

## SMART LINK #3

## Laboratorios EXCELL en 2021: ¡tres informaciones clave recopiladas en este primer trimestre!

Una misión fundamental del trabajo como analistas es aprovechar las innovaciones analíticas que permitan identificar y solucionar problemas a nivel industrial. Como revisión del primer trimestre del año, en este artículo se resumen tres ilustraciones de lo dicho. La primera se refiere a un aspecto microbiológico, la segunda al análisis de residuos de plaguicidas y la última al problema de filtrabilidad y estabilidad coloidal de los vinos.

### *Lactobacillus hilgardii*: ¡un intruso finalmente desenmascarado!

El descenso de los niveles de SO<sub>2</sub> en los vinos, asociado a otros factores (aumento del pH, etc.), contribuye a numerosas alteraciones microbiológicas. Desde hace algún tiempo, los enólogos alertan sobre los sorprendentes aumentos de las características "lácticas" en los vinos.

Para comprender bien el problema, utilizamos técnicas microbiológicas de secuenciación combinadas con técnicas más tradicionales de observación y aislamiento (microscopía, medio de cultivo). Los resultados fueron claros: en casi el 80% de los casos, la bacteria es de la especie *Lactobacillus hilgardii*. Esta especie forma parte de la categoría de bacterias lácticas heterofermentativas; esto significa que usan hexosas para producir ácido láctico y acético. El trabajo de referencia es de Aline Lonvaud Funel que permitió describir bien esta especie. Las características son:

- Fuerte resistencia al alcohol: *Lactobacillus hilgardii* se encuentra frecuentemente en vinos licorosos y mistelas con problemas de aumento de la acidez volátil.
- Capacidad de degradar glicerol (vía glicerol deshidratasa) que a veces conduce a la llamada enfermedad del amargor con la presencia de acroleína.

- Incapacidad de utilizar ácido cítrico.
- Capacidad de producir metabolitos implicados en el gusto a ratón, especialmente cuando existen trazas de fructosa en fermentaciones con dificultades.
- Capacidad de producir precipitados en vinos debido a su cápsula rica en polisacáridos, lo que también ocasiona con frecuencia problemas de filtrabilidad.

En laboratorio y en bodega, se han realizado numerosas pruebas para contrarrestar su presencia. Como era de esperar, una de ellas es el uso de SO<sub>2</sub>, pero generalmente es necesario subir a niveles muy elevados a nivel de SO<sub>2</sub> molecular (> 0,8 mg/L), lo que obviamente es difícil de lograr con el pH actual de los vinos. La lisozima funciona relativamente bien, pero en dosis altas (30 g/hL). También se puede combinar eficazmente el tratamiento con quitosano, que por sí solo no es suficiente. Las bajas temperaturas tampoco son suficientes para frenarlo. El desarrollo de estas bacterias (en vinos incluso a 4 °C), se han observado aumentos de población). Por el contrario, los tratamientos térmicos a altas temperaturas parecen relativamente efectivos. Las filtraciones son generalmente menos efectivas. Finalmente, la prevención es sin duda la mejor forma de prevenir el desarrollo de estas bacterias contaminantes.

Para ello, el manejo de la flora durante las fases prefermentativas es sin duda la vía más convincente y, en particular, la competencia entre la flora a través de la bioprotección. Más adelante, también observamos que una vez que se completó la fermentación maloláctica, llevar a cabo una clarificación temprana con su respectivo trasiego, asegura una separación severa de las diferentes fracciones (lías, vino turbio y vino limpio) limita futuros desarrollos de estas bacterias, encontrándose preferentemente en las fracciones más turbias.

### El ácido fosforoso (H<sub>3</sub>PO<sub>3</sub>), también en otros aspectos, puede tener orígenes sorprendentes ...

Los residuos de plaguicidas en los vinos son objeto de interés por parte de todos los sectores de la industria vitivinícola. Un ejemplo muy singular del soporte que ofrecen los laboratorios a la industria, es sobre la investigación de los residuos de ácido fosforoso, un metabolito del aluminio fosetil (molécula sintética), fungicida muy utilizado en el viñedo para combatir el mildiú y que se degrada rápidamente a ácido fosfónico.



El ácido fosforoso ( $\text{H}_3\text{PO}_3$ ) es un ácido en equilibrio tautomérico con el ácido fosfónico ( $\text{HPO}_2\text{OH}$ ), siendo estas dos formas inseparables analíticamente. Este equilibrio está a favor de la forma fosfónica, pero el término "ácido fosforoso" se utilizará comúnmente en la literatura para la mezcla tautomérica del ácido fosforoso y fosfónico. Estos ácidos no deben confundirse con el ácido fosfórico ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ), un aditivo utilizado en la industria alimentaria (E338) para controlar el pH de determinadas gaseosas, y completamente diferente analíticamente del ácido fosforoso.

El ácido fosforoso es un metabolito del fosetil-Al, las regulaciones europeas exigen la dosificación de estas moléculas para expresar el residuo del fosetil-Al, pero el ácido fosforoso también puede tener otros orígenes. En los últimos años, la presencia de ácido fosforoso en vinos elaborados con uvas que nunca han sido tratadas con fosetil se ha asociado con el uso de fosfitos o fosfonatos en el viñedo o, en vinos, tras el uso de fosfato diamónico (DAP) como nitrógeno asimilable empleado en la nutrición de las levaduras. Además de la contaminación ambiental, otra vía explicativa de la presencia de este compuesto en el vino es el tiempo necesario para la eliminación de los residuos de ácido fosforoso por parte del viñedo.

Otras investigaciones también nos han permitido comprender otro tipo de contaminación del vino. Excell estudió todo el proceso de elaboración de una bodega, analizando la uva, el mosto y la maduración del vino tras diversas intervenciones. Este enfoque permitió identificar la presencia del ácido fosforoso en el vino cuando antes no contenía ni fosetil ni ácido fosforoso. Esta presencia de ácido fosforoso se ha asociado al uso de productos de limpieza o detergentes comúnmente utilizados en la bodega para desinfectar. De hecho, las dosis de ácido fosforoso en algunos productos han permitido cuantificar niveles muy significativos en algunos de ellos:

	Ácido fosforoso (mg/Kg)
Producto desinfectante A	120,0
Producto desinfectante B	No detectado
Detergente C	0,9
Detergente D	0,4

Para el producto desinfectante "A" a base de peróxido de hidrógeno y ácido peracético, la presencia en la ficha de datos de seguridad de un agente quelante difosfónico que inhibe la corrosión, podría alertar sobre la presencia de ácido fosforoso (como producto de degradación o impureza sintética), lo cual fue confirmado mediante análisis. Para los otros productos analizados con base de sosa, potasa y peróxido de hidrógeno, no hubo indicios de una posible presencia de ácido fosforoso (no se mencionaba en la ficha de seguridad que existiera algún componente sospechoso) pero sin embargo, se cuantificó el ácido fosforoso significativamente en dos de ellos (producto "C" y "D").

El impacto del uso de estos productos en bodega no es inocuo, dado que se han cuantificado incrementos de unos cientos de  $\mu\text{g/L}$  de ácido fosforoso en vinos que han estado expuestos a este tipo de productos. El aumento del uso de desinfectantes o detergentes en enología para el control de ciertos microorganismos como *Brettanomyces* (por ejemplo, tuberías en contacto prolongado con desinfectantes), asociado a la dificultad de aclarar algunos de estos materiales (porosidad, difícil acceso, etc.) también puede explicar la contaminación de los vinos por ácido fosforoso. Por tanto, es aconsejable elegir cuidadosamente los productos de limpieza utilizados para reducir el riesgo de contaminación del vino.

### La dosificación de pectinas: ¡un largo proyecto finalmente completado!

Las pectinas son complejos de azúcares y ácidos que forman una sustancia coloidal presente de forma natural en las uvas, mostos y vinos. Su carácter gelificante (bien conocido en la industria alimentaria) es muy restrictivo para la clarificación de mostos (desfangado) y vinos (filtrabilidad). Pero algunos catadores reconocen su presencia como un elemento importante en la apreciación gustativa de los vinos.

La prueba de presencia por precipitación alcohólica es bien conocida en los laboratorios de vino, pero no es realmente específica y sobre todo es sinónimo de "todo o nada", lo que no puede conducir a una gestión precisa del problema. Para ganar en precisión, hemos desarrollado una prueba rápida y precisa para cuantificar pectinas mediante cromatografía iónica con el objetivo de determinar el ácido galacturónico, un componente clave de las pectinas. Según nuestro procedimiento, medimos con precisión el contenido de pectina que expresamos en pectinas hidrolizables en equivalente de ácido galacturónico.

Esta novedosa metodología analítica abre una nueva vía en la gestión de las fases de clarificación prefermentativa (enzimática, decantación estática o dinámica como flotación, etc.) pero también constituye una notable herramienta para anticipar problemas de filtrabilidad e inestabilidad coloidal del vino.

A continuación, se muestra en esta tabla vinos con valores bajos y otros con valores que podemos considerar críticos para su estabilidad.

*Tabla de ensayos de pectina en diferentes vinos tintos del 2019 (ensayos realizados en marzo de 2021). Los valores señalados en rojo indican altos contenidos de pectina con problemas de filtrabilidad y/o inestabilidad.*

Vino	Pectinas hidrolizables (Equivalentes de Ácido galacturónico mg/L)
21111920	61
211112848	5
211119970	269
211110717	296
211119973	272
211112849	79
211119971	209
211119919	12
211110339	213
211119969	247
211119972	234