IVES Technical Reviews
vigna & vino

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

Valutazione dell'impatto del trattamento con chitosano sui microrganismi in enologia

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.

In un contesto di riduzione delle dosi di SO_2 nei vini, l'uso empirico del chitosano per eliminare il lievito alterante *Brettanomyces bruxellensis* è diventato un'alternativa frequente. Il trattamento con chitosano influenza un certo numero di specie microbiche, almeno transitoriamente, ma esiste una grande variabilità di risposta all'interno dei ceppi di ciascuna specie. Inoltre, l'efficacia del chitosano sembra essere modulata anche dai parametri chimico-fisici del vino. Tuttavia, quando il trattamento con chitosano è efficace il suo effetto sembra essere duraturo.

Il chitosano in enologia

Il progetto Chitowine, finanziato dall'Agenzia Nazionale della Ricerca dal 2018 fino alla fine del 2022, è stato finalizzato ad una migliore comprensione del meccanismo d'azione del chitosano in enologia, attraverso una fine valutazione della sua efficacia per diversi usi enologici. Tali lavori si basano in particolare sulle conoscenze scientifiche acquisite sui grandi gruppi microbici di interesse enologico.

Il chitosano è utilizzato dal 2009 (OIV/Oeno, 338A/2008 e normativa europea EC/53/2011) anche in Agricoltura Biologica (Regulation EU 1584/2018) per trattare i vini contaminati dal lievito alterante *Brettanomyces bruxellensis*. Infatti, questo polisaccaride derivato dalla chitina possiede una carica positiva al pH del vino, la quale gli permette di interagire con le particelle cariche negativamente nel vino e in particolare con i microrganismi presenti. Tuttavia, i lavori svolti divergono sulla sua efficacia nei confronti di questa specie e di altri microrganismi di interesse enologico. Inoltre, mentre è raccomandato da poco tempo durante l'affinamento, molte applicazioni in fasi della vinificazione più precoci sono ormai proposte dai fornitori, in particolare per l'uso in fase pre-fermentativa, senza una reale dimostrazione scientifica.

Qual è l'impatto del trattamento con chitosano sui microrganismi di interesse enologico?

Un ampio studio, che ha preso in considerazione 206 ceppi di 27 specie di lieviti e batteri appartenenti all'ecosistema enologico, è stato condotto nel vino, in condizioni standardizzate[1]. Per alcune specie, come *Saccharomyces cerevisiae*, *B. bruxellensis* e *Oenococcus oeni*, i ceppi sono stati selezionati in base alla loro rappresentatività all'interno dei gruppi genetici[2 3 4]. Questi ceppi sono stati adattati e poi messi in coltura in un vino fermentato in laboratorio. Per ciascuno, è stato effettuato un trattamento con chitosano a 4 o 10 g/hL, seguito da un travaso a 3 o 10 giorni dopo il trattamento. Un testimone, semplicemente travasato nelle stesse condizioni, ha permesso di confermare la sopravvivenza dei ceppi microbici nelle condizioni dell'esperimento in assenza di trattamento.

Esistono 3 grandi comportamenti di risposta di *Brettanomyces bruxellensis* all'aggiunta di chitosano

Questo studio ha messo in evidenza l'esistenza di tre tipi di risposte di *B. bruxellensis* rispetto al trattamento con chitosano (Figura 1):

- I ceppi detti **SENSIBILI,** che dal terzo giorno di contatto sono a livelli di popolazioni vitali e coltivabili molto bassi (o al di sotto del limite di rilevazione del metodo) sia nelle fecce che nella frazione di vino travasato.
- I ceppi considerati **INTERMEDI**, per i quali sono rilevate nella frazione di vino travasato poche cellule vitali e coltivabili, mentre nelle fecce sono presenti popolazioni non trascurabili di microrganismi.
- I ceppi definiti **TOLLERANTI**, transitoriamente colpiti dal trattamento, ma che presentano popolazioni vitali e coltivabili importanti nella frazione di vino travasato e nelle fecce dopo dieci giorni.

B. bruxellensis è quindi globalmente influenzato dal chitosano[2]. Per riprova, in condizioni di laboratorio in vini standardizzati, il 41% dei ceppi di *B. bruxellensis* presentano un comportamento «sensibile» e il 38% sono piuttosto associati ad una risposta «intermedia».

Infine, diversi studi hanno dimostrato che, dopo il travaso, il trattamento con chitosano elimina quasi l'80 % dei ceppi tra una cinquantina di quelli testati in vino rosso. Tuttavia, alcuni ceppi rimangono insensibili al trattamento rimanendo vitali e possono crescere e produrre fenoli volatili nel vino anche se trattato.

Per uno stesso vino e un determinato ceppo, la dose utilizzata, 4 o 10 g/hL (come raccomandato dall'OIV), modula poco il comportamento del ceppo, soltanto la tendenza del risultato.

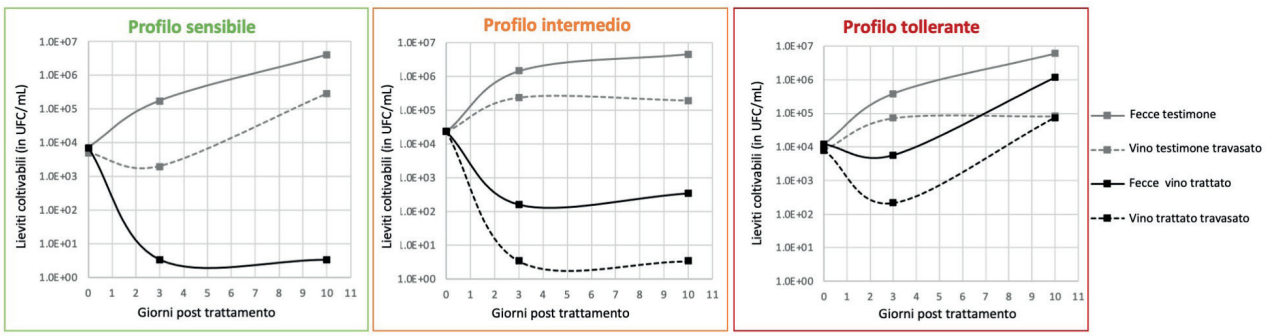

FIGURA 1. Curve di tendenza che definiscono i diversi comportamenti dei ceppi microbici di *B. bruxellensis* osservati in seguito a un trattamento con chitosano a 10 g/hL in uno stesso vino rosso. Le linee piene corrispondono alle fecce del vino trattato (in nero) o del testimone (in grigio). Le linee tratteggiate corrispondono alla frazione di vino travasato trattato (in nero) o testimone (in grigio).

La traduzione di questo articolo in italiano vi stata offerta da WineHunter Hub. https://www.winehunterhub.com/

Esiste un legame tra il gruppo genetico dei lieviti *B. bruxellensis* e la loro risposta al chitosano?

Il legame tra la sensibilità all'SO_2 e l'appartenenza a un gruppo genetico di *B. bruxellensis* è stato dimostrato nel 2018[5]. I lavori del progetto CHITOWINE si sono quindi concentrati sulla ricerca di un legame potenziale tra il gruppo genetico e il comportamento nei confronti del chitosano su una cinquantina di ceppi[6] . Ad esempio, la natura del comportamento dei ceppi di *B. bruxellensis* nei confronti del chitosano è stata stabilita per gli isolati di ciascuno dei 6 grandi gruppi genetici.

Alle dosi di chitosano raccomandate in enologia (da 4 a 10 g/hL), lo studio non permette di stabilire un legame chiaro e solido tra gruppo genetico e comportamento del ceppo (Figura 2). Tuttavia, una grande percentuale di ceppi resistenti all'SO_2 (gruppo AWRI 1499) sono sensibili al chitosano.

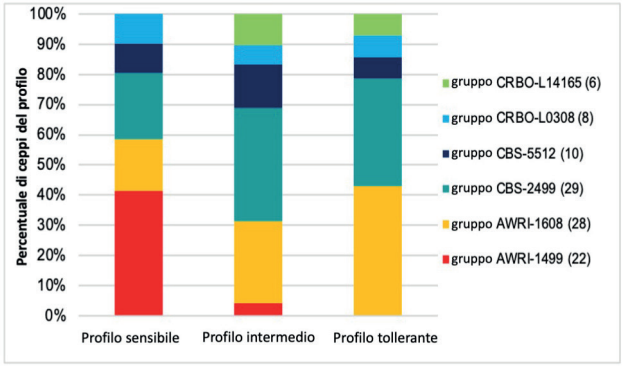

FIGURA 2. Distribuzione dei ceppi di *B. bruxellensis* secondo il gruppo genetico (numero di campioni tra parentesi) in funzione del loro comportamento nei confronti di un trattamento con chitosano a 10 g/hL in uno stesso vino rosso.

E gli altri microrganismi di interesse enologico?

Lo studio è stato esteso a 27 specie di lieviti e batteri enologici. I tre grandi comportamenti nei confronti del chitosano sono confermati ma in proporzioni variabili secondo la specie o il gruppo di specie considerato (Figura 3).

La maggior parte dei microrganismi studiati sono affetti, almeno temporaneamente, dal trattamento con chitosano a 10 g/hL in un vino rosso. Ad esempio, tra i lieviti *S. cerevisiae* testati, più della metà è efficacemente eliminata dal chitosano. Gli effetti sono variabili sulle specie di lieviti non-*Saccharomyces* incontrate nella fase pre-fermentativa. In laboratorio, la maggior parte dei ceppi della specie *Hanseniaspora uvarum* non è affetta dal trattamento precoce con chitosano. Per i lieviti di interesse come *T. delbrueckii* o *M. pulcherrima*, i risultati sono molto eterogenei e dipendono chiaramente dal ceppo considerato.

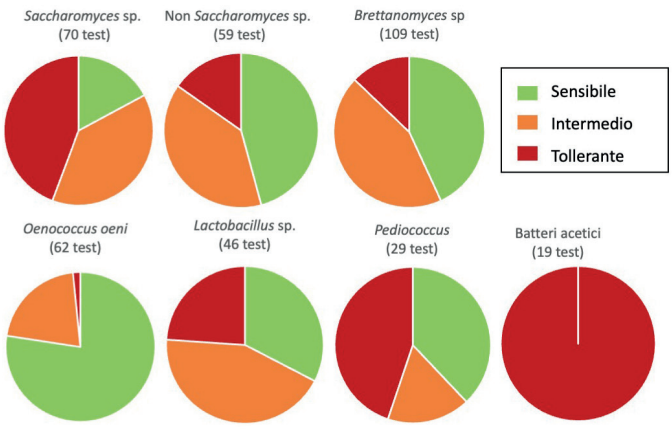

FIGURA 3. Distribuzione del profilo sensibile, intermedio o tollerante dei ceppi microbici all'interno di una specie o di un gruppo di microrganismi dopo il trattamento con chitosano a 10 g/hL in uno stesso vino rosso.

I batteri acetici sono molto poco colpiti dal trattamento nel vino rosso, sia in vinificazione che in affinamento: nessuno dei ceppi testati ha modificato la sua vitalità post-trattamento con chitosano. Infine, l'efficacia sui batteri lattici è variabile, con una diversità di risposte, salvo nella specie *O. oeni* fortemente colpita dal chitosano in più del 90 % dei test.

L'efficacia del chitosano è modulata dalla fase di vinificazione ?

La natura del vino modula la disponibilità del chitosano e la capacità dei microrganismi a opporsi al suo effetto.

L'utilizzo precoce del chitosano durante l'ammostatura non permette di sostituire l'uso dei solfiti per controllare la predominanza di lieviti indesiderati come la specie *H. uvarum*, confermando le prove di laboratorio (Figura 3). Tale applicazione precoce non sembra tuttavia perturbare lo svolgersi della fermentazione alcolica quando il mosto è inoculato con un ceppo selezionato di *S. cerevisiae*. D'altra parte, un'applicazione precoce anche se efficace rende casuale il processo di fermentazione malolattica. Ciò è in parte spiegato dalla sensibilità dei ceppi di *O. oeni* al chitosano. L'eliminazione duratura di B. bruxellensis è tuttavia possibile, a condizione di un travaso efficace (Dati in corso di publicazione). Infine, il trattamento non è efficace per il controllo dei batteri acetici.

Conclusioni

I microrganismi enologici reagiscono in tre modi al trattamento di un vino con chitosano e possono essere classificati come sensibili, intermedi o tolleranti. Un travaso efficace dopo il trattamento permette l'eliminazione del lievito alterante *B. bruxellensis*, per l'80 % dei ceppi studiati, e in modo duraturo. In questo studio la maggior parte dei ceppi appartenenti al gruppo genetico AWRI 1499 (noto per la sua tolleranza ai solfiti[5]), è risultata essere sensibile al chitosano. Inoltre, un trattamento precoce non sembra influenzare il corretto svolgimento della fermentazione alcolica, ma ha un interesse limitato, se non nullo, per il controllo dei lieviti non-*Saccharomyces* o dei batteri acetici. Inoltre, applicato troppo precocemente, il chitosano rende aleatorio il corretto svolgimento della fermentazione malolattica e quindi non è raccomandato. ■

Gli autori ringraziano l'ANR (Agence national de la Recherche) per il finanziamento del progetto CHITOWINE : ANR-17-CE21-0006.

***Fonte:** Articolo basato sui lavori di ricerca "Brettanomyces bruxellensis displays variable susceptibility to chitosan treatment in wine." (Front. Microbio, 2021) e "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

This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License.