IVES Technical Reviews
vinha & vinho

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

Avaliação do impacto do tratamento com quitosana nos microrganismos de 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, ISW, F-33140 Villenave d'Ornon, France
[2] Microflora-ADERA, Univ. Bordeaux, INRAE, Bordeaux INP, Bordeaux Sciences Agro, UMR 1366 OENOLOGIE, ISW, F33882 Villenave d'Ornon, France.
[3] BioLaffort, 11 rue Aristide Berges, 33700 FLOIRAC, France.

Num contexto de redução de SO_2 nos vinhos, a utilização empírica de quitosana, para eliminar o agente deteriorante *Brettanomyces bruxellensis*, torna-se uma alternativa frequente. O tratamento com quitosana afeta várias espécies microbianas, pelo menos temporariamente, mas há uma grande variabilidade na resposta dentro das estirpes de cada espécie. Além disso, a eficácia da quitosana também seria modulada pelos parâmetros físico-químicos do vinho. No entanto, quando o tratamento com quitosana é eficaz, o seu efeito parece ser duradouro.

Quitosana em enologia

O projeto Chitowine, financiado pela Agência Nacional de Investigação francesa entre 2018 e o final de 2022, teve como objetivo compreender melhor o mecanismo de ação da quitosana em enologia, através da avaliação detalhada da sua eficácia para diferentes utilizações enológicas. Este trabalho baseia-se, em particular, no conhecimento científico adquirido sobre os principais grupos microbianos encontrados na enologia.

A quitosana é utilizada desde 2009 (OIV/Oeno, 338A/2008 e Regulamento Europeu CE/53/2011), incluindo na agricultura biológica (Regulamento UE 1584/2018) para tratar vinhos contaminados pela levedura deteriorante *Brettanomyces bruxellensis*. De facto, este polissacárido derivado da quitina tem carga positiva ao pH do vinho, o que lhe permite interagir com as partículas de carga negativa no vinho e, em particular, com os microrganismos presentes. No entanto, os trabalhos realizados sobre a sua eficácia divergem em relação a esta espécie, bem como a outros microrganismos enológicos. Além disso, recomendado até recentemente na reprodução, muitas aplicações iniciais são agora propostas pelos fornecedores, sem verdadeira demonstração científica, especialmente para uso na fase de pré-fermentação.

Qual é o impacto do tratamento com quitosana nos microrganismos enológicos?

Foi realizado um estudo de grande escala, em 206 estirpes de 27 espécies de leveduras e bactérias do ecossistema enológico do vinho, em condições padronizadas[1]. Para algumas espécies, como *Saccharomyces cerevisiae*, *B. bruxellensis* e *Oenococcus oeni*, as estirpes foram selecionadas de acordo com a sua representatividade dentro dos grupos genéticos[2 3 4]. Estas estirpes foram adaptadas e depois cultivadas num vinho fermentado em laboratório. Para cada um, foi realizado um tratamento com quitosana a 4 ou 10 g/hl, seguido de trasfega após 3 ou 10 dias de teste. Uma amostra controlo, trasfegada de forma simples nas mesmas condições, permitiu certificar a sobrevivência das estirpes microbianas, nas condições do teste, na ausência de tratamento.

Existem 3 comportamentos principais de resposta da *Brettanomyces bruxellensis* à adição de quitosana

Este estudo evidenciou a existência de três tipos de respostas da *B. bruxellensis* em relação ao tratamento com quitosana (Figura 1):

- As chamadas estirpes **SENSÍVEIS**, que a partir do 3º dia de contacto se encontram em níveis populacionais viáveis e cultiváveis muito baixos (ou abaixo do limiar de deteção do método), tanto nas borras como na fração de vinho trasfegado.
- Estirpes consideradas **INTERMÉDIAS**, para as quais são detetadas poucas células viáveis e cultiváveis na fração do vinho trasfegado, estando presentes nas borras populações significativas de microrganismos.
- Estirpes qualificadas como **TOLERANTES**, afetadas temporariamente pelo tratamento, mas que apresentam populações viáveis e cultiváveis significativas na fração de vinho trasfegada e nas borras aos dez dias.

B. bruxellensis é, portanto, globalmente afetada pela quitosana[2]. Como prova, em condições laboratoriais em vinhos padronizados, 41% das estirpes de *B. bruxellensis* apresentam comportamento "sensível" e 38% estão bastante associadas a uma resposta dita "intermédia".

Por último, vários testes demostraram que, após trasfega, o tratamento com quitosana elimina quase 80% das estirpes entre as cinquenta testadas no vinho tinto. No entanto, algumas estirpes permanecem insensíveis ao tratamento, permanecendo viáveis e suscetíveis de crescer e produzir fenóis voláteis num vinho tratado.

Para o mesmo vinho e uma determinada estirpe, a dose utilizada, 4 ou 10 g/hl (como recomendado pela OIV), dificilmente modula o comportamento da estirpe, apenas a dimensão do resultado.

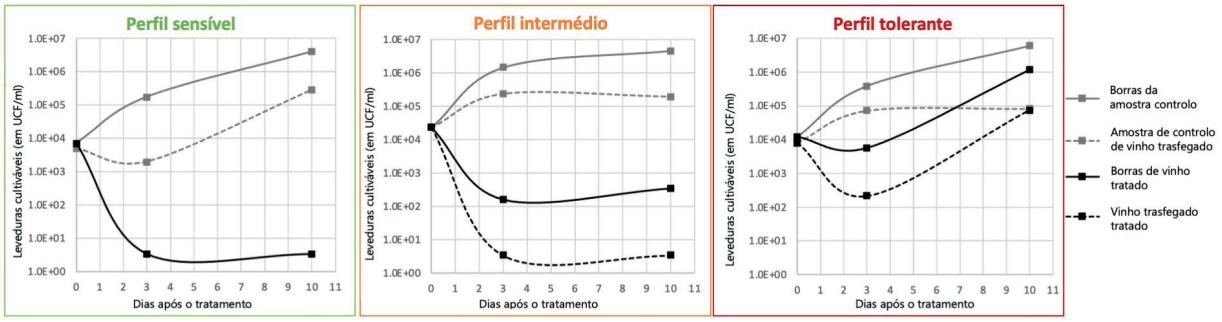

FIGURA 1. Curvas de tendência que definem os diferentes comportamentos das estirpes microbianas da *B. bruxellensis* observadas após tratamento com quitosana a 10 g/ hl num mesmo vinho tinto. As linhas contínuas correspondem às borras do vinho tratado (a preto) ou daa amostra controlo (a cinzento). As linhas pontilhadas correspondem à fração de vinho trasfegado tratado (a preto) ou da amostra controlo (a cinzento).

A tradução deste artigo para português foi-lhe oferecida pela Sogrape. Consulte https://sogrape.com/pt/sustentabilidade

Existe uma ligação entre o grupo genético das leveduras da *B. bruxellensis* e a sua resposta à quitosana?

A relação entre a sensibilidade ao SO_2 e a pertença a um grupo genético da *B. bruxellensis* foi demonstrada em 2018[5]. O trabalho do projeto CHITOWINE centrou-se, portanto, na investigação da existência de uma ligação potencial entre o grupo genético e o comportamento da quitosana em cerca de cinquenta estirpes[6]. Assim, foi estabelecida a natureza do comportamento das estirpes de *B. bruxellensis*, face ao tratamento com quitosana para isolados de cada um dos 6 principais grupos genéticos.

Nas doses de quitosana recomendadas em enologia (4 a 10 g/ hl), o estudo não estabelece uma ligação clara e robusta entre o grupo genético e o comportamento da estirpe (Figura 2). No entanto, uma grande proporção de estirpes resistentes ao SO_2 (grupo AWRI 1499) são sensíveis à quitosana.

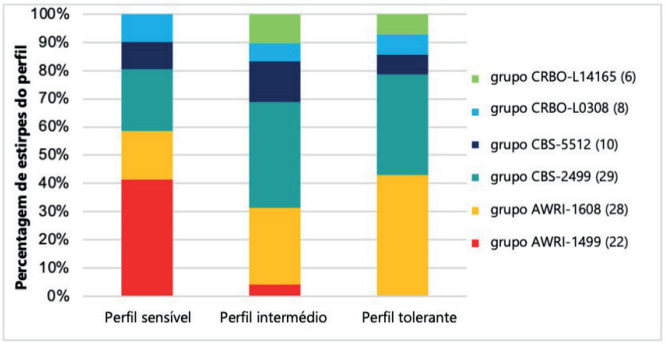

FIGURA 2. Distribuição das estirpes de *B. bruxellensis* de acordo com o grupo genético (número de testes entre parênteses) de acordo com o seu comportamento face a um tratamento com quitosana a 10 g/ hl num vinho tinto igual.

E quanto a outros microrganismos encontrados na enologia?

O estudo foi alargado a 27 espécies de leveduras e bactérias enológicas. Os três principais comportamentos em relação à quitosana são encontrados, em proporções variáveis dependendo da espécie ou grupo de espécies considerado (Figura 3).

A maioria dos microrganismos estudados são afetados, pelo menos temporariamente, pelo tratamento com quitosana a 10 g/ hl num vinho tinto. Por exemplo, das leveduras de *S. cerevisiae* testadas, mais de metade é efetivamente eliminada pela quitosana. Os efeitos são variáveis nas chamadas espécies de levedura não-*Saccharomyces* encontradas na fase de pré-fermentação. Em laboratório, a maioria das estirpes da espécie *Hanseniaspora uvarum* não é afetada pelo tratamento precoce com quitosana. Para leveduras de interesse como *T. delbrueckii* ou *M. pulcherrima*, os resultados são muito heterogéneos e dependem claramente da estirpe considerada.

As bactérias do acido acético são muito pouco afetadas pelo tratamento num vinho tinto, tanto na vinificação como no envelhecimento: nenhuma das estirpes testadas viu a sua viabilidade modificada pela quitosana. Por fim, a eficácia sobre as bactérias lácticas é variável, com um mosaico de respostas, exceto na espécie *O. oeni* fortemente afetada pela quitosana em mais de 90% das experiências.

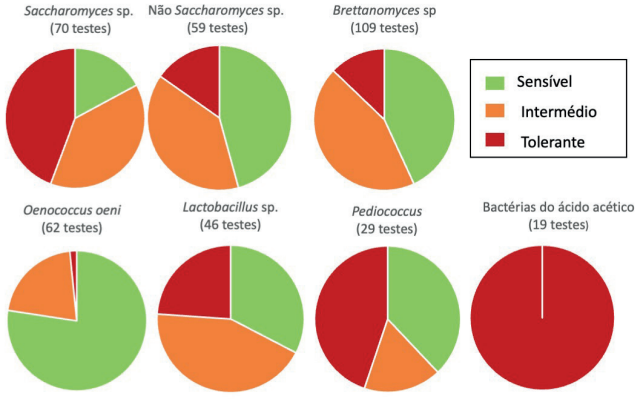

FIGURA 3. Distribuição do perfil sensível, intermédio ou tolerante das estirpes microbianas, testadas numa espécie ou grupo de microrganismos após tratamento com quitosana a 10 g/ hl no mesmo vinho tinto.

A eficácia da quitosana é modulada pela fase de vinificação?

A natureza do vinho modula a disponibilidade de quitosana e a capacidade de os microrganismos superarem os seus efeitos.

A aplicação precoce de quitosana na barrica não substitui a sulfitação para controlar a predominância de leveduras indesejadas, como a espécie *H. uvarum*, confirmando os testes laboratoriais (Figura 3). No entanto, esta aplicação precoce não parece perturbar o curso de uma fermentação alcoólica quando o mosto é inoculado com uma estirpe selecionada de *S. cerevisiae*. Por outro lado, uma aplicação precoce, embora eficaz, torna o curso da fermentação maloláctica aleatório. Isto é parcialmente explicado pela sensibilidade das estirpes de *O. oeni* à quitosana. A eliminação de B. bruxellensis é, no entanto, possível, sob reserva de uma trasfega efetiva, de uma forma sustentável (dados em processo de publicação). Por fim, o tratamento não é eficaz no controlo de bactérias do ácido acético.

Conclusão

Os microrganismos enológicos reagem de acordo com três comportamentos em relação a um tratamento de quitosana num vinho e podem ser classificados como sensíveis, intermédios ou tolerantes. A trasfega eficaz após o tratamento, permite a eliminação da levedura deteriorante *B. bruxellensis*, para 80% das estirpes testadas neste estudo, e de forma sustentável. De forma tranquilizadora, a maioria das estirpes pertencentes ao grupo genético AWRI 1499 (conhecido pela sua tolerância aos sulfitos[5]) testadas neste estudo, são sensíveis à quitosana. Além disso, o tratamento precoce não parece influenciar o bom funcionamento da fermentação alcoólica, mas é apenas de interesse limitado, ou nulo, no controlo de leveduras não-*Saccharomyces* ou bactérias do ácido acético. Além disso, quando aplicada muito cedo, a quitosana torna o bom funcionamento da fermentação malolática aleatório e, portanto, não é recomendada. ■

Os autores agradecem à Agência Nacional de Investigação francesa pelo financiamento do projeto CHITOWINE: ANR-17-CE21-0006.

Extraído do artigo de investigação "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.