IVES Technical Reviews
viña & vino

https://doi.org/10.20870/IVES-TR.2023.7743

Evaluación del impacto de un tratamiento con quitosano sobre los microorganismos en enología

Cécile Miot-Sertier[1], Margot Paulin[1], Lucie Dutilh[2], Marine Lucas[2], Patricia Ballestra[1], Warren Albertin[1], Isabelle Masneuf-Pomarede[1], Joana Coulon[3], Virginie Moine[3], Amélie Vallet-Courbin[2], Julie Maupeu[2], Marguerite Dols-Lafargue[1]

[1] Univ. Bordeaux, INRAE, Bordeaux INP, Bordeaux Sciences Agro, UMR 1366 OENOLOGIE, ISVV, F-33140 Villenave d'Ornon, France
[2] Microflora-ADERA, Univ. Bordeaux, INRAE, Bordeaux INP, Bordeaux Sciences Agro, UMR 1366 OENOLOGIE, ISVV, F33882 Villenave d'Ornon, France.
[3] BioLaffort, 11 rue Aristide Berges, 33700 FLOIRAC, France.

En el contexto de la disminución del SO_2 en los vinos, el empleo empírico de quitosano para eliminar el agente alterante *Brettanomyces bruxellensis* se torna una alternativa frecuente. El tratamiento con quitosano afecta a un cierto número de especies microbianas, al menos transitoriamente, aunque existe una gran variabilidad de respuestas dentro de las cepas de cada especie. Además, la eficacia del quitosano sería igualmente modulada por los parámetros fisicoquímicos del vino. Aún así, cuando el tratamiento con quitosano es eficaz, su efecto parece ser duradero.

El quitosano en enología

El proyecto Chitowine, financiado por la Agencia Nacional de la Investigación desde 2018 hasta finales del 2022, buscó comprender mejor el mecanismo de acción del quitosano en enología, por medio de la evaluación fina de su eficacia para diferentes usos enológicos. Estos trabajos se apoyan sobre todo en los conocimientos científicos adquiridos con respecto a los grandes grupos microbianos encontrados en enología.

El quitosano se emplea desde el 2009 (OIV/Oeno, 338A/2008 y reglamento europeo EC/53/2011) incluso en Agricultura Biológica (Regulación EU 1584/2018) para tratar los vinos contaminados por la levadura de alteración *Brettanomyces bruxellensis*. En efecto, este polisacárido derivado de la quitina se encuentra con carga positiva en el pH del vino, lo que le permite interactuar con las partículas de carga negativa y sobre todo con los microorganismos presentes. No obstante, los trabajos efectuados divergen con respecto a su eficacia frente a esta especie así como frente a otros microorganismos enológicos. Además, aconsejada hasta hace poco durante la crianza, ahora los proveedores proponen numerosas aplicaciones precoces sin verdadera demostración científica, sobre todo para su utilización en fase prefermentativa.

¿Cuál es el impacto del tratamiento con quitosano sobre los microorganismos enológicos?

Se condujo un estudio de amplia envergadura, efectuado en 206 cepas de 27 especies de levaduras y bacterias del ecosistema enológico en vino bajo condiciones estandarizadas[1]. Para ciertas especies, como *Saccharomyces cerevisiae, B. bruxellensis* y *Oenococcus oeni*, las cepas fueron seleccionadas según su representatividad dentro de los grupos genéticos[2 3 4]. Estas cepas fueron adaptadas y luego puestas en crecimiento en un vino fermentado en el laboratorio. Para cada una, se realizó un tratamiento con quitosano a 4 o 10 g/hL seguido de un trasiego a 3 o 10 días de iniciadas las pruebas. Un control, simplemente trasegado bajo las mismas condiciones, permitió atestiguar la supervivencia de las cepas microbianas en las condiciones del ensayo en ausencia de tratamiento.

Existen 3 grandes comportamientos de respuesta a la adición de quitosano en *Brettanomyces bruxellensis*

Este estudio puso de manifiesto la existencia de tres tipos de respuesta en *B. bruxellensis* frente al tratamiento con quitosano (Figura 1):

- Las cepas dichas SENSIBLES, las cuales desde el 3er día de contacto se encuentran a niveles de población viable y cultivable muy bajos (o por debajo del umbral de detección del método) tanto en las lías como en la fracción de vino trasegado.
- Las cepas consideradas INTERMEDIAS, para las cuales se detectan pocas células viables y cultivables en la fracción de vino trasegado, mientras que poblaciones no despreciables de microorganismos se encuentran presentes en las lías.
- Las cepas calificadas como TOLERANTES, transitoriamente afectadas por el tratamiento, pero que presentan poblaciones viables y cultivables importantes en la fracción de vino trasegado y en las lías a los diez días.

B. bruxellensis se ve, por lo tanto, globalmente afectada por el quitosano[2]. Como prueba, en condiciones de laboratorio en vinos estandarizados, el 41 % de las cepas de *B. bruxellensis* presenta un comportamiento «sensible» y el 38 % se asocia más bien a una respuesta dicha «intermediaria».

Finalmente, diversas pruebas demostraron que después del trasiego el tratamiento con quitosano elimina cerca del 80 % de las cepas entre una cincuentena testeadas en vino tinto. Sin embargo, ciertas cepas se mantienen insensibles al tratamiento y siguen siendo viables y susceptibles de crecer y producir fenoles volátiles en el vino a pesar de haber sido tratado.

Para un mismo vino y una cepa dada, la dosis utilizada, 4 o 10 g/hL (como recomienda la OIV), modula poco el comportamiento de la cepa, afectando solo la envergadura del resultado.

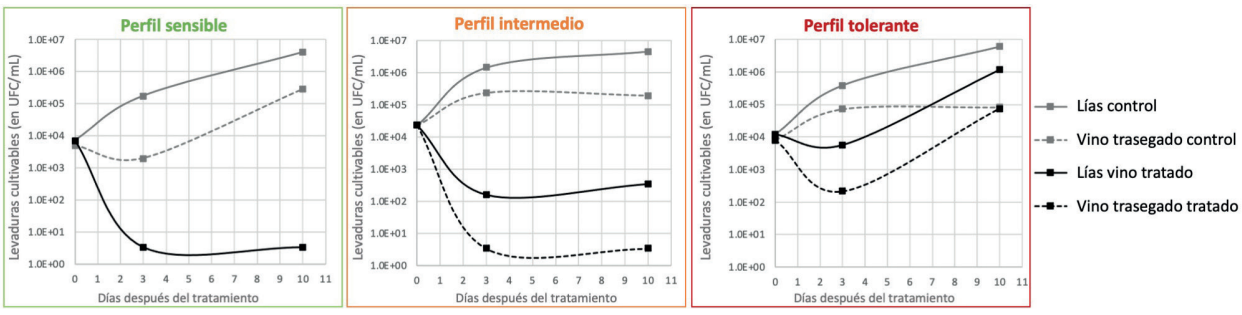

FIGURA 1. Curvas de tendencia que definen los diferentes comportamientos de las cepas microbianas de *B. bruxellensis* observadas luego de un tratamiento con quitosano a 10 g/L en un mismo vino tinto. Las líneas continuas corresponden a las lías del vino tratado (en negro) o control (en gris). Las líneas punteadas corresponden a la fracción de vino trasegado tratado (en negro) o control (en gris).

Esta obra está bajo una licencia internacional Creative Commons Atribución 4.0.

¿Existe una relación entre el grupo genético de las levaduras *B. bruxellensis* y su respuesta frente al quitosano?

La relación entre la sensibilidad al SO_2 y la pertenencia a un grupo genético de *B. bruxellensis* fue demostrada el 2018[5]. Los trabajos del proyecto Chitowine fueron entonces agregados para buscar la existencia de una potencial relación entre el grupo genético y el comportamiento frente al quitosano para una cincuentena de cepas[6]. Así, se estableció la naturaleza del comportamiento de las cepas de *B. bruxellensis* frente al tratamiento con quitosano para muestras de cada uno de los 6 grandes grupos genéticos.

A las dosis de quitosano recomendadas en enología (4 a 10 g/hL), el estudio no permite establecer una relación clara y robusta entre grupo genético y comportamiento de la cepa (Figura 2). No obstante, una gran proporción de cepas resistentes al SO_2 (grupo AWRI 1499) son sensibles al quitosano.

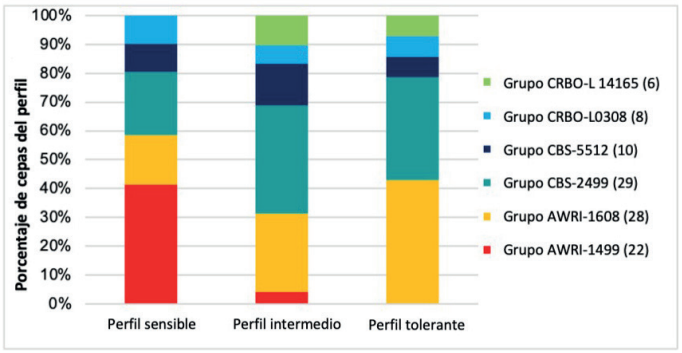

FIGURA 2. Repartición de las cepas de *B. bruxellensis* según el grupo genético (número de ensayos entre paréntesis) en función de su comportamiento frente al tratamiento con quitosano a 10 g/L en un mismo vino tinto.

¿Qué hay de los otros microorganismos encontrados en enología?

El estudio fue ampliado a 27 especies de levaduras y bacterias enológicas. Se encuentran los tres grandes comportamientos frente al quitosano en proporciones variables según la especie o el grupo de especies consideradas (Figura 3).

La mayoría de los microorganismos estudiados se ven afectados, al menos transitoriamente, por el tratamiento con quitosano a 10 g/hL en vino tinto. Por ejemplo, entre las levaduras *S. cerevisiae* testeadas, más de la mitad son eficazmente eliminadas por el quitosano. Los efectos son variables en las especies de levaduras dichas no-*Saccharomyces* encontradas en fase prefermentativa. En laboratorio, la mayor parte de las cepas de la especie *Hanseniaspora uvarum* no se ven afectadas por el tratamiento precoz con quitosano. Para las levaduras de interés como *T. delbrueckii* o *M. pulcherrima*, los resultados son muy heterogéneos y dependen claramente de la cepa considerada.

Las bacterias acéticas casi no se ven afectadas por el tratamiento del vino tinto, ya sea en vinificación o en crianza: ninguna de las cepas testeadas experimentó modificaciones en su viabilidad debido al quitosano. Finalmente, la eficacia para las bacterias lácticas es variable, con un mosaico de respuestas, excepto para la especie *O. oeni*, fuertemente afectada por el quitosano en más del 90 % de las pruebas.

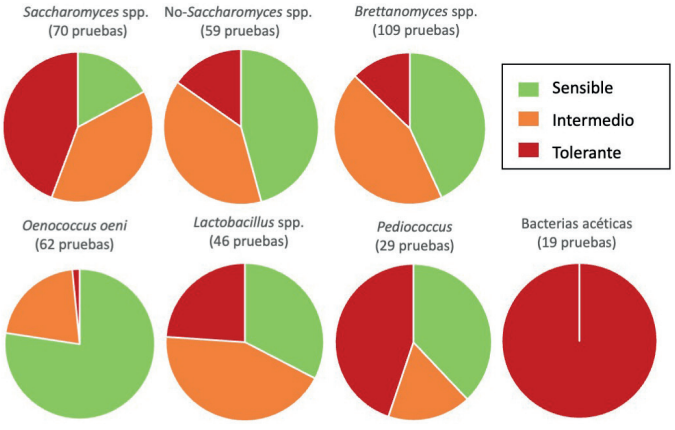

FIGURA 3. Repartición del perfil sensible, intermedio o tolerante de las cepas microbianas testeadas dentro de una especie o un grupo de microorganismos después del tratamiento con quitosano a 10 g/hL en un mismo vino tinto.

¿La eficacia del quitosano es modulada por el estado de la vinificación?

La naturaleza del vino modula la disponibilidad del quitosano y la capacidad de los microorganismos a sobrellevar sus efectos.

La aplicación precoz de quitosano en el encubado no permite remplazar el sulfitado para controlar la predominancia de levaduras no deseadas como la especie *H. uvarum*, confirmando las pruebas de laboratorio (Figura 3). De todas maneras, esta aplicación precoz no parece perturbar el avance de la fermentación alcohólica cuando el mosto es inoculado con una cepa seleccionada de *S. cerevisiae*. Sin embargo, una aplicación precoz, aunque eficaz, produce fermentaciones malolácticas de duración variable. Esto se explica en parte por la sensibilidad de las cepas de *O. oeni* al quitosano. No obstante, la eliminación de *B. bruxellensis* es posible de forma duradera siempre y cuando sea acompañada de un trasiego eficaz (datos en curso de publicación). Finalmente, el tratamiento no es eficaz para el control de las bacterias acéticas.

Conclusión

Los microorganismos enológicos reaccionan según tres comportamientos frente al tratamiento con quitosano en el vino y pueden ser categorizados como sensibles, intermedios o tolerantes. Un trasiego eficaz después del tratamiento permite la eliminación de la levadura alterante *B. bruxellensis* para el 80 % de las cepas testeadas en este estudio, y de forma duradera. Para nuestra tranquilidad, la mayoría de las cepas pertenecientes al grupo genético AWRI 1499 (conocido por su tolerancia a los sulfitos[5]) testeadas en este estudio son sensibles al quitosano. Por lo demás, un tratamiento precoz no parece influenciar el buen desarrollo de la fermentación alcohólica, pero no tiene más que un interés limitado, incluso ninguno, para el control de las levaduras no-*Saccharomyces* o de las bacterias acéticas. Además, aplicado demasiado pronto, el quitosano vuelve aleatorio el buen desarrollo de la fermentación maloláctica y por lo tanto no es recomendado. ■

Los autores quisieran agradecer a la Agencia Nacional de la Investigación por la financiación del proyecto Chitowine: ANR-17-CE21-0006.

Información extraída del artículo de investigación "Brettanomyces bruxellensis displays variable susceptibility to chitosan treatment in wine." (Front. Microbio, 2021) y "Assessment of chitosan antimicrobial effect on wine microbes" (Int. Journal of Food Microbiol., 2022).

1 Miot-Sertier C., Paulin M., Dutilh L., Ballestra P., Albertin W., Masneuf-Pomarède I., Coulon J., Moine V., Vallet-Courbin A., Maupeu J. and Dols-Lafargue M. (2022). Assessment of chitosan antimicrobial effect on wine microbes. *Int. Journal of Food Microbiol.* (381). https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2022.109907

2 Da Silva T, Albertin W, Dillmann C, Bely M, la Guerche S, Giraud C, Huet S., Sicard D., Masneuf-Pomarede I., De Vienne D. and Marullo P. (2015). Hybridization within *Saccharomyces* genus results in homoeostasis and phenotypic novelty in winemaking conditions. *PLoS One*. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0123834

3 Avramova M., Cibrario A., Peltier E., Coton M., Coton E., Schacherer J., Spano G ., Capozzi V., Bmaiotta G., Salin F., Dols-Lafargue M., Grbin P., Curtin C., Albertin W. and Masneuf-Pomarede I. (2018a). *Brettanomyces bruxellensis* population survey reveals a diploid-triploid complex structured according to substrate of isolation and geographical distribution. *Sci. Rep.* (8) 4136. http://doi.org/10.1038/s41598-018-22580-7

4 Campbell-Sills H., El Khoury M., Favier M., Romano A., Biasioli F., Spano G., Sherman D.J., Bouchez O., Coton E., Coton M., Okada S., Tanaka N., Dols-Lafargue M. and Lucas P.M. (2015). Phylogenomic analysis of *Oenococcus oeni* reveals specific domestication of strains to cider and wines. *Genome Biol Evol 7*, 1506–1518. https://doi.org/10.1093/gbe/evv084

5 Avramova M., Vallet-Courbin A., Maupeu J., Masneuf-Pomarède I. and Albertin W. (2018b). Molecular diagnosis of *Brettanomyces bruxellensis*'s sulfur dioxide sensitivity through genotype specific method. Front. Microbiol. (9)1260. http://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01260

6 Paulin M., Miot-Sertier C., Dutilh L., Brasselet C., Delattre C., Pierre G., Dubessay P., Michaud P., Doco T., Ballestra P., Albertin W., Masneuf-Pomarède I., Moine V., Coulon J., Vallet-Courbin A., Maupeu J. and Dols-Lafargue M. (2020). Brettanomyces bruxellensis displays variable susceptibility to chitosan treatment in wine. Front Microbiol. (11)571067. http://doi.org/ 10.3389/fmicb.2020.571067