

Palabras clave: PCR en tiempo real, *Brettanomyces*, *Zygosaccharomyces*, bacterias lácticas y bacterias acéticas.

Resumen: La estabilidad microbiológica del vino es una condición impredecible para su conservación en buenas condiciones. El vino es sujeto a la contaminación de varios microorganismos (levaduras, bacterias) durante todo su proceso de elaboración (vinificación, crianza, envasado, envejecimiento en botella). Estas contaminaciones pueden conducir a la producción de varios metabolitos cuyos impactos en el vino pueden ser irreversibles. El control de la estabilidad microbiológica durante las etapas claves de vinificación permite asegurarse entonces la buena calidad del producto final.

Excell ha desarrollado métodos de análisis microbiológicos finos específicos para levaduras, bacterias y *Brettanomyces /Dekkera* que permite seguir la evolución y el control de *Brettanomyces* y su impacto organoléptico en el vino.

La reacción en cadena de la polimerasa, cuyas iniciales en inglés son PCR (Polymerase Chain Reaction), es una técnica con la que se pueden producir en el laboratorio múltiples copias de un fragmento de ADN específico, incluso en presencia de millones de otras moléculas de ADN. Como su nombre indica, se basa en la actividad de la enzima ADN polimerasa que es capaz de fabricar una cadena de ADN complementaria a otra ya existente. Sus únicos requerimientos son que existan nucleótidos en el medio que son la materia base para fabricar el ADN (los nucleótidos de adenina, timina, citosina y guanina), y una pequeña cadena de ADN que pueda unirse a la molécula que queremos copiar para que sirva como cebadora (el cebador, en inglés "primer").

La sensibilidad de la técnica de PCR es muy alta pero presenta algunos inconvenientes, como son que no es una técnica cuantitativa y una relativamente alta probabilidad de obtener falsos positivos por contaminación. Para solventar este último problema se ha de optimizar la secuencia

de los cebadores. Por otra parte para solventar el problema de la cuantificación se han generado la técnica de la PCR cuantitativa o PCR en tiempo real. La clave en la PCR cuantitativa es la posibilidad de detectar en tiempo real la amplificación de nuestro genoma de interés. Para llevar a cabo esta detección existen varios métodos pero casi todos basados en la utilización de otro fragmento de ADN (sonda) complementario a una parte intermedia del ADN que queremos amplificar. Esta sonda lleva adherida una molécula fluorescente y otra molécula que inhibe esta fluorescencia (quencher), de tal forma que sólo cuando la sonda es desplazada de su sitio por acción de la ADN polimerasa la molécula fluorescente se libera de la acción del "quencher" y emite fluorescencia al ser iluminada con un láser. La cuantificación de la fluorescencia emitida durante cada ciclo de la PCR será proporcional a la cantidad de ADN que se está amplificando. En general para que sea válida esta técnica requiere realizar en paralelo una curva patrón en las mismas condiciones para conocer la cantidad total de ADN que se está amplificando.

El Laboratorio EXCELL ha desarrollado recientemente una nueva técnica de análisis de microbiológica basada en una amplificación específica del genoma de ciertos gérmenes de alteración. Esta nueva tecnología es perfectamente complementaria de las soluciones ya utilizadas para la identificación y el control del desarrollo de *Brettanomyces* gracias a la dosificación rápida de los etil-fenoles (en 24 h) y al cultivo en medio específico (8 días) pero con un espectro de control mucho más amplio. Esta técnica cuantitativa es, comparada con las precedentes, infinitamente más rápida (resultados en el día), sensible y muy específica y permite además realizar recuentos simultáneamente de diversos micro-organismos.

Existen dos métodos diferentes, uno desarrollado para la identificación y cuantificación de levaduras (EXCELL Gen levaduras), que sirva para *Brettanomyces/Dekkera* y *Zygosaccharomyces*, y otro para bacterias contaminantes (EXCELL Gen bacteria), útil para *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Lactobacillus* y *Pediococcus*. En análisis se realiza sobre una misma muestra.