



# **Universidad Católica de Cuyo**

## **Facultad Don Bosco de Enología y Ciencias de la Alimentación**

### **Licenciatura en enología e industrias frutihortícolas**

**Evaluación del proceso de estandarización del uso de quitosano en vinos de alta gama**

**Alumno/a: Battaglia Nerina**

**Docente Tutor: Carla Emilia Brandolin**

**Docente Revisor: Elena Caliguli**

**Mendoza, Sede Rodeo del Medio, 2025**

**Defensa Oral**

Libro: \_\_\_\_\_ Folio N°: \_\_\_\_\_ Acta N°: \_\_\_\_\_

Fecha: \_\_\_\_\_

Calificación: \_\_\_\_\_

**Firmas y Aclaración del Tribunal Examinador**

\_\_\_\_\_

## RESUMEN

La brettanomyce es una levadura que causa una de las principales alteraciones en vinos, ya que al producir compuestos fenólicos, afecta su composición, gusto y olfato. En efecto, la biosíntesis de fenoles volátiles se realiza a partir de ácidos hidroxicinámicos y en vinos tintos el contenido de estos compuestos es mayor. Además, al ser una levadura de crecimiento muy lento, la alteración se presenta principalmente durante el almacenamiento y sobre todo la crianza del vino, habitual en los vinos tintos de alta gama. Como medida correctiva para este rango de vinos se utiliza el quitosano de origen fúngico, que tiene un efecto biológico y otro físico para la eliminación de Brettanomyces. Para prevenir la aparición de brett, el uso de quitosano en una dosis de 2 gr/Hl, anhídridos libre entre 35-38 y con la aplicación correcta de POES es una excelente combinación como medida preventiva para brettanomyces. Y en el caso que ya este presente la brettanomyces, una dosis de 4gr/Hl de quitosano, homogenizado durante 10 días y posterior trasiego, permite la eliminación de brettanomyces del vino.

Palabra clave: Brettanomyces, quitosano, vino alta gama

## ABSTRACT

Brettanomyces is a yeast that causes one of the main alterations in wines, since by producing phenolic compounds, it affects their composition, taste and smell. Indeed, the biosynthesis of volatile phenols is carried out from hydroxycinnamic acids and in red wines the content of these compounds is higher. Furthermore, as it is a very slow-growing yeast, the alteration occurs mainly during storage and especially the aging of the wine, common in high-end red wines. As a corrective measure for this range of wines, chitosan of fungal origin is used, which has a biological and physical effect to eliminate Brettanomyces. To prevent the appearance of brett, the use of chitosan at a dose of 2 gr/Hl, free anhydrides between 35-38 and with the correct application of POES is an excellent combination as a preventive measure for brettanomyces. And in the event that brettanomyces is already present, a dose of 4gr/Hl of chitosan, homogenized for 10 days and subsequent racking, allows the elimination of brettanomyces from the wine.

**Keyword:** Brettanomyces, chitosan, high-end wine

## INTRODUCCIÓN

La Brettanomyces es una de las alteraciones microbiológicas que actualmente pueden sufrir los vinos, y especialmente los vinos tintos de calidad que deben ser sometidos al proceso de crianza en barricas de madera. Esta levadura es responsable de pérdidas económicas de la industria enológica en todos los países productores del mundo, ya que altera su composición, al olfato y al gusto.

Aunque la población de Brettanomyces evoluciona durante todas las etapas de la fermentación, los fenoles volátiles se acumulan y son de difícil eliminación por medios tradicionales.

Por tal motivo, el objetivo del presente trabajo va a consistir en utilizar el quitosano, como una nueva herramienta para el tratamiento de este problema, sin alterar la complejidad de vinos de alta gama. El mismo, es de origen fúngico, y además cuenta con características favorables como que es biodegradable y no alérgico.

Como método se aplicará la dosis recomendada, el momento oportuno y el correcto procedimiento de agregado, para lo cual, las muestras que se utilizarán, serán dos añadas diferentes de vinos, donde aparecen las Brettanomyces.

Finalmente se muestran los resultados de la experiencia práctica desarrollada.

## CAPÍTULO I : BRETTANOMYCES

El género *Brettanomyces* se conoce desde hace tiempo como agente contaminante, en la industria cervecera, de la sidra y de bebidas carbonatadas. En la industria enológica su descripción como alterante es más reciente, aunque el género lo constituyen cinco especies diferentes, en los vinos aparece únicamente *Brettanomyces bruxellensis*.

El experto Pascal Chatonnet (2004) en una entrevista, afirmó lo siguiente: Los olores animales o carácter fenolado, son debidos a los etilfenoles, formados a partir de compuestos fenólicos existentes en todos los vinos, por acción de unas levaduras llamadas *Brettanomyces*. Como es imposible eliminar los fenoles de los vinos, la única solución será controlar las *Brettanomyces*.

En este caso la prevención viene de la mano de la higiene general en la bodega y muy específica en las barricas, y en los vinos la protección con sulfuroso.<sup>1</sup>

### 1.1 Origen del Término *Brettanomyces*

“*Brettanomyces* es una levadura descubierta inicialmente en la cerveza por Claussen en 1905, quien la bautiza con el nombre de *Brettanomyces* (brettano por su procedencia de Bretaña y myces del griego myketes o fungus en latín)”.(Palacios Antonio,2020).<sup>2</sup>

Fue entre los años 1950 y 1955 se documenta la ocurrencia de *Brettanomyces* en vinos blancos y tintos embotellados en Alemania, Italia y Francia y

---

<sup>1</sup>Gutierrez Luis, 2004, Chatonnet, 'brett' y TCA: el bueno, el feo y el malo, *elmundovino.com* ([http://elmundovino.elmundo.es/elmundovino/noticia.html?vi\\_seccion=4&vs\\_fecha=200407&vs\\_noticia=1089745716](http://elmundovino.elmundo.es/elmundovino/noticia.html?vi_seccion=4&vs_fecha=200407&vs_noticia=1089745716))

<sup>2</sup>Palacios Antonio,2020, *Brettanomyces*:fisiología, enología, prevención y soluciones, *acenología.com* ([https://www.acenologia.com/dossier176\\_0620/#:~:text=Brettanomyces%20es%20una%20levadura%20descubierta,uva%2C2%20y%20finalmente%20en](https://www.acenologia.com/dossier176_0620/#:~:text=Brettanomyces%20es%20una%20levadura%20descubierta,uva%2C2%20y%20finalmente%20en))

en ese momento se relaciona su existencia también a instalaciones de bodegas y se establecen las primeras necesidades de sanidad para evitar su desarrollo.

## 1.2 Especies del Género *Brettanomyces*/*Dekkera*

La designación *Brettanomyces* se refiere a la forma de reproducción asexuada, por otro lado, el término *dekkera* es la reproducción sexual por la formación de 1 a 4 ascosporas, que surgen sin conjugación. Actualmente *Dekkera bruxellensis* es la designación aceptada taxonómicamente para esta especie, sin embargo en el ámbito de la enología la nomenclatura *Brettanomyces bruxellensis* es la más ampliamente adoptada, incluso con la simple referencia *Brettanomyces* o *Brett*.

“El género *Brettanomyces*/*Dekkera* incluye actualmente cinco especies, las cuales se muestran en la tabla 1. Sin embargo, cabe mencionar que otras especies identificadas entre los años 1940-50 dentro del género *Brettanomyces* fueron posteriormente reclasificadas dentro del género *Cándida*” .(Portugal Cauré Barbosa,2014,p.14).<sup>3</sup>

**Tabla 1:**

*Especies actualmente reconocidas dentro del género Brettanomyces-Dekkera*

<b>Especies</b>	<b>Autores</b>
<b>Dekkera anómala</b>	Smith y Grinsven (1984)
<b>Dekkera bruxellensis</b>	Van der Walt (1964)
<b>Dekkera custersiana</b>	Lee y Jong (1986)
<b>Dekkera naardenensis</b>	Jong y Lee (1986)
<b>Dekkera nana</b>	Kirk (2011)

Nota: tomado de tesis doctoral de Portugal Cauré Barbosa,p.14

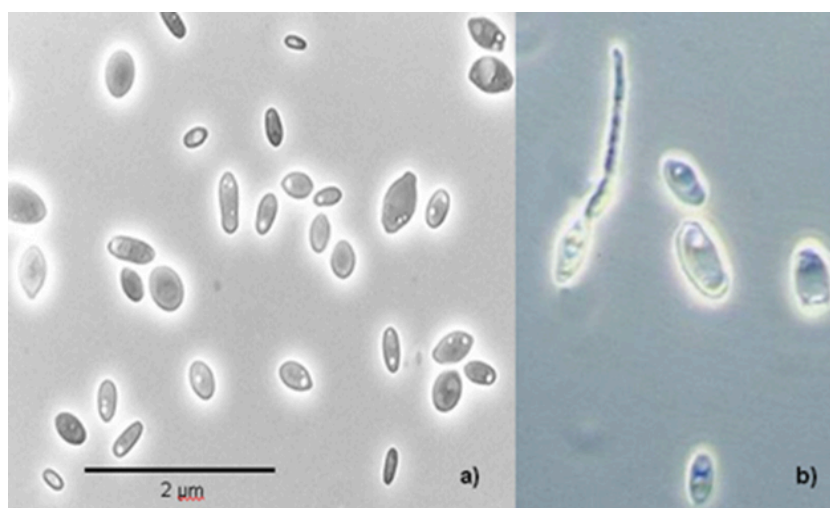
<sup>3</sup> Portugal Cauré Barbosa,2014, Detección Caracterización de Brett en el contexto enológico, *Universidad de la Rioja. Tesis Doctoral* (file:///C:/Users/nerib/Downloads/Dialnet-DeteccionYCaracterizacionDeBrettanomycesBruxellens-40441%20(2).pdf)

### 1.3 Morfología de Brettanomyces

La morfología celular de Brettanomyces es ojival o cilíndrica, con gemación multipolar en reproducción vegetativa, algo más pequeña que Saccharomyces cerevisiae. Una de las características de este género es su tamaño celular variable y la formación de filamentos. En vinos se observan siempre células mucho más pequeñas que en medio de cultivo y son frecuentes estas formas filamentosas que ayudan a la adherencia del microorganismo a las superficies, por ejemplo de las barricas.

**Figura 1:**

*Microfotografía de cultivo de Brettanomyces*



a) Variabilidad morfológica y de tamaño celular; b) Forma filamentosa

Nota: adaptado de brettanomyces/Dekkera: control y detección en bodega,2007,acnología.com

### 1.4 Compuestos Fenólicos Producidos por las Brettanomyces

Los aromas descritos como fuertemente especiado, fenólico, medicinal, clavo de olor, ahumado, animal, establo, caballo transpirado y caucho quemado son defectos graves y una gran preocupación para los elaboradores de vino, cuyos compuestos responsables son los etilguayacoles y los etilfenoles.

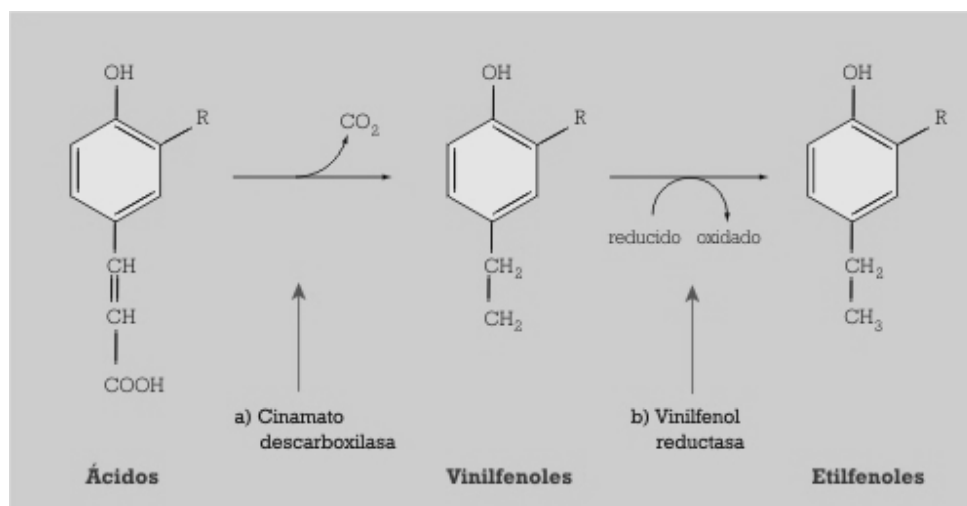
A partir de los ácidos hidroxicinámicos presentes en el vino, un gran número de bacterias, hongos y levaduras producen la decarboxilación (mediante la descarboxilasa cinnamato) y los transforman en vinilfenoles.

En una segunda etapa por acción de una vinil-fenol-reductasa se produce la reducción de los vinilfenoles a etilfenoles, ver figura 2. Las bacterias lácticas pueden producir cantidades significativas de vinilfenoles, pero producen únicamente trazas de etilfenoles en las condiciones del vino, al igual que las levaduras fermentativas *saccharomyces cerevisiae* y otras levaduras consideradas alterantes del vino pueden producir vinilfenoles, pero son incapaces de producir etilfenoles.

Si bien algunas bacterias son capaces de producir estos compuestos, solamente Brett los produce a niveles capaces de modificar sensorialmente el vino, por lo tanto la presencia de estos aromas es indicio de la contaminación con Brett.

**Figura 2:**

*Síntesis de etilfenoles por Brettanomyces - Dekkera*



a) Descarboxilación de los ácidos hidroxicinámicos; b) Reducción de vinilfenoles

Nota: adaptado de *brettanomyces/Dekkera: control y detección en bodega, 2007, acenología.com*

Junto con la formación de fenoles volátiles, *Brettanomyces* produce elevadas cantidades de ácido acético y tiene la capacidad de sintetizar, en condiciones especiales, tetrahidropiridinas que se identifican con el «gusto a ratón». También se le atribuye la producción de isovalérico y otros ácidos grasos que confieren gustos a rancio y de ciertas estearasas, acentuando la pérdida de aromas afrutados del vino. Por todo ello, el género *Brettanomyces/Dekkera* es uno de los más temidos agentes microbianos de los vinos.

Cuando los etilfenoles se encuentran en grandes concentraciones por la actividad de *Brettanomyces*, producen un carácter fenólico en los vinos, modificando completamente su perfil sensorial. A estos compuestos se atribuyen diferentes aromas, que aparecen recogidos en la tabla 2. El umbral de percepción de estos compuestos tiene el límite de detección en 450 µg/L para la suma de 4-etilfenol y 4-etilguaiacol. Sin embargo, una percepción odorante clara de la presencia de 4-etilfenol se encuentra a partir de 600 µg/L de este compuesto, ya que se vuelve un carácter dominante a esta concentración (Chattonet, Dubordieu, & Boidron, 1993).<sup>4</sup>

**Tabla 2:**

*Umbral de percepción, prescriptor aromático, principal origen de compuestos fenólicos*

Contaminante	Umbral	Aroma	Principal origen
<b>Etil-4-fenol</b>	440 µg/L	sudor de caballo, cuero	Brett
<b>Etil-4-guaiacol</b>	47 µg/L	Madera, especias	Brett
<b>Vinil-4-guaiacol</b>	180 µg/L	Farmacia	Saccharomyces

<sup>4</sup> García Paula Andres, 2016, estudio prospectivo de una lengua electrónica para la detección de fenoles y guayacoles en vino, *master universitario en enología* (<https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/73333/ANDR%C3%89S%20-%20Estudio%20prospectivo%20de%20una%20lengua%20electr%C3%B3nica%20para%20la%20detecci%C3%B3n%20de%20Fenoles%20y%20Guayacoles%20....pdf?sequence=1>)

Vinil-4-fenol

130 µg/L

Clavel

Saccharomyces

---

## 1.5 Procedencia de las Poblaciones de Brettanomyces

### 1.5.1 Uva

*Brettanomyces* es un microorganismo ubicuo, con poblaciones escasas pero repartidas en suelo, cortezas de árboles y sustratos azucarados (frutos, miel). Su detección en uvas y mostos es poco frecuente debido sobre todo a la gran competencia existente con otros microorganismos mucho más activos. No obstante, se han detectado focos en viñedos particulares.<sup>5</sup>

Al principio la contaminación viene del campo, más tarde la brett se instala en la bodega. Si encontramos elevadas poblaciones de Brett al final de la fermentación alcohólica, significa que la bodega está contaminada. Las vendimias en verde suponen mejorar la calidad de la uvas, pero supone un factor de alto riesgo cuando se realizan después del envero, cerca de la fecha de la vendimia y las uvas no se recolectan, de hecho, en este caso, las uvas cortadas contienen azúcar que atraen a aves e insectos de todo tipo, portadores de diversos microorganismos. Estas uvas que quedan en el suelo y son aplastadas por el paso del personal y de los animales, inician una fermentación salvaje en la vid a partir de todos esos microorganismos, incluyendo brettanomyces. Estos contaminantes se mantendrán bien en el viñedo de un año para otro, y volverán a contaminar la uva a través de la lluvia, los insectos, etc. Las parcelas más húmedas, cerca de ríos o poco ventiladas, y la vendimia a máquina, también son factores de riesgo importantes. Las máquinas vendimiadoras

---

<sup>5</sup> Lopez Cordón Eva Navascués, 2007, brettanomyces/Dekkera: control y detección en bodega, *acenología.com*, ([http://www.acenologia.com/ciencia78\\_2](http://www.acenologia.com/ciencia78_2))

son difíciles de limpiar, y las prisas en las vendimias hacen que la limpieza no sea correcta.

### 1.5.2 Bodega

Podemos tener cultivos de brett debajo de las capas de tártaro que se forman en cualquier parte del depósito, ya que se reblandece al entrar en contacto con el mosto de la nueva vendimia, y libera los cultivos en el nuevo mosto. No es suficiente cumplir con el protocolo de limpieza de depósitos; es necesario desinfectar todas las partes desmontables: juntas, grifos, puertas y tapas.

**Figura 3:**

*Juntas, puertas y tapas luego de una imcompleta limpieza*

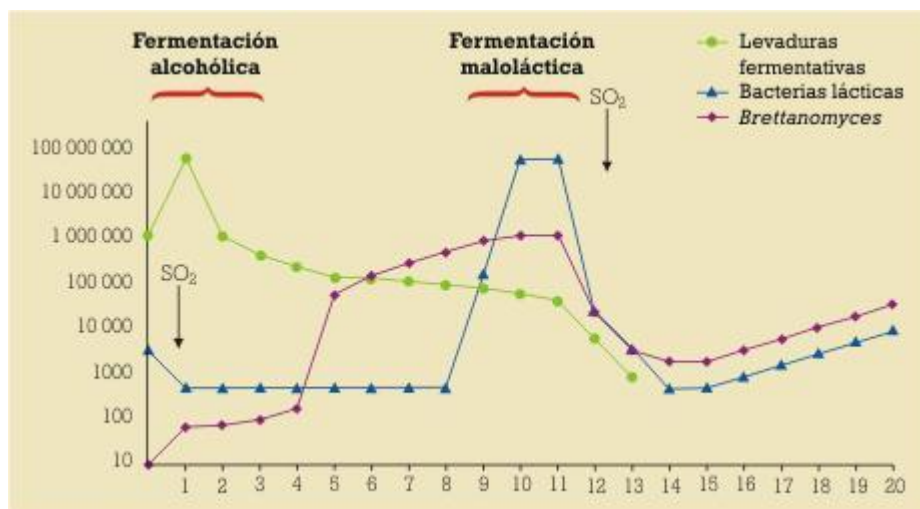


El desarrollo de las poblaciones de *Brettanomyces* se inicia después de la fermentación alcohólica. En este momento, y a partir del reducido número de células procedentes del viñedo que durante la fermentación alcohólica no han tenido la oportunidad de multiplicarse debido a su escasa competitividad respecto a *S. cerevisiae*, inician su desarrollo en un vino poco o nada protegido (ausencia de sulfuroso). Dependiendo del arranque más tardío de la fermentación maloláctica, la población será mayor, y aunque luego se corrija con sulfuroso, mayor es la

probabilidad de presentar células viables capaces de desarrollar la alteración posteriormente.

**Figura 4:**

*Dinámica de las poblaciones de levaduras fermentativas, bacterias lácticas y Brettanomyces desde la llegada de la uva hasta el vino elaborado*



Nota: adaptado de brettanomyces/Dekkera: control y detección en bodega,2007,acnología.com

Durante la crianza, procedentes del vino o de las propias barricas ya contaminadas, las poblaciones aumentan de manera lenta pero sin competencia, aquí se originan los principales riesgos. Es destacable señalar que no hace falta un gran número de células para desarrollar la alteración, y que por encima de 1000 células/mL la calidad organoléptica del vino está seriamente comprometida.

## 1.6 Condiciones de Desarrollo de Brettanomyces en Bodega

A continuación se analizan los distintos factores que contribuyen al desarrollo de las poblaciones de Brettanomyces en la bodega y que se traducen por tanto en un mayor riesgo de producción de fenoles volátiles.

### 1.6.1 Nutrientes

Como fuente de carbono Brettanomyces emplea azúcares residuales presentes en el vino después de la fermentación alcohólica. Al no tener un

metabolismo muy activo, 300 mg/L de azúcares son más que suficientes para el desarrollo de una población alterante. Una de las causas de que las contaminaciones por Brett sean más frecuentes en los vinos de elevada graduación alcohólica, a pesar del carácter antimicrobiano del etanol, es que estos vinos, procedentes de uvas muy maduras, presentan mayor cantidad de azúcares residuales (apenas glucosa y fructosa, pero sí otras pentosas residuales). El azúcar trehalosa, procedente de la autólisis de las levaduras, constituye una fuente de carbono importante en los vinos con crianza sobre lías. *B. bruxellensis* desarrolla además complejas estrategias para su desarrollo en un medio tan empobrecido nutricionalmente como el vino: presenta una fuerte actividad glicosidasa, capaz de liberar la glucosa ligada a los antocianos. Mediante varias actividades celulolíticas, degradan la celobiosa de la madera de las barricas, que junto a la propia reducción de los vinilfenoles en etilfenoles supone un mecanismo de obtención de energía. En cuanto a los compuestos nitrogenados, *Brettanomyces* presenta requerimientos escasos, aunque la presencia de aminoácidos y sales amoniacales estimula la proliferación celular. De aquí que se aconseje la nutrición adecuada en fermentación alcohólica, pero nunca en exceso, sobre todo de sales de amonio.

### **1.6.2 Tiempo**

Ya se ha comentado que *Brettanomyces* posee un metabolismo lento, por lo que el factor tiempo es requisito fundamental para el desarrollo de poblaciones alterantes. Se explica de esta forma la mayor incidencia de etilfenoles en vinos de crianza. Los vinos conservados en barricas usadas presentan mayor incidencia de concentración de estos compuestos. Efectivamente, la reutilización de las barricas contribuye en gran medida a acentuar el problema, ya que buena parte de las células de *Brettanomyces* permanecen en la barrica después del trasiego del vino,

resisten al proceso de limpieza, y el vino nuevo con el que se rellena la barrica supone una renovación del sustrato, sobre el que se desarrollará una población más importante.

### **1.6.3 Temperatura**

Como para todos los microorganismos, la temperatura activa el metabolismo celular. Para el control de Brett, la crianza del vino precisa una atención máxima de primavera a otoño, donde la temperatura y el ritmo de evaporación aumentan. Por otro lado, *Brettanomyces* presenta actividad a bajas temperaturas y tan sólo por debajo de 8 °C se inhibe su crecimiento.

### **1.6.4 Presencia/Ausencia de Oxígeno**

Se trata de una levadura capaz de desarrollarse en anaerobiosis estricta, aunque la presencia de oxígeno favorece su desarrollo y estimula la síntesis de acidez volátil.<sup>6</sup>

## **1.7 Alteraciones en vinos de alta gama**

Los defectos sensoriales asociados directamente a brett aparecen mayoritariamente en vinos tintos de calidad y las causas radican en la propia fisiología del microorganismo. En efecto, la biosíntesis de fenoles volátiles se realiza a partir de ácidos hidroxicinámicos y en vinos tintos el contenido de estos compuestos es mayor. Además, al ser una levadura de crecimiento muy lento, la alteración se presenta principalmente durante el almacenamiento y sobre todo la crianza del vino, habitual en los vinos tintos de alta gama. En las barricas de madera el microorganismo tiene a su disposición todo el sustrato y tiempo suficiente para realizar su actividad. La naturaleza porosa de la madera y su difícil limpieza

---

<sup>6</sup> Lopez Córdón Eva Navascués, 2007, *brettanomyces/Dekkera: control y detección en bodega*, *acnología.com*, ([http://www.acenologia.com/ciencia78\\_2](http://www.acenologia.com/ciencia78_2))

contribuye a que las poblaciones existentes se mantengan incluso después del lavado de la barrica. Además, *B. bruxelliensis* tiene la capacidad de degradar uno de sus componentes, la celobiosa.

### **1.7.1 Influencia de las Nuevas Prácticas en Vinos de Alta Calidad**

Las nuevas prácticas enológicas dirigidas hacia la elaboración de vinos de calidad pueden constituir factores de riesgo y su aplicación debe conllevar la adopción de medidas de control para evitar el desarrollo de *Brettanomyces*. Así:

- Los vinos procedentes de uvas en el punto correcto de maduración fenólica, que en nuestras latitudes se acompaña de elevado grado alcohólico y por tanto de mayor proporción de azúcares residuales, suponen un aumento del sustrato disponible para Brett,
- Las maceraciones prefermentativas en frío, proporcionan tiempo y sustrato para el desarrollo de las poblaciones procedentes de la uva,
- La crianza sobre lías enriquece el medio en factores nutritivos (trehalosa y sustancias nitrogenadas),
- El empleo, cada vez más habitual, de la microoxigenación favorece el desarrollo del microorganismo, tanto de manera directa, al implicar una mayor presencia de oxígeno, como indirecta, al favorecer la combinación del sulfuroso libre o al implicar un retraso en el inicio de la fermentación maloláctica,
- La crianza en madera, además de sustrato, supone la permanencia del vino en su contacto, cediendo el tiempo imprescindible para su desarrollo,
- La tendencia hacia la reducción de las dosis de sulfuroso en la elaboración, es uno de los factores que más ha contribuido a la extensión del problema.

Precisamente, el sulfuroso es un instrumento eficaz y permitido para el control de *Brettanomyces*,

- Por último, la salida al mercado de vinos sin clarificar, sin estabilizar y por supuesto sin filtrar, hace posible la presencia del microorganismo al final del proceso y la formación de etilfenoles en la propia botella.

## **1.8 Detección de *Brettanomyces* en Vinos**

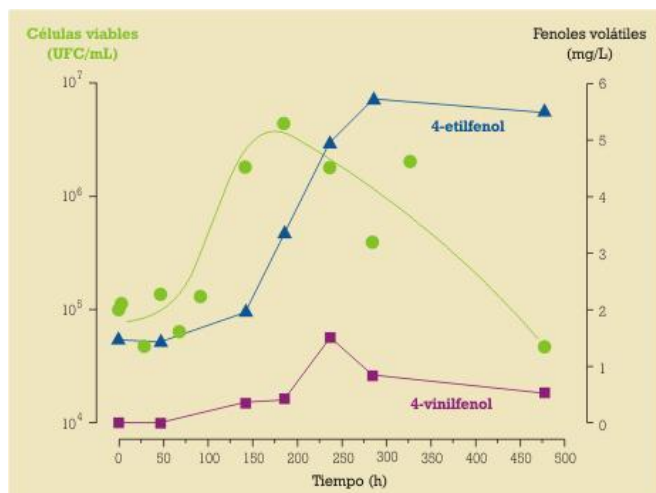
Para detectar su presencia, confirmar su ausencia o verificar la existencia de un problema de una manera efectiva en bodega pueden seguirse dos líneas analíticas, útiles en función del objetivo perseguido:

### ***1.8.1 Análisis de 4-etilfenol/guayacol Mediante Cromatografía Gaseosa***

Permite el seguimiento de la evolución del contenido de etilfenoles en el tiempo, en un vino determinado. Cuando el compuesto es detectado, implica que la población de *Brettanomyces* es muy elevada y reparar la alteración prácticamente es imposible. Se trata de un método confirmativo. Es sin embargo útil; combinada con la detección del microorganismo; en los casos en los que se registran poblaciones importantes pero no la alteración sensorial, es muy importante aplicar alguna técnica que eliminarán a la microbiota contaminante, pero no el resultado de su acción.

#### **Figura 5:**

*Desarrollo de *Brettanomyces* y génesis de 4-etilfenol y 4-etilguaicol. Inóculo inicial:105 células/ml*



Nota: adaptado de *brettanomyces/Dekkera: control y detección en bodega, 2007, acenología.com*

### 1.8.2 Detección del Microorganismo

La formación de 4-etilfenol/guayacol en vinos se encuentra retardada respecto a la proliferación de las poblaciones de *Brettanomyces*, como se observa en la figura 5. Por ello es posible detectar un posible problema, antes de que la alteración sensorial sea perceptible. La detección de Brett empleando los medios de cultivo habituales en microbiología del vino se ve impedido por otros microorganismos (levaduras, bacterias lácticas, etc.) mucho más competitivos que ellos en condiciones favorables. Obliga a la utilización de medios de cultivo con agentes selectivos y diferenciales y, en muchos casos, a la comprobación microscópica de las colonias. A diferencia de otras contaminaciones microbianas, las poblaciones de riesgo en vinos son del orden de  $10$  UFC /mL, por lo que se hace imprescindible tratar volúmenes grandes de vino. Hay que tener en cuenta que, debido al crecimiento lento del microorganismo, los resultados se obtienen a los 8-10 días de incubación. En casos de vinos con crianzas muy largas es frecuente la presencia de formas viables pero no cultivables, en poblaciones que han permanecido en contacto con el vino un tiempo largo (más de dos años), siendo habituales los falsos negativos. La utilización de técnicas de biología molecular, solventa este problema.

Mediante el análisis de secuencias génicas exclusivas de las células de *Brettanomyces* se detecta con exactitud su presencia en pocas horas. En estos casos la detección de poblaciones de *Brettanomyces* se realiza por PCR.<sup>7</sup>

La idea es hacer seguimientos de la población, para ver si hay desarrollo o no. Podemos tener vinos contaminados por Brett, pero sin que esta se haya desarrollado, porque las condiciones son adversas. Pero un vino sano sensible puede acabar contaminado.

Un buen control implica unos 15 análisis por depósito a lo largo de todo el año, pero los momentos críticos que requieren mayor seguimiento pueden ser:

- Entre fermentación alcohólica y maloláctica, cuando los niveles de sulfuroso son bajos,
- En crianza, siempre que los niveles de sulfuroso sean bajos y pH altos.
- En los momentos de aumento de temperatura y niveles de sulfuroso bajos (primavera),
- En trasiegos, cupages, movimientos y mezclas de vinos en general,
- Podemos hacer el seguimiento de las poblaciones mediante siembra sobre medio específico Kit de Bret o de forma más rápida mediante la técnica de PCR.

## **1.9 Control Preventivo de *Brettanomyces***

El control del desarrollo de Brett en la bodega se realiza en tres niveles:

### **1.9.1 *Materia Prima***

Las levaduras del género *Brettanomyces* se detectan en los hollejos de la uva desde las primeras etapas de desarrollo de la baya. Aunque las poblaciones

---

<sup>7</sup> Lopez Cordón Eva Navascués, 2007, *brettanomyces/Dekkera: control y detección en bodega*, *acenología.com*, ([http://www.acenologia.com/ciencia78\\_2](http://www.acenologia.com/ciencia78_2))

de Brett son de partida escasas, se ha de tener en cuenta que en uvas en deficiente estado sanitario, la población de levaduras pasa de 100 células/g, a 100 millones de células/g, y la proporción de *Brettanomyces* puede ser considerable. Un primer enfoque preventivo podría consistir en la estricta selección de las uvas sanas como una vía importante en la disminución del riesgo de *Brettanomyces*, que están generalmente más presentes en las uvas podridas. La cosecha tardía de uvas es cada vez más frecuente; en dicho caso, se deberían tener en consideración precauciones especiales. Las aportaciones organolépticas son interesantes, pero esto incrementa el riesgo de producción de fenoles volátiles, ya que las uvas sobremaduras contienen más precursores de los mismos. Trabajar en estas condiciones no incrementa necesariamente la presencia de *Brettanomyces*, pero aumenta el riesgo de actividad (menor acidez total, pH más elevado que impacta directamente en el nivel de SO<sub>2</sub> molecular y por ende en el crecimiento de las levaduras del género *Brettanomyces*).

### **1.9.2 Bodega**

Como consecuencia de varios factores, como el incremento de la graduación alcohólica, se observa una disminución de la diversidad microbiana en el proceso de fermentación alcohólica. Sin embargo, como *Brettanomyces* tiene una buena resistencia al etanol, su presencia no disminuye, por lo tanto es esencial una higiene perfecta en la elaboración del vino (uvas sanas, equipo de vinificación y de almacenamiento, etc.).

### **1.9.3 Operaciones y Tratamientos Prefermentativos**

Se recomienda garantizar que se apliquen adecuadas prácticas de higiene en la bodega. Los factores más importantes son el sulfitado y la temperatura:

- El sulfitado es la acción preventiva más eficaz en la fase de prefermentación a la hora de limitar el desarrollo de poblaciones de *Brettanomyces*. No obstante, se recomienda evitar el sulfitado excesivo (>8 g/hL), ya que podría conllevar retrasos en la fermentación maloláctica,
- Una maceración pre fermentativa en frío, a una temperatura cercana o por debajo de los 10°C, evita su proliferación pero no las matan.

**1.9.3.1 Fermentación Alcohólica (FA).** Durante la FA, la diversidad microbiana disminuye y *Saccharomyces cerevisiae* se convierte en la especie principal. Sin embargo, el género *Brettanomyces*, debido a su resistencia al etanol y a su baja necesidad de nutrientes, puede crecer a medida que la FA ralentiza o termina. Se deberán poner en funcionamiento las prácticas enológicas comúnmente recomendadas para el manejo de la fermentación alcohólica. La inoculación de mostos con levaduras seleccionadas contribuye a una FA más fiable.

Los azúcares residuales (principalmente glucosa y fructosa) son sustratos para el crecimiento de *Brettanomyces*. Los vinos son usualmente considerados como secos cuando el nivel de azúcar es inferior a 4 g/L. Para la proliferación de biomasa de *Brettanomyces* basta con una concentración de 0,3 g/L de azúcares residuales.

### **1.9.3.2 Período de Latencia Antes de la Fermentación Maloláctica.**

Al completarse la FA, las condiciones favorecen tanto a las bacterias lácticas como a las *Brettanomyces*, a pesar de que la proliferación de estas continuará siendo lenta, es importante hacer un seguimiento de la población de *Brettanomyces*, ya que el medio es relativamente pobre en microorganismos.

Los factores favorables al desarrollo de *Brettanomyces* en esta fase son: las maceraciones finales a temperaturas altas (40-45 °C), la microoxigenación y la liberación de azúcares en el caso de uvas no estrujadas.

**1.9.3.3 Fermentación Maloláctica (FML).** Los parámetros fisicoquímicos (pH, temperatura, SO<sub>2</sub> total) afectan a la progresión de la FML. Si esta se retrasa, el riesgo de producción de fenoles volátiles aumenta ya que las *Brettanomyces* podrán utilizar dicho intervalo de tiempo para multiplicarse. El uso de iniciadores malolácticos es una buena manera de limitar el desarrollo de *Brettanomyces*, agregados de forma temprana evitan la contaminación por *Brettanomyces* al reducir el período de latencia entre la FA y la FML.

Después de la fermentación maloláctica, se recomienda eliminar todos los microorganismos, principalmente añadiendo SO<sub>2</sub> puro, las cantidades a añadir deberán ajustarse en función del pH del vino. Al ser el SO<sub>2</sub> molecular la forma activa, a pH altos el control debe ser más riguroso.

**1.9.3.4 Operaciones de Crianza y Clarificación.** La primera medida preventiva indispensable es realizar un análisis microbiológico que determine el número exacto de *Brettanomyces*. Este análisis debe repetirse en el período de crianza.

El manejo del SO<sub>2</sub> es crucial para limitar el desarrollo de *Brettanomyces*. La dosis recomendada es de entre 0,5 y 0,8 mg/L de SO<sub>2</sub> molecular .

El envejecimiento sobre lías es un factor de riesgo adicional, ya que las levaduras del género *Brettanomyces* tienen una capacidad considerable para sobrevivir y proliferar en las lías.

La clarificación mediante trasiego, aclarado y filtración es crucial a la hora de reducir las poblaciones viables, que pueden multiplicarse al metabolizar los azúcares residuales. El tratamiento con proteínas clarificantes puede reducir las poblaciones en un rango comprendido entre 40 y 2 000 veces. La clarificación con caseína o caseinato de potasio podría reducir los niveles de etilfenol, si estos no son demasiado altos. El producto final deberá cumplir con las regulaciones vigentes aplicables con respecto a los límites de SO<sub>2</sub> total.

La adición de quitosano es una alternativa a la hora de controlar la proliferación de microorganismos indeseables, principalmente las levaduras del género *Brettanomyces*.

Algunas operaciones de vinificación (trasiego, llenado, filtrado, embotellado, etc.) podrían provocar una disolución del oxígeno en el vino, lo que favorece la proliferación de *Brettanomyces*. Si se lleva a cabo un proceso de microoxigenación, se deberá verificar la ausencia de *Brettanomyces* a través de un análisis apropiado.

Al añadir el SO<sub>2</sub>, la población de *Brettanomyces* puede pasar de un estado viable a un estado viable no cultivable. Estos cambios implican una reducción del tamaño de las levaduras, por lo que se hace necesario adaptar la filtración.

**1.9.3.5 En las Barricas.** Verdadero punto crítico de contaminación, se debe prestar especial atención a su limpieza y desinfección, asumiendo que es imposible su esterilización total, debido a la microporosidad natural de la madera, ya que los microorganismos permanecen vivos en las cavidades de las capas inferiores de la madera.

Sin embargo, algunas técnicas de desinfección de las barricas reducen de manera significativa las poblaciones de *Brettanomyces* y podrían utilizarse en caso de que las legislaciones del país en cuestión lo permitieran, como por ejemplo:

- Tratamiento tradicional con agua: Debe realizarse inmediatamente después de cada trasiego y antes de ser rellenas. La temperatura de lavado se debe mantener, a menor temperatura, mayor tiempo de aplicación. Nunca por debajo de 60 °C,
- La limpieza a alta presión (80-110 bares) elimina los depósitos fijos, siempre que se empleen cabezas rotativas adaptadas a la geometría de la barrica y tiempos suficientes (10-20 minutos). No afecta a la integridad de la madera,
- Tratamiento con vapor: la desinfección total requiere un período de tratamiento, que sea lo suficientemente largo (enjuague con agua fría, enjuague con agua caliente a 70 °C y vapor de baja presión durante 10 minutos),
- Esterilización con ozono: ozono gaseoso combinado con un tratamiento de agua caliente a 82 °C durante 20 minutos o con agua ozonizada. Al reaccionar los materiales con una carga orgánica elevada, el ozono no penetra en la madera en profundidad,
- Esterilización con SO<sub>2</sub>: se debe utilizar un mínimo de 5 g de SO<sub>2</sub> por barrica para desinfectar las barricas vacías y secas. El SO<sub>2</sub> es muy eficaz en la

superficie y también en profundidad, ya que penetra en los primeros milímetros de madera,

- Cepillado/fresado y tostado de barricas: este tratamiento no desinfecta la madera pero elimina la fracción más contaminada. El cepillado/fresado y tostado conllevan una disminución del 80 % de fenoles volátiles en comparación con una barrica no tratada,
- Ultrasonido: esta técnica elimina más del 90% de las levaduras del género *Brettanomyces* viables (hasta 2-4 mm bajo la superficie interior de la duela).

Durante el muestreo se debe evitar las contaminaciones cruzadas. Para evitar la degradación microbiana, el vino que se utilice para el llenado no deberá estar contaminado.

La madera favorece el desarrollo de *Brettanomyces*, que pueden utilizar la celobiosa como fuente de carbono. Las barricas son difíciles de limpiar y desinfectar. Las barricas usadas y mal limpiadas son una fuente conocida de contaminación por *Brettanomyces*, no obstante, las barricas nuevas también favorecen la multiplicación de la levadura y el desarrollo de fenoles volátiles, debido a que estos liberan más nutrientes. Además, las barricas nuevas son más permeables al O<sub>2</sub>, con lo que se favorece una posible óxido-reducción relativamente alta y se disminuye la concentración de SO<sub>2</sub> (activo o molecular), dos parámetros favorables al desarrollo de *Brettanomyces*.

**1.9.3.6 Condiciones de Conservación.** Para evitar la proliferación de *Brettanomyces* en las botellas durante la conservación, se recomienda mantener las botellas a una temperatura inferior a 12 °C, especialmente para los vinos con poco nivel de filtración o vinos que contienen un bajo nivel de SO<sub>2</sub>.<sup>8</sup>

### **1.10 Tratamiento de Vinos Contaminados**

En el caso de que la detección de *Brettanomyces* sea positiva hay que considerar la adopción de medidas correctivas. Es recomendable analizar el contenido en fenoles volátiles y realizar una cata fuera de la bodega. Se ha comprobado que la percepción organoléptica de los fenoles volátiles en el vino disminuye cuando se realiza en el interior de la bodega de origen.

Cuando el vino no manifiesta sensorialmente la alteración y el contenido de fenoles volátiles es inferior a 450 µg/L, el objetivo prioritario es detener el desarrollo de *brettanomyces* y por lo tanto el aumento de la concentración de fenoles volátiles. Para ello se deben corregir los niveles de sulfuroso libre en cantidad suficiente y acorde con el pH, por encima de 0,8 ppm de SO<sub>2</sub> molecular. Además es recomendable acotar perfectamente el lote alterado, evitando las mezclas y la utilización de las barricas que han tenido contacto con el vino contaminado. Con respecto a estas barricas, deben realizarse programas de limpieza y desinfección especialmente enérgicos y cuidadosos.

En el caso de que el vino contaminado sí manifieste la alteración, además de las medidas anteriores, se debe emplear algún tratamiento desodorante, capaz de eliminar el olor al menos parcialmente (bentonita, caseína, carbón, pvpp). En estos casos y cuando la contaminación es muy elevada (> 1000 células/mL) debe considerarse realizar procedimientos de clarificación y posterior filtración por debajo

---

<sup>8</sup> Resolución OIV-OENO 462-2014, ORGANIZACIÓN INTERNACIONAL DE LA VIÑA Y EL VINO, 2014.

de 1 micrómetro. La pasteurización es también efectiva, pero poco aplicable a vinos de crianza.

#### **1.10.1 Flash Pasteurización**

Es un tratamiento térmico eficaz en la destrucción de los microorganismos del vino, que consiste en un calentamiento y enfriamiento de la bebida en unas secuencias temperatura-tiempo preestablecidas y en atmósfera sin oxígeno para evitar oxidaciones. El tiempo de reducción decimal será de 24 segundos a 55 °C y el factor Z de 5 °C. Este tratamiento está limitado a vinos comunes o de mesa ya que no está permitido en vinos con D.O.

#### **1.10.2 Filtración Amicróbica de Superficie**

Se aplicará tras la crianza y justo antes del embotellado, que es cuando el vino tiene más riesgo o cuando ya ha sido contaminado según los controles realizados antes del trasiego. Las membranas utilizadas, de una porosidad de 0,65 µm para tintos y de 0,45 µm para blancos, conseguirán una filtración de grado estéril. Este proceso va precedido de una etapa de prefiltración o de un pretratamiento clarificante para evitar la colmatación de los filtros.

#### **1.10.3 Microfiltración Tangencial**

Es la tecnología más eficaz en la eliminación selectiva de esta levadura, con membranas específicas de 0,5 micras, que ni descarna el vino ni altera su personalidad organoléptica, dejándolo preparado para la filtración amicróbica previa a embotellado.<sup>9</sup>

#### **1.10.4 Velcorin**

Se ha observado la efectividad del dimetil dicarbonato (DMDC) en la prevención y eliminación de la Brett en la elaboración del vino a una dosis de 200

---

<sup>9</sup> SEFILRA SA, Calidad de los vinos con crianza. Eliminación de la Brett *Bruxellensis*, (<https://www.sefiltra.com/calidad-de-los-vinos-con-crianza-eliminacion-de-la-brett-bruxellensis/>)

mg/L. Los inconvenientes para el uso de este producto comprenden la necesidad de una unidad de dosificación concreta y unas precauciones especiales para su uso, así como un marco reglamentario restrictivo.

#### **1.10.5 Quitosano**

El uso de este producto, garantiza la eliminación de brettanomyces del vino, con una dosis de 10 gr/Hl. Sin alteraciones organolépticas ni calidad del vino.

## **CAPÍTULO II: QUITOSANO**

La quitina es el principal componente de los exoesqueletos de crustáceos e insectos, también se encuentran en las paredes celulares de ciertos hongos como los ascomicetos, basidiomicetos y deuteromicetos, y en algas como las diatomeas. Es un polisacárido natural, de tonalidad blanca-amarillenta, rígida y no elástica estructuralmente parecido a la celulosa, siendo el segundo polímero más abundante y más distribuido en seres vivos después de esta. Se estima que cada año se producen en la naturaleza alrededor de 100 millones de toneladas de quitina, es la fuente de biomasa disponible en el planeta menos explotada.

El quitosano es uno de los pocos polisacáridos catiónicos naturales. Se deriva de la quitina mediante la desacetilación de la misma en condiciones muy alcalinas y altas temperaturas. Es un polímero biodegradable, no tóxico, biocompatible, semipermeable, con propiedades filmogénicas y antimicrobianas. Además presenta la habilidad de ligar lípidos y metales como cobre, zinc, plomo y hierro, y puede extender la vida de productos alimenticios frescos y con alta actividad de agua como frutas, verduras y carnes<sup>10</sup>.

### **2.1 Estructura Química**

Tanto la quitina como el quitosano están formados por cadenas lineales de monómeros de glucopiranosas unidas por enlaces  $\beta$  (1,4). La diferencia entre la estructura química del quitosano, poli [ $\beta$  (1,4)-2-amino-2-desoxi-D-glucopiranososa], y la de la quitina, poli [ $\beta$  (1,4)-2-acetamida-2-desoxi-D-glucopiranososa], radica en el carbono número 2, en donde la quitina posee un grupo acetoamida, mientras que el quitosano ese grupo es desacetilado resultando en un grupo amino.

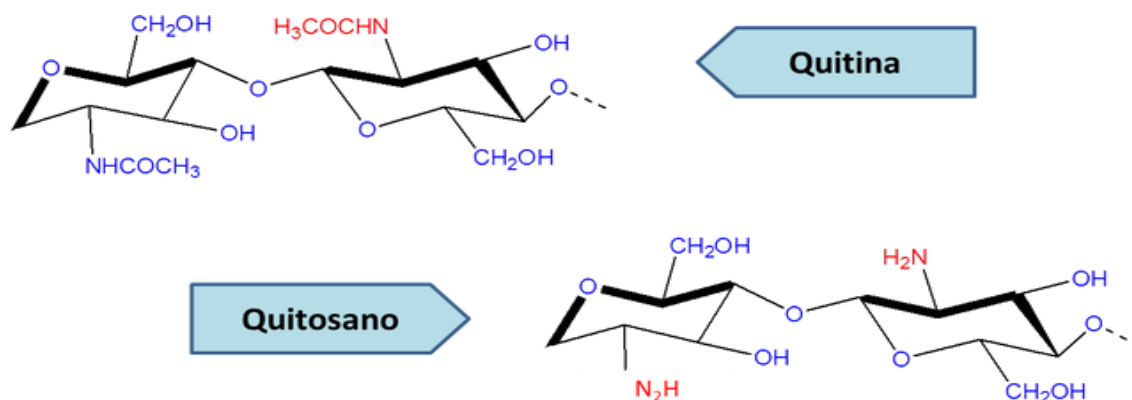
La abundancia de los grupos hidroxilo y amino altamente reactivo en el quitosano, o del grupo acetoamida en la quitina, y su tendencia a formar puentes de hidrógeno intra e intermoleculares, resultan en la formación de agregados lineales con un amplio grado de cristalización. Eso contribuye a la fuerza mostrada por las estructuras quitinosas y a que sean prácticamente insolubles en agua.

#### **Figura 6:**

*Estructura química de quitina y quitosano*

---

<sup>10</sup> Generalidades de quitina y quitosano, Universidad de Sonora,(p.5) XHUS-TDT.  
(<http://tesis.uson.mx/digital/tesis/docs/19407/capitulo2.pdf>)



Nota: adaptado de Viannis, 2017, obtención de quitosano a partir de desechos de exoesqueletos de cangrejo azul, *steemit.com*

## 2.2 Fuente de Quitina y Quitosano

El quitosano existe de forma natural en algunos hongos pero en menor proporción que la quitina, por lo que es necesario someterla a un proceso de desacetilación para obtener el quitosano. A pesar de la amplia distribución de la quitina en la naturaleza, ver tabla 3, la principal fuente comercial la constituyen los desechos de camarón y cangrejo provenientes mayormente de las industrias de enlatado de estos alimentos.

El quitosano es obtenido comercialmente de los desechos quitinosos, es decir, del cefalotórax de crustáceos, principalmente de camarón, cangrejo y langostino. También se ha demostrado que es posible extraerlo de jaiba y de la pluma del calamar, así como de ciertos hongos e insectos. El proceso de obtención de quitosano comprende dos etapas principales, la primera es la extracción de quitina de los desechos de crustáceos y la segunda la conversión de esta en quitosano.

**Tabla 3:**

*Contenido de quitina en diferentes organismos*

Fuente	Contenido de quitina (%)	Referencia
<b>Crustáceos</b>		
Cangrejo (Cancer)	72.1 c	Tharanathan y Kittur,2003

<b>Cangrejo (Carcinus)</b>	64.2 b	Tharanathan y Kittur,2003
<b>Cangrejo rey (Paralithodes)</b>	5.0 b	Tharanathan y Kittur,2003
<b>Cangrejo azul (Callinectes)</b>	14.0 a	Tharanathan y Kittur,2003
<b>Cangrejo (Sylla cerrata)</b>	23.0 b	Oudor-Odote y col, 2005
<b>Camarón (Crangon)</b>	69.1 c	Tharanathan y Kittur,2003
<b>Camarón de Alaska</b>	28.0 d	Tharanathan y Kittur,2003
<b>Camarón (Penaeus spp)</b>	13.1-23.2 b	Cira y col, 2002
<b>Langosta (Nephrops)</b>	9.8 c	Tharanathan y Kittur,2003
<b>Langosta (Homarus)</b>	60-75 c	Tharanathan y Kittur,2003
<b>Langosta (Pinilirus ornatus)</b>	5.71 b	Oudor-Odote y col, 2005
<b>Gamba</b>	67.9-97.0 c	Beaney y col, 2005
<b>Gamba (Penaeus monodon)</b>	22.18 b	Chandumpai y col. 2004
<b>Gamba (Penaeus indicus)</b>	28.0 b	Oudor-Odote y col, 2005
<b>Moluscos</b>		
<b>Concha de ostra</b>	3.6	Tharanathan y Kittur,2003
<b>Concha de almeja</b>	6.1	Tharanathan y Kittur,2003
<b>Pluma de calamar</b>	41.0	Tharanathan y Kittur,2003
<b>Pluma de calamar</b>	36.06 b	Chandumpai y col. 2004
<b>Pluma de calamar</b>	36.55 b	Chandumpai y col. 2004
<b>Hongos</b>		
<b>Aspergillus niger</b>	42.0 e	Tharanathan y Kittur,2003
<b>Penicilium notatum</b>	18.5 e	Tharanathan y Kittur,2003
<b>Agaricus bisporus</b> (champiñón blanco común)	27 b	Wu y col., 2004
<b>Saccharomyces cereviseae</b>	2.9 e	Tharanathan y Kittur,2003
<b>Mucor rouxxi</b>	44.5	Tharanathan y Kittur,2003
<b>Lactarius vellereus</b> (champiñón)	19.0	Tharanathan y Kittur,2003
<b>Insectos</b>		
<b>Cucaracha</b>	18.4 e	Tharanathan y Kittur,2003
<b>Escarabajo</b>	27-35 c	Tharanathan y Kittur,2003
<b>Mosca</b>	54.8 c	Tharanathan y Kittur,2003
<b>Mariposa sulfurada común</b>	64.0 c	Tharanathan y Kittur,2003
<b>Mosca azul larva</b>	12.0 b	Oudor-Odote y col.,2005
<b>Gusano de cera</b>	33.7 c	Tharanathan y Kittur,2003

- a. Peso cuerpo húmedo
- b. Peso cuerpo seco
- c. Peso cutícula orgánica

d. Peso total cutícula húmeda

e. Peso seca de pared celular

Nota: Generalidades de quitina y quitosano, Universidad de Sonora,(pp.7-8) XHUS-TDT.

### 2.2.1 *Aspergillus Niger*

La figura 7 muestra varias imágenes del hongo *Aspergillus niger*. Esta es la forma más común de los hongos del género *Aspergillus*. Sus esporas pueden sobrevivir bajo condiciones adecuadas durante miles de años, manteniendo intacta su capacidad invasiva y su potencial alérgeno.

#### Figura 7:

Imagen digital de *Aspergillus Niger* y en su forma esporulada

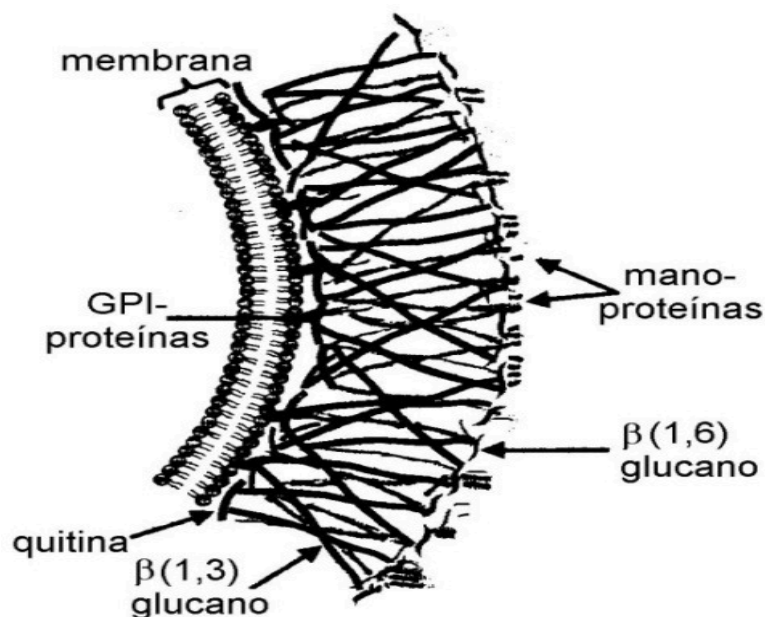


Nota: obtenida de <https://www.shutterstock.com/>

Esta es una estructura con gran plasticidad, que da forma a la célula, controla su permeabilidad y la protege de cambios osmóticos. Está compuesta básicamente por polisacáridos (quitina, glucano, manano, entre otros) y proteínas que generalmente están asociadas a éstos formando glucoproteínas. La capa externa está formada por un complejo de manoproteínas, que se une en forma directa con los 1-3  $\beta$ -glucanos, o en forma indirecta con los 1-6  $\beta$ -6 glucanos. Por su parte, la capa interna está constituida por un complejo conformado por  $\beta$ -glucanos (1-3, 1-6) unidos a la quitina por los extremos no reductores. Se conoce que la quitina es la responsable de la rigidez y forma de la pared celular.

#### Figura 8:

*Esquema de pared fúngica*



Nota: obtenida de <https://solagro.com.pe/blog/hongos-entomopatogenos/>, 2019

La tabla 4 muestra la composición química de la pared celular del *Aspergillus niger*. Está compuesta básicamente de polisacáridos heteropoliméricos, lípidos, quitina, proteínas y ácidos nucleicos y minerales.

**Tabla 4:**

*Composición química de la pared celular de Aspergillus Niger*

Compuesto	Concentración (%)
Azúcares (D-glucosa, D-galactosa, D-manosa, D-arabinosa, D-glucosamina y D-galactosamina)	45.5 a 51.3
Lípidos no ligados	7.4
Lípidos ligados	11.5
Quitina	14.7 a 18.2
Proteína	8.3
Cenizas	4.0
Ácidos nucleicos (ácido aspártico y glutámico, entre otros)	0.2 a 0.35

De otra parte, Stagg afirma que la pared celular puede dividirse en una parte álcali- soluble y otra álcali-resistente. La primera puede disolverse en agua caliente, fenol o álcali; la segunda no es soluble en estos componentes y está compuesta por glucanos (52.4%), quitina (29.4%) y trazas de galactosa y manosa. Los glucanos insolubles corresponden al 58.7% del total de los glucanos presentes en la pared celular.<sup>11</sup>

### **2.3 Método de Obtención de Quitina**

La primera etapa debe realizarse mediante un proceso químico que emplea soluciones de HCL y NaOH. Sin embargo también es posible obtener quitina mediante un proceso biológico empleando bacterias ácido-lácticas que provocan la fermentación y conduce a la hidrólisis de proteínas, o bien bacterias proteolíticas con actividad quitinolíticas. Los procesos biológicos para la obtención de quitina permiten minimizar la degradación química de la misma, disminuir el uso de sustancias químicas nocivas, y además generar menores cantidades de residuos contaminantes, por lo que son más seguros para el medio ambiente.

Debido a que la quitina se encuentra covalentemente asociada a diferentes compuestos, como minerales, lípidos y proteínas, en los organismos que la contienen, es necesario la aplicación de métodos drásticos para poder remover el material quitinoso. El método más utilizado en la industria es el químico, que involucra el uso de ácidos y álcalis a altas concentraciones y temperaturas.

#### **2.3.1 Método Químico**

El método usado a nivel industrial para la obtención de quitina consiste en un proceso químico de hidrólisis de la proteína y remoción del material inorgánico. Generalmente los métodos químicos emplean grandes cantidades de agua y

---

<sup>11</sup> Santiago de Cali, Trabajo de grado, Universidad del Valle, (Ordoñez, 2011)

energía, y generan desechos corrosivos, además dificultan la recuperación de otros productos de alto valor comercial como proteínas y pigmentos.

El proceso de extracción de la quitina puede iniciarse ya sea con la remoción del material mineral o con la desproteínización. Si la fuente tiene una alta cantidad de material proteico soluble que se desea recuperar, entonces se prefiere realizar la desproteínización primero, y si el material tiene un alto contenido de minerales entonces se prefiere eliminar estos antes.

La desacetilación parcial de quitina da lugar al quitosano, con mejores propiedades de reactividad y solubilidad.

La desproteínización química en crustáceos se lleva a cabo usando generalmente solución de NaOH a temperaturas entre los 65° y 100° C durante 1 a 24 horas.

La desmineralización consiste básicamente en la remoción del carbonato de calcio, y de fosfato presente en menor cantidad. Esto se realiza mediante un tratamiento ácido con solución diluida de HCl a temperatura ambiente. El tiempo de tratamiento, la concentración de las soluciones y la cantidad a usar de las mismas, puede variar dependiendo del tipo de materia prima. Después de la desproteínización y desmineralización de la materia prima puede llevarse a cabo o no un proceso de decoloración en el cual se suelen usar solventes como etanol, acetato, cloroformo, así como agentes blanqueadores como el peróxido de hidrógeno e hipoclorito de sodio.

### **2.3.2 Método Biológico**

Los métodos biológicos pueden emplear extractos enzimáticos, o bien, aislados de enzimas, y fermentación microbiológica.

#### **Ensilados**

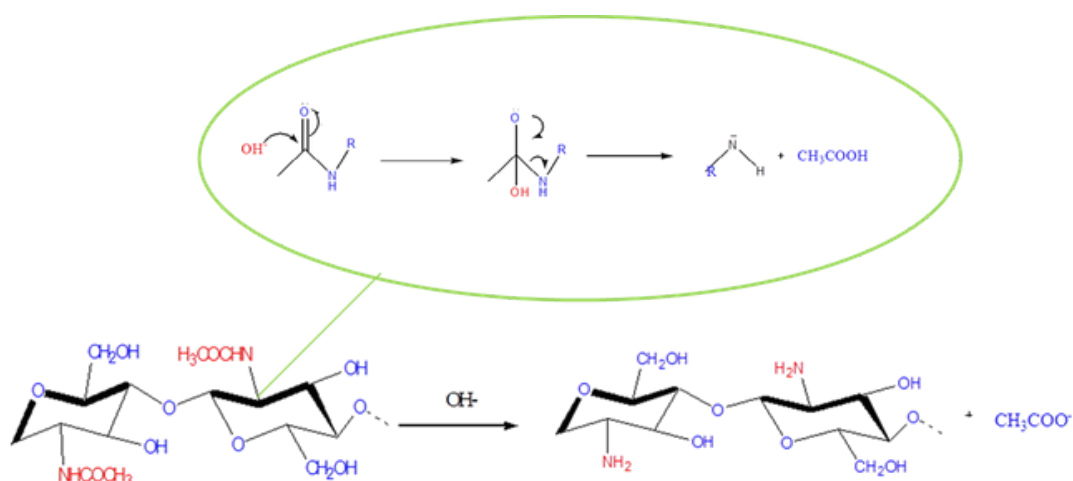
El ensilado consiste en un tratamiento de la biomasa por medio de la adición de ácidos orgánicos como el ácido láctico, o inorgánico como el ácido sulfúrico, conociéndose este método como ensilado ácido; o bien por medio de la fermentación de bacterias ácido lácticas que producen el ácido in situ a partir de una fuente barata de azúcares lo que se denomina ensilado fermentado. Los ácidos utilizados ayudan a conservar el material inhibiendo el crecimiento de organismos no deseados.

## 2.4 Método de Obtención de Quitosano

Una vez que la quitina ha sido obtenida, el siguiente paso es una conversión a quitosano para lo cual es necesario desacetilar, es decir hidrolizar los grupos acetoamida de la quitina hasta grupos amino, que es grupo funcional característico del quitosano. La desacetilación puede lograrse empleando métodos químicos o biológicos.

**Figura 9:**

*Mecanismo de reacción de la desacetilación de la quitina para obtener quitosano*



Nota: adaptado de Viannis, 2017, obtención de quitosano a partir de desechos de exoesqueletos de cangrejo azul, steemit.com

#### **2.4.1 Método Químico:**

Este proceso suele emplear soluciones alcalinas (generalmente de NaOH o KOH) muy concentradas y tratamiento térmico a alta temperatura (60°C o más). Estas severas condiciones de reacción se deben a la baja reactividad de la quitina, ocasionada por la configuración trans de los grupos acetoamida respecto al grupo hidroxilo del carbono 3 del anillo piranósico del monómero; la presencia de puentes de hidrógeno entre los grupos carbonilo y amida de las cadenas adyacentes del monómero; y a la compactación de las cadenas en la estructura cristalina de la quitina que dificulta el acceso del álcali a los sitios reactivos de la molécula.

La desacetilación difícilmente se alcanza y tampoco es necesaria, puesto que la solubilidad en soluciones de ácido diluido se logra con 60% de desacetilación.

#### **2.4.2 Método Biológico**

Se realiza mediante el uso de enzimas. La quitindeacetilasa es la enzima que cataliza la conversión de quitina en quitosano mediante la desacetilación de los residuos N-acetilglucosamina.

La enzima es una glicoproteína que se secreta tanto en la región periplástica como en el medio de cultivo. Además exhibe una notable estabilidad térmica, siendo su temperatura óptima de 50°C con una alta especificidad por los enlaces  $\beta$ - (1,4) y polímeros de N-acetil-glucosamina soluble en agua.

La efectividad de la enzima disminuye radicalmente (de 9.5 a 0.5% de efectividad) cuando se usa como sustrato, quitina amorfa. Pero si se utiliza quitosano parcialmente desacetilado soluble en agua, la efectividad llega hasta 97%,

lo que indica que es necesario un pretratamiento de la quitina cristalina, que favorezca la accesibilidad de la enzima a los grupos acetamida de la molécula.

Aunque aún no se ha optimizado en proceso enzimático, tiene la ventaja de producir quitosano con mayor uniformidad en cuanto a su grado de desacetilación y polimerización, a diferencia del proceso químico, en donde estos fenómenos ocurren al azar.<sup>12</sup>

## **2.5 Propiedades Físicoquímicas del Quitosano:**

La presencia de grupos amino en la estructura de la molécula de quitosano, convierte a este polímero en un polielectrolito catiónico natural con un pKa de alrededor de 6.5, lo que le confiere propiedades muy particulares. Además, la presencia de los grupos amino e hidroxilo, permite su modificación química fácilmente.

Las propiedades fisicoquímicas del quitosano afectan su funcionalidad y, además, varían dependiendo de la fuente y método de obtención de la quitina, del método y las condiciones de desacetilación de la misma, así como de los métodos y condiciones de determinación de las características fisicoquímicas.

### **2.5.1 *Peso Molecular***

El peso molecular y su distribución afectan las propiedades físicas y químicas del quitosano, así como su funcionalidad, y determina en gran parte la solubilidad y la viscosidad del mismo.

El peso molecular afecta la actividad que presenta el quitosano como espesante, regulador de la viscosidad, antifúngico, agente ligante de color, grasa y agua, entre otras aplicaciones.

---

<sup>12</sup> Generalidades de quitina y quitosano, Universidad de Sonora,(pp 9-15) XHUS-TDT.  
(<http://tesis.uson.mx/digital/tesis/docs/19407/capitulo2.pdf>)

### **2.5.2 Grado de Desacetilación**

El grado de desacetilación, el cual consiste en el porcentaje de grupos amino libres en el quitosano, es la característica que permite la solubilidad de la molécula, su bioactividad así como en el desempeño de muchas de las aplicaciones del polímero. De hecho, el quitosano se define como la quitina que ha sido desacetilada en un 60-75, o más, punto en el cual se vuelve soluble en ácidos orgánicos.

### **2.5.3 Viscosidad**

El quitosano forma soluciones viscosas en varios ácidos orgánicos. La viscosidad de la solución obtenida depende del peso molecular, grado de desacetilación, concentración, temperatura, pH, la fuerza iónica y el solvente ácido utilizado. La determinación de la viscosidad permite una aproximación al peso molecular del quitosano puesto que la viscosidad puede relacionarse en el peso molecular.

### **2.5.4 Solubilidad**

El quitosano es insoluble en agua pura y en solventes orgánicos, pero es soluble en soluciones acuosas diluidas de ácidos orgánicos y minerales a condiciones específicas. Esta disolución, a diferencia de la quitina, es posible por la protonación de los grupos amino libres a lo largo de la cadena del polímero, generando así la correspondiente sal de quitosano en solución. Por lo tanto las cargas positivas presentes a lo largo de la molécula, determinan en gran medida el comportamiento del quitosano en solución.

Dado que la desacetilación de la quitina da como resultado una estructura irregular debido a la semicristalinidad de la misma, la distribución de los grupos aminos a lo largo de la cadena del polímero es también azarosa.

## 2.6 Aplicaciones del Quitosano

Es posible usarlo en diferentes formas como polvo, soluciones, geles, películas o membranas.

En la tabla 5 se resumen varias de las aplicaciones del quitosano en industrias tan diversas como la cosmética, la farmacéutica y la alimenticia entre otras.

Los mecanismos propuestos para la capacidad quelante del quitosano son la floculación y la coagulación, que ocurren debido a las cargas positivas presentes en el polímero que pueden combinarse con las cargas negativas de dichos compuestos. La eficiencia del proceso, por lo tanto, dependerá mayormente del pH en el que se encuentre el quitosano, aunque también pueden intervenir factores como la cantidad y la calidad del mismo, así como la concentración y tamaño de la partícula a separar.

**Tabla 5:**

*Aplicaciones del quitosano*

<b>Industria</b>	<b>Aplicaciones</b>
<b>Cosmética</b>	Tratamiento del acné Mantenimiento de humedad de la piel Reducir la estática del pelo Cuidado dental Disminuir líneas de expresión Lentes de contacto
<b>Papelera y textil</b>	Resistencia al quebrado de papel Mejora el brillo de papel Resistencia al deterioro microbiano o enzimático Mejora la biodegradabilidad de plásticos Menos absorción de grasa Mayor estabilidad y resistencia en color de telas
<b>Biomedicina</b>	Actividad inmunológica y antitumoral Anticoagulante Curación (vendas) Bacteriostático-fungistático

	Sedante del sistema nervioso central Ayuda a generar tejido conjuntivo
<b>Tratamientos de aguas</b>	Floculación para clarificar agua Remoción de iones metálicos Reducción de olores
<b>Agricultura</b>	Activador de mecanismos de defensa en plantas Estimulación de crecimientos en plantas Mejora germinación de semillas Protege de daño microbiano

Nota: Generalidades de quitina y quitosano, Universidad de Sonora,(p.21) XHUS-TDT.

Una de las industrias con mayores posibilidades de aplicación del quitosano es la alimenticia, donde se puede utilizar para diversos objetivos:

- Como agente gelificante, ya que gelifica a pH mayor al de su pK incrementando la viscosidad de los alimentos,
- Como fibra dietaria, ya que retiene grasas y agua hasta 20 veces su peso,
- Como agente antioxidante debido a su capacidad de quelar metales que son catalizadores de las reacciones de oxidación de las grasas,
- Como emulsificante, y agente estabilizador de emulsiones ya que puede actuar como emulsificante primario,
- Como emulsificante secundario al incrementar la viscosidad de la fase continua,
- Como agente estabilizador de color debido a su afinidad con varios colorantes,
- Como agente conservador debido a su acción antimicrobiana sobre bacterias y hongos contaminantes de alimentos, ya sea inhibiendo o retardando su crecimiento.

El quitosano posee también la capacidad de formar cubiertas o películas cuando se deja evaporar la solución del polímero sobre una superficie. Esto ha

permitido su utilización como cubiertas protectoras para alimentos y una posible aplicación como empaque comestible y biodegradable.<sup>13</sup>

**Tabla 6:**

*Aplicaciones del quitosano en la industria alimenticia*

<b>Aplicación</b>	<b>Efecto</b>
<b>Aditivo</b>	Clarificación y desacidificación de bebidas de frutas Control de textura Agente emulsificante Agente estabilizante Antioxidante Gelificante
<b>Calidad nutricional</b>	Fibra dietaria Agente antigastritis Formulaciones para alimento de bebés
<b>Agente conservador</b>	Antibacterial Antifúngico/fungistático
<b>Películas y cubiertas comestibles</b>	Control de transferencia de humedad Protección antimicrobiana Barrera protectora contra el medio Control de oxidación enzimática en frutas

Nota: Generalidades de quitina y quitosano, Universidad de Sonora,(p.23) XHUS-TDT.

## **2.7 Modo de Acción del Quitosano sobre Brettanomyces**

El quitosano tiene dos efectos complementarios frente a las células de Brettanomyces presentes en los vinos:

### **2.7.1 Un Efecto Biológico**

Interacción entre el quitosano y la membrana de Brettanomyces que provoca una pérdida de la viabilidad de estas últimas. La presencia de quitosano genera una liberación del ATP en el medio, que genera una perturbación fuerte de la

<sup>13</sup>Generalidades de quitina y quitosano, Universidad de Sonora,(pp.22) XHUS-TDT.

permeabilidad de la membrana de *Brettanomyces* muy probablemente correlacionada a la mortalidad de la misma.

### 2.7.2 Un Efecto Físico

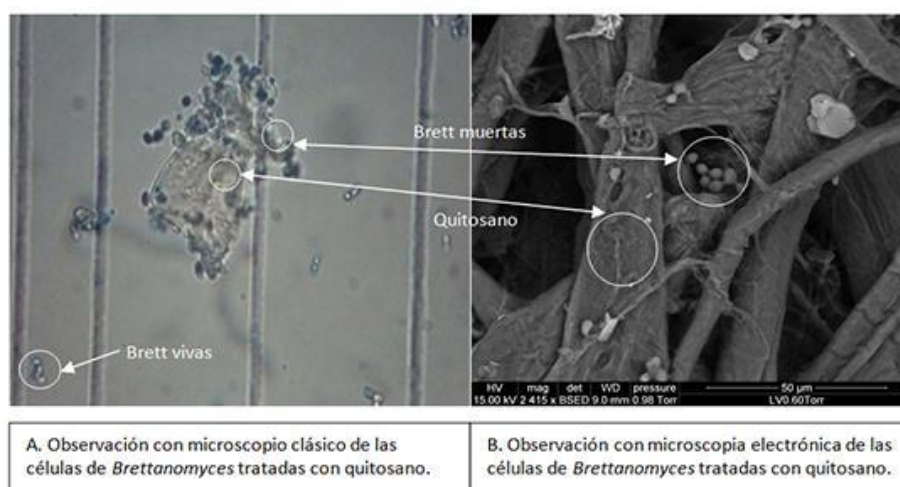
Interacción de carga entre el quitosano y la pared de *Brettanomyces* que provoca la agregación y la sedimentación de *Brettanomyces*.

El quitosano y *Brettanomyces* se agregan, gracias a interacciones de carga, lo que provoca la sedimentación de las células de *Brettanomyces*. En efecto, al pH en el que se realizaron los estudios, pH del vino, el quitosano está cargado positivamente, mientras que la superficie de la levadura *Brettanomyces* está cargada negativamente.

La principal característica que confiere el potencial antimicrobiano del quitosano es su carácter catiónico, que será mayor cuanto más ácido el pH del medio y con un grado de desacetilación más elevado, así que cuanto mayor sea la densidad de carga positiva generadas, más potente será la acción antimicrobiana.<sup>14</sup>

#### Figura 10:

*Observación de Brettanomyces tratadas con quitosano*



<sup>14</sup> Heras José María, 2020, Quitosano de origen fúngico: una herramienta natural de lucha contra *Brettanomyces* en el vino, ACENOLOGIA.COM ([https://www.acenologia.com/brett\\_quitosano\\_origen\\_fungico\\_cienc174\\_0220/](https://www.acenologia.com/brett_quitosano_origen_fungico_cienc174_0220/))

Nota: adaptada de Heras José María, 2020, Quitosano de origen fúngico: una herramienta natural de lucha contra *Brettanomyces* en el vino, *acenologia.com*

## **2.8 Legales de Quitosano**

### **2.8.1 Resolución N°51/2011 de INV**

Que mediante la actuación citada en el Visto, se solicitó la autorización del uso de quitosano como práctica enológica a fin de reducir la presencia de levaduras del género *Brettanomyces*.

Que el quitosano es un polisacárido natural de origen fúngico, extraído y purificado a partir de fuentes fúngicas alimentarias o biotecnologías seguras y abundantes como *Agaricus bisporus* o *Aspergillus niger*, utilizado como agente de clarificación y como estabilizante biológico del vino.

Que este compuesto resulta una herramienta útil, de fácil aplicación y eficaz contra las levaduras *Brettanomyces* presentes en los vinos, como así también para reducir la concentración de metales pesados y de contaminantes, y evitar quiebras férricas y cúpricas, sin modificar el perfil organoléptico y las características analíticas de los mismos.

La ORGANIZACIÓN INTERNACIONAL DE LA VIÑA Y EL VINO (OIV), ha dado el visto bueno en relación al uso de este producto, mediante Resolución OENO N°338ª de fecha 3 de julio de 2009.

La OIV, en su CÓDIGO INTERNACIONAL DE PRÁCTICAS ENOLÓGICAS, acepta como práctica enológica, la adición de quitosano de origen fúngico al vino.

La UNIÓN EUROPEA, en su reglamento N°53 de fecha 21 de enero de 2011, apéndice 13, también autoriza como práctica enológica lícita el tratamiento de los vinos con dicho producto.

El presidente del Instituto Nacional de Vitivinicultura

Resuelve:

1° Autorícese, como práctica lícita, la adición de quitosano al vino, para el cumplimiento de los siguientes objetivos:

- a) Reducir la concentración de metales pesados, como Fe, Pb, Cd y Cu.
- b) Evitar las quiebras férricas y cúpricas.
- c) Reducir la cantidad de posibles contaminantes, especialmente la Ocratoxina A.
- d) Reducir la presencia de microorganismos indeseables como Brettanomyces.

2° La dosis máxima de quitosano a utilizar deberá ser:

1. CIEN GRAMOS POR HECTOLITRO para los objetivos a) y b).
2. QUINIENTOS GRAMOS POR HECTOLITRO para objetivo c)
3. DIEZ GRAMOS POR HECTOLITRO para el objetivo d)<sup>15</sup>

### **2.8.2 Resolución OIV/OENO 368-2009**

Presenta una monografía sobre el quitosano, donde establece que:

Se extrae y se purifica a partir de fuentes fúngicas alimentarias o biotecnológicas seguras y abundantes como *Agaricus bisporus* o *Aspergillus niger*.

- Aspecto y solubilidad: El quitosano se presenta en forma de polvo inodoro, insípido y de color blanco. El polvo es casi totalmente insoluble en medio acuoso u orgánico,
- Pureza: La pureza del producto tiene que ser igual o superior al 95 %,
- Establece ensayos sobre Determinación del grado de acetilación y del origen del quitosano, pérdida de peso por secado, cenizas, preparación de la solución para los ensayos, Plomo, Mercurio, Arsénico, Cadmio, Cromo, Zinc, Hierro, Cobre.

---

<sup>15</sup> Resolución N°51/2011 de INV, INSTITUTO NACIONAL DE VINICULTURA

- Y sobre controles microbiológicos, refiere a microorganismos totales, enterobacterias, Salmonella, Coliformes, Levaduras Hongos, y análisis de Ocratoxina.

Todos parámetros que deben ser cumplidos para poder ser utilizado en la enología, los cuales fueron verificados para poder otorgar el libre circulación de dicho producto.

Como se puede observar el producto fue aprobado para su uso en vinos, por la OIV en el año 2009, pero su implementación en Argentina no fue hasta el 2011 cuando fue aceptado y reconocido para su utilización por el Instituto Nacional de Vitivinicultura.<sup>16</sup>

## **CAPÍTULO III: RESULTADOS Y DISCUSIONES**

### **3.1 Brettanomyces y Quitosano en la enología**

Se ha escuchada reiteradas veces, que el carácter Brett a un nivel bajo contribuye a la complejidad del terroir, pero al producir compuestos fenólicos reducen la expresión propia del carácter de un lugar, una añada o una cosecha.

La idea de pensar que se puede tener solo un poco de Brett es una utopía. Si las condiciones lo permiten y el vino contiene alguna levadura Brettanomyces, podemos estar prácticamente seguros de que se multiplicará y contaminará el vino; comprometiendo su expresión, su tipicidad y su intensidad.

Los vinos de terroir son aquellos que no están enmascarados por las desviaciones de la fermentación, y existen varias soluciones para evitar que su calidad se vea comprometida, entre ellas una buena gestión de la uva, buenas

---

<sup>16</sup>Resolución OIV/OENO 368-2009, 2009, ORGANISMO INTERNACIONAL DE LA VIÑA Y EL VINO

prácticas en los viñedos y en la bodega, una higiene impecable y un minucioso control de la fermentación.

Pero estos medios no siempre son suficientes, por lo que el quitosano de origen fúngico, representa una herramienta innovadora y eficaz de lucha contra *Brettanomyces*.

- Biodegradable: una vez en contacto con el suelo, es digerido por microorganismos que lo transforman en metabolitos solubles,
- No alérgeno: El origen fúngico propuesto para la enología asegura su carácter no alérgeno,
- Embalaje: se presenta en forma de un polvo fino de un color beige claro en envases de 100 gr.
- Su aplicación es muy sencilla, y no es peligroso para su utilización.

### **3.2 Bodega**

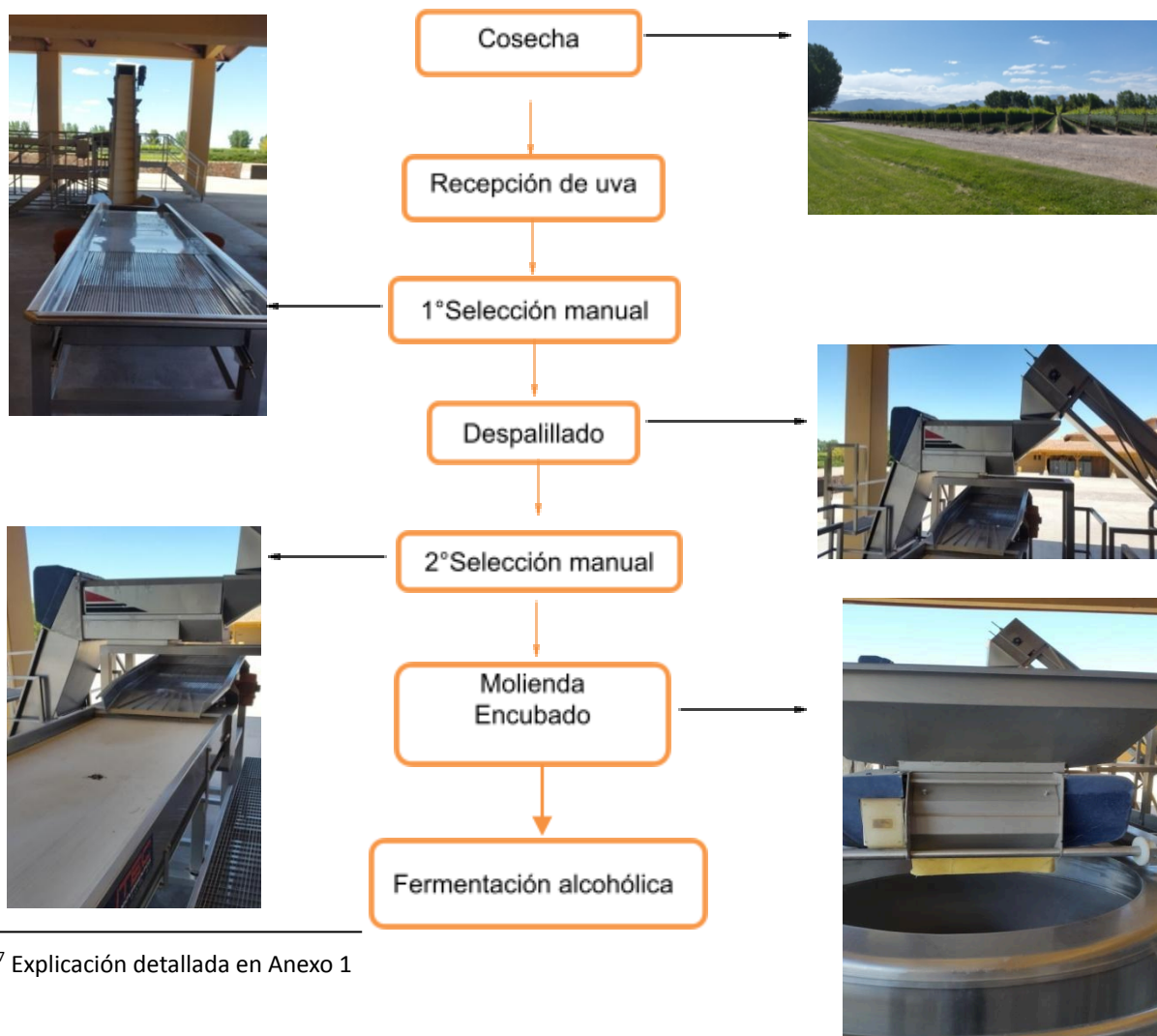
El trabajo se realizó en un establecimiento, cuyos viñedos y bodegas se ubican a 1050 metros sobre el nivel del mar, en la zona de Agrelo, una de las más prestigiosas de Mendoza.

Como toda la elaboración de los vinos está basada en viñedos propios únicamente, se hizo un análisis a fondo de los suelos y su conformación antes de definir los varietales a plantar, finalmente solo fueron cepajes tintos, como Malbec, Cabernet Sauvignon, Syrah, y tres terruños no tan comunes como Tannat, Petit Verdot y Cabernet Franc. Además tiene la particularidad que las hileras se plantaron de Noroeste al Sudsudeste rompiendo con toda la tradición, pero logrando que los racimos se beneficien con la exposición directa al sol tibio de la mañana y estuvieran protegidos de los rayos de la tarde.

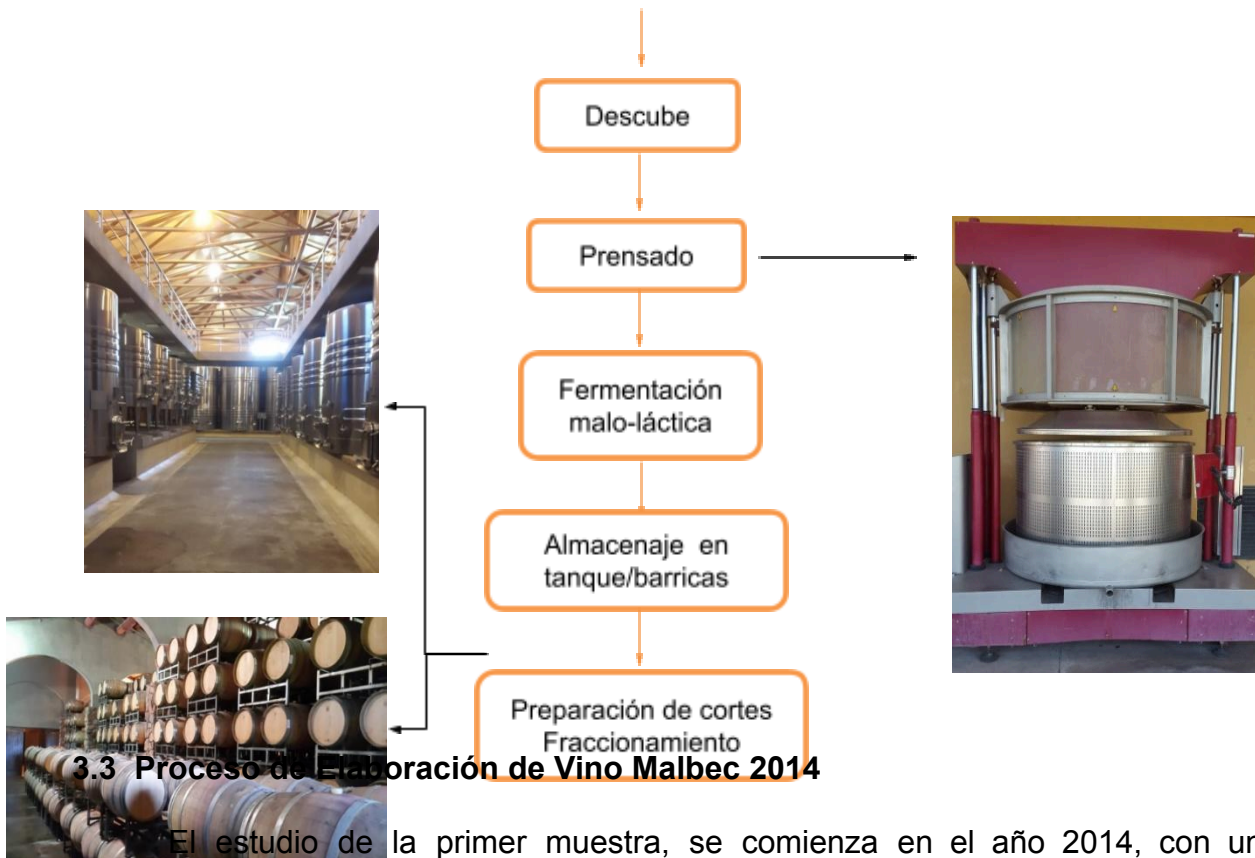
El terreno presenta distintos tipos de suelo aluvial y coluvial, por lo que cada parcela es única, con su propio carácter y personalidad. Para lograrlo, la viticultura también debe ser sustentable, y el impacto sobre el medio ambiente, mínimo.

La filosofía de la empresa es hacer las cosas a mano, cuidando los detalles y siendo respetuosos con el medio ambiente desde la planta hasta la botella, estando presentes en cada paso con gente capaz, para lograr la excelencia.

### 3.2.1 Diagrama de Flujo del Proceso de Elaboración<sup>17</sup>



<sup>17</sup> Explicación detallada en Anexo 1



El estudio de la primer muestra, se comienza en el año 2014, con una cosecha más fría de lo habitual. Comenzando con un diciembre de temperaturas más altas de las normales y un febrero con varias precipitaciones, que produce el retraso de la maduración y por ende, se procede a cosechar una semana más tarde de lo programado.

En este caso se decide levantar la uva el 08-04-14. Toma de decisión del enólogo en conjunto con el ingeniero agrónomo, a partir de visitas al viñedo y de datos analíticos de materia prima, cuya técnica se encuentra disponible en Anexo 2.

Ingresan al tanque 5500 kg de uva malbec, en este caso la maceración prefermentativa se realiza solo 3 días. A continuación los 3 controles.

**Tabla 7:**

*Control analítico durante la maceración en frío - MB 2014*

	<b>Bx</b>	<b>Ac. Total</b>	<b>pH</b>
<b>08/04/14</b>	23,5	3,78	3,68

09/04/14	23,5	3,15	3,78
10/04/14	23,4	2,89	3,91

Para el inicio de la fermentación se realizan las siguientes adiciones:

- 6 kg de ácido tartárico
- 750 gr EC 1118 (20 gr/Hl)
- 500 gr GoFerm
- 800 gr Fermaid k

La EC 1118, es una levadura adecuada para uvas tintas con alta resistencia a los alcoholes altos. El GoFerm es un nutriente que ayuda a la rehidratación y tolerancia al alcohol de la levadura y otro nutriente como el Fermaid K que sirve de complemento para asegurar una fermentación completa.

A nivel laboratorio se realizan seguimientos día por medio, si no surgen inconvenientes hasta finalizar la fermentación y llegar a rastro.

**Tabla 8:**

*Control analítico durante la fermentación alcohólica - MB 2014*

	Ac. Total	Ac. Volátil	pH	Azúcar	Alcohol
15/04/14	6,33	0,25	3,48	238	0
17/04/14	6,83	0,30	3,64		
19/04/14				3,22	13,6
22/04/14				1,8	13,8

Una vez finalizada la fermentación alcohólica, se procede al descube y prensado del mosto, se trabaja con una prensa vertical de baja capacidad, lo cual no

es problema ya que al elaborar en tanques pequeños se puede cumplir un descube con un solo prensado y así garantizar la calidad del vino.

El líquido prensado es degustado por el enólogo, y se decide juntar con el vino gota. Obteniendo un total de 2400 litros.

**Tabla 9:**

*Control analítico post-prensado - MB 2014*

	<b>Ac. Total</b>	<b>Ac. Volátil</b>	<b>pH</b>	<b>Azúcar</b>	<b>Alcohol</b>	<b>obs.</b>
<b>26/04/14</b>	6,26	0,26	3,74	1,8	13,9	tanque descubado

Permanece 2 días en tanque y luego se baja a 10 barricas de roble francés de primer uso, a donde se va a continuar con el seguimiento de la fermentación maloláctica, para la cual no se realiza siembra de bacterias lácticas, sino que se espera que arranque con bacterias indígenas.

**Tabla 10:**

*Control analítico durante la fermentación maloláctica - MB 2014*

	<b>Ac. Total</b>	<b>Ac. Volátil</b>	<b>pH</b>	<b>Azúcar</b>	<b>Alcohol</b>	<b>SO<sub>2</sub> Libre</b>	<b>Seguimiento</b>
<b>28/04/14</b>	6,26	0,246	3,74	1,8	13,9	0	Cromatografía +
<b>22/05/14</b>	6,07	0,327	3,64			0	Cromatografía +
<b>13/06/14</b>	5,47	0,354	3,75			0	Cromatografía +
<b>27/06/14</b>	5,55	0,346	3,79			0	Cromatografía +
<b>01/07/14</b>	5,29	0,336	3,68	1,8	13,95	49	Enzimático 0,165

La fermentación se termina a fines de junio, en este punto se realiza la corrección de anhídrido sulfuroso por medio del agregado de 100 ml MBSK al 25% y 270 ml de ácido tartárico al 10% para corregir pH, adiciones por barrica.

A partir de este momento se comienza con la crianza en barricas donde el vino cumple un plazo de 14 meses, con sus respectivos trabajos de trasiegos, desborre, rellenos y correcciones.

De ahora en más se continúa con 2 tipos de controles, por un lado el seguimientos analíticos mensuales de rutina y por otro, el control microbiológico, haciendo degustaciones cuando el enólogo lo considere necesario.

Con respecto al control de Brettanomyces, se realizan seguimientos de la población, para controlar si hay desarrollo o no de las mismas. Puede haber vinos contaminados por Brett, pero sin que esta se haya desarrollado, porque las condiciones le son adversas (poco azúcar, pH bajo), pero un vino sano sensible puede acabar contaminado.

Un buen control implica 12 análisis por depósito que se puedan realizar a lo largo de todo el año, pero los momentos críticos que requieren mayor seguimiento son:

- Entre fermentación alcohólica y maloláctica, cuando los niveles de sulfuroso son bajos,
- En crianza, siempre que los niveles de sulfuroso sean bajos y pH altos,
- En los momentos de aumento de temperatura y niveles de sulfuroso bajos,
- En trasiegos, movimientos y mezclas de vinos en general.

Los análisis de microbiología se realizan en laboratorios externos por no contar con las herramientas necesarias en bodega. Debido a que es muy costoso y poco práctico poder cumplir con análisis mensuales, se realizan controles en los momentos críticos o por la sospecha de la presencia de Brettanomyces. Se trabajo

con un laboratorio que realiza el recuento de microorganismos y otro que cuantifica los compuestos fenólicos, para más información en Anexo 2.

A continuación se detalla una tabla donde se coloca foco en el desarrollo analítico del vino en su etapa de añejamiento, para así poder observar el momento de la aparición de Brett y su posterior tratamiento con quitosano. Además se complementa junto a los análisis físico-químicos, los exámenes microbiológicos que se realizan acorde a los requerimientos del momento en el proceso que se encuentre.

**Tabla 11:**

Seguimiento analítico y microbiológico durante el añejamiento - MB 2014

	Ac.Total	Ac. Volátil	pH	Az	Alcohol	SO <sub>2</sub> Libre	Obs.	Brettanomyces	Etil-fenol	Etil-guayacol	
22/07/14	5,02	0,372	3,69	1,8	13,95	40					
12/08/14	4,87	0,492	3,69			35					
09/09/14	4,87	0,420	3,67			45	Trasiego y desborre				
16/10/14	4,98	0,456	3,67			34					
10/11/14	5,10	0,430	3,67			39					
03/12/14	5,14	0,480	3,66		13,95	37					
07/01/15	4,98	0,468	3,65			34/38					
03/03/15	5,14	0,516	3,68			34					
26/05/15	5,13	0,450	3,71			29/41	1° Degustación				
02/06/15									301 µg/lt	62 µg/lt	
17/07/15	5,32	0,582	3,68			40					
14/08/15	5,13	0,576	3,66		13,95	29	2° Degustación				
07/09/15	5,17	0,570	3,70			49					
11/09/15								1 UFC			
13/09/15								Trasiego con adición de QUITOSANO			
18/09/15									533 µg/lt	62 µg/lt	
23/10/15	5,14	0,582	3,64			29/43					
02/11/15								< 1 UFC			
03/11/15	5,32	0,560	3,66			37/41					
24/11/15	4,95	0,524	3,68		13,95	41					
16/12/15	Trasiego a un corte blend 2014										

Como se muestra en la tabla el trasiego se realiza el día 09/09/14 esto consiste en vaciar todas las barricas a un tanque previamente lavado y desinfectado. Una vez todo homogéneo se adiciona 300 gr de MBSK para subir el anhídrido libre y mantener protegido el vino.

En las barricas de roble, y sobre todo las que ya fueron usadas, se debe extremar la higiene mediante los métodos enológicos estipulados, como el mechado y la desinfección, haciendo especial énfasis en la prevención usando una correcta y esmerada limpieza. Estas medidas son necesarias ya que las barricas son el escondite preferido para Brett, debido a la porosidad y al permanente contacto con el vino.

Recién al año siguiente, en el mes de mayo por medio de una degustación se identifican aromas no deseados muy leves, un olor a sucio, como sudor de caballo, sin alteración de la parte gustativa, esto genera la sospecha de que se trata de brettanomyces. Si bien los datos analíticos no mostraban grandes modificaciones se prepara una muestra y se envía a laboratorio externo.

A los días se reciben los resultados de 301 microgramos por litro de etilfenoles y 62 microgramos por litro de etilguayacol, esto nos habla de la presencia de brettanomyces, ya que son los responsables directos de generar estos fenoles. Se decide poner en aislamiento el lote para evitar contaminación cruzada con el resto de los vinos y se corrige con 25 ml de MBSK 25 %, para intentar detener a la brett, dejando el vino con 40 ppm de anhídrido y por ende un activo alto.

En el mes de agosto, se realiza una degustación de las 10 barricas por separado y se identifica solo una vasija con el defecto marcado. Se procede a vaciar el vino y colocarlo en otra barrica sin defecto. Se determina mandar muestras para

hacer un recuento microbiológico de *brettanomyces* y otra muestra para ver si había aumento de los fenoles.

Se entiende que la causa fue que esta barrica se saltió en las correcciones y rellenos mensuales, por lo que su anhídrido quedó más bajo y por lo que al llegar los calores del otoño, permitió que se desarrollara la Brett.

El 11/09/15 se recibe la confirmación de 1 unidad formadora de colonia de *brettanomyces*, que si bien no es un gran número, confirma su presencia y la preocupación de su proliferación en el tiempo. Situación que queda confirmada con los datos de 533  $\mu\text{m}/\text{lt}$  EF, los cuales se pueden observar que se han elevado bastante desde el análisis anterior, mientras que los EG se mantienen.

### **3.3.1 Procedimiento y Resultados**

Ante esta situación se hace una investigación de mercado y por recomendación para estos tipos de vinos, que no se exponen a ningún tipo de clarificación y muy escasa filtración solo al llegar al fraccionamiento, surge la opción de utilizar un producto nuevo, el quitosano.

Para comenzar su uso, el vino se trasiega a un tanque y se corrige nuevamente con 15 ml MBSK 25%, para soportar los siguientes trabajos.

#### **Figura 11:**

*Presentación comercial del quitosano*



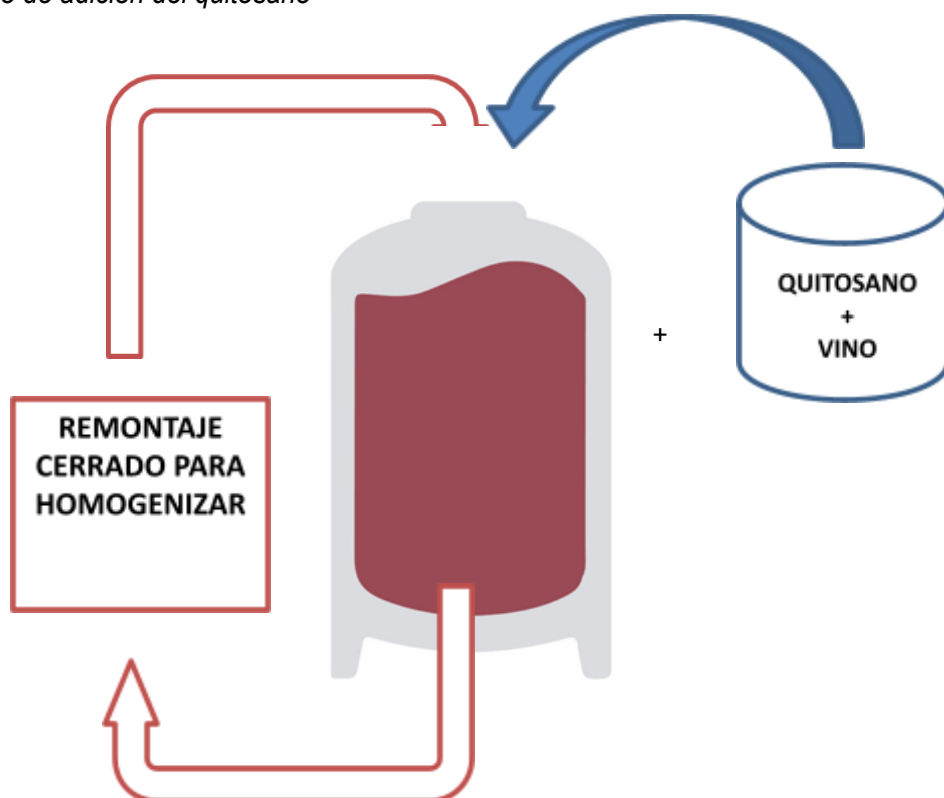
Se trata de un polvo beige, de una textura como harina, que viene en bolsas herméticas de 100 gr, la dosis recomendada es de 4 gr/Hl, dado el volumen de vino en el tanque se deben agregar 90 gr.

#### Procedimiento de agregado de Quitosano

- Se disuelven los 90 gr, en una jarra con 500 ml de vino.
- Se agrega al tanque, donde se vaciaron las barricas.
- Se realiza un remontaje cerrado de unos 10 min para mover todo el volumen.
- Por los próximos 10 días se realiza el mismo movimiento del vino.
- Finalmente se trasiega para separar los fondos.

**Figura 12:**

*Modo de adición del quitosano*



Nuevamente se manda muestra a recuento de Brett y pasados los 10 días que demora el análisis, el resultado es  $< 1$  UFC, lo cual indica que el vino quedó limpio de Brettanomyces.

A través de una degustación se concluye que el vino tiene un nivel de acidez estable, con un buen equilibrio en boca, con un color rojo violáceo propio del varietal, y la pequeña desviación aromática se pierde al ser destinado a un corte.

Desde el punto de vista organoléptico, el vino no sufre alteraciones por el agregado de quitosano y por la parte analítica, por medio de unas gráficas se puede mostrar que no sufre tampoco alteraciones en los parámetros más importantes del vino.

**Figura 13:**

*Gráfico de seguimiento de Acidez Total - MB 2014*

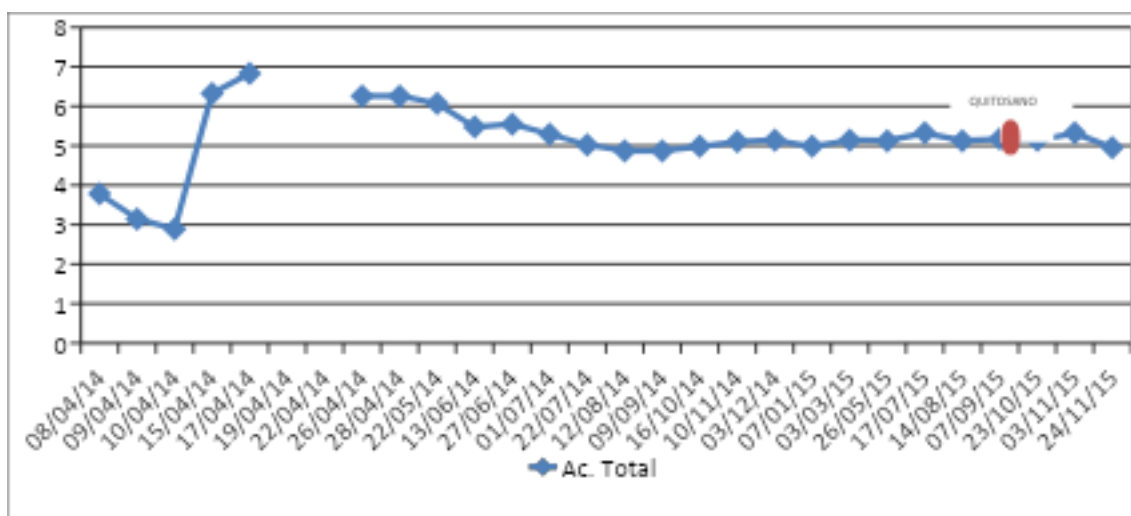


Figura 14:

Gráfica de seguimiento del pH – MB 2014

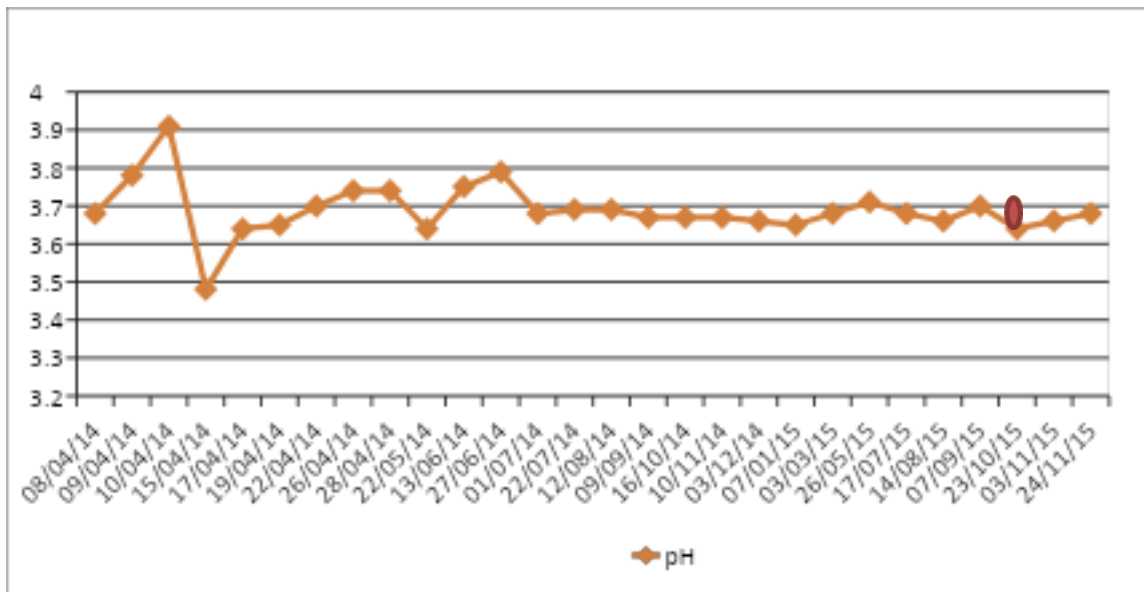


Figura 15:

Gráfica de seguimiento de Acidez Volátil - MB 2014

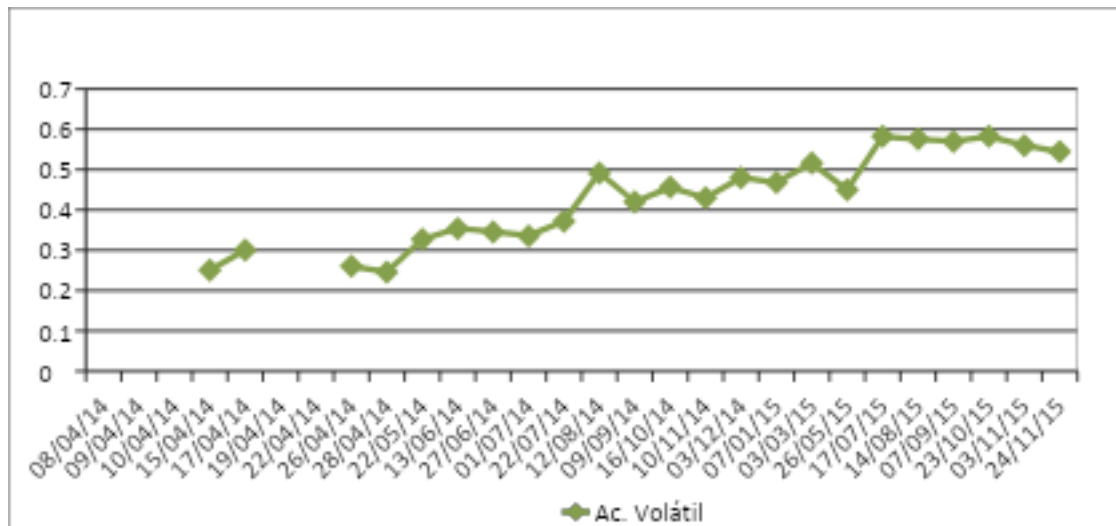
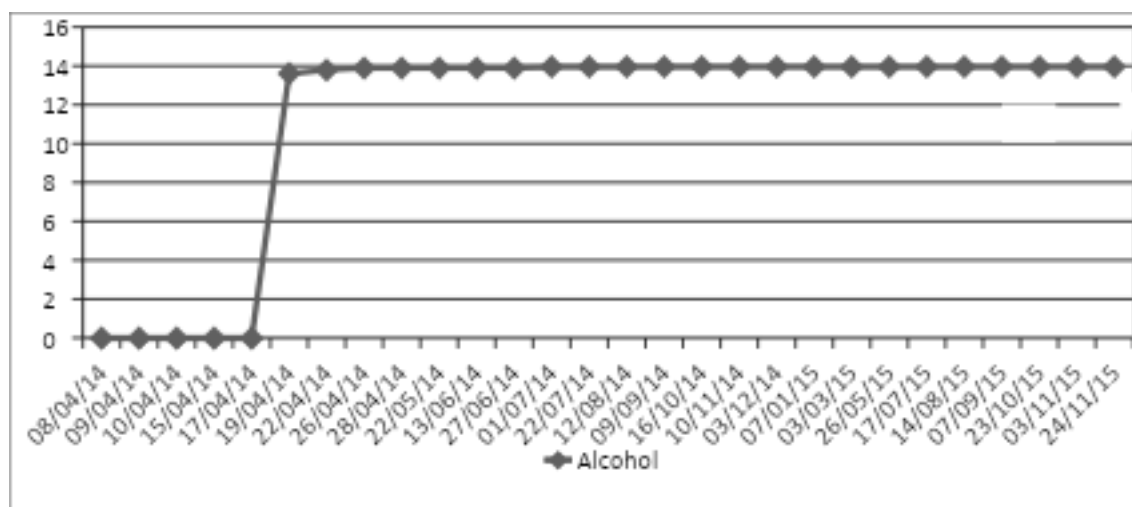


Figura 16:

Gráfica de seguimiento de Alcohol - MB 2014



Claramente se puede observar en los esquemas que parámetros tales como acidez total y pH no sufren modificación por el agregado de quitosano, al igual que el alcohol, que es un parámetro de suma importancia que no se fuera a encontrar afectado, principalmente por tratarse de vinos de alta gama donde los niveles de alcoholes elevados son una gran característica, junto con gran complejidad en cuanto a gusto y olfato.

Si podemos observar un aumento de acidez volátil, si bien es una curva que siempre va en ascenso, principalmente en los momentos en que se detecta la presencia de *brettanomyces*. Pero también se puede ver, que al agregarse el quitosano se mantiene la curva e incluso tiende a disminuir al final. Esto muestra la detención de la acción de la *brettanomyces* por acción del quitosano junto con el aumento de anhídrido.

### 3.4 Proceso de Elaboración de Vino Malbec 2016

El estudio de la segunda muestra se realiza en el año 2016, la cosecha se caracteriza por una primavera y comienzo de verano cálido, pero a partir de febrero aparecen lluvias frecuentes, lo cual produce un adelanto de dos semanas en la cosecha.

Uno de los últimos cuarteles que se cosecha es un malbec que ingresa a bodega el día 20/04/16 con un volumen de 25000 kg, como ya se ha establecido antes, los tanques son pequeños para favorecer el contacto, por lo que estos kilos se dividen en dos vasijas.

Con lo que respecta a la vendimia es igual a la antes mencionada; cabe destacar que se trata de un proceso en el cual se cuida la calidad de la uva al máximo.

Se comienza con la cosecha manual y selección en viñedo, colocándose en cajas para evitar que se aprieten los racimos. Una vez en bodega se sigue un proceso en el cual no intervienen bombas de ningún tipo, haciendo todo el traslado por cintas y una doble selección durante todo su camino; para lo cual, se necesita disponer de un gran grupo de personas y se requiere mayor tiempo dado que la vendimia es prácticamente a mano. La inversión en estos recursos, está más que justificado por las características que se busca en estos mostos.

Mientras se cursa la maceración en frío, que se cumple en 3 días, se realizan los 3 análisis iniciales, según protocolo establecido. Lo que principalmente se busca en esta etapa, es enriquecer los caldo en antocianos; responsables del color principalmente en tintos, y taninos que son los encargados de aportar aromas, aspereza o astringencia. También son importantes los polisacáridos que al unirse a los tanino, forman complejos que aportan la suavidad, para poder lograr vinos

complejos y más aromáticos. Además son vinos que van a pasar un largo periodo en barricas por lo que este paso es fundamental e indispensable.

**Tabla 12:**

*Control analítico durante la maceración en frío - MB 2016*

	<b>Bx</b>	<b>Ac. Total</b>	<b>pH</b>
<b>20/04/16</b>	22,3	7,46	3,42
<b>21/04/16</b>	22,2	7,05	3,62
<b>22/04/16</b>	22,5	6,45	3,53

Las adiciones que se realizaron para comenzar la fermentación son:

- kg levaduras F15
- kg GoFerm
- kg Fermaid K

La levadura F15, proporciona vinos más redondos y aromáticos, al mismo tiempo que nos da una seguridad fermentativa, recomendada para uvas con un potencial alcohólico elevado, además proporciona una gran producción de glicerol. El glicerol del vino, al no tratarse de un compuesto volátil, no tiene un impacto directo en las características aromáticas del vino; sin embargo, presenta otras cualidades sensoriales, por ejemplo, aporta sabor ligeramente dulce, y debido a su naturaleza viscosa, contribuye a la suavidad, consistencia y cuerpo de los vinos.

No se realiza un agregado de ácido tartárico ya que no es necesario por los datos de pH.

**Tabla 13:***Control analítico de la fermentación - MB 2016*

	<b>Ac. Total</b>	<b>Ac. Volátil</b>	<b>pH</b>	<b>Azúcar</b>	<b>Alcohol</b>
<b>22/04/16</b>	6,45	0,192	3,53	220	0
<b>28/04/16</b>		0,258		60	8,3
<b>02/05/16</b>		0,300		1,8	13

La fermentación alcohólica se completa en 10 días sin inconvenientes en ambos tanques. Se deja 7 días más en maceración post-fermentativa, para así aumentar la extracción de taninos, pero seguido de cerca por degustaciones diarias, lo que se busca es mayor aroma pero se debe tener cuidado con los sabores no deseados.

El día 09/05/16 se realiza el desvine y prensado, ambos tanques se descubran a uno solo, junto con sus prensas. Obteniendo 19400 lt.

**Tabla 14:***Control analítico post-prensado - MB 2016*

	<b>Ac. Total</b>	<b>Ac. Volat</b>	<b>pH</b>	<b>Azúcar</b>	<b>Alcohol</b>	<b>obs.</b>
<b>09/05/16</b>	7,69	0,258	3,67	1,8	12,7	tanque descubado

Se continúa con la fermentación maloláctica, en este caso se desarrolla en tanque, debido a su volumen y la gran demanda de barricas que implica.

**Tabla 15:***Control analítico de la fermentación maloláctica - MB 2016*

	<b>Ac. Total</b>	<b>Ac. Volátil</b>	<b>pH</b>	<b>Azúcar</b>	<b>Alcohol</b>	<b>SO<sub>2</sub> Libre</b>	<b>Seguimiento</b>
<b>19/05/16</b>	7,57	0,300	3,66	1,8	12,7	0	Cromatografía +
<b>23/05/16</b>	5,88	0,312	3,77	1,8	12,7	0	Cromatografía +
<b>07/06/16</b>	5,81	0,450	3,79	1,8	12,8	35	Enzimático 0,09

Una vez finalizada, se realiza un trasiego y desborre con la adición de 1 kg de anhídrido gas y 12 kg de ácido tartárico en el tanque destino de 19000 lt, con su previa limpieza y desinfección. El objetivo es que este tanque quede lleno, para evitar oxigenación del vino y posibles desarrollos de microorganismos no deseados.

Durante 3 meses permanece en tanque, recién en el mes de septiembre se dispone de las 84 barricas para su bajada, se utilizaron barricas nuevas y usadas. Se continua con el control mensual, hasta este momento no se han producido desviaciones del vino.

Ahora se detalla una tabla con los datos analíticos del vino en su etapa de añejamiento, para así poder identificar el momento de la aparición de Brett y su posterior tratamiento con quitosano. También se encuentran los exámenes microbiológicos que se realizan acorde a los requerimientos del momento en el proceso que se encuentre.

Tabla 16:

Seguimiento analítico y microbiológico durante el añejamiento - MB 2016

	Ac. Total	Ac. Volátil	pH	Az	Alcohol	SO <sub>2</sub> Libre	Obs.	Brettanomyces	Etil-fenol	Etil-guayacol
20/07/16	5,43	0,432	3,74	1,8	12,8	36/38				
01/08/16	5,70	0,386	3,73			34/38				
01/09/16	5,55	0,350	3,67			38				
01/09/16	Bajada a barricas									
11/10/16	5,55	0,380	3,67		12,8	39				
06/12/16	5,73	0,516	3,71			34				
16/01/17	5,58	0,504	3,71			40				
13/03/17	5,77	0,576	3,64			29/41	1° Degustación			
27/03/17								> 3000 UFC		
27/03/17							Adición de QUITOSANO			
21/04/17	5,74	0,528	3,69			38/43				
09/05/17	5,81	0,660	3,62		13	41				
24/05/17	Trasiego a tanque									
24/05/17	5,77	0,486	3,62		13	40				
01/06/17									521 µg/L	32 µg/L
12/06/17								< 1 UFC		
23/06/17	5,88	0,528	3,68			40				

El 13/03/17 por medio de una degustación de rutina se detecta la presencia de aromas extraños vinculados a Brettanomyces, pero con la experiencia preexistente, se toma la decisión de enviar muestra a recuento de Brett y en forma conjunta realizar una corrección de anhídrido de 30 ml MBSK 25% por barrica, para comenzar con la protección del vino.

A los 10 días se reciben los resultados, dando 3000 UFC y claramente se confirma la presencia de Brettanomyces. Ese mismo día se procede al agregado de quitosano, en una dosis de 10 gr por barrica, lo que equivale a la dosis curativa recomendada de 4 gr/Hl.

### **3.4.1 Procedimientos y Resultados**

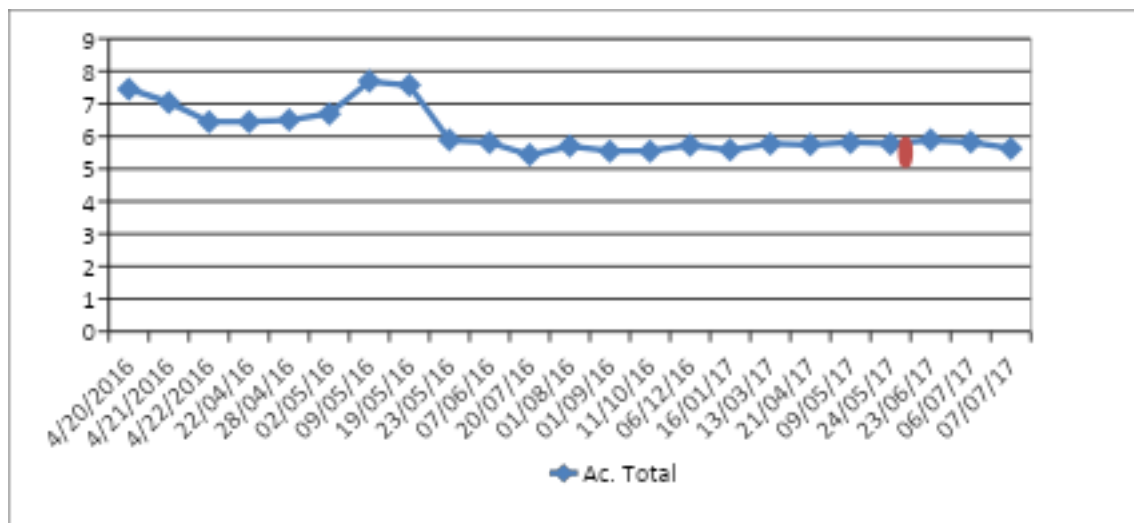
Se pesan los 10 gr en una balanza de alta precisión en un vaso de precipitado previamente desinfectado con alcohol al 70% y se refuerza el anhídrido con una dosis de 10 ml MBSK 25% por barrica.

Se extrae una porción de vino de la barrica y se disuelve el quitosano, posteriormente se realiza la adición y se finaliza con un batonage para homogenizar. Dicho proceso se realiza por los siguientes 10 días, ya que es fundamental mantener el producto en suspensión para que pueda captar a la levadura. Pasado este tiempo se procede a realizar un trasiego a tanque, dejando en barricas las borras, que es donde queda el quitosano junto con las Brettanomyces.

Nuevamente se manda muestra al laboratorio externo, para poder verificar si resultó el tratamiento y para saber la carga de aromas fenólicos que han quedado en el vino. A los días se constata que la presencia de Brettanomyces ha desaparecido, pero los compuestos fenoles están presentes en alta cantidad, principalmente etil-fenol.

**Figura 17:**

*Gráfica de seguimiento de Acidez Total - MB 2016*



**Figura 18:**

*Gráfica seguimiento de pH - MB 2016*

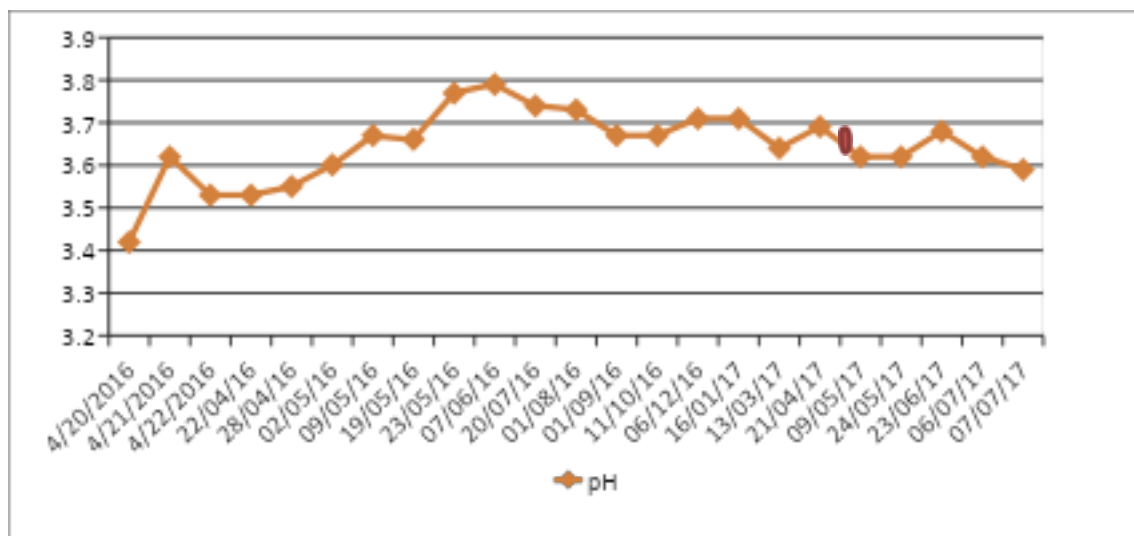


Figura 19:

Gráfica de seguimiento de Acidez Volátil - MB 2016

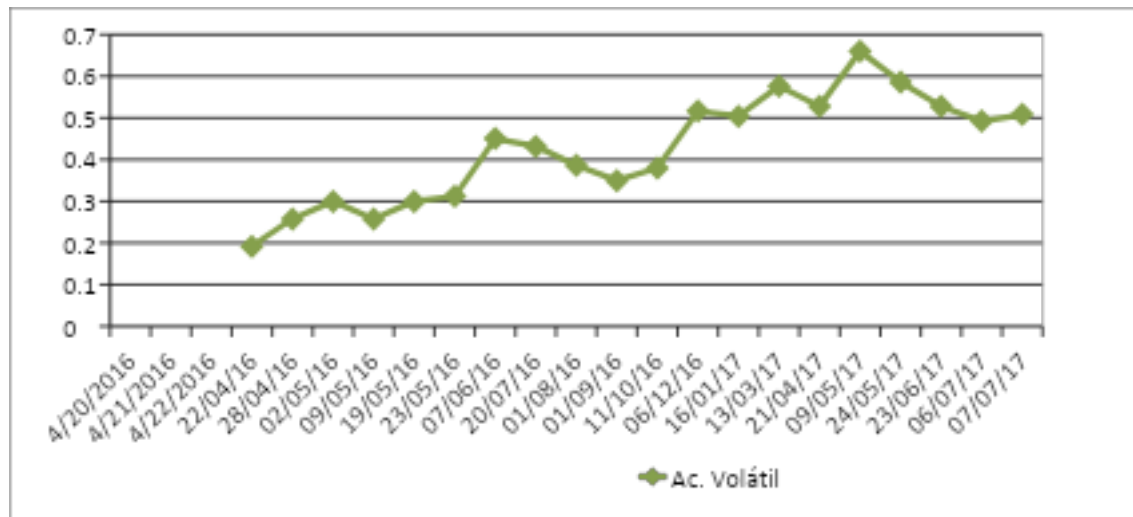
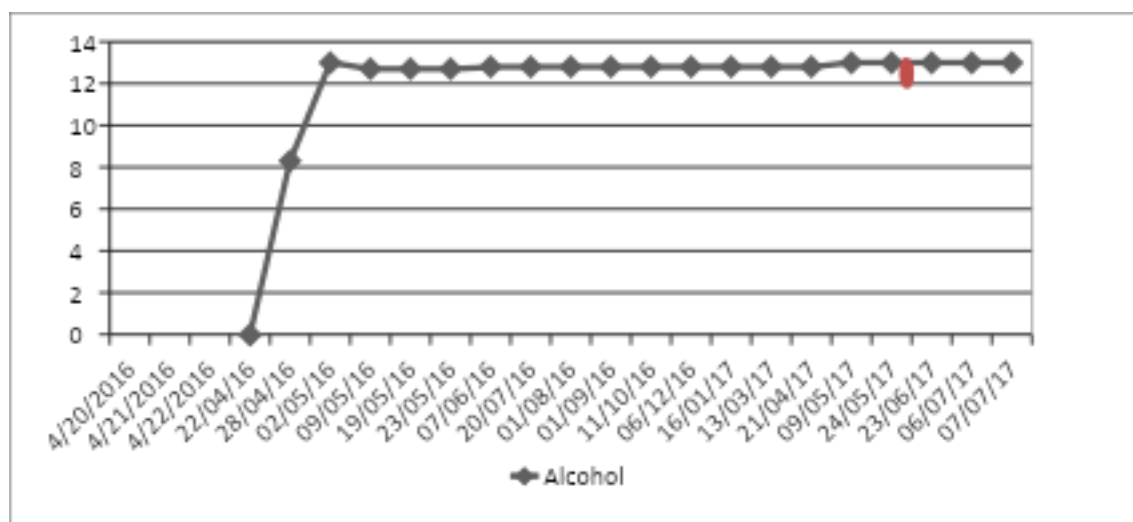


Figura 20:

Gráfica de seguimiento de Alcohol - MB 2016



Lo que podemos observar es una acidez total muy estable, con pequeñas variabilidad de pH debido a las correcciones realizadas. Con respecto a la acidez volátil, hubo un pico cuando se realizó el trasiego a tanque, posiblemente debido a una aireación, la cual lentamente se va corrigiendo al pasar el tiempo.

Con respecto al alcohol, no sufre ninguna alteración con el agregado del quitosano. Y en sentido contrario, la presencia de etanol en el medio, no modifica

significativamente la acción frente a células Brett, ya que el etanol no tiene capacidad de modificar la estructura de carga eléctrica del quitosano.

### **3.5 Procedimiento de Vinos para Rellenos**

Con el vino previamente estudiado, malbec 2016, se detecta por medio de trazabilidad que ha sido utilizado para los rellenos en barricas en meses previos a conocer su contaminación con Brett, por lo que el riesgo de contaminación cruzada es muy alto.

Se comienza con seguimiento por degustación de todos los lotes de barricas de la bodega, y en caso de algo sospechoso, se procede al agregado de quitosano en dosis curativa, pudiendo comprobar la eficiencia del producto ya que se obtienen excelentes resultados.

Teniendo en cuenta esta situación se elabora un protocolo para vinos destinados a relleno;

- a) El vino se pasa por filtración tangencial.
- b) Corregir anhídrido sulfuroso a 45-50 ppm.
- c) Corregir a pH 3.5, con ácido tartárico.
- d) Adicionar 4gr/Hl de quitosano.
- e) Realizar un recuento microbiológico de Brettanomyces.

Hasta no haber cumplido todo este proceso no se autoriza el uso del vino para rellenar.

El relleno es un punto importante para esta bodega que elabora vinos de alta gama, ya que todos sus productos tienen un mínimo de 12 meses de estadía en barricas, por lo que se deben tomar medidas de todos los puntos posibles, para evitar comprometer las características y cualidades de los mismos.

Como se observa en la tabla 17, a nivel analítico luego de la filtración tangencial se produce una caída del pH característica de este tipo de filtración, pero la principal característica la encontramos a nivel degustativo, los vinos tienden a ser más diluidos, perdiendo características que se habían obtenido en barrica, por lo que no es un trabajo que podamos utilizar en la totalidad de los vino.

Si bien la filtración tangencial no es un proceso que se utilice habitualmente, dado que es un vino para relleno las cantidades utilizadas son pequeñas por lo que no alteran la calidad en el volumen.

**Tabla 17:**

*Control analítico post-filtración tangencial - MB 2016*

	Ac. Total	Ac. Volátil	pH	Alcohol	SO <sub>2</sub> Libre	Obs.
<b>06/07/17</b>	5,82	0,492	3,62	13	41	Pre Filt. Tangen.
<b>07/07/17</b>	5,63	0,508	3,59	13	38	Post Filt. Tangen.

### **3.6 Quitosano y POES**

Las vasijas, tanques, tuberías, la bodega completa, deben ser higienizadas para impedir la formación de colonias de Brett, que luego se encuentren alerta y dispuestas para contaminar el vino. Para lo cual se implementas los procesos de POES (Procedimientos Operativos Estandarizados de Sanitización) para cada área y trabajo que se realiza.

Con lo visto anteriormente, se nota que la limpieza en bodega es un punto fundamental, no solo para evitar la proliferación de microorganismos no deseados sino también para complementar el uso de quitosano.

Si bien la bodega cuenta con implementación de POES, es importante revisar estos procesos y definir con exactitud las dosis de producto a agregar en cada

etapa, y crear planillas de registros para poder controlar el cumplimiento de dichos procesos sin excepción.<sup>18</sup>

Con respecto a las POES de barricas donde no se utilizan productos químicos, aquí lo que se evalúa son los tiempos de las diferentes etapas. Como mejora se implementaron 2 etapas más en el proceso.

- La primera fue que las barricas luego de su lavado y completo secado se las debe sulfitar, que consiste en encender una pastilla de azufre en su interior, esta medida se toma de forma rutinaria, anteriormente solo se hacía si las barricas no se llenaban con vino de forma inmediata, lo que exige 24 hs de secado de la barrica antes de su llenado nuevamente,
- La segunda modificación es implementar la limpieza de los bitoques con alcohol al 70%, no solo cuando se realiza el proceso de POES, sino cada vez que se realiza un trabajo en las barricas que implique destaparlas, principalmente al realizar los rellenos y correcciones.

## CONCLUSIÓN

---

<sup>18</sup> Explicación de POES de lavado de tanques en Anexo 2

En conclusión, este estudio permitió verificar que el uso de quitosano de origen fúngico, cuyo producto cuenta con todas las aprobaciones legales necesarias para su uso, cumple para la eliminación de trazas de *Brettanomyces* en vinos de alta gama.

Dado que no se quería perder ninguna característica organoléptica ni de calidad, fue beneficioso poder estandarizar que es un producto adecuado para esta exigente gama de vinos, ya que eliminó la levadura y no se vió afectado ningún parámetro del vino.

Este estudio también sirve para tomar nuevas medidas en el trabajo futuro, para perfeccionar el control de *brettanomyces* en bodega y así poder erradicar su presencia o al menos poder actuar de forma rápida y eficiente ante la aparición de un incipiente foco.

Con respecto al manejo de barricas, las mejoras que se decidieron son, que al vaciar las barricas de lotes con Brett, se las debe marcar para poder identificarlas fácilmente, ya que por su estructura porosa podrían quedar incrustadas en la madera las levaduras y así afectar futuros vinos. Además en el proceso de lavado de barrica ya explicado se adiciona un paso más; quemar en su interior una pastilla de azufre hasta su consumo total, luego se retira la pastilla quemada y se coloca el tapón de silicona. También se establece, que se debe realizar una limpieza de los tapones de silicona mensualmente, pasándolos por agua y cepillando de ser necesario, luego colocar alcohol al 70%, dejar secar y colocar nuevamente en tapón en la barrica.

La medida tomada con respecto a la cava de barricas, es que se debe realizar una limpieza con hidrolavadora 2 veces por año, principalmente lavar y desinfectar

paredes y pisos, los momentos oportunos son después de haber finalizado la vendimia y otra previo al fraccionamiento.

Para los controles microbiológicos, se debe armar un esquema de muestreo para mandar a hacer análisis, se define de forma rutinaria cada 3 meses a partir que el vino ingresa a barricas. Se puede comenzar con muestras compuestas con cortes realizados en laboratorio, en el caso de un resultado positivo de Brett, se procede a abrir la muestra y mandar cada lote por separado. Una vez que se identifica el lote problema, ponerlo en aislamiento y realizar el tratamiento con quitosano.

Para prevenir la aparición de brett, podemos decir que el uso de quitosano en una dosis de 2 gr/Hl, anhídridos libre entre 35-38 y con la aplicación correcta de POES (Procedimientos Operativos Estandarizados de Sanitización) y BPM (Buenas Prácticas de Manufactura) es una excelente combinación como medida preventiva para Brettanomyces.

Y en el caso que ya este presente la Brettanomyces, una dosis de 4gr/Hl de quitosano, homogenizado durante 10 días y posterior trasiego, permite la eliminación de Brettanomyces del vino.

Para finalizar puedo confirmar por mi experiencia que su eficiencia es indiscutible, pero también es verdad que su costo no es algo para pasar por alto. En este caso, al tratarse de vinos de alta gama se puede absorber la inversión, pero en posteriores trabajos se podría evaluar si es un producto apto para otra gama de vinos, ya que su costos se verían muy afectados.

### **Anexo N°1: Proceso de Elaboración**

El suelo es poco vigoroso, franco arcilloso sobre lecho rocoso, con una producción de 6000 a 8000 kg por hectárea.

La uva se obtiene solo de cultivos propios, el sistema de conducción de los viñedos es por espaldero y el riego se realiza por goteo, contando además con telas antigranizo en el 80% del viñedo. En cuanto al manejo de la canopia se realiza un intenso raleo de hojas y racimos.

El comienzo de la cosecha depende de los valores obtenidos en cuanto al índice de madurez que varía según la variedad de la uva de la cual se trate. La técnica de la toma de muestra en viñedo está disponible en Anexo 2.

En un viñedo que no fue correctamente vigilado y atendido, las uvas pueden ingresar a la bodega con déficit de pH, carencia de acidez o falta de nutrientes para las levaduras buenas, lo que tal vez induzca a fermentaciones defectuosas o imposibilidad de utilizar los regímenes indicados de sulfuroso, favoreciendo la multiplicación de Brett.

La cosecha se realiza de forma manual con tijeras y cajas plásticas de cosecha, el acarreo a la bodega es en un carro traccionado por un tractor ya que los viñedos utilizados son los propios de la empresa. En este punto la uva ya pasó por dos selecciones, una en la planta y la segunda al cargar el carro.

Además en el trayecto, pasa por la báscula donde se toma su peso y el correspondiente CIU (certificado de ingreso de uva), además se completa una ficha de calidad sobre la sanidad de la uva.

La uva es descargada a la sombra en pallets, donde permanece poco tiempo hasta entrar en proceso. En algunos casos se adiciona hielo seco para evitar posibles inicios de fermentación, además es importante considerar los tiempos de carencia de las aplicaciones fitosanitarias, con el objetivo de preservar la inocuidad del alimento.

Para iniciar el proceso de vendimia, las cajas se toman de los pallet y de manera manual se colocan en una cinta vibratoria donde se realiza la primera selección en bodega, contando con 4 personas que apartan piedras, hojas y racimos no deseados, de ahí pasa a una cinta de cangilones que elevan la uva hasta la despalladora, donde el objetivo es separar los granos del escobajo, de aquí caen los granos de uva en otra cinta transportadora donde se realiza la segunda selección, cuarta selección si se cuentan las dos realizadas en viñedo, contando nuevamente con 4 personas para esta tarea.

La molidora que son dos rodillos que giran en sentido opuesto para apretar la uva sin romperla y así lograr que empiece a desprender jugo; se encuentra debajo de la segunda cinta, por donde pasa la uva por gravedad, a la salida los granos de uva caen en un cubón, donde se realizan las primeras adiciones de metabisulfito de potasio, para evitar arranques de fermentación indeseadas y oxidaciones, además la primera corrección de ácido tartárico en medio acuoso. Estos cubones se suben con un autoelevador a la planta alta de la bodega y al tener ruedas se pueden empujar hasta la boca del tanque, donde se abre el clapé inferior del cubón y se llenan los tanques, de esta manera sucesivamente se logra el encube de los tanques hasta una medida no superior al 75% de su capacidad, para evitar derrames por la fermentación y además para poder realizar las prácticas enológicas de manera eficiente.

Cabe destacar que durante todo el proceso no se utilizan bombas, el diseño de vanguardia de la bodega utiliza un sistema de gravedad que permite tratar con extrema delicadeza las uvas y mostos, también se utilizan tanques pequeños y anchos que aseguran maximizar el contacto entre el jugo y los hollejos optimizando la extracción de aromas y taninos.

Con el mosto en tanque, los primeros 3 días se realiza una maceración en frío, que puede llegar a ser en algunos casos de hasta 7 días donde solo se hace un remontaje abierto al día; pasado este tiempo, se considera que el tanque está completamente homogéneo por lo que se procede a los agregados para dar inicio a la fermentación alcohólica.

La correcta preparación de las levaduras es un punto importante, se procede a colocar 75 litros de agua a 38° C, se espolvorea la levadura y se hace una agitación suave, pasado unos 20 minutos se activan. Como la diferencia de temperatura entre el mosto a inocular y el medio de rehidratación no debe ser mayor a 10° C, se agrega lentamente mosto con intervalos de 10 min, hasta llegar a 30° C. Junto con las levaduras se incorporan los nutrientes y ácido tartárico por la parte superior del tanque, luego se debe realizar un remontaje abierto, no más de 10 minutos, para distribuir de forma correcta las levaduras.

Durante la fermentación, se realizan diariamente dos mediciones de temperatura y Baumé, como así también se extraen muestras de 200 ml para la degustación diaria, y de esta manera poder detectar posibles desviaciones, aparición de aromas reducidos y determinar si es necesario el agregado de algún producto enológico.

Si bien es raro que las *brettanomyces* se desarrollen durante la fermentación, ya que la competencia con la fermentación de la levadura *saccharomyces* es

demasiado alta, en cuanto éstas últimas tienen una debilidad o comienzan a iniciar su fase de declive, las Brett se benefician de los residuos de azúcares e inician su crecimiento. En resumen, todo lo que desfavorece a las levaduras de la fermentación favorece a los contaminantes, por lo que es conveniente considerar la cinética de fermentación, ralentizaciones, paradas, nitrógeno natural o añadido.

Una vez finalizada la fermentación alcohólica se deja 4 días más de maceración post-fermentativa, donde se hacen muy pocos movimientos para poder extraer aromas y color de la parte sólida.

Se continúa con el desvine, para lo cual se coloca frente a la pileta una bandeja cribada sobre una tarza, y un codo con una manguera conectado al clapé superior del tanque, todo de acero inoxidable. Se comienza a sacar el vino, y al pasar por la bandeja queda retenido en esta los sólidos. En la parte inferior de la tarza se dispone una bomba a rotor y mangueras que llevan este vino a un nuevo tanque limpio y desinfectado.

Terminado esto, una persona ingresa al tanque con todas las medidas de seguridad y patea el sólido a bins para ser enviado al prensado. La prensa es vertical, cuyo beneficio es que trabaja a menor presión y así podemos obtener vinos de mejor calidad y con pocos fangos. Además el peligro de oxidación es mínimo, ya que el mosto es recogido por canales de drenaje y conducido por un colector sin estar en contacto con el oxígeno; también son fácilmente automatizables, se pueden memorizar diferentes programas de prensado.

A continuación se desarrolla la fermentación maloláctica, como no se siembran bacterias lácticas, se coloca el vino a una temperatura controlada de 23°C para que arranque de manera espontánea, de esta manera se obtienen vinos elegantes, equilibrados y de gran complejidad. El seguimiento de esta etapa se realiza con

cromatografías semanales y luego kits enzimáticos hasta que finalice, una vez que llegue a menos de 0.2 gr/L de ácido málico se trasiega y se adiciona anhídrido sulfuroso como protector.

A partir de este momento, se inicia con la crianza en barricas donde el vino cumple un plazo de 12 a 14 meses, con sus respectivos trabajos de trasiegos, desborre, correcciones y rellenos mensualmente.

La sala de barricas cuenta con tecnología para poder mantener condiciones óptimas para los vinos, por un lado equipos de frío para mantener una temperatura de 16° a 18°C y equipos humificadores con los que se alcanza una humedad entre 60% a 70%, con esto garantizamos una buena polimerización y concentración del vino.

De ahora en más se continúa con 2 tipos de controles, por un lado el seguimientos analíticos mensuales de rutina y por otro el control microbiológico, haciendo degustaciones cuando el enólogo lo considere necesario, hasta llegar al momento de realizar los cortes finales y proceder al fraccionamiento del vino.

## Anexo N°2: Técnicas y Métodos

### Método de Toma de Muestras en Viñedo

#### *Técnica N°1:*

Diariamente durante semanas previas a cosecha lo que equivale a semanalmente por block.

#### 1- Descripción de Actividades

De cada block en producción anual se seleccionan 6 hileras a muestrear, las cuales deben ser marcadas con cinta a fin de efectuar todos los muestreos futuros sobre las mismas hileras.

2- El modo de selección de las hileras es el siguiente:

- La cuarta y quinta hileras del inicio del block,
- Las dos hileras centrales del block,
- La quinta y cuarta hileras anteriores al final del block.

3- El modo de muestreo de las bayas es el siguiente:

- Al ingresar por cada hilera se cuentan tres pasos y se comienzan a muestrear racimos al azar de izquierda a derecha,
- Por racimo se extraen cuatro bayas: 1 baya del hombro, 2 bayas del centro (cara oculta y cara expuesta) y 1 baya de la punta,
- Debe evitarse dañar el grano, en lo posible extraerlo con el pequeño pedicelo.

Los muestreos deben realizarse por la mañana indefectiblemente y en blocks que no hayan sido regados el día anterior. En caso de lluvias no efectuar muestreos.

La cantidad de muestra debe ser aproximadamente 350 bayas o 250 gramos. Estos deben colectarse en bolsas de plástico, correctamente identificadas y transportarse en contenedores térmicos.

A cada muestra se le realizarán dos tipos de controles: de madurez fenólica, antocianos y polifenoles y de madurez fisiológica, Bx, pH y acidez total.

## **POES en Tanques y Barricas**

### ***Técnica N°2: Proceso de lavado de tanques de acero inoxidable***

- Periodicidad: Cada vez que se desocupen y antes de su uso.
- Procedimiento: Se aplica la Técnica de Limpieza Manual - Mecanizada.

Se utiliza una máquina lavadora tipo CLAUD que trabaja con alto caudal y alta presión. Este equipo se conecta a una bomba rotor y una tina donde se colocarán los productos no espumígenos a utilizar, cuando haya recirculación.

Este tipo de limpieza combina un proceso mecanizado con uno manual, ya que hay partes como por ejemplo el borde de tapas y puertas, interior de clapet, válvulas, sacamuestras donde los productos sanitizantes no llegan a penetrar lo suficiente por más que se dosifiquen a alta presión.

- a) Preenjuague con Agua:** Con agua se arrastra la suciedad grosera. No hay recirculación.
- b) Limpieza:** Preparar una solución de producto alcalino según planilla de dosis. Aplicarlo sobre las zonas que lo requieran por recirculación.
- c) Enjuague:** Enjuagar con agua para eliminar los restos de producto y suciedad desprendida.
- d) Neutralización:** Preparar una solución de ácido cítrico según *PG-LIM-BOD-01/ANEXO-3*. Aplicarlo por recirculación.
- e) Enjuague:** Enjuagar con agua para eliminar los restos de ácido cítrico No hay recirculación.
- f) Desinfección:** Preparar una solución de peracético según plainilla de dosis. Aplicar por recirculación.

**g) Enjuague:** Enjuagar con agua para eliminar los excesos de Peracético No hay recirculación.

Nota: La desinfección se realizará además antes de su utilización.

### ***Técnica N°3: Proceso de lavado de las barricas***

Terminada la utilización de la barrica se le coloca hacia abajo para su escurrido total.

Se coloca la misma en el lava-barricas que se compone de un banco de soporte y una flecha con dos picos difusores por donde ingresa agua a presión impulsada por la hidrolavadora. El agua utilizada es agua blanda. Se enjuaga primero durante 4-5 minutos con agua caliente 40°C y 60°C, luego con agua fría durante 10 seg y finaliza con 3 - 5 min con agua ozonizada salida del ozonizador, terminada esta operación se deja escurrir la barrica con el orificio de llenado hacia abajo un mínimo de 12 horas.

Pasado este plazo se llenan las barricas nuevamente, se les coloca el tapón de silicona, y nuevamente se llevan a la cava.

### **Métodos de Seguimiento de Fermentación Maloláctica**

#### ***Determinación de ácido málico por Cromatografía:***

El Ácido Málico a lo largo del proceso de elaboración de un vino va sufriendo *transformaciones* y hacia el final disminuye dándole paso a ácidos menos agresivos como el ácido láctico. Esta técnica es una estimación semicuantitativa de la cantidad de ácido málico presente en la muestra, ya que será válida para valores superiores a 0.3 g/l de málico. El método se basa en la separación cromatográfica de ambos ácidos del vino al enfrentarse a un solvente determinado.

***Determinación de ácido málico por Método Enzimático:***

Esta determinación será empleada en todos aquellos vinos que ya no acusen presencia de málico por cromatografía (es decir tengan menos de 0.25 g/l) y este dato, cuantitativo, servirá para tomar la decisión en qué momento corregir con anhídrido sulfuroso al vino.

**Métodos de Seguimiento de Control Microbiológico**

En este caso se terciarizan estos análisis, con laboratorios externos muy serios y que cuentan con todas las normas de calidad necesarias para confiar en sus resultados.

***Determinación de 4-etilfenol y 4-etilguyacol***

El método utilizado es cromatografía de gases con detector de masa, y para obtener los resultados debemos esperar 48 hs.

Toma de muestra: se envía en una botella de vidrio color caramelo de 100 ml de primer uso, aislada con papel metálico en el interior de la tapa.

***Deterrminación de recuento de bretanomyces***

Se realiza el recuento de diferentes grupos microbianos en los medios de cultivo adecuado, utilizando filtración por membrana. Se confirma con la evaluación morfológica celular por microscopio y producción de aromas característicos.

Toma de muestra: se envía en una botella de vidrio 750 ml de primer uso, la cual está previamente desinfectada con alcohol al 70%, al igual que cualquier elemento que se utilice, incluido el sacamuestras.

## BLOGRAFIA

Gutierrez Luis, 2004, Chatonnet, brett y TCA: el bueno, el feo y el malo,

*EL MUNDOVINO.COM*

([http://elmundovino.elmundo.es/elmundovino/noticia.html?vi\\_seccion=4&vs\\_fecha=200407&vs\\_noticia=1089745716](http://elmundovino.elmundo.es/elmundovino/noticia.html?vi_seccion=4&vs_fecha=200407&vs_noticia=1089745716))

Palacios Antonio,2020, Brettanomyces:fisiología, enología, prevención y soluciones,

*ACENOLOGÍA.COM*

([https://www.acenologia.com/dossier176\\_0620/#:~:text=Brettanomyces%20es%20una%20levadura%20descubierta,uva%2C%20y%20finalmente%20en](https://www.acenologia.com/dossier176_0620/#:~:text=Brettanomyces%20es%20una%20levadura%20descubierta,uva%2C%20y%20finalmente%20en))

Portugal Cauré Barbosa,2014, Detección Caracterización de Brett en el contexto enológico, UNIVERSIDAD DE LA RIOJA. TESIS DOCTORAL

([file:///C:/Users/nerib/Downloads/Dialnet-DeteccionYCaracterizacionDeBrettanomycesBruxellens-40441%20\(2\).pdf](file:///C:/Users/nerib/Downloads/Dialnet-DeteccionYCaracterizacionDeBrettanomycesBruxellens-40441%20(2).pdf))

García Paula Andres,2016, estudio prospectivo de una lengua electrónica para la detección de fenoles y guayacoles en vino, MASTER UNIVERSITARIO EN ENOLOGÍA

(<https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/73333/ANDR%C3%89S%20%20Estudio%20prospectivo%20de%20una%20lengua%20electr%C3%B3nica%20para%20la%20detecci%C3%B3n%20de%20Fenoles%20y%20Guayacoles%200....pdf?sequence=1>)

Lopez Cordón Eva Navascués,2007,brettanomyces/Dekkera: control y detección en bodega, *ACENOLOGÍA.COM* ([http://www.acenologia.com/ciencia78\\_2](http://www.acenologia.com/ciencia78_2))

Resolución OIV-OENO462-2014,*ORGANIZACIÓN INTERNACIONAL DE LA VIÑA Y EL VINO*

Resolución OIV-OENO368-2009, *ORGANIZACIÓN INTERNACIONAL DE LA VIÑA Y EL VINO*

Resolución N°51/2011 INV, 2011. INSTITUTO NACIONAL DE VITIVINICULTURA SEFILRA SA, Calidad de los vinos con crianza. Eliminación de la Brett Bruxellensis, (<https://www.sefiltra.com/calidad-de-los-vinos-con-crianza-eliminacion-de-la-brett-bruxellensis/>)

Generalidades de quitina y quitosano, Universidad de Sonora, XHUS-TDT. (<http://tesis.uson.mx/digital/tesis/docs/19407/capitulo2.pdf>)

Santiago de Cali, Trabajo de grado, Universidad del Valle, (Ordoñez, 2011)

Heras José María, 2020, Quitosano de origen fúngico: una herramienta natural de lucha contra Brettanomyces en el vino, ACENOLOGIA.COM ([https://www.acenologia.com/brett\\_quitosano\\_origen\\_fungico\\_cienc174\\_0220/](https://www.acenologia.com/brett_quitosano_origen_fungico_cienc174_0220/)).

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1: <i>Microfotografía de cultivo de Brettanomyces</i> _____	8
Figura 2: <i>Síntesis de etilfenoles por Brettanomyces - Dekkera</i> _____	9
Figura 3: <i>Juntas, puertas y tapas luego de una imcompleta limpieza</i> _____	12
Figura 4: <i>Dinámica de las poblaciones de levaduras fermentativas, bacterias lácticas y Brettanomyces desde la llegada de la uva hasta el vino elaborado</i> _____	13
Figura 5: <i>Desarrollo de Brettanomyces y génesis de 4-etilfenol y 4-etilguaicol. Inóculo inicial: 10<sup>5</sup> células/ml</i> _____	17
Figura 6: <i>Estructura química de quitina y quitosano</i> _____	29
Figura 7: <i>Imagen digital de Aspergillus Niger y en su forma esporulada</i> _____	31
Figura 8: <i>Esquema de pared fúngica</i> _____	32
Figura 9: <i>Mecanismo de reacción de la desacetilación de la quitina para obtener quitosano</i> _____	36
Figura 10: <i>Observación de Brettanomyces tratadas con quitosano</i> _____	43
Figura 11: <i>Presentación comercial del quitosano</i> _____	55
Figura 12: <i>Modo de adición del quitosano</i> _____	56
Figura 13: <i>Gráfico de seguimiento de Acidez Total - MB 2014</i> _____	57
Figura 14: <i>Gráfica de seguimiento del pH – MB 2014</i> _____	58
Figura 15: <i>Gráfica de seguimiento de Acidez Volatil - MB 2014</i> _____	58
Figura 16: <i>Gráfica de seguimiento de Alcohol - MB 2014</i> _____	59
Figura 17: <i>Gráfica de seguimiento de Acidez Total - MB 2016</i> _____	66
Figura 18: <i>Gráfica seguimiento de pH - MB 2016</i> _____	66

Figura 19: *Gráfica de seguimiento de Acidez Volátil - MB 2016*\_\_\_\_\_67

Figura 20: *Gráfica de seguimiento de Alcohol - MB 2016*\_\_\_\_\_67

## INDICE DE TABLAS

Tabla 1: <i>Especies actualmente reconocidas dentro del género</i> <i>Brettanomyces-Dekkera</i> _____	7
Tabla 2: <i>Umbral de percepción, prescriptor aromático, principal origen</i> <i>de compuestos fenólicos</i> _____	10
Tabla 3: <i>Contenido de quitina en diferentes organismos</i> _____	30
Tabla 4: <i>Composición química de la pared celular de Aspergillus Niger</i> _____	32
Tabla 5: <i>Aplicaciones del quitosano</i> _____	40
Tabla 6: <i>Aplicaciones del quitosano en la industria alimenticia</i> _____	41
Tabla 7: <i>Control analítico durante la maceración en frío - MB 2014</i> _____	49
Tabla 8: <i>Control analítico durante la fermentación alcohólica - MB 2014</i> _____	50
Tabla 9: <i>Control analítico post-prensado - MB 2014</i> _____	50
Tabla 10: <i>Control analítico durante la fermentación maloláctica - MB 2014</i> _____	51
Tabla 11: <i>Seguimiento analítico y microbiológico durante el añejamiento - MB 2014</i> _____	53
Tabla 12: <i>Control analítico durante la maceración en frío - MB 2016</i> _____	61
Tabla 13: <i>Control analítico de la fermentación - MB 2016</i> _____	62
Tabla 14: <i>Control analítico post-prensado - MB 2016</i> _____	62
Tabla 15: <i>Control analítico de la fermentación maloláctica - MB 2016</i> _____	62
Tabla 16: <i>Seguimiento analítico y microbiológico durante el añejamiento</i> <i>- MB 2016</i> _____	64
Tabla 17: <i>Control analítico post-filtración tangencial - MB 2016</i> _____	69

## INDICE GENERAL

RESUMEN _____	3
ABSTRACT _____	4
INTRODUCCIÓN _____	5
<b><i>CAPÍTULO I : BRETTANOMYCES</i></b>	<b>6</b>
1.1 Origen del Término Brettanomyces	6
1.2 Especies del Género Brettanomyces/Dekkera	7
1.3 Morfología de Brettanomyces	8
1.4 Compuestos Fenólicos Producidos por las Brettanomyces	8
1.5 Procedencia de las Poblaciones de Brettanomyces	11
1.5.1 <i>Uva</i>	11
1.5.2 <i>Bodega</i>	12
1.6 Condiciones de Desarrollo de Brettanomyces en Bodega	13
1.6.1 <i>Nutrientes</i>	13
1.6.2 <i>Tiempo</i>	14
1.6.3 <i>Temperatura</i>	15
1.6.4 <i>Presencia/Ausencia de Oxígeno</i>	15
1.7 Alteraciones en vinos de alta gama	15
1.7.1 <i>Influencia de las Nuevas Prácticas en Vinos de Alta Calidad</i>	16
1.8 Detección de Brettanomyces en Vinos	17
1.8.1 <i>Análisis de 4-etilfenol/guayacol Mediante Cromatografía Gaseosa</i>	17
1.8.2 <i>Detección del Microorganismo</i>	18
1.9 Control Preventivo de Brettanomyces	19
1.9.1 <i>Materia Prima</i>	19
1.9.2 <i>Bodega</i>	20
1.9.3 <i>Operaciones y Tratamientos Prefermentativos</i>	20
1.10 Tratamiento de Vinos Contaminados	25
1.10.1 <i>Flash Pasteurización</i>	26
1.10.2 <i>Filtración Amicróbica de Superficie</i>	26
1.10.4 <i>Velcorin</i>	27
1.10.5 <i>Qitosano</i>	27

<b>CAPÍTULO II: QUITOSANO</b>	<b>28</b>
2.1 Estructura Química	28
2.2 Fuente de Quitina y Quitosano	29
2.2.1 <i>Aspergillus Niger</i>	31
2.3 Método de Obtención de Quitina	33
2.3.1 <i>Método Químico</i>	34
2.3.2 <i>Método Biológico</i>	35
2.4 Método de Obtención de Quitosano	35
2.4.1 <i>Método Químico:</i>	36
2.4.2 <i>Método Biológico</i>	37
2.5 Propiedades Físicoquímicas del Quitosano:	37
2.5.1 <i>Peso Molecular</i>	38
2.5.2 <i>Grado de Desacetilación</i>	38
2.5.3 <i>Viscosidad</i>	38
2.5.4 <i>Solubilidad</i>	39
2.6 Aplicaciones del Quitosano	39
2.7 Modo de Acción del Quitosano sobre <i>Brettanomyces</i>	42
2.7.1 <i>Un Efecto Biológico</i>	42
2.7.2 <i>Un Efecto Físico</i>	42
2.8 Legales de Quitosano	43
2.8.1 <i>Resolución N°51/2011 de INV</i>	43
2.8.2 <i>Resolución OIV/OENO 368-2009</i>	45
<b>CAPÍTULO III: RESULTADOS Y DISCUSIONES</b>	<b>46</b>
3.1 <i>Brettanomyces</i> y Quitosano en la enología	46
3.2 Bodega	47
3.2.1 <i>Diagrama de Flujo del Proceso de Elaboración</i>	47
	48
3.3 Proceso de Elaboración de Vino Malbec 2014	49
3.3.1 <i>Procedimiento y Resultados</i>	55
3.4 Proceso de Elaboración de Vino Malbec 2016	60
3.4.1 <i>Procedimientos y Resultados</i>	65

	90
3.5 Procedimiento de Vinos para Rellenos	68
3.6 Quitosano y POES	69
<i>CONCLUSIÓN</i>	71
<i>Anexo N°1: Proceso de Elaboración</i>	73
<i>Anexo N°2: Técnicas y Métodos</i>	78
<i>BLIOGRAFIA</i>	82
<i>INDICE DE FIGURAS</i>	84
<i>INDICE DE TABLAS</i>	86