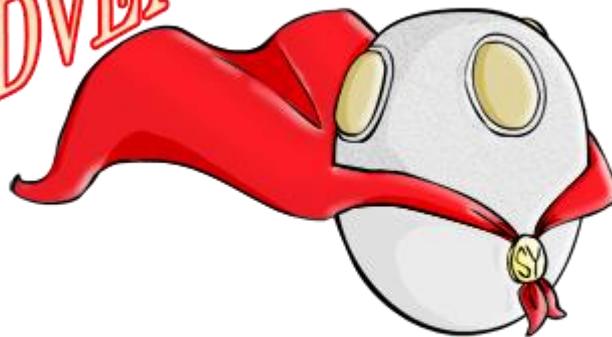
Reducción de EPs con levaduras HCDC+

DETECCIÓN

ESTRATEGIAS PREVENTIVAS/CURATIVAS

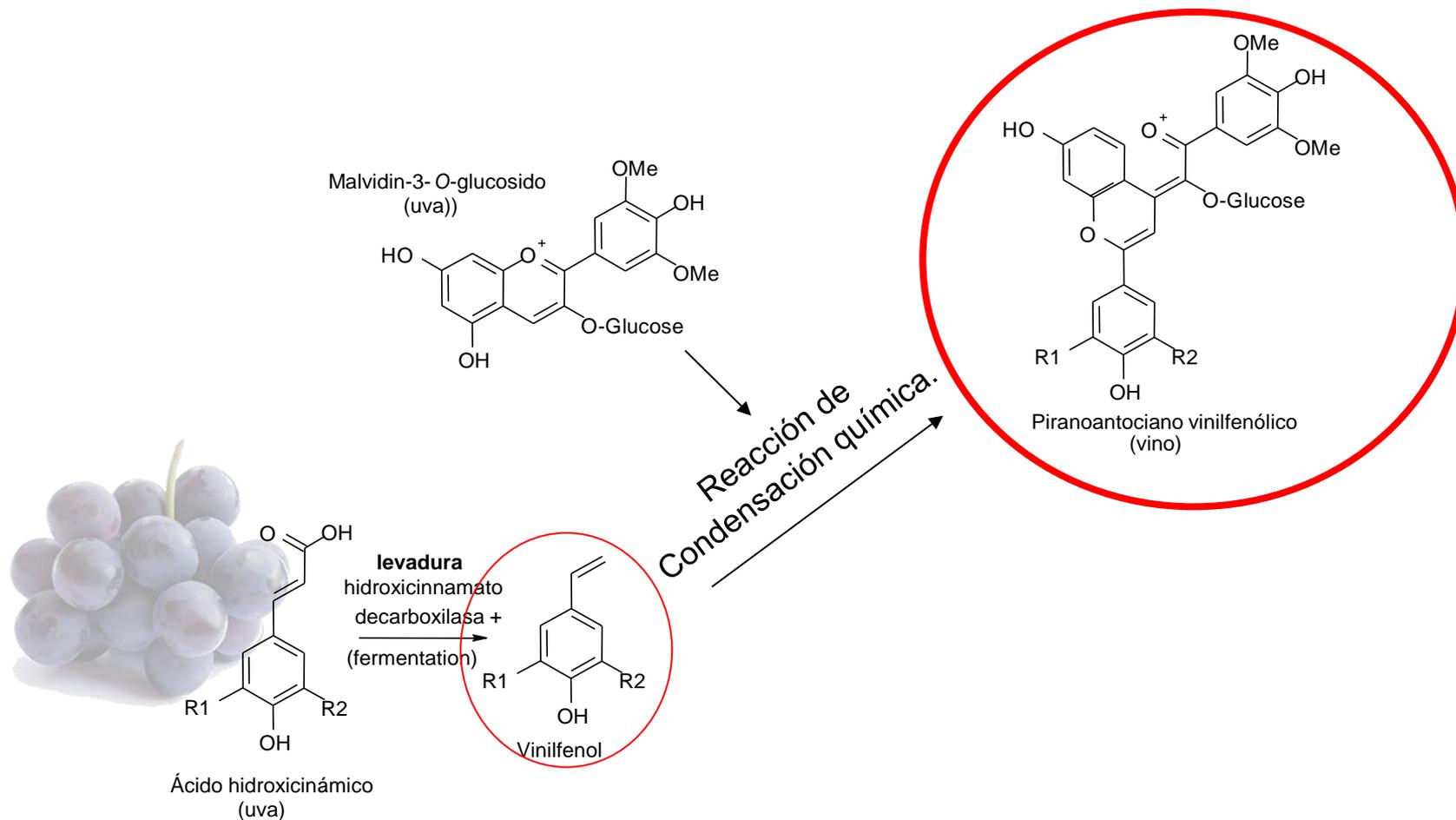
Método de Detección/Estimación de poblaciones

THE ADVENTURES OF...

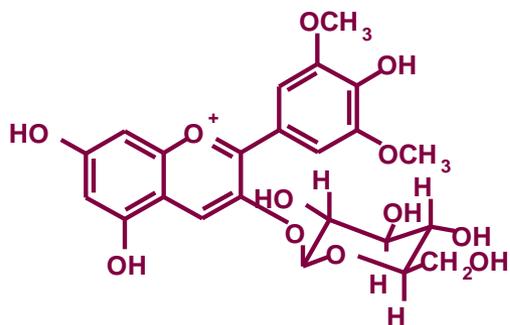


SUPER YEAST!

Reacciones de condensación

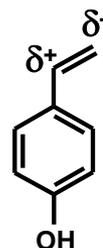


"Estrategias microbiológicas para el control y detección rápida de *Brettanomyces*"

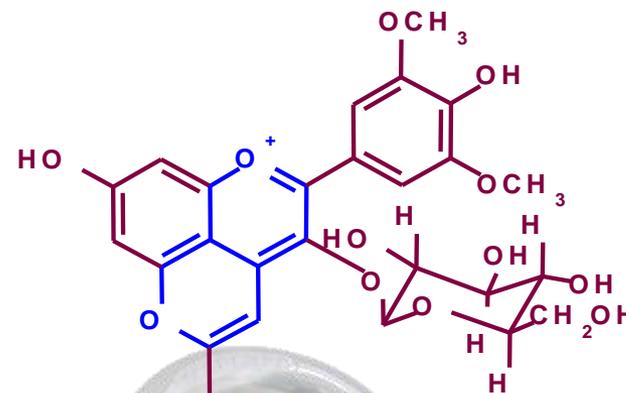


Malvidin-3-O-glucósido

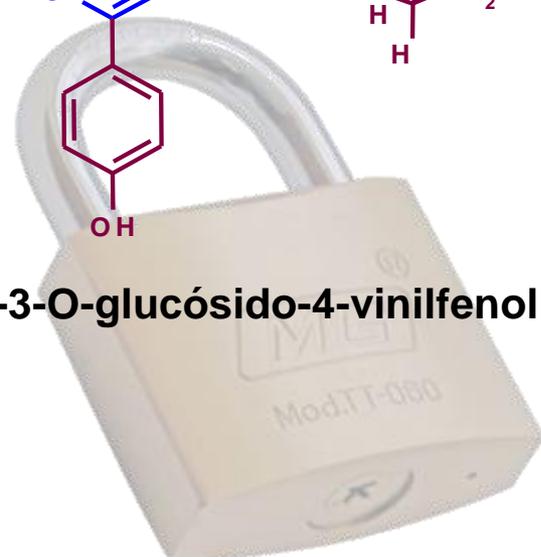
+



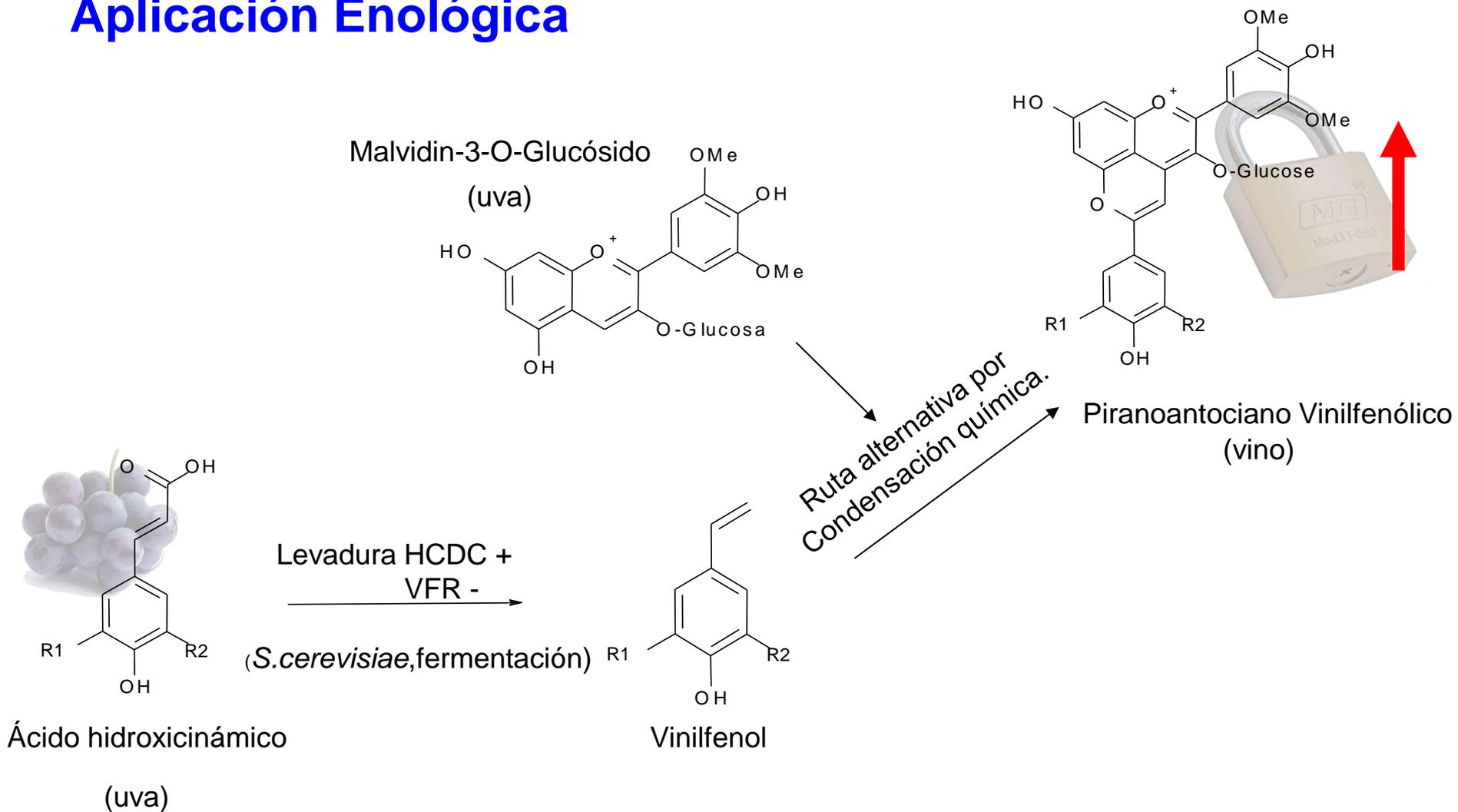
4-vinilfenol



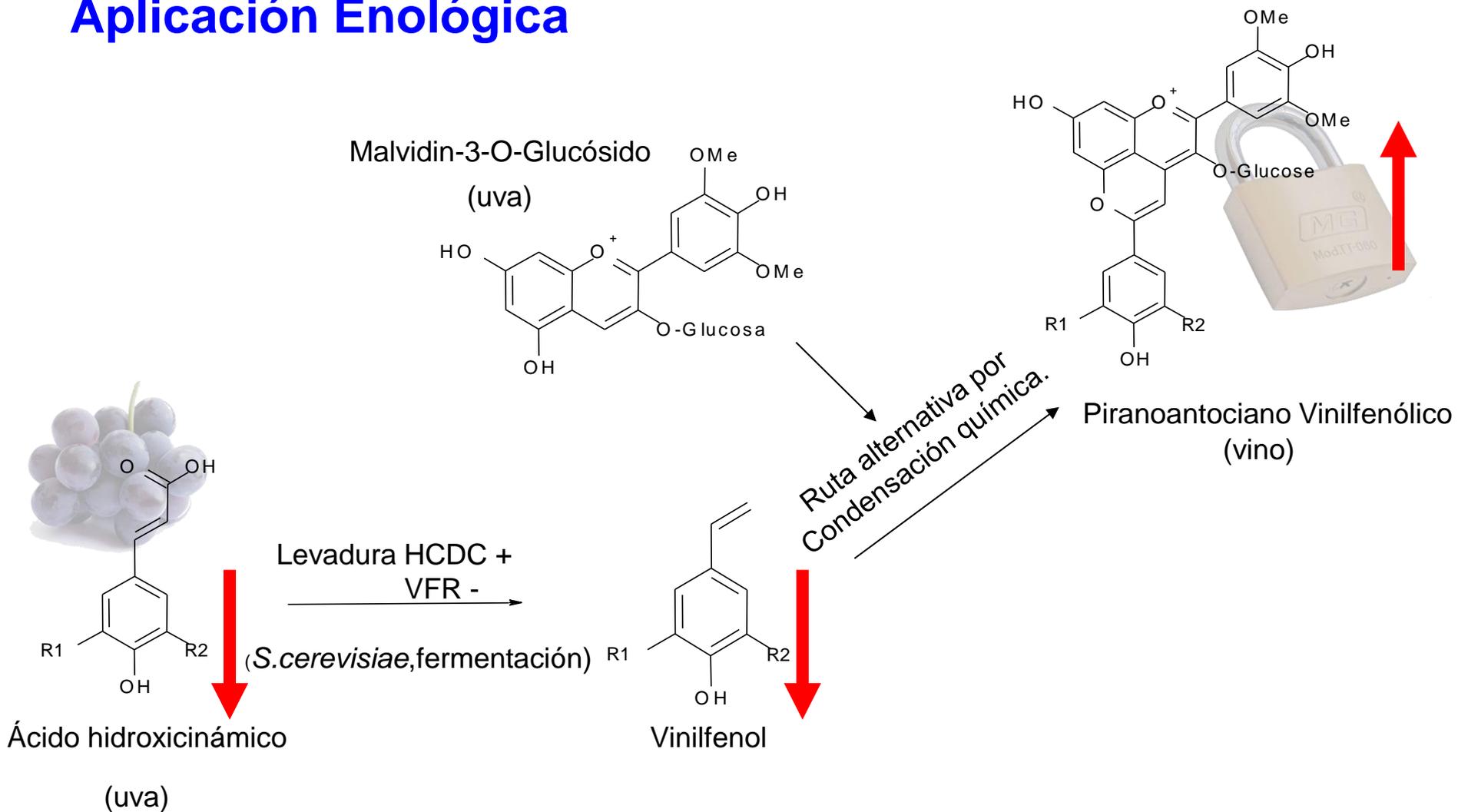
Malvidin-3-O-glucósido-4-vinilfenol



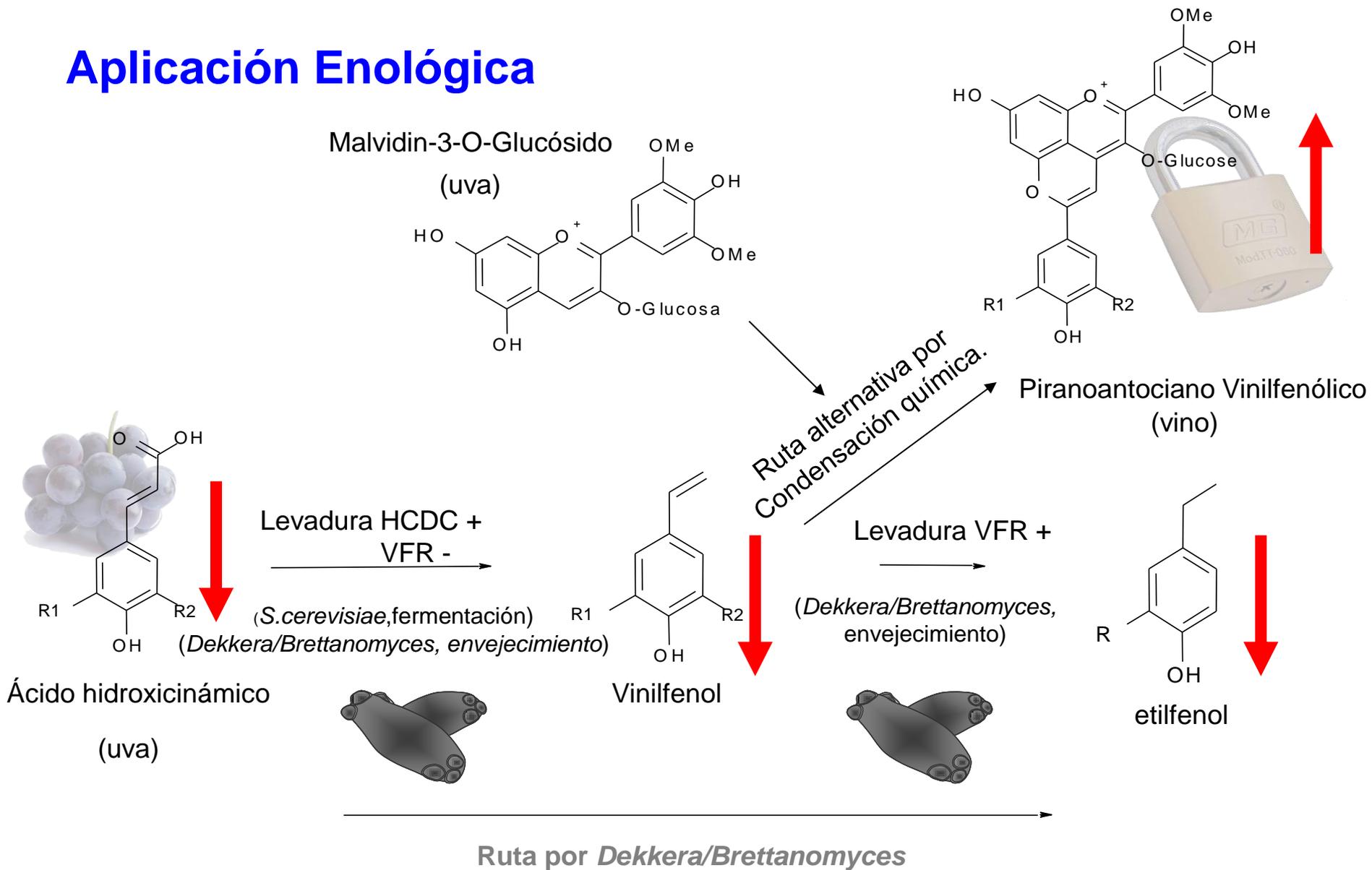
Aplicación Enológica

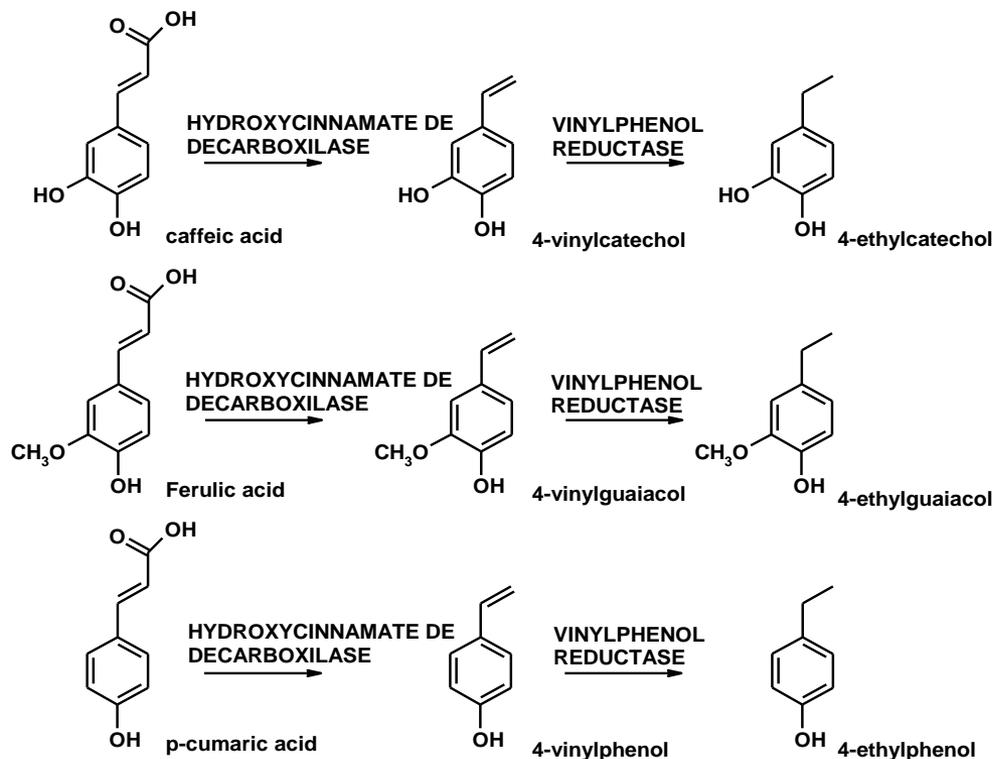
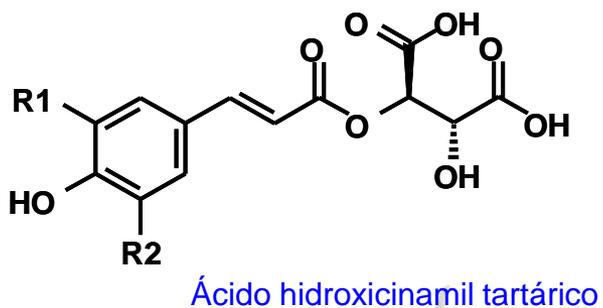
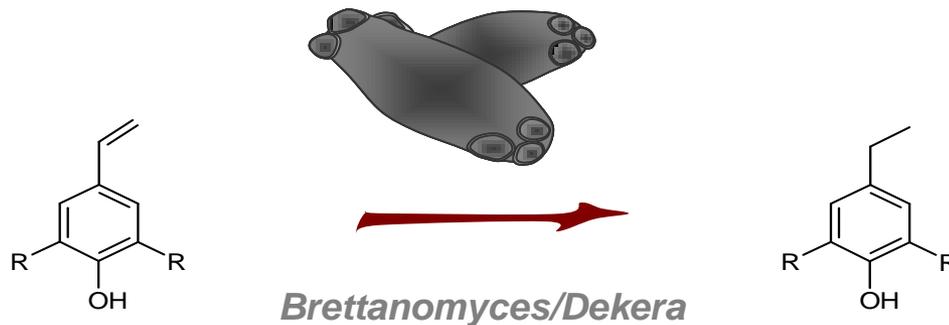


Aplicación Enológica

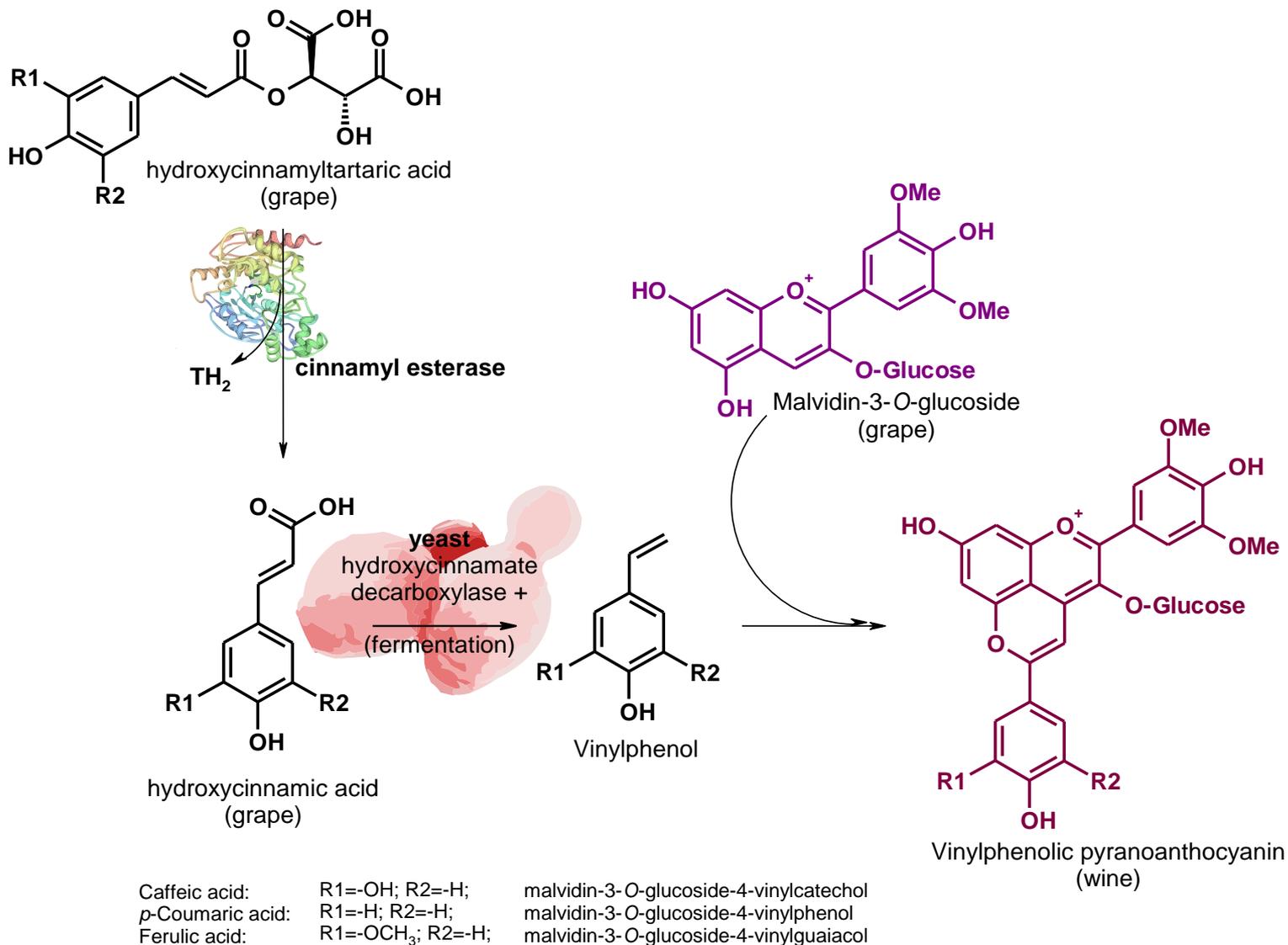


Aplicación Enológica





“Estrategias microbiológicas para el control y detección rápida de *Brettanomyces*”



Reducción de 4EPs con CEs & levaduras HCDC+

Table 2

Vinylphenolic pyranoanthocyanins contents (mg/l) in musts treated with cinnamyl esterases and fermented with HCDC+ strains except S6U that is HCDC-.

Fermentative yeast	Cinnamyl esterases (mg/l)	HCDC activity	M3GVCath	M3GVPh	M3GVG	AcM3GVPh	CmM3GVPh	Totals
S6U c	–	–	–	–	–	–	–	–
S6U	30	–	–	–	–	–	–	–
7VA c	–	+	–	0.46 ± 0.11ab	0.23 ± 0.06ef	0.13 ± 0.02a	0.15 ± 0.02ab	0.88 ± 0.06
7VA	30	+	0.05 ± 0.00a	1.05 ± 0.03d	0.17 ± 0.01bc	0.51 ± 0.02cde	0.35 ± 0.01c	2.13 ± 0.06
TP2A16 c	–	+	–	0.36 ± 0.03a	0.16 ± 0.01b	0.18 ± 0.02a	0.13 ± 0.00a	0.84 ± 0.05
TP2A16	30	+	0.22 ± 0.02d	1.51 ± 0.05f	0.24 ± 0.00f	0.75 ± 0.01g	0.58 ± 0.00f	3.22 ± 0.17
M29	30	+	–	1.32 ± 0.07e	0.19 ± 0.02bcd	0.57 ± 0.03ef	0.45 ± 0.01e	2.54 ± 0.12
XL	30	+	–	1.23 ± 0.01d	0.21 ± 0.01cd	0.58 ± 0.01de	0.45 ± 0.01de	2.47 ± 0.01
VR5	30	+	0.06 ± 0.00a	1.29 ± 0.04e	0.20 ± 0.01cde	0.61 ± 0.03f	0.46 ± 0.04e	2.59 ± 0.12
AWRI 1503	30	+	–	1.09 ± 0.05d	0.18 ± 0.00bc	0.48 ± 0.02c	0.38 ± 0.03cd	2.14 ± 0.10
CT07	30	+	–	0.56 ± 0.04c	0.08 ± 0.01a	0.24 ± 0.02b	0.20 ± 0.02b	1.09 ± 0.08
EC1118	30	+	–	1.11 ± 0.08d	0.19 ± 0.00bc	0.52 ± 0.04cd	0.39 ± 0.03cd	2.20 ± 0.15
RHONE	30	+	0.16 ± 0.01c	1.52 ± 0.03f	0.23 ± 0.01def	0.76 ± 0.02g	0.60 ± 0.02f	3.26 ± 0.09
AWRI 796	30	+	0.12 ± 0.01b	1.52 ± 0.05f	0.23 ± 0.01ef	0.72 ± 0.04g	0.57 ± 0.04f	3.16 ± 0.17

 The values are the mean ± standard deviation of 3 replicates. Means with same letter in same column are not significantly different ($p < 0.05$)

- * 12 levaduras comerciales HCDC (+) con CEs
- * 1 cepa de levadura HCDC (-)

No addition of SO₂
10⁶ CFU/ml *Dekkera* D37

Reducción de 4EPs con CEs & levaduras HCDC+

Table 3

4-Ethylphenol contents ($\mu\text{g/l}$) in wines treated with cinnamyl esterases and fermented with HCDC+ strains except S6U that is HCDC-. Samples noted with letter c were not treated with cinnamyl esterases and were used as controls. After alcoholic fermentation all were contaminated with 10^6 CFU/ml of *Dekkera* D3. It has been calculated the concentration of 4-VP blocked in VPAs pigments and the corresponding amount of 4-EP.

Fermentative yeast	Specie	Cinnamyl esterases (mg/l)	HCDC activity	Postfermentative addition of <i>Dekkera</i> D37 CFU/ml	4VP blocked-up in VPAs (equivalent 4EP) ($\mu\text{g/l}$)	4-Ethylphenol ($\mu\text{g/l}$)
S6U c	<i>S. uvarum</i>	–	–	10^6	0 (0)	40 \pm 26
S6U	<i>S. uvarum</i>	30	–	10^6	0 (0)	1150 \pm 99
7VA c	<i>S. cerevisiae</i>	–	+	10^6	139 (141)	0 \pm 0
7VA	<i>S. cerevisiae</i>	30	+	10^6	357 (363)	405 \pm 110
TP2A16 c	<i>S. cerevisiae</i>	–	+	10^6	125 (127)	133 \pm 111
TP2A16	<i>S. cerevisiae</i>	30	+	10^6	529 (537)	174 \pm 30
M29	<i>S. cerevisiae</i>	30	+	10^6	437 (445)	69 \pm 99
XL	<i>S. cerevisiae</i>	30	+	10^6	421 (428)	498 \pm 92
VR5	<i>S. cerevisiae</i>	30	+	10^6	440 (448)	69 \pm 58
AWRI 1503	<i>S. cerevisiae x kudriavzevii</i>	30	+	10^6	364 (370)	252 \pm 129
CT07	<i>S. cerevisiae</i>	30	+	10^6	187 (190)	682 \pm 600
EC1118	<i>S. cerevisiae bayanus</i>	30	+	10^6	377 (383)	383 \pm 214
RHONE	<i>S. cerevisiae</i>	30	+	10^6	536 (545)	22 \pm 22
AWRI 796	<i>S. cerevisiae</i>	30	+	10^6	523 (532)	208 \pm 65

The values of 4-ethylphenol are the mean \pm standard deviation of 3 replicates.

4VP blocked-up in VPAs and equivalent 4EP that is removed were calculated from the mean concentration of VPAs (M3GVPh, AcM3GVPh and CmM3GVPh) detailed in Table 2.

A. Morata et al. / *Enzyme and Microbial Technology* 52 (2013) 99–104

CEs & levaduras HCDC+
CEs & levaduras HCDC -

4-EP 22-498 $\mu\text{g/l}$
4-EP 1150 $\mu\text{g/l}$

Conclusiones

* Estrategia natural para reducir precursores de etilfenoles

- CEs
- levadura seleccionada HCDC+

* Incremento del contenido de pigmentos estables

CONTROL

ESTRATEGIAS PREVENTIVAS

Reducción de EPs con levaduras HCDC+

DETECCIÓN

ESTRATEGIAS PREVENTIVAS/CURATIVAS

Método de Detección/Estimación de poblaciones

Problemática de Detección

Crecimiento lento

Poblaciones bajas respecto otras especies

Peculiaridades y exigencias nutricionales

Diferentes técnicas de detección de *Dekkera/Brettanomyces*

Técnica	PCR cuantitativo	Microscopía epifluorescencia	Medios Selectivo- diferenciales	Cromatografía Fenoles volátiles
Tiempo	1-3 días	horas	5-10 días	Horas
Umbral	10-100 ufc/ml	10-100 ufc/ml	1 ufc/volumen	2 µg/l
Ventajas	* Especificidad * Precisión	Rápido	* Sencillos * Detección prematura	Seguimiento actividad Metabólica
Inconvenientes	* ADN Células muertas * Reactivos mutágenicos	* ADN Células muertas * Precisión	* Falsos positivos * Evaluación	* No carácter preventivo * No cuantifica levaduras
Precio aproximado	125 €	5-10 €	12 €	65 €

Fuente: Elaboración propia

Método de detección de *Dekkera/Brettanomyces*

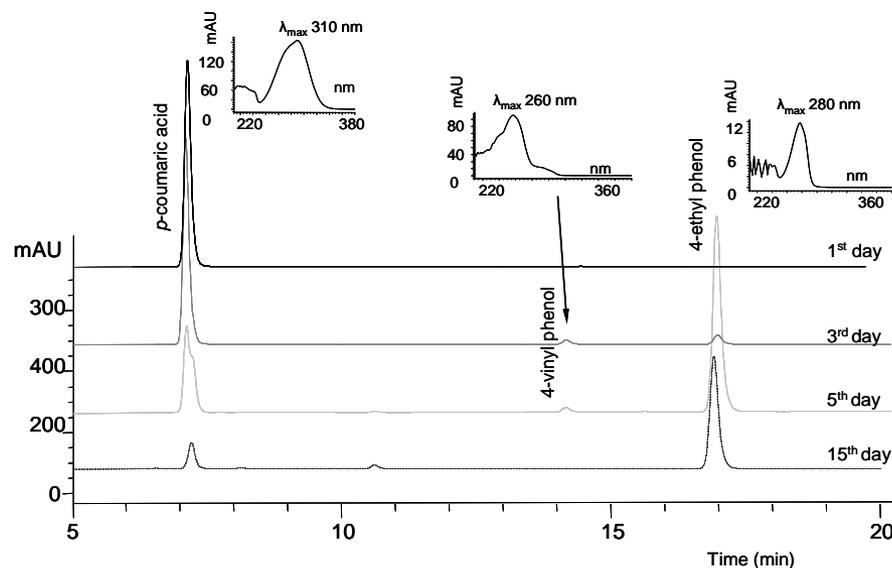
Medio Selectivo-diferencial líquido



Análisis instrumental HPLC

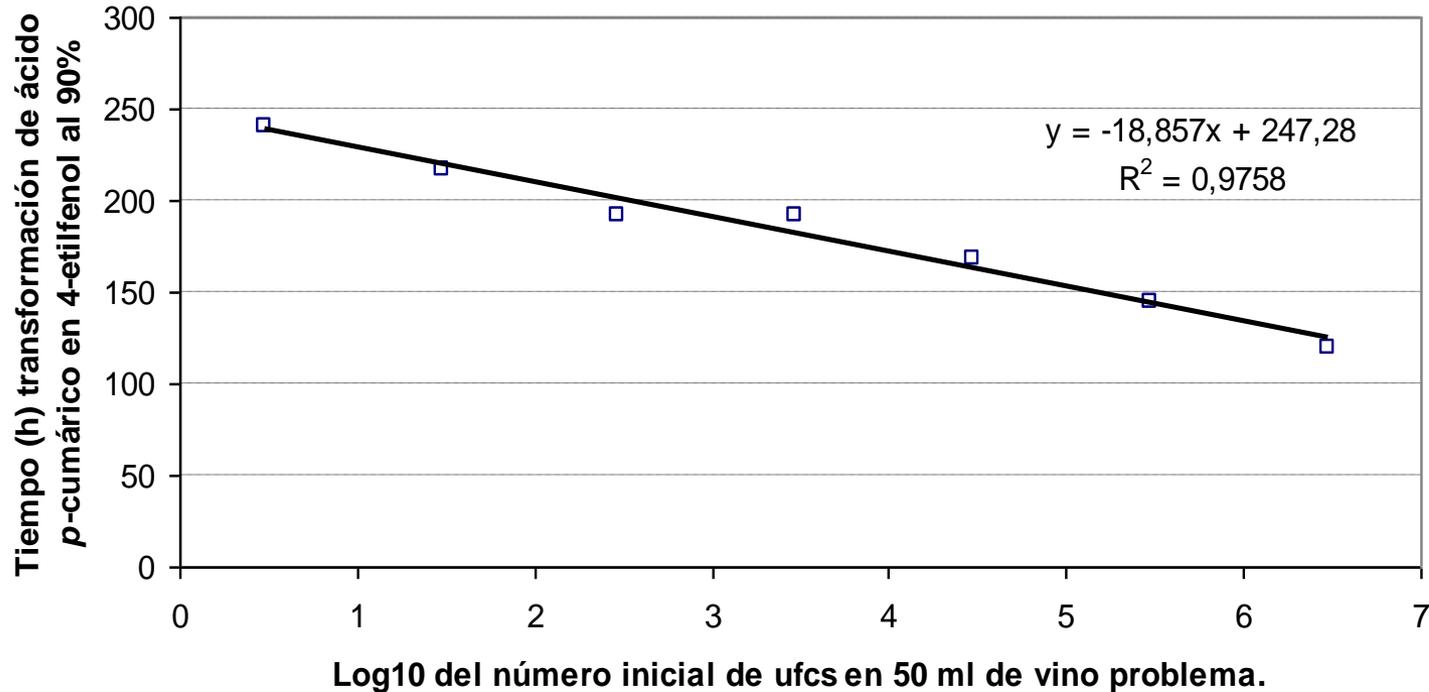


Actividad **potencial** HCDC y VFR en vino problema.





"Estrategias microbiológicas para el control y detección rápida de *Brettanomyces*"



Relación lineal: degradación ácido p-cumárico, formación 4-etilfenol y población inicial de *Brettanomyces/Dekkera*

Estimación población inicial

Conclusiones

Medio selectivo-diferencial + HPLC

Detección actividad potencial HCDC y VFR

Estimación población inicial de *Brettanomyces/Dekkera*

Solución a:

- Falsos positivos
- Hongos oportunistas
- ADN células muertas
- Rigor para confirmar resultados positivos
- Umbrales de detección

“Estrategias microbiológicas para el control y detección rápida de *Brettanomyces*”



GRACIAS!

