

DetECCIÓN DE LEVADURAS CONTAMINANTES: INNOVADORA INVESTIGACIÓN MEJORA LA CALIDAD DEL VINO, MEDIANTE BIOLOGÍA MOLECULAR

Claudio Martínez Fernández
claudio.martinez@usach.cl

Doctor en Ciencias con mención en Biología Universidad de Chile, investigación y docencia de pre y postgrado en biotecnología de alimentos, particularmente, en genética de levaduras de interés industrial. Actualmente trabaja en mejoramiento genético de levaduras vínicas.



Resumen

*La levadura contaminante *Brettanomyces bruxellensis*, produce desagradables características en el vino. Detectarla a tiempo puede significar la reducción de millonarias pérdidas en la industria vitivinícola nacional y el efectivo posicionamiento en los mercados internacionales.*

El sistema de detección de esta levadura, a través del método PCR en tiempo real, desarrollado gracias a esta investigación, responde a esta necesidad y está siendo comercializado en nuestro país desde mediados del año 2007.

Antecedentes

La industria del vino en Chile ha estado en constante desarrollo debido –entre otras causas- a una larga tradición vitivinícola que se remonta a tiempos de la colonia; a la apreciación que se tiene del producto nacional en el extranjero y a que la vid –no siendo una planta originaria de Chile- se ha adaptado tan bien a nuestra tierra y clima que ha desarrollado características propias, muy apetecidas en el mercado nacional e internacional.

La calidad del vino chileno ya es reconocida mundialmente, y aún se sigue trabajando en mejorarla, desarrollando, implementando e introduciendo nuevas tecnologías, que están permitiendo posicionarlo como uno de los pilares de las exportaciones silvoagropecuarias.

Una de las principales preocupaciones de la industria enológica es el aporte de las levaduras en la fermentación, por lo que se investiga tanto sobre aquellas

que permiten transformar el mosto (jugo de uva) en vino, como en las que producen daño a las propiedades organolépticas del producto, es decir, a las características que percibimos a través de los sentidos, como el olor, el sabor, etc.

En este último grupo destaca la levadura *Brettanomyces bruxellensis*, conocida universalmente como una de las más importantes enfermedades del vino, que genera pérdidas a la industria mundial evaluadas en el rango de los millones de dólares anuales, no solamente por producir un producto imposible de vender, sino por disminuir su calidad afectando, así, el precio esperado de venta.

El olor que esta levadura produce en el vino afectado, ha sido comparado con aromas tan desagradables como orina de caballo, ratón mojado o plástico quemado, entre otros.

Desde el punto de vista de su control, el principal problema presentado por la levadura *B. bruxellensis*, es su lento e imperceptible crecimiento, además de ser capaz de sobrevivir en medios adversos como el vino. Por ello, es prácticamente imposible detectarla antes de que cause el daño y, generalmente, su presencia se percibe después de varios meses, cuando el vino se encuentra en su etapa de maduración en barricas o ya embotellado.

Frente a esto, y en consideración a los daños irreversibles que se provocan a la industria del vino, es que el Laboratorio de Biotecnología y Microbiología Aplicada (LAMAP) de la Universidad de Santiago de Chile (USACH) diseñó una estrategia experimental que permitiera desarrollar un sistema de detección precoz de esta levadura en mostos y vinos. Con ella, la industria enológica podría establecer protocolos efectivos para el control definitivo de esta enfermedad.

¿Qué son las levaduras?

Las levaduras son hongos unicelulares, que han intervenido en la elaboración de alimentos y bebidas desde hace más de 8000 años, aunque su existencia sólo se reconoció en 1869.

La transformación del mosto en vino es un proceso que se realiza naturalmente hace millones de años, gracias a los microorganismos que se encuentran en forma natural sobre la piel de los granos de uva cuando están maduros. De hecho, si los racimos de uvas maduros cayeran al azar en una cavidad del suelo, terminarían por convertirse en un líquido de aspecto turbio y sabor desagradable, pero que tendría todos los ingredientes para ser llamado vino. Antiguamente, las fermentaciones de vinos y cerveza, se realizaban en forma espontánea con las levaduras aportadas por el mosto, o por las que se encontraban en los equipos utilizados.

La importancia de la participación de las distintas levaduras dependerá de las características del medio y de las condiciones operativas en que se desarrolle la fermentación del vino. De esta manera, la distribución de ellas variará a lo largo del proceso fermentativo, en función del estado sanitario de la bodega, entre otros factores.

“Brettanomyces bruxellensis”

De todas las levaduras de la etapa postfermentativa, la levadura *Brettanomyces*, y su forma esporulada *Dekkera*, es la que produce mayores alteraciones organolépticas sobre el vino y no sólo en Chile, sino que a nivel mundial.

Esta levadura ha sido aislada en los principales países vitivinícolas tales como: Francia, Italia, España, Portugal, Australia, Nueva Zelanda, Estados Unidos, Argentina y Chile, y es uno de los temas prioritarios en muchos institutos de investigación enológica como, por ejemplo, el Australian Wine Research Institute.

En Chile existe escasa información sobre las enfermedades vitivinícolas producidas por levaduras. Sin embargo, hay preocupación en el sentido que estas enfermedades se están haciendo cada vez más frecuentes.

En una encuesta realizada por el grupo de investigación de la USACH, a enólogos de distintas empresas, se concluyó que claramente, entre las enfermedades producidas por levaduras, aquella causada por la levadura *Dekkera / Brettanomyces* es de gran importancia, con un 42% aproximado de incidencia. Esta encuesta también reveló el gran interés de estos enólogos, por contar con metodologías eficientes de detección.

La investigación

Este trabajo se enmarcó en el proyecto “Desarrollo de Sistemas de Diagnóstico Microbiológico para Vinos de Calidad” y fue financiado por la iniciativa INNOVA de CORFO y la empresa ROCHE, líder internacional en el área farmacéutica, quien -a través de este proyecto-, decidió incursionar en el sector vitivinícola trabajando, en conjunto con el equipo liderado por el Dr. Claudio Martínez de la USACH, para desarrollar este sistema de detección rápida de la levadura *B. bruxellensis* en mostos y vinos.

Entre los requisitos que se debían cumplir, para que fuera realmente eficaz, estaban:

Rapidez de respuesta: La detección del agente contaminante *Brettanomyces / Dekkera* es útil sólo antes de que deteriore el vino, ya que una vez que éste es afec-

tado no es posible revertir su efecto. Por ello, lo ideal es hacerlo antes de que el vino entre en la etapa de maduración y, si no es así, evitar mezclar el vino contaminado con el resto, y contener la infección sanitizando o sacando de uso las barricas afectadas.

Lo peor que puede ocurrir es que el deterioro se detecte una vez que el vino ya fue embotellado, ya sea en un certamen internacional o al ser servido, pues el consumidor internacional asocia las falencias no sólo a una marca en particular, sino al origen del vino, lo que afecta la denominada “marca país”.

Antes del desarrollo de esta herramienta, los métodos disponibles para la detección de *B. bruxellensis* en el vino tardaban entre dos a tres semanas y su respuesta era poco precisa y tardía.

Sensibilidad: era necesario detectar estos agentes contaminantes aún en muy bajas cantidades ya que, particularmente en el caso de la levadura contaminante *B. bruxellensis*, ésta se puede encontrar en muy bajas concentraciones al inicio de la fermentación o en las barricas antes de ser utilizadas.

Precisión: disponer de información sobre el estado microbiológico del proceso fermentativo y, particularmente, de la presencia de *B. bruxellensis* en los estanques de fermentación, o en las barricas durante la maduración del mosto, supone intervenir el proceso y/o cambiar el destino del producto, con efectos claros sobre el retorno económico del mismo. Por lo mismo, era muy importante que el enólogo tome su decisión, en base a un análisis altamente confiable.

La investigación de la USACH apuntó a analizar directamente el material genético de la levadura contaminante, por lo que los resultados no están influenciados por las condiciones en que los análisis son realizados, ni por variaciones en la respuesta que los propios microorganismos puedan entregar frente a determinados reactivos o medios de cultivo.

Esto último es particularmente importante en el caso de los actuales métodos existentes para la detección de la *B. bruxellensis*, ya que ellos se basan en la respuesta fisiológica que la levadura presenta frente al medio de cultivo utilizado, la cual también es posible de observar

en otros microorganismos normalmente presentes en viñas y bodegas.

Por otro lado, aún existe escaso conocimiento sobre la forma en que esta levadura se desarrolla desconociéndose, hasta el momento, los factores ambientales involucrados en la generación de los compuestos que ella produce y que son -en última instancia- los que provocan los desperfectos organolépticos en el vino.

Por lo tanto, para detectar y corregir los problemas producidos por levaduras que disminuyen la calidad del vino, principalmente en el segmento Reserva y Premium, se generó una aplicación basada en biología molecular que, por medio de la amplificación específica de segmentos de ADN, permitiera evaluar, con sólo horas de diferencia, la presencia de la levadura *Brettanomyces / Dekkera* en fermentaciones y bodegas.

PCR en tiempo real

En la naturaleza todos los organismos requieren duplicar su información genética si desean reproducirse y, de esta forma, perpetuarse en el tiempo. Para ello, necesitan hacer copias de su genoma (ADN) por medio de complejas reacciones químicas que ocurren en el interior de sus células. Pues bien, este proceso se puede reproducir en el laboratorio, en pocas horas, por medio de una técnica llamada PCR, que deriva de las iniciales en inglés de Polimerase Chain Reaction o Reacción en Cadena de la Polimerasa, la cual le significó a su inventor, el Dr. Kary B. Mullis, el premio Nobel en 1993.

Teóricamente, este proceso puede orientarse a amplificar una zona particular y única del genoma de cualquier especie permitiendo, entre otras aplicaciones, la identificación de agentes patógenos específicos, que dañan la salud humana; la búsqueda de genes defectuosos asociados al cáncer; la identificación de agentes microbiológicos que afectan a la industria alimentaria, etc.

Innovaciones de este método, han permitido el desarrollo del PCR en tiempo real, con el que se puede obtener el resultado y análisis de la amplificación en un menor tiempo, de forma cuantitativa y con una mayor sensibilidad que los métodos originalmente desarrollados.

Por todo lo anterior, los equipos de la USACH, y la empresa ROCHE, se abocaron a identificar una zona del genoma de la levadura *B. bruxellensis* que fuera específica de ella y que no estuviera en ningún otro microorganismo presente normalmente en viñas y bodegas.

Para ello se estudiaron cientos de fragmentos del genoma de la levadura, analizando su presencia en decenas de especies de hongos y bacterias, hasta encontrar un grupo de secuencias de ADN que cumplían este requisito. Luego, se analizaron bioinformáticamente aquellas secuencias identificadas, que podían ser eficientes blancos de amplificación por medio de PCR en tiempo real y fueron modificadas para servir como reactivos para este sistema. Posteriormente, se experimentó con ellas, en laboratorio y en bodega, para evaluarlas hasta seleccionar una única secuencia, que cumplió todos los requisitos para identificar inequívocamente la presencia de la levadura *B. bruxellensis*.

Sin embargo, la alta complejidad química del mosto y el vino, y la alta sensibilidad del método de PCR, hicieron necesario, además, el desarrollo de un sistema para la adecuada toma de muestras, que permitiera -junto con asegurar la presencia o ausencia de esta levadura- confirmar la efectividad de la reacción química que involucra el PCR. Para ello, el proyecto involucró el desarrollo de un método para la purificación del ADN desde mosto y vino, y la generación de fragmentos de ADN sintéticos que sirvieran como controles positivos y negativos de la reacción.

Finalmente, y con el objeto de dar seguridad al usuario, todo el proceso fue comprobado bajo el criterio de la norma ISO 16140.

Así, el sistema desarrollado por el equipo de la USACH, en conjunto con la empresa PRODUCTOS ROCHE LTDA, permite la detección de células vivas de la levadura *B. bruxellensis* desde muestras de vino, mosto y otras fuentes sospechosa de contaminación.

La sensibilidad del protocolo desarrollado, permite la detección desde una célula por ml de vino, con una ra-

pidez de respuesta mucho mayor que la de otros métodos, posibilitando obtener resultados precisos en un lapso de 80 horas.

Conclusiones

La investigación desarrollada representa un importante aporte a la industria vitivinícola local e internacional, cuyo resultado (el sistema de detección de *B. bruxellensis* por PCR en tiempo real) ya está siendo comercializado por la farmacéutica ROCHE desde mediados de este año. De hecho, varias empresas del sector están analizando sus vinos a través de la unidad de servicios de LAMAP de la Universidad de Santiago de Chile.

Gracias a este desarrollo, la industria vitivinícola tiene una herramienta más para asegurar la calidad de sus productos. Con este sistema puede detectar, efectivamente y de forma rápida, la presencia de esta levadura y tomar las medidas necesarias, para el efectivo control y erradicación de esta enfermedad, presente en sus bodegas.

Esto debiera redundar tanto en la disminución de las pérdidas asociadas a este microorganismo, como en el aseguramiento de los mercados internacionales, que en su mayoría son reacios a los vinos con aromas a *Brettanomyces*.

Por otra parte, aunque lo ideal es eliminar por completo esta levadura de las bodegas, actualmente, el método de detección de *B. bruxellensis* está siendo transformado en un sistema cuantitativo, para determinar el número de levaduras presentes en la muestras analizadas.

El desarrollo de este tipo de métodos, para el control microbiológico del proceso de producción de vino, establece las herramientas necesarias para un nuevo concepto de trabajo en bodega, que cada vez da mayor importancia al papel de los microorganismos en la elaboración del vino, permitiendo su manejo de forma más precisa de lo que antes podía hacerse.