

Winemaking update

BRETTANOMYCES/DEKKERA

Control y detección en bodegas

Eva NAVASCUÉS LÓPEZ-CORDÓN

Doctora en Microbiología - Área Biotecnología Agrovin

1- INTRODUCCIÓN

Las levaduras pertenecientes al género *Brettanomyces/Dekkera* ocasionan uno de los problemas más graves de la enología actual. A ellas se debe la génesis en vinos de determinados fenoles volátiles (4-etil fenol, 4-etil guayacol) que se traducen, a partir de cierta concentración, en sensaciones olfativas muy negativas, descritas como "olor animal", "cuero mal curado" o "sudor de caballo".

La percepción olfativa de estos fenoles volátiles resulta controvertida ya que los descriptores sensoriales tipo animal se han considerado tradicionalmente como característicos de determinados vinos de crianza en madera. Dado que en pequeñas concentraciones, estos compuestos contribuyen a la complejidad aromática del vino, y en concentraciones grandes enmascaran completamente su perfil sensorial con sensaciones muy desagradables, para la descripción de fenoles volátiles se prefiere hablar de "umbral de preferencia" en lugar de "umbral de detección". Se define como umbral de preferencia la concentración de fenoles volátiles a partir del cual el 50% de los catadores considera una muestra como defectuosa. Los umbrales determinados para el 4-etil fenol son muy bajos, del orden de 440 µg/L, para 4-etil fenol, y de 620 µg/L para la suma de 4-etil fenol y 4-etil guayacol (Chattonet *et al.*, 1993).

En la determinación sensorial de los vinos afectados por *Brett*, desempeña un importante papel la matriz intrínseca del vino. Así en los vinos con más cuerpo y estructura se detecta el carácter fenólico a mayores concentraciones de 4-etil fenol que en los vinos de menos consistencia. En este aspecto, también la variedad de uva parece influir, siendo las variedades más robustas (Cabernet-Sauvignon), más proclives a enmascarar un contenido elevado en 4-etil fenol.

Esta doble cara de la presencia de etilfenoles en vino ha contribuido a despistar a bodegas y enólogos sobre la naturaleza, procedencia y repercusiones del problema. Vinos en perfectas condiciones organolépticas han manifestado después de algunos meses en la botella alteraciones graves, de difícil solución. Es por ello que el conocimiento de la fisiología y de las características de desarrollo del principal microorganismo causante, *Dekkera/Brettanomyces*, puede ayudar a su detección y control, y así evitar sorpresas desagradables en un futuro.

2- BRETTANOMYCES/DEKKERA Y SÍNTESIS DE FENOLES VOLÁTILES

Las levaduras del género *Brettanomyces*, o su forma teleomorfa (perfecta o esporulada) *Dekkera*, fueron descritas por primera vez por Claussen en 1903, en la producción de cerveza (Gilliland, 1961). Este género se conoce desde hace tiempo como agente contaminante, en la industria cervecera, sidra y bebidas carbonatadas (Deak y Beuchat, 1996). En la industria enológica su descripción como alterante es más reciente. Aunque el género lo constituyen 5 especies diferentes, en vinos aparece únicamente *Dekkera bruxellensis*.

El origen de los fenoles volátiles está relacionado con la actividad secuencial de dos enzimas que descarboxilan los ácidos hidroxicinámicos (ej: ácido ferúlico, ácido p-cumárico y ácido cafeico) en hidroxiestirenos (vinilfenoles) que son posteriormente reducidos a etilfenoles (etilfenoles) (Steinke y Paulson, 1964), **Figura 1**.

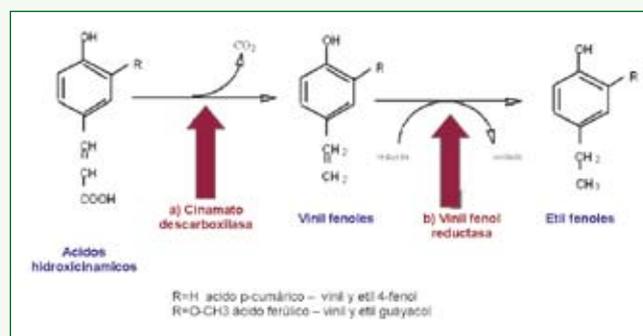


Figura 1: Síntesis de etilfenoles por *Brettanomyces/Dekkera ssp.*
a) Descarboxilación de los ácidos hidroxicinámicos
b) reducción de vinilfenoles.

El primer paso de descarboxilación está presente en un gran número de bacterias, hongos y especies de levaduras (Degraasi *et al.* 1995, Edwin *et al.* 1995, Suezawa, 1995, Suezawa *et al.*, 1998). Sin embargo el segundo paso, o la reducción de los vinilfenoles se ha registrado de manera especialmente efectiva en varias especies de levaduras: *Dekkera bruxellensis*, *D. anomala*, *Pichia guillermondi*, *Candida versatilis*, *C. halophila* y *C. manitofaciens* (Días *et al.* 2003).

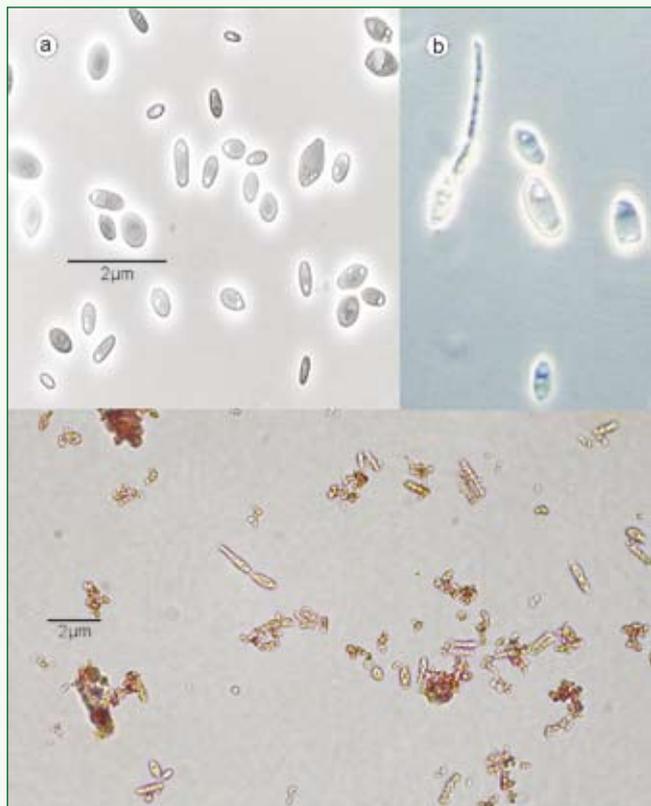
Herestzyn (1986) describió por primera vez la producción de etilfenoles por *Dekkera/Brettanomyces*, pero la contribución de estas moléculas al carácter fenólico en los vinos y su relación con la actividad de levaduras del género *Brettanomyces* ha sido esclarecida recientemente (Chattonet *et al.*, 1995).

Anteriormente su origen se relacionó con la actividad bacteriana (Cavin *et al.*, 1993). De hecho, las bacterias lácticas pueden producir cantidades significativas de vinilfenoles, pero producen únicamente trazas de etilfenoles en las condiciones del vino (Chattonet *et al.* 1995, 1997). Las levaduras fermentativas *Saccharomyces cerevisiae* y otras levaduras consideradas alterantes del vino (*Pichia*, *Torulaspora*, *Zygosaccharomyces*) pueden producir vinilfenoles pero son incapaces de producir etilfenoles (Rodríguez *et al.*, 2001). En *D. bruxellensis* las enzimas cinamato descarboxilasa y vinilfenol reductasa son muy activas en las condiciones del vino y se la considera el principal causante de este problema.

Brettanomyces, al contrario de las levaduras responsables de la fermentación del mosto, se caracteriza por una actividad fermentativa baja y crecimiento lento. En condiciones de cultivo sobre medio sólido forma colonias al cabo de siete a diez días. Crece en medios de cultivo habituales de crecimiento de levaduras (MEA, YPD), sin embargo, cuando se desea aislarlo de mosto o vino es necesario emplear medios de cultivo diferenciales que impidan el crecimiento de otros microorganismos, mucho más activos que *Brettanomyces* y que ocultan o impiden el desarrollo de las colonias de *Brett*.

La morfología celular de *Brettanomyces* es ojival o cilíndrica, con gemación multipolar en reproducción vegetativa. Una de las características de este género es su tamaño celular variable y la formación de filamentos. En vino se observan siempre células mucho más pequeñas que en medio de cultivo y son frecuentes estas formas filamentosas que ayudan a la adherencia del microorganismo a las superficies, por ejemplo de las

barricas. (Figuras 2 y 3).



Figuras 2 y 3: Microfotografía de cultivo de *Dekkera/Brettanomyces*. a) variabilidad morfológica y de tamaño celular. b) forma filamentososa

Los defectos sensoriales asociados directamente a *Brett* aparecen mayoritariamente en vinos tintos de calidad y las causas radican en la propia fisiología del microorganismo. En efecto, la biosíntesis de fenoles volátiles se realiza a partir de ácidos hidroxixánámicos y en vinos tintos el contenido de estos compuestos es mayor. Además, al ser una levadura de crecimiento muy lento, la alteración se presenta principalmente durante el almacenamiento y sobre todo, la crianza del vino, habitual en los vinos tintos de gama alta. En las barricas de madera el microorganismo tiene a su disposición todo el sustrato y tiempo suficiente para realizar su actividad. La naturaleza porosa de la madera y su difícil limpieza contribuye a que las poblaciones existentes se mantengan incluso después del lavado de la barrica. Además, *D. bruxelliensis* tiene la capacidad de degradar uno de sus componentes, la celobiosa (Boulton *et al.* 1996).

Junto con la formación de fenoles volátiles, *Brettanomyces* produce elevadas cantidades de ácido acético (Freer *et al.* 2000) y tiene la capacidad de sintetizar, en condiciones especiales, tetrahidropiridinas que se identifican con el "gusto a ratón" (Heresztyn, 1986, Grbin *et al.*, 2000). También se le atribuye la producción de isoaléxico y otros ácidos grasos que confieren gustos a rancio y de ciertas esterasas, acentuando la pérdida de aromas afrutados del vino. Por todo ello, el género *Brettanomyces/Dekkera* es uno de los más temidos agentes microbianos de los vinos.

3- PROCEDENCIA DE LAS POBLACIONES DE BRETTANOMYCES

Brettanomyces es un microorganismo ubicuo, con poblaciones escasas pero repartidas en suelo, cortezas de arboles y sustratos azucarados (frutos miel). Su detección en uvas y mostos es poco frecuente debido sobre todo a la gran competencia existente con otros microorganismos mucho más activos. No obstante, se han detectado focos en viñedos particulares. Su aisla-

miento es frecuente en materiales de bodega, mangueras, depósitos, suelos, siempre asociado a higiene deficiente. Pero donde es más habitual su presencia es en las barricas y tinas de madera.

El desarrollo de las poblaciones de *Brettanomyces* se inicia después de la fermentación alcohólica (Figura 4). En este momento, y a partir del reducido número de células procedentes del viñedo que durante la fermentación alcohólica no han tenido la oportunidad de multiplicarse debido a su escasa competitividad respecto a *S. cerevisiae*, inician su desarrollo en un vino poco o nada protegido (ausencia de sulfuroso). Dependiendo del arranque más tardío de la fermentación maloláctica, la población será mayor, y aunque luego se corrija con sulfuroso, mayor la probabilidad de presentar células viables capaces de desarrollar la alteración posteriormente.

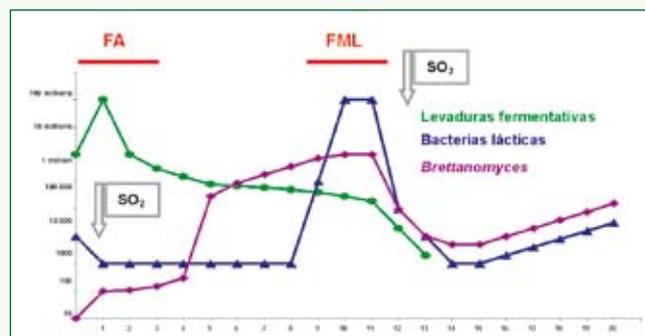


Figura 4: Dinámica de las poblaciones levaduras fermentativas bacterias lácticas y *Brettanomyces* desde la entrada de uva hasta vino terminado. FA: fermentación alcohólica, FML: fermentación maloláctica.

Durante la crianza, procedentes del vino o de las propias barricas ya contaminadas, las poblaciones aumentan de manera lenta pero sin competencia. Aquí se originan los principales riesgos. Es destacable señalar que no hace falta un gran número de células para desarrollar la alteración, y que por encima de 1000 células/ml la calidad organoléptica del vino está seriamente comprometida (González y Navascués, 2006).

4- CONDICIONES DE DESARROLLO DE BRETTANOMYCES EN BODEGA

A continuación se analizan los distintos factores que contribuyen al desarrollo de las poblaciones de *Brettanomyces* en la bodega y que se traducen por tanto en un mayor riesgo de producción de fenoles volátiles.

a) Nutrientes: Como fuente de carbono *Brettanomyces* emplea azúcares residuales presentes en el vino después de fermentación alcohólica. Al no tener un metabolismo muy activo, 300 mg/L de azúcares son más que suficientes para el desarrollo de una población alterante. Una de las causas de que las contaminaciones por *Brett* sean más frecuentes en los vinos de elevada graduación alcohólica, a pesar del carácter antimicrobiano del etanol, es que estos vinos, procedentes de uvas muy maduras, presentan mayor cantidad de azúcares residuales (apenas glucosa y fructosa, pero si otras pentosas residuales),

Figura 5.

El azúcar trehalosa, procedente de la autólisis de las levaduras, constituye una fuente de carbono importante en los vinos con crianza

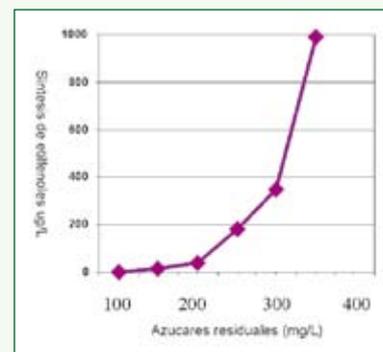


Figura 5: Relación entre síntesis de etilenoles y fermentación de azúcares residuales durante la crianza de vinos tintos de una misma bodega. Adaptado de Chattonet *et al.*, 1995

sobre lías. *B. bruxelliensis* desarrolla además complejas estrategias para su desarrollo en un medio tan empobrecido nutricionalmente como el vino: presenta una fuerte actividad glicosídica, capaz de liberar la glucosa ligada a los antocianos. Mediante varias actividades celolíticas, degradan la celobiosa de la madera de las barricas y la propia reducción de los vinilfenoles en etilfenoles supone un mecanismo de obtención de energía.

En cuanto a compuestos nitrogenados, *Brettanomyces* presenta requerimientos escasos, aunque la presencia de aminoácidos y sales amoniacales estimula la proliferación celular. De aquí que se aconseje la nutrición adecuada en fermentación alcohólica pero nunca en exceso, sobre todo de sales de amonio.

b) Tiempo: Ya se ha comentado que *Brettanomyces* posee un metabolismo lento, por lo que el factor tiempo es requisito fundamental para el desarrollo de poblaciones alterantes. Se explica de esta forma la mayor incidencia de etilfenoles en vinos de crianza. Los vinos conservados en barricas usadas presentan mayor incidencia de concentración de estos compuestos. Efectivamente, la reutilización de las barricas contribuye en gran medida a acentuar el problema, ya que buena parte de las células de *Brettanomyces* permanecen en la barrica después del trasiego del vino, resisten al proceso de limpieza, y el vino nuevo con el que se rellena la barrica supone una renovación del sustrato, sobre el que se desarrollara una población más importante.

c) Temperatura: Como para todos los microorganismos, la temperatura activa el metabolismo celular. Para el control de *Brett*, la crianza del vino precisa una atención máxima en primavera a otoño, donde la temperatura y el ritmo de evaporación aumentan. A modo de ejemplo se muestra la evolución de las poblaciones de *Brettanomyces* a lo largo de 6 meses en barrica (Tabla 1).

	Mayo (0)	Agosto (3)	Noviembre(6)
Temperatura	16°C	18°C	16°C
SO2 libre	15	10	6
<i>Brettanomyces</i> (UFC/ml)	10	630	1480
4-etil fenol (µg/L)	0	35	484
Percepción sensorial	--	--	++

Tabla 1: Poblaciones de *Brettanomyces* a lo largo de 6 meses de crianza de vino tinto en crianza en barrica (variedad Tempranillo, pH: 3,9)

Por otro lado, *Brettanomyces* presenta actividad a bajas temperaturas y tan solo por debajo de 8°C se inhibe su crecimiento.

d) Presencia/ausencia de oxígeno: Levadura capaz de desarrollarse en anaerobiosis estricta, la presencia de oxígeno favorece su desarrollo y estimula la síntesis de acidez volátil.

Las nuevas prácticas enológicas dirigidas hacia la elaboración de vinos de calidad pueden constituir factores de riesgo y su aplicación debe conllevar la adopción de medidas de control para evitar el desarrollo de *Brettanomyces*. Así:

» los vinos procedentes de uvas en el punto correcto de maduración fenólica, que en nuestras latitudes se acompaña de elevado grado alcohólico y por tanto mayor proporción de azúcares residuales, suponen un aumento del sustrato disponible para *Brett*.

» Las maceraciones prefermentativas en frío, proporcionan tiempo y sustrato para el desarrollo de las poblaciones procedentes de la uva.

» La crianza sobre lías enriquece el medio en factores nutritivos (trehalosa y sustancias nitrogenadas) la autólisis de las levaduras.

» El empleo, cada vez más habitual, de la microoxigenación favorece el desarrollo del microorganismo, tanto de manera directa, al implicar una mayor presencia de oxígeno, como indirecta, favorecer la combinación del sulfuroso libre o al implicar un retraso en el inicio de la fermentación maloláctica (Arvik y Henick-Kling, 2002).

» La crianza en madera, además de sustrato, supone la permanencia del vino en su contacto, cediendo el tiempo imprescindible para su desarrollo.

» La tendencia hacia la reducción de las dosis de sulfuroso en la elaboración, es uno de los factores que más ha contribuido a la extensión del problema. Precisamente, el sulfuroso es un instrumento eficaz y permitido para el control de *Brettanomyces*.

» Por último la salida al mercado de vinos sin clarificar, sin estabilizar y por supuesto sin filtrar, hace que posible la presencia del microorganismo al final del proceso y la formación de etilfenoles en la propia botella.

5- CONTROL PREVENTIVO DE BRETTANOMYCES

El control del desarrollo de *Brettanomyces* en la bodega se realiza a tres niveles:

1- Materia prima, prestando atención a la sanidad de la uva. Aunque las poblaciones de *Brett* son de partida escasas, se ha de tener en cuenta que en uvas deficientes estado sanitario la población de levaduras pasa de 100 cels/gramo, a 100 millones de cels/gramo, y la proporción de *Brettanomyces* puede ser considerable.

La aplicación de maceraciones prefermentativas, donde la competencia de *S. cerevisiae* está inhibida por la temperatura, supone una práctica de riesgo, ya que levaduras contaminantes como *Brett* proliferan a temperaturas bajas (>8°C).

2- En el vino es el sulfuroso el instrumento más eficaz para el control del desarrollo de *Brettanomyces*. Contrariamente a lo que se cree, *Brett* es bastante sensible a su presencia, y la existencia de fenómenos de resistencia entre cepas es escasa. Se debe tener en cuenta la relación del sulfuroso libre con el pH. Al ser el SO2 molecular la forma activa, a pH altos el control debe ser más riguroso (Tabla 2).

	Mayo (0)	Agosto (3)	Noviembre(6)
Temperatura	16°C	18°C	16°C
SO2 libre	15	10	6
<i>Brettanomyces</i> (UFC/ml)	10	630	1480
4-etil fenol (µg/L)	0	35	484
Percepción sensorial	--	--	++

Tabla 2: Relación entre pH y sulfuroso libre para alcanzar 0,5 mg/L de sulfuroso molecular (límite de eficacia antimicrobiana)

3- En las barricas, verdadero punto crítico de contaminación, se debe prestar especial atención a su limpieza y desinfección, asumiendo que es imposible su esterilización total.

» Debe realizarse inmediatamente después de cada trasiego y antes de ser rellenadas. La temperatura de lavado se debe mantener, a menor temperatura, mayor tiempo de aplicación. Nunca por debajo de 60°C. El vapor es más eficaz pero repercute en la calidad de las barricas y se aconseja reservar para casos de sospecha de contaminación

» La limpieza a alta presión (80-110 bares) elimina los depósitos fijos, siempre que se empleen cabezas rotativas adaptadas a la geometría de la barrica y tiempos suficientes (10-20 min). No afecta a la integridad de la madera

» El empleo de productos de limpieza, también se aconseja reservar para barricas sospechosas.

» El azufrado permite secar la madera sin alteración microbiana durante 5 días aproximadamente. Se debe repetir la operación cuando la barrica está seca.

6- DETECCIÓN DE BRETTANOMYCES EN VINOS

Para detectar su presencia, confirmar su ausencia o verificar la existencia de un problema de una manera efectiva en bodega pueden seguirse dos líneas analíticas, útiles en función del objetivo perseguido.

6.1- Análisis del contenido de etil 4-fenol/guayacol mediante cromatografía gaseosa.

Permite el seguimiento de la evolución del contenido de etilfenoles en el tiempo e un vino determinado. Cuando el compuesto es detectado, implica que la población de *Brettanomyces* es muy elevada y reparar la alteración prácticamente imposible. Se trata de un método confirmativo. Es sin embargo útil, combinada con la detección del microorganismo, en los casos en los que se registran poblaciones importantes pero no la alteración sensorial e imprescindible en el caso de filtración amicrobica o aplicación de niveles de sulfuro elevados, que eliminaran a la microbiota contaminante, pero no el resultado de su acción.

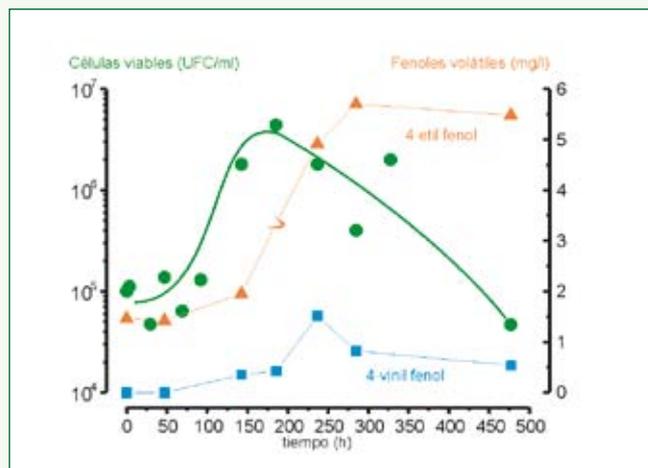


Figura 6: Desarrollo de población de *Brettanomyces* y génesis de 4-etil fenol/4-etil guayacol. Inóculo inicial 105 cels/ml

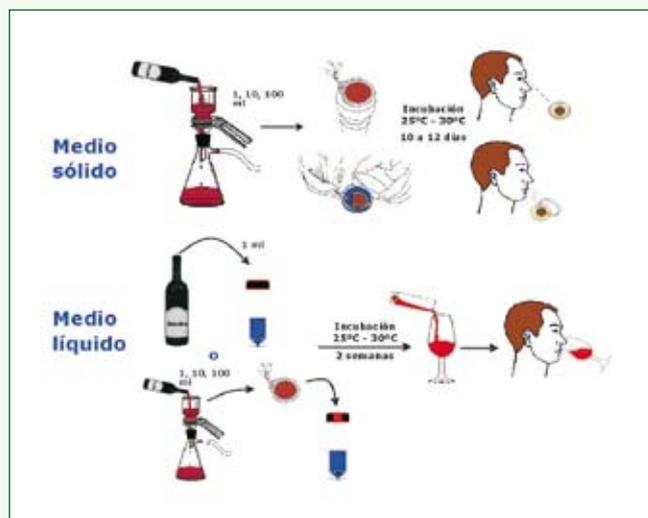


Figura 7: Identificación y recuento de *Brettanomyces* ssp. en vinos. Empleo de medio de cultivo selectivo y diferencial (DBDM)

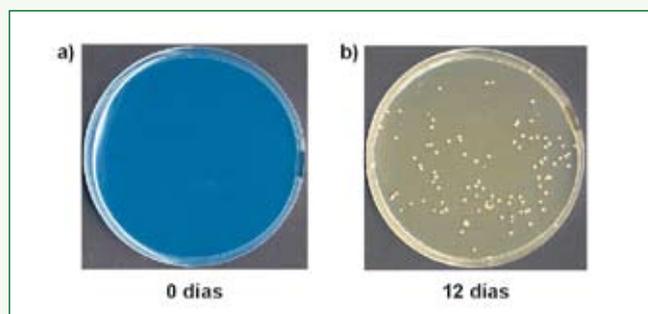


Figura 8: *Brettanomyces* ssp. Crecimiento en medio DBDM a) siembra, b) crecimiento a los 10 días: viraje de color azul a amarillo, colonias amarillas, olor fenólico característico.

6.2.- Detección del microorganismo.

La formación de 4-etilfenol/guayacol en vinos se encuentra retardada respecto a la proliferación de las poblaciones de *Brettanomyces*, Figura 6. Por ello que es posible detectar un posible problema, antes que la alteración sensorial sea perceptible.

La detección de *Brett* empleando los medios de cultivo habituales en microbiología del vino se ve impedido por otros microorganismos (levaduras, bacterias lácticas) mucho más competitivos que ellos en condiciones favorables. Obliga a la utilización de medios de cultivo con agentes selectivos y diferenciales y, en muchos casos, a la comprobación microscópica de las colonias. A diferencia de otras contaminaciones microbianas, las poblaciones de riesgo en vinos son del orden de 10 UFC /ml, por lo que se hace imprescindible tratar volúmenes grandes de vino. El medio DBDM (Rodríguez *et al.*, 2001) ha demostrado su eficacia en la detección de levaduras productoras de fenoles volátiles (Figuras 7 y 8). Hay que tener en cuenta que, debido al crecimiento lento del microorganismo, los resultados se obtienen a los 8-10 días de incubación.

En casos de vinos con crianzas muy largas es frecuente la presencia de formas viables pero no cultivables (Millet y Lonvaud-Funel, 2000), en poblaciones que han permanecido en contac-



Una opción diferente en
suministros de insumos y
servicios de calidad



ENOLOGÍA DE FUTURO
Ahora también en Argentina

PURAC® Vin

EL ÁCIDO LÁCTICO
ENOLÓGICO



Re-Impresión
de Etiquetas Autoadhesivas

Los Jazmines 1054 - Godoy Cruz (5501)
Mendoza -Argentina

Tel/Fax: +54 (0261) 4526294 / 4520923
info@enobo.com.ar - ventas@enobo.com.ar

to con el vino un tiempo largo (más de dos años), siendo habituales los falsos negativos. La utilización de técnicas de biología molecular, solventa este problema. Mediante el análisis de la secuencia génica exclusiva de las células de *Brettanomyces* se detecta con exactitud su presencia en pocas horas. En estos casos la detección de poblaciones de *Brettanomyces ssp.* se realiza por *nested PCR* (Figura 9), Ibeas *et al.* 1996, Navascués, (2003).



Figura 9: Nested PCR con cebadores específicos de *Brettanomyces ssp.* A, B vino control negativo (1ul y 5ul), C, D vino control positivo 1ul y 1/10 ul, C+ control positivo de la reacción (*Brettanomyces bruxellensis*) en dos diluciones 1/50 y 1/100. NTC: not template control, PM: marcador.

7- TRATAMIENTO DE VINOS CONTAMINADOS

En el caso de que la detección de *Brettanomyces* sea positiva hay que considerar la adopción de medidas correctoras. Es recomendable analizar el contenido en fenoles volátiles y realizar una cata fuera de la bodega. Se ha comprobado que la percepción organoléptica de los fenoles volátiles en el vino disminuye cuando se realiza en el interior de la bodega de origen, debido a la presencia en el ambiente de las propias sustancias volátiles que producen un fenómeno de acomodación de la pituitaria.

Cuando el vino no manifiesta sensorialmente la alteración y el contenido de fenoles volátiles es inferior a 400 $\mu\text{g/l}$, el objetivo prioritario es detener el desarrollo de *Brettanomyces* y por tanto el aumento de la concentración de fenoles volátiles. Para ello se deben corregir los niveles de sulfuro libre en cantidad suficiente y acorde con el pH, por encima de 0,8 ppm de SO_2 molecular. Además es recomendable acotar perfectamente el lote alterado, evitando las mezclas y la utilización de las barricas que han tenido contacto con el vino contaminado. Con respecto a estas barricas, deben acometerse programas de limpieza y desinfección especialmente enérgicos y cuidadosos.

En el caso de que el vino contaminado si manifieste la alteración, además de las medidas anteriores, se debe emplear algún tratamiento desodorante, capaz de eliminar el olor al menos parcialmente (bentonita, caseína, carbón, pvpp). En estos casos y cuando la contaminación de es muy elevada (>1000cels/ml) debe considerarse realizar procedimientos de clarificación y posterior filtración por debajo de una micra. La pasteurización es también efectiva, pero poco aplicable a vinos de crianza.

Las barricas que han albergado vino con grado de contaminación son un peligro potencial para la bodega y deben desecharse. Una barrica contaminada es foco de infección para las restantes.

REFERENCIAS

» Arvik, T., Henick-Kling, T. (2002) *Brettanomyces bruxellensis* occurrence, growth, and effect on wine flavor. *Practical Winery May-jun*, 48-56.
 » Boulton, R.B., Singleton, V.L., Visón, L.F., Kunkee, R.E. (1996) *Principles and Practices of Winemaking*. Chapman & Hall, New York.
 » CCavin, J., Andioc, P., Etievant, P., Divies, C. (1993) Ability of

wine lactic bacteria to metabolize phenol caboxylic acid. *American Journal of Enology and Viticulture*, 1, 76-8.

» Chattonet, P., Boidron, J., Dubordieu, D. (1993) Influence des conditions d'élevage et de sulfitage des vins rouges en barriques sur le teneur en acide acétique et en ethyl-phenols. *J. Int. Sci. Vigen Vin*, 27, 277-298.
 » Chattonet, P., Dubordieu, D., Boidron, J. (1995) The influence of *Brettanomyces/Dekkera* sp. Yeast and lactic acid bacteria on the ethylphenol content of red wines. *American Journal of Enology and Viticulture* 46, 463-468.
 » Chattonet, P., Vila, C. Dubordieu, D. (1997). Influence of polyphenolic components of red wines on the microbial synthesis of volatile phenols. *American Journal of Enology and Viticulture*, 48, 443-448.
 » Deak, T., Beuchat, L.R. (1996). *Handbook of spoilage yeast*. CRC Press, New York.
 » Degrossi, G., Laureto, P., Buschi, C. (1995). Purification and characterization of ferulate and p-coumarate descarboxylase from *Bacillus pumilus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61, 326-332.
 » Dias, L., Pereira-da-Silva, S., Tavares, M., Nalfeito-Ferreira, M., Loureiro, V. (2003). Factors affecting the production of 4-ethylphenol by the yeast *Dekkera bruxellensis* in enological conditions. *Food. Microbiology*, 377-384.
 » Edlin, D., Narbad, A., Dickinson, J., Lloyd, D. (1995). The biotransformation of phenolic compounds by *Brettanomyces anomalus*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 15, 311-315.
 » Freer, S.N., Dien, B.S., Matsuda, S. Rothast, R.J. (2000) Acetic acid production by *Brettanomyces* yeast. *Abstracts of the general Meeting of the American Society for Microbiology*. 100,503.
 » Gilliland, R.B. (1961) *Brettanomyces*. I. Occurrence, characteristics and effects on beer flavour. *J. Inst. Brew*, 67, 257-261.
 » Grbin, P.R., Henschke, P.A. (2000) Mousy off-flavour production in grapejuice and wine by *Dekkera* and *Brettanomyces* yeast. *Aust. J. Grape Wine Res.* (6) 255-256.
 » González, U, Navascués, E. (2006). Contaminación por *Brettanomyces* en vinos españoles: incidencia y causas más frecuentes. V Foro Mundial del Vino, Logroño.
 » Heresztyn, T. (1986) Formation of substituted tetrahydropyridines by species of *Brettanomyces* and *Lactobacillus* isolated from mousy wines. *Am J. Enol & Vitic*, 37, 127-132.
 » Ibeas, J.I., Lozano, I. Perdignes, F. y Jiménez, J. (1996) Detection of *Dekkera-Brettanomyces* strains in Sherry by a Nested PCR Method. *Applied and Environmental Microbiology* 62 (3) Mar. 998-1003.
 » Millet V., Lonvaud-Funel, A. (2000). The viable but not culturable state of wine microorganisms during storage. *Letters in Applied Microbiology*. 30(2) Feb. 136-141.
 Navascués, E., (2003). Método de detección directa de *Brettanomyces ssp.* en vinos de crianza en barrica. *Enólogos*, Año V, num. 23, 24-26.
 » Rodrigues, N., Gonçalves, G., Malfeito-Ferreira, M., Loureiro, V. (2001) Development and use of a differential medium to detect yeast of the genera *Dekkera/Brettanomyces*. *Journal of Applied Microbiology*, 90, 588-599.
 » Steinke, R.D., Paulson, M.C. (1964). The production of steam volatile phenols during the cooking and alcoholic fermentation of grain. *Agric. Food Chem.*, 12, 381-387.
 » Suezawa, Y. (1995) Bioconversions of ferulic and p-coumaric acid to volátil phenols by halotolerant yeast. *Nippon Nogeikagaku Kaishi*, 69, 1587-1596.
 » Suezawa, Y., Yoshioka, N., Mori, H. (1998). Bioconversions of ferulic and p-coumaric acid to volatile phenols by *Aspergillus* sp and bacteria found in soy sauce Koji and mash. *Nippon Nogeikagaku Kaishi*, 69, 1587-1596
 » Walker, G.M. (1999) *Yeast Physiology and Biotechnology*. John Wiley and Sons. New York.

PARA MAYOR INFORMACIÓN, INGRESE EN:
www.revistaenologia.com