




LOW  
**SO<sub>2</sub>**



# SO<sub>2</sub>



## **Disminución de las concentraciones de SO<sub>2</sub>:** Control de las poblaciones indígenas en el mosto y el vino

La concentración máxima permitida de SO<sub>2</sub> total en el vino ha ido disminuyendo continuamente en Francia desde el año 1926. Si en dicho año era de 450 mg/L, en 1970 había bajado ya a 200–350 mg/L en función del tipo de vino. En el año 1999, el reglamento europeo 1493/1999 redujo de nuevo esta concentración a 160 mg/L en los vinos tintos, y 210 mg/L en los blancos y rosados secos.

En 2009, estos valores se revisaron nuevamente a la baja, disminuyendo en 10 mg/L.

Actualmente, la utilización de sulfitos es un tema

que está en el centro de las preocupaciones técnicas. Por un lado, los consumidores buscan productos más naturales, con menos aditivos, y por otro lado hay que tener en cuenta también los efectos alergénicos de este conservante. Sin embargo, a día de hoy no existe ningún proceso o sustancia que por sí solos puedan reemplazar por completo el uso de SO<sub>2</sub>. Así, aunque su utilización genere muchas controversias, los sulfitos presentan también múltiples ventajas que hacen que su uso en enología sea esencial.

## LOS SULFITOS

Los sulfitos tienen un espectro de acción particularmente amplio. Poseen una acción **antioxidante, antioxidásica** y **antiséptica**. Además, son fáciles de usar y su bajo costo supone también una gran ventaja.

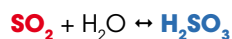
Para poder reducir las concentraciones de  $\text{SO}_2$  en el vino es necesario actuar sobre sus dos efectos protectores: contra la **oxidación** por un lado, y contra los **microorganismos no deseados** por otro lado.

Para ello es necesario conocer perfectamente tanto los mecanismos de oxidación como la interacción con los microorganismos en el mosto y el vino.

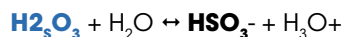


El término « $\text{SO}_2$ » se refiere en realidad a varias formas del dióxido de azufre (Figura 1).

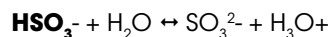
« $\text{SO}_2$ » hace referencia a varias formas del dióxido de azufre



$\text{pK}_{a1} = 1,77$



$\text{pK}_{a2} = 7,08$



### Molecular

En solución acuosa da lugar al **ácido sulfuroso**

### El ion bisulfito

Figura 1:  
Las distintas formas del  $\text{SO}_2$  en equilibrio en solución acuosa

La abundancia relativa de cada una de estas formas depende del pH (Figura 2)

Como se muestra en la Figura 2, el ion bisulfito es la forma mayoritaria al pH del vino. Sin embargo, es la forma molecular del  $\text{SO}_2$  la que posee una actividad antiséptica. Por lo tanto, cuanto mayor es el pH del vino, menor es su acción antiséptica.

El calentamiento global y el cambio climático han conducido en los últimos años a un aumento constante del pH de mostos y vinos. Además, el uso generalizado de sulfitos desde hace ya mucho tiempo parece haber desarrollado cierta resistencia en algunos microorganismos, especialmente las *Brettanomyces*.

Teniendo en cuenta las observaciones anteriores y la tendencia actual de reducir la concentración de sulfitos en mostos y vinos, proporcionar nuevas soluciones para complementar la acción antiséptica del  $\text{SO}_2$  molecular se ha convertido en una necesidad.

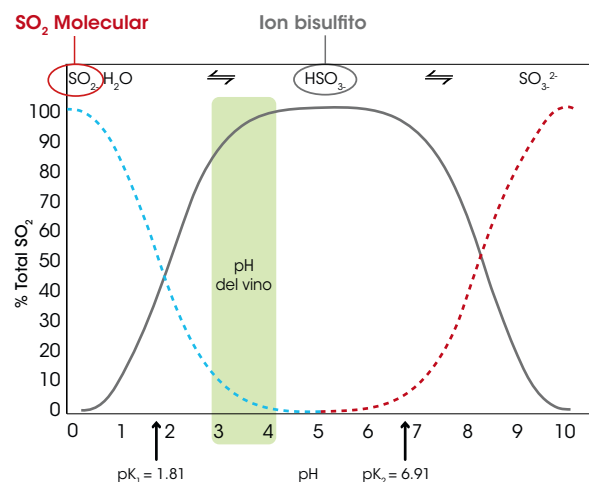


Figura 2:  
Porcentaje de las distintas formas del  $\text{SO}_2$  en función del pH



## ¿Por qué el quitosano?

El **quitosano** es un polisacárido catiónico que se obtiene por desacetilación de la quitina. La quitina es un polímero que se encuentra presente de forma natural en la pared celular de *Aspergillus niger*. Tanto la quitina como el quitosano fueron descubiertos en el siglo XIX.

En diciembre de 2010, la UE aprobó el uso de quitosano y de quitina-glucano de *Aspergillus niger* en enología. De entre las aplicaciones descritas por la OIV, el quitosano puede utilizarse para reducir la población microbiana, en particular la de *Brettanomyces*, a una dosis máxima de 10 g/hL.

## ¿Cómo funciona?

El quitosano, al obtenerse por desacetilación de la quitina, se caracteriza por su grado de desacetilación (GD), es decir, el número de **funciones amina** en relación con el de **funciones acetamida**. También se define por su número de **funciones hidroxilo**, las cuales le confieren un carácter más o menos hidrófilo, y la **longitud de la cadena macromolecular** (número de repeticiones de la molécula), de la que depende su **masa molecular** (Figura 4).

La extracción de la **quitina** se realiza de acuerdo con unas condiciones variables de distintos parámetros (temperatura, tiempo, concentración de las soluciones básicas). La quitina así obtenida presenta variaciones en el grado de funciones amida y en la masa molecular.

Las condiciones de desacetilación para obtener el **quitosano** a partir de la quitina también dan lugar a quitosanos con distintos grados de desacetilación y distinta masa molecular.

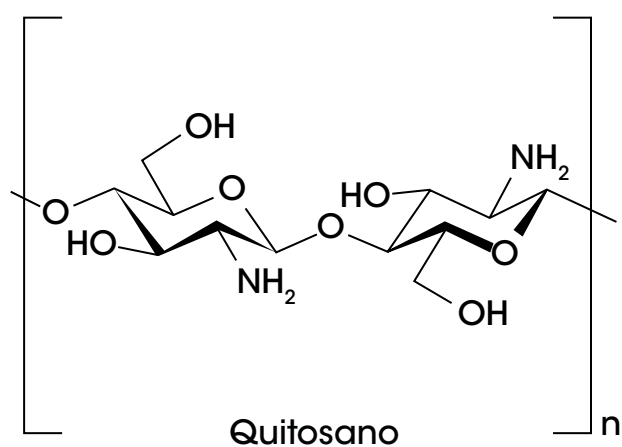


Figura 3:  
Estructura química del quitosano - Fórmula semidesarrollada

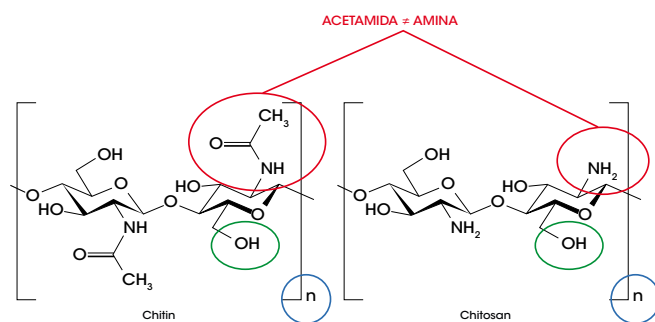


Figura 4:  
Estructura química de la quitina y el quitosano - Fórmula semidesarrollada - Representación de los grupos importantes

Las condiciones de extracción de la quitina y de su desacetilación tienen un efecto sobre la estructura final del quitosano y, por lo tanto, sobre su funcionalidad. Por todo ello, el término quitosano no designa necesariamente una molécula en particular, sino toda una familia de copolímeros cuyo grado de desacetilación es superior al 50%.

# LOW SO<sub>2</sub>

## NO ORGANISMOS



### Las propiedades del quitosano

Las propiedades del quitosano vienen determinadas por la relación entre su grado de acetilación y de desacetilación, lo que condiciona su solubilidad en medio ácido, así como la flexibilidad de las cadenas macromoleculares, y por lo tanto su conformación y viscosidad en solución. Cuanto más bajo es el grado de desacetilación del quitosano, menor es su solubilidad. La masa molecular del quitosano también influye sobre su solubilidad, pero también sobre sus propiedades reológicas. Cuanto mayor es la masa molecular, mayor es la posibilidad de funciones amina, lo que favorece un alto grado de desacetilación y, por lo tanto, el número de cargas posibles. La actividad antimicrobiana del quitosano se atribuye a sus cargas positivas, las cuales interferirían con los residuos cargados negativamente en la superficie de las células de los microorganismos, lo que conduciría en última instancia a la muerte de dichas células (Valencia-Chamorro et al. 2011). Por lo tanto, la masa molecular del quitosano y su grado de desacetilación son unos parámetros que garantizan su eficacia.

### KTS® y el biocontrol en Martin Vialatte®:

resultados de un estudio inédito realizado por el departamento de Investigación, Desarrollo e Innovación de Martin Vialatte®

#### ● KTS® FA

Este estudio original, llevado a cabo en bodega con mostos de distintas regiones vinícolas de Francia, tenía como objetivo determinar el efecto de una preparación específica a base de quitosano activado sobre la población indígena. KTS® FA es una preparación a base de quitosano activado y cortezas de levadura cuyo objetivo es controlar las poblaciones microbianas presentes en el mosto.

KTS® FA se utiliza como herramienta de bioprotección: contribuye a la disminución de las dosis de sulfitos y reduce la contaminación causada por los microorganismos de alteración.



# EFEECTO sobre la FLORA INDÍGENA

## KTS® FA y las levaduras no *Saccharomyces*

Un estudio llevado a cabo por Kisko *et al.* muestra como el quitosano inactiva determinadas levaduras de alteración. El tratamiento con quitosano a una dosis de 5 g/hL inhibe completamente el desarrollo de las levaduras *Kloeckera apiculata* y *Metschnikowia pulcherrima* durante la fermentación alcohólica, mientras que el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia spp* no resulta afectado por dicho tratamiento (Figura 5).

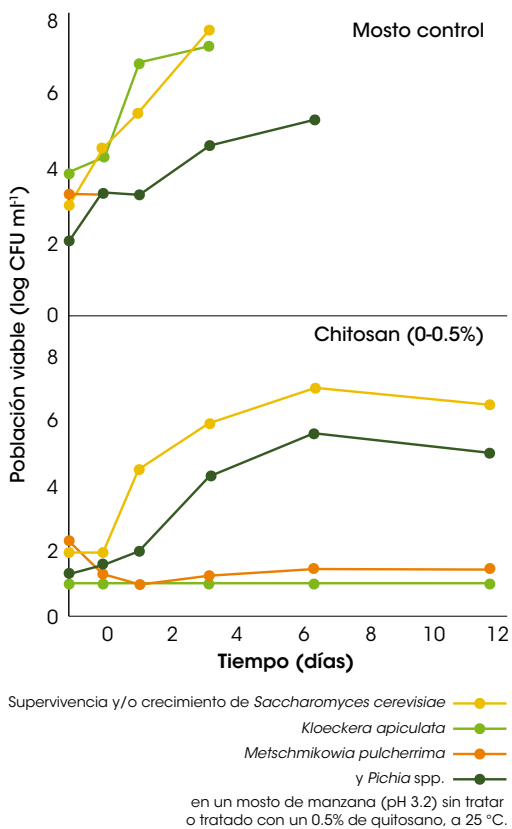
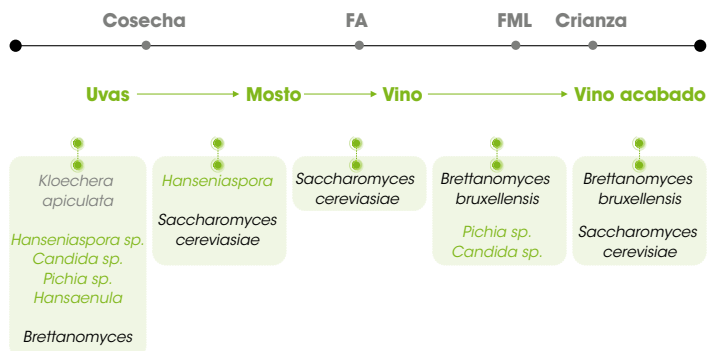


Figura 5: Evolución de la población de microorganismos (log UFC/mL) en función del tiempo. Fermentación de un mosto sin quitosano (gráfico superior) y fermentación con una dosis de 5 g/hL de quitosano (gráfico inferior).

## ADICIÓN AL MOSTO: Efecto sobre la flora indígena, aplicación y precauciones

La microbiota del mosto es muy variada, y el control de las distintas especies microbianas en presencia o ausencia de SO<sub>2</sub> no está exento de riesgos. Además, las poblaciones evolucionan a lo largo de la vinificación, tal y como se muestra en las figuras 6 y 7 siguientes:

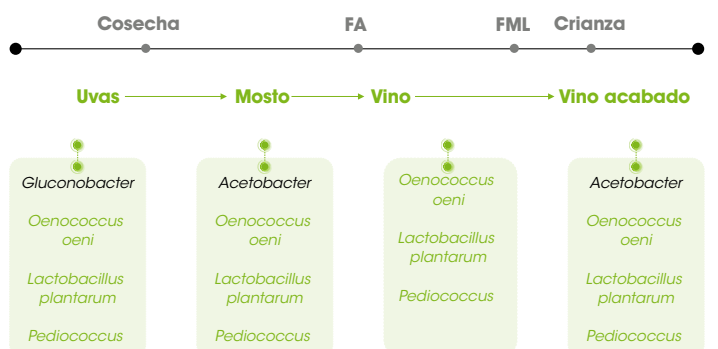
### Levaduras: especies mayoritarias de las uvas al vino



<b>Levaduras fermentativas:</b> Presentes en las uvas (minoría < 1%) Condiciones favorables para su desarrollo en el mosto	<b>Levaduras apiculadas:</b> Presentes en las uvas Crecimiento rápido pero no toleran el etanol	<b>Levaduras oxidativas:</b> Presentes en las uvas Crecimiento posible pero solo en presencia de O <sub>2</sub>
--	---	---

Figura 6: Evolución de las especies de levaduras mayoritarias durante la vinificación

### Bacterias: especies mayoritarias de las uvas al vino



<b>Bacterias lácticas:</b> responsables de la FML	<b>Bacterias acéticas:</b> producción de ácido acético
--	---

Figura 7: Evolución de las especies de bacterias mayoritarias durante la vinificación

## KTS<sup>®</sup> FA y las *Saccharomyces cerevisiae*

Dado que el quitosano posee una acción antimicrobiana, la primera pregunta que surge respecto a su utilización en el mosto es el efecto que pueda tener sobre las levaduras de fermentación como las *Saccharomyces*.

Varios estudios muestran que estas levaduras son muy poco sensibles al quitosano, ya que durante su crecimiento las *Saccharomyces* producen quitinasas y quitosinasas que afectan a la estructura del quitosano. Para una concentración de quitosano puro comprendida entre 20 g/hL y 200 g/hL, la fase de latencia de las *Saccharomyces* se ve más o menos afectada en función de la dosis de tratamiento. Sin embargo, haría falta una concentración superior a los 400 g/hL para que la fase de crecimiento de la levadura se viera afectada. La dosis máxima autorizada de tratamiento, de acuerdo con la reglamentación europea, es de 10 g/hL, muy por debajo de las dosis que podrían afectar a las *Saccharomyces*.

Así, este estudio confirma claramente que el uso de KTS<sup>®</sup> FA a una dosis de 20 g/hL no tiene ningún efecto negativo sobre la fase de latencia o sobre la cinética de fermentación.

Evolución de la densidad a lo largo de la vinificación

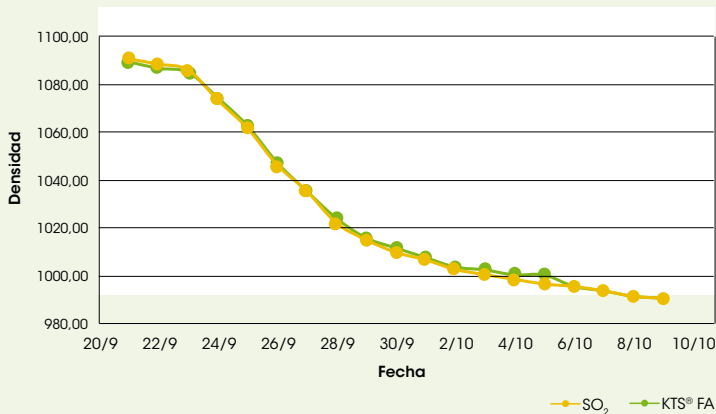


Figura 8:  
Evolución de la densidad a lo largo de la fermentación

## KTS<sup>®</sup> FA y gestión de las *Brettanomyces* desde la vendimia

Las investigaciones realizadas por el departamento de I+D confirman las ventajas de utilizar KTS<sup>®</sup> FA en tratamiento preventivo en el encubado con el objetivo de reducir las dosis de SO<sub>2</sub>. Este producto permite un mayor control sobre las poblaciones de *Brettanomyces* a lo largo de la vinificación, en comparación con un depósito tratado solamente con SO<sub>2</sub> (Figura 9).

Evolución de la población de *Brettanomyces* en el transcurso de la vinificación. Análisis por qPCR

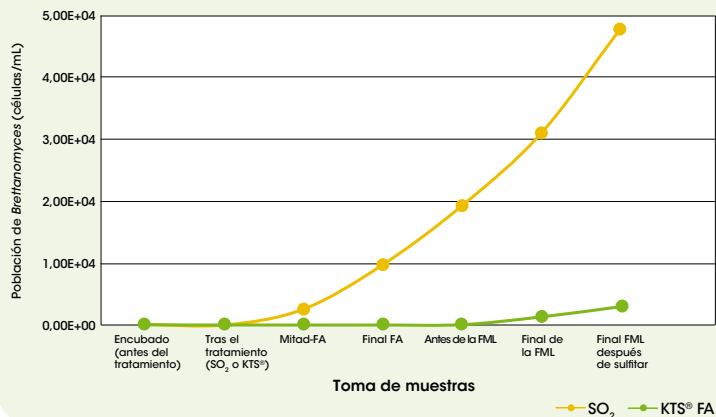


Figura 9:  
Evolución de la población de *Brettanomyces* a lo largo de la vinificación. Análisis por qPCR.

# Aplicación

KTS® FA, a una dosis comprendida entre 15 y 20 g/hL, puede utilizarse en cualquier tipo de mosto, justo antes de la inoculación de las levaduras. También puede pulverizarse la solución directamente sobre las uvas en los remolques o en la tolva de recepción, siempre y cuando éstas no vayan a ser sometidas a un tratamiento térmico por encima de 40 °C. Una vez que las uvas están ya dentro de los depósitos, se recomienda añadir las levaduras justo después de la adición de KTS® FA (tiempo inferior a 2 horas), especialmente si las uvas están calientes o si la temperatura del mosto es alta en el momento de su recepción.



Figura 10:  
Ejemplo de protocolo para el tratamiento de un mosto con KTS® FA en el encubado

KTS® FA es un producto **antimicrobiano** especialmente interesante como **alternativa a los sulfitos**.

## Precauciones

### KTS® FA y tratamientos térmicos.

Está totalmente desaconsejado el uso de KTS® FA en un mosto que vaya a ser sometido a un tratamiento térmico, ya que el quitosano se degrada parcialmente a una temperatura superior a 40 °C. No obstante, una vez que el mosto esté de nuevo a temperatura ambiente sí se le puede añadir KTS® FA, antes de inocular las levaduras, y protegerlo ya que estos mostos son particularmente sensibles a los microorganismos de alteración.

### KTS® FA y levaduras no *Saccharomyces*

Tampoco se aconseja el uso de KTS® FA en mostos que vayan a ser inoculados con levaduras no *Saccharomyces*. Si bien es cierto que el

quitosano tiene muy poco efecto sobre las levaduras *Saccharomyces* a las dosis enológicas autorizadas, varios estudios han mostrado que el quitosano bloquea por completo el crecimiento de determinadas levaduras y bacterias a partir de una dosis de 0.2 g/L. Por este motivo, al utilizar KTS® FA en estos mostos se correría el riesgo de inactivar las levaduras.

### KTS® FA y lisozima

El uso de productos de la gama KTS® tampoco está recomendado en aquellos mostos o vinos que contengan lisozima, ya que tanto el quitosano como la quitina son hidrolizados fácilmente por la lisozima.



# Adición al vino

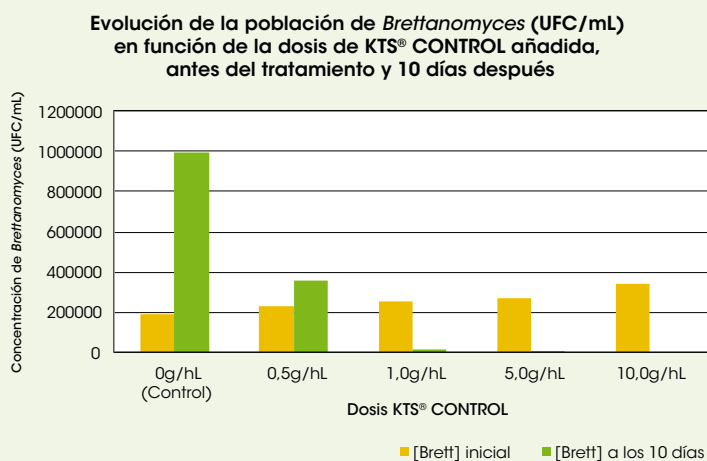
## Brettanomyces y las contaminaciones del vino

Hace ya varios años que se está desarrollando el uso en el vino de productos a base de quitosano para aprovechar su acción contra determinados microorganismos de alteración, y su eficacia para reducir las poblaciones de *Brettanomyces* ha sido demostrada ampliamente, tanto en la bibliografía como sobre el terreno.

No obstante, un único tratamiento en el encubado puede no ser suficiente, ya que ello depende de la presión microbiológica en la bodega. Al final de la fermentación alcohólica y/o maloláctica, se puede llevar a cabo un seguimiento de las poblaciones de *Brettanomyces* y añadir **KTS® CONTROL** (producto de la gama Martin Vialatte® para el tratamiento del vino) precisamente para controlar el desarrollo de microorganismos. De la misma manera que con los sulfitos, con el quitosano se pueden realizar varias adiciones a lo largo del proceso de vinificación y crianza, en los momentos en que sean más oportunas.

**KTS® CONTROL** ha sido formulado específicamente a base de quitosano de *Aspergillus niger* para **controlar** el desarrollo de los **microorganismos de alteración del vino**.

Figura 11:  
Evolución de la población de *Brettanomyces* (UFC/mL) en función de la dosis de **KTS® CONTROL**, antes del tratamiento y a los 10 días





## KTS® FA VS BIOPROTECCIÓN

	KTS® FA (BIOCONTROL)	BIOPROTECCIÓN
<b>Principio</b>	Adición de un producto a base de quitosano al mosto para controlar las poblaciones indígenas, con el objetivo de reducir las dosis de sulfitos	Adición precoz y masiva de levaduras no <i>Saccharomyces</i> en el mosto o las uvas, con el objetivo de reducir las dosis de sulfitos
<b>Consecuencias en el mosto</b>	<b>No modifica</b> la composición de nutrientes del mosto	Modificación de la composición de nutrientes
<b>Consecuencias sobre la fermentación</b>	<b>Sin efecto</b> sobre las <i>Saccharomyces</i> , a las dosis enológicas autorizadas. No altera ni la fase de latencia ni su crecimiento	¿Qué nutrientes quedarán para las <i>Saccharomyces</i> ? Imposible de predecir
<b>Consecuencias sobre las características organolépticas</b>	Contribuye al desarrollo de un perfil aromático más <b>definido</b> y más <b>aromático</b>	¿Qué pasará con el potencial aromático? Algunos aminoácidos son precursores de compuestos volátiles. Si estos aminoácidos son metabolizados por las no <i>Saccharomyces</i> para dar lugar a otros compuestos, habrá una pérdida del potencial aromático.
<b>Otras consecuencias</b>	No hay competencia con las <i>Saccharomyces</i> , sino todo lo contrario, les deja "espacio"	Formación de metabolitos por parte de las no <i>Saccharomyces</i> , que pueden dificultar el desarrollo de las <i>Saccharomyces</i> ( <b>amensalismo</b> )  Competencia con las <i>Saccharomyces</i> . Una inoculación masiva puede dificultar su desarrollo

### BIBLIOGRAFÍA:

Ribéreau-Gayon P., Glories Y., Maujean A., Dubourdieu D., *Traité d'œnologie*. Tome 1, 2012.

Valencia-Chamorro SA, Palou L, Del Río MA, Pérez-Gago MB (2011) Antimicrobial edible films and coatings for fresh and minimally processed fruits and vegetables: a review. *Crit Rev Food Sci Nutr* 51:872-900.

Livre chitosan Céline.

G. Kisko, R. Sharp and S. Roller (2004) Chitosan inactivates spoilage yeasts but enhances survival of *Escherichia coli* O157:H7 in apple Juice.

L. Gomez RIVA – J. IND. *Microbiol Biotechnol* (2004) 31/16-22: Selective antimicrobial action of chitosan against spoilage yeast in a mixed culture fermentations.

Kuranda \_ journal of microbiology (15/10/1991) 266 Chitinase is required in cell separation during growth of *Saccharomyces cerevisiae*.



79, av. A.A. Thévenet - CS 11031 - 51530 MAGENTA - France - Tél. : + 33 3 26 51 29 30 - Fax: + 33 3 26 51 87 60

