

L'OZONO, UNO STRUMENTO POTENTE E SOSTENIBILE NEL CONTROLLO MICROBIOLOGICO ALL'INTERNO DELLE BOTTI. TEST DI LABORATORIO ED ESPERIENZE PRATICHE IN UNA CANTINA ITALIANA.

R. Guzzon⁽¹⁾, T. Nardin⁽¹⁾, G. Nicolini^{(1)*}, R. Larcher⁽¹⁾

⁽¹⁾Unità Chimica Vitienologica e Agroalimentare, Centro di Trasferimento Tecnologico, Fond. Edmund Mach, Via Edmund Mach 1, 38010 San Michele all'Adige (TN), Italia

* giorgio.nicolini@fmach.it

RIASSUNTO

Questo lavoro descrive l'uso dell'ozono per la sanificazione delle botti. L'ozono è stato testato verso 19 microrganismi enologici alterativi utilizzando soluzioni a densità cellulare e concentrazione di O₃ variabile. I risultati mostrano una correlazione inversa tra la densità cellulare e l'efficacia dell'ozono; la concentrazione di ozono utilizzata è risultata meno importante. Microrganismi aerobici facoltativi risultano più sensibili all'ozono; al contrario, la capacità di generare biofilm ha aumentato la resistenza a questo gas. La seconda fase del lavoro descrive test di sanificazione delle botti. La caratterizzazione della flora microbica presente al loro interno ha indicato che la concentrazione cellulare è proporzionale agli anni di utilizzo delle botti. *Saccharomyces*, *Candida* e *Pichia* sono i generi più rappresentati; *Brettanomyces* costituisce il 10% della popolazione. 4 tecniche di sanificazione sono state confrontate: vapore, irradiazione con UV, O₃ gassoso e acquoso. Il vapore e l'ozono sono risultati i più efficaci, eliminando circa il 70% dei lieviti.

This paper illustrates on the use of ozone to sanitize barrels. Ozone was tested against 19 wine spoilage microorganisms, using different cell and ozone concentrations. The results showed a correlation between cell density and ozone effectiveness. The ozone concentration used in the treatments appears to be a less important parameter. Some differences were found between the different microorganisms. Facultative aerobic species are more sensitive to ozone. Furthermore the ability of microorganisms to produce biofilm increases resistance to ozone. The second part of the work describes barrel sanification tests using ozone. The characterization of barrel microbiota showed that cell density was proportional to the number of years the barrels had been used. *Saccharomyces*, *Candida*, and *Pichia* were the most represented genera, while *Brettanomyces* made up 10% of the population. 4 treatments were compared: steam, UV irradiation, gaseous and aqueous O₃. Steam and ozone were the most effective treatments, eliminating about 70% of yeasts.

INTRODUZIONE

Negli ultimi anni l'interesse dei consumatori e dei produttori di vino verso tecnologie a basso impatto ambientale è aumentato. Pertanto, anche in enologia, l'uso di additivi con effetto antisettico come l'anidride solforosa e il lisozima (Guzzo et al., 2011) va riducendosi sensibilmente, con un impatto significativo sulla stabilità microbiologica dei vini e sul controllo della contaminazione microbica in cantina. L'uso dell'ozono può essere una valida alternativa per il controllo microbico ai tradizionali strumenti disponibili in enologia. Questa molecola risulta attiva contro tutte le forme microbiologiche e ha un tempo di vita decisamente breve, garantendo quindi la completa scomparsa dei residui nel giro di poche ore

(Jin-Gab et al., 2003). In enologia l'ozono è stato applicato alla sanificazione dei vasi vinari in acciaio, delle linee di imbottigliamento e, più recentemente, delle botti (Guzzon et al., 2011; Gullien et al., 2010; Hester et al., 2006) ma ad oggi manca uno studio dettagliato riguardante l'efficacia dell'ozono nell'inibire lo sviluppo della microflora alterativa dei vini e i possibili rischi associati al suo uso. Questo lavoro presenta uno studio sul comportamento dell'ozono nell'ambiente enologico. Considerando che le peggiori contaminazioni microbiche si verificano durante l'invecchiamento del vino in botte, il lavoro si è concentrato sull'attività dell'ozono contro alcuni microrganismi alterativi caratteristici dei vasi vinari in legno. È stato inoltre valutato l'impatto dell'ozono sui fenoli semplici, una famiglia di composti che rappresenta una frazione significativa e particolarmente pregiata tra i componenti estraibili trasferiti dalle botti al vino durante l'affinamento.

MATERIALI E METODI

L'ozono utilizzato nei test qui descritti è stato prodotto da un generatore a plasma freddo Plasma Ossigen A3 (Aslan srl, I) con un tasso di produzione massimo di 12 g O₃/h, controllato da una sonda Ozon Q45H ATI (Analytical Technology Inc., USA). Per tutte le prove l'ozono è stato disciolto in acqua sterile a 17 °C. Nei test microbiologici una coltura pura di ciascun microrganismo è stata utilizzata come inoculo, raggiungendo concentrazioni, nella soluzione da trattare con ozono, comprese tra 10² e 10⁶ ufc/mL. I microrganismi sono stati messi in contatto con la soluzione acquosa di ozono per 30 minuti. Dopo il trattamento la concentrazione cellulare residua è stata quantificata mediante conta su piastra Petri, secondo i metodi OIV di riferimento (2012). Per le prove riguardanti gli effetti dell'ozono sulle componenti fenoliche del legno sono stati utilizzati sei diversi tipi di chips di quercia (trucioli di rovere francese e americano a bassa, media e alta tostatura, aventi dimensioni medie 3 x 5 x 5 mm). I trucioli di legno sono stati utilizzati al fine di massimizzare il contatto tra l'ozono, il legno e il vino e per minimizzare l'eterogeneità caratteristica del legno, parzialmente tostato, con cui sono costruite le botti. Aliquote omogenee di chips (500 g) sono state trattate in una camera d'acciaio inossidabile ermeticamente chiusa (volume interno 5 L, velocità di rotazione 60 rpm) con dosi crescenti di O₃ gassoso. Sono stati eseguiti due diversi test. Il protocollo del primo test ha previsto un trattamento delle chips con ozono fluente per 30 secondi fino a una concentrazione di O₃ pari a 10 mg/L. I campioni sono stati mantenuti in atmosfera satura di ozono per 9.5 minuti, in continua agitazione (gruppo T1). Tale procedura è stata ripetuta fino a tre volte per un totale di 30 minuti di trattamento nei casi più estremi. Un secondo test, volto a valutare se esistesse una soglia di degradazione dei componenti fenolici dovuta all'azione dell'ozono è stata effettuata trattando i campioni di chips nella camera rotante con un flusso continuo di ozono ad una concentrazione di 20 mg/L per 40 minuti. La possibile depauperazione delle componenti estraibili dal legno, dovuta all'azione dell'ozono, è stata studiata valutando il profilo fenolico dei vini dopo 7 giorni di contatto con le chips trattate con ozono, rispetto al profilo di vini ottenuti dopo il contatto con chips non trattate. Complessivamente sono stati considerati 54 campioni di vino, il cui profilo fenolico è stato indagato con un sistema HPLC Alliance 2695 (Waters Corporation, MA), dotato di un rilevatore elettrochimico coulometrico dotato di 8 elettrodi (5600A ESA, Bedford, MA), adattando il metodo proposto da Larcher et al. nel 2007. La separazione delle frazioni fenoliche è stata ottenuta utilizzando una colonna RP-18e LiChroCART Purospher (125 mm × 3 mm, dimensione delle particelle 5 µm, Merck, D).

RISULTATI E DISCUSSIONE

I test microbiologici hanno preso in considerazione 19 specie di microrganismi che in precedenti test fisiologici, svolti dagli stessi autori, avevano dimostrato un elevato potenziale alterativo nelle specifiche condizioni delle botti. Per ciascuna specie la concentrazione cellulare residua dopo una permanenza di 30 minuti in una soluzione acquosa di ozono è stata valutata variando sia la concentrazione iniziale di cellule che di ozono. Alle più alte concentrazioni cellulari (10^6 e 10^5 ufc/mL) è ipotizzabile che l'abbondante sostanza organica presente nel mezzo abbia esercitato un'azione protettiva non specifica sulle cellule, nei confronti dell'ozono. Infatti, nella maggioranza di questi campioni si è resa necessaria la massima concentrazione di ozono (7 ppm) per eliminare completamente i microrganismi e, nonostante l'intensità del trattamento, in alcuni casi sono state osservate cellule vitali residue dopo il trattamento (Figura 1 e 2). Riducendo la concentrazione cellulare iniziale al di sotto delle 10^4 ufc/mL, e di conseguenza il contenuto di materia organica nel campione, l'azione di ozono è stata più uniforme e 2.5 mg/L di ozono sono stati generalmente sufficienti per inattivare la popolazione microbica. Questi risultati hanno significative implicazioni tecnologiche perché la concentrazione delle forme microbiche alteranti presenti in cantina su superfici e attrezzature non supera generalmente questi valori. Tra le specie con più alta rilevanza enologica *Saccharomyces cerevisiae* ha dimostrato una media resistenza ai trattamenti con ozono, essendo inattivato con 1 mg/L di O_3 a densità cellulari inferiore a 10^5 ufc/ml. *Oenococcus oeni* ha dimostrato scarsa resistenza all'ozono, probabilmente a causa del suo carattere anaerobio facoltativo e quindi alla bassa tolleranza a stress ossidativi causati da forme attive dell'ossigeno. Risultati simili, a conferma di questa tesi, sono stati ottenuti con batteri appartenenti ai generi *Lactobacillus* e *Pediococcus* (Tab. 1). Anche la notevole resistenza osservata in specie fortemente aerobie, come *Acetobacter aceti* e *Gluconobacter oxidans*, avvalorata questa ipotesi, sebbene non sia da trascurare l'effetto protettivo dovuto alla formazione di biofilm propria dei batteri acetici (Tristezza et al., 2010). Tra i lieviti alterativi *Brettanomyces bruxellensis* ha mostrato una bassa tolleranza all'ozono: 1 mg/L di O_3 è stato sufficiente per la sua completa eliminazione anche in soluzioni molto concentrate (10^5 ufc/mL).

Per valutare possibili effetti negativi dei trattamenti con ozono sulla componente fenolica del legno sono stati considerati 30 composti ceduti dalle chips al vino, comparando il profilo di campioni trattati, rispetto a testimoni non trattati. Il primo approccio, più diretto alla pratica di cantina, ha studiato i possibili effetti indesiderati dell'esposizione del legno all'ozono in un range tempo/concentrazione simile a quello suggerito per le applicazioni di cantina. Non è stato possibile evidenziare differenze statisticamente significative per nessuno dei composti analizzati, sia utilizzando analisi non parametriche (Anova per ranghi, test di Kruskal-Wallis), sia approcci parametrici (tests Anova-Tukey) (Tab. 1). Il secondo test ha voluto verificare eventuali variazioni del profilo fenolico indotte da un trattamento drastico per eliminare ogni dubbio sull'applicabilità dell'ozono al trattamento di vasi vinari in legno. Anche in questo caso non si sono osservate differenze statisticamente significative, se non per l'acido gentisico, sia utilizzando un approccio non-parametrico (test U di Mann-Whitney) che approcci parametrici (tests ANOVA, Tukey). A margine è utile ricordare che l'acido gentisico è noto per la sua attività antiossidante ma che questa molecola non ha rilevanza tecnologica essendo generalmente presente nel vino solo in tracce (Joshi et al., 2012).

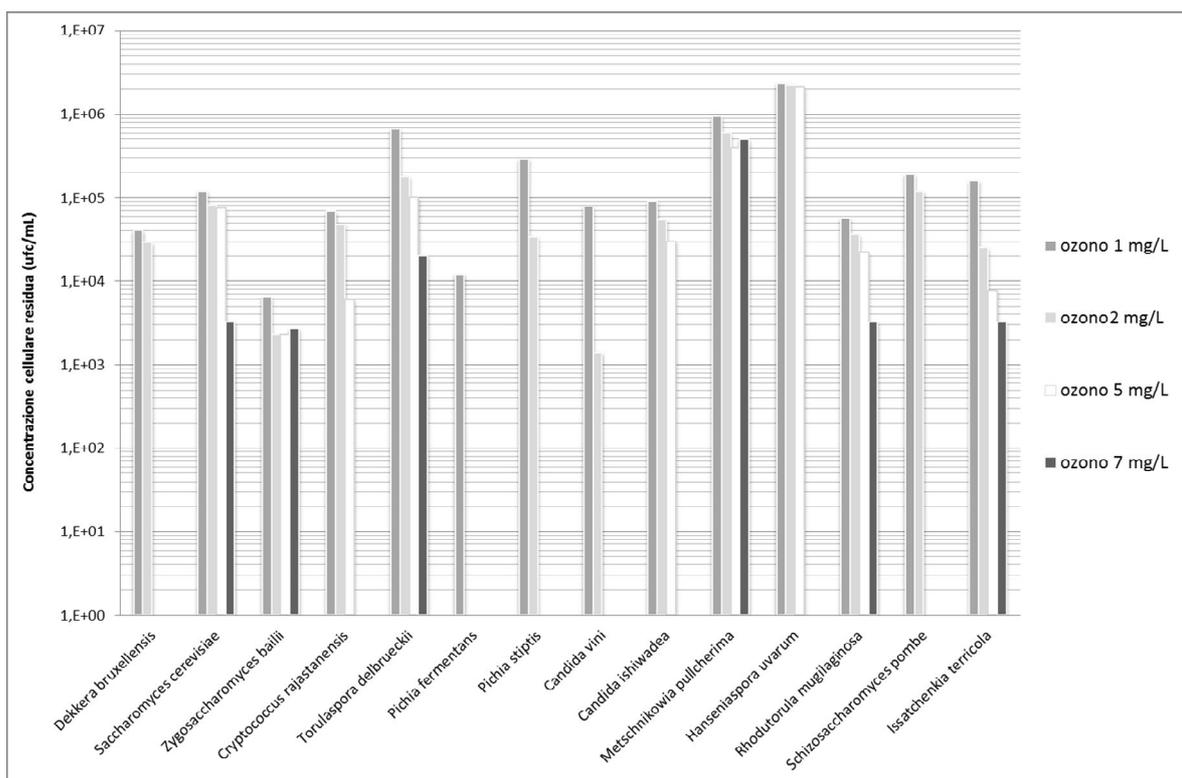


Figura 1. Concentrazione cellulare residua di specie microbiche di rilevanza enologica dopo 30 minuti di trattamento in soluzione acquosa (carica cellulare iniziale 10^6 ufc/ml) a concentrazioni crescenti di ozono (1-7 mg/l)

CONCLUSIONI

L'evoluzione dell'industria enologica è ormai chiaramente orientata verso la produzione di vini con una bassa impronta ecologica. In questo contesto, l'implementazione di soluzioni tecnologiche in grado di contrastare il danno microbiologico senza effetti collaterali sull'ambiente o sulla salute umana è essenziale. L'applicazione dell'ozono per la prevenzione delle alterazioni microbiche va in questa direzione senza ridurre la qualità dei vini prodotti. L'ozono ha dimostrato di essere efficace per eliminare cellule vitali presenti in soluzione, anche se la sua attività sembra essere strettamente correlata ad alcune variabili ambientali, come la temperatura, la sostanza organica disciolta, la concentrazione cellulare. I test svolti non hanno evidenziato danni al profilo fenolico del legno utilizzato per la costruzione dei vasi vinari e solo esposizioni prolungate a questo gas hanno la diminuzione dei contenuti di una molecola, l'acido genticico, presente nei vini ma di scarsa rilevanza tecnologica.

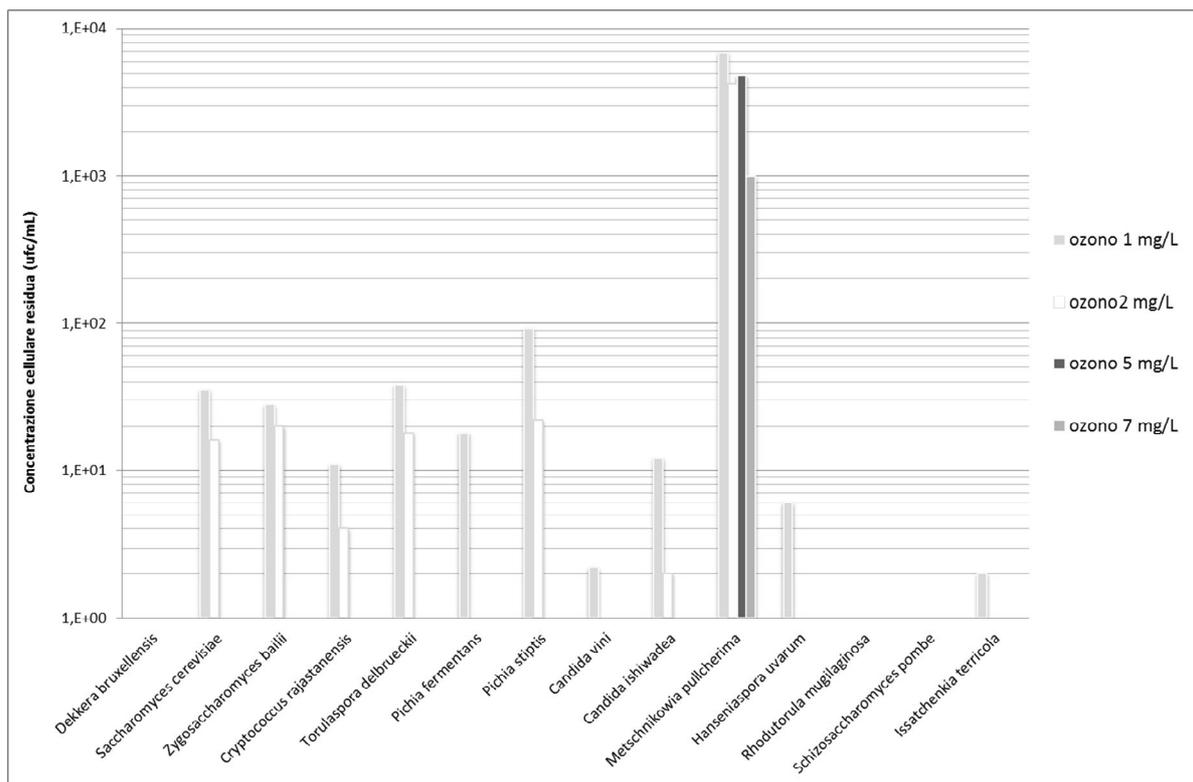


Figura 2. Concentrazione cellulare residua di specie microbiche di rilevanza enologica dopo 30 minuti di trattamento in soluzione acquosa (carica cellulare iniziale 10^5 ufc/ml) a concentrazioni crescenti di ozono (1-7 mg/l.)

Tabella 1. Profilo fenolico di vini ottenuti dopo il contatto con chips trattate con ozono, in confronto a vini ottenuti con chips non trattate.

Composti (mg/L)	Controllo (n=24)			Trattato (n=24)			Test U Mann-Whitney Risultato
	10 ^{mo} Percentile	Mediana	90 ^{mo} Percentile	10 ^{mo} Percentile	Mediana	90 ^{mo} Percentile	
4-allylsyringol	0.01	0.22	0.83	0.01	0.16	0.92	n.s.
4-ethylphenol	0.01	0.01	0.49	0.01	0.01	0.37	n.s.
4-hydroxybenzoic acid	0.01	0.06	0.30	0.01	0.06	0.35	n.s.
4-methylcatecol	0.01	0.01	2.31	0.01	0.01	2.05	n.s.
4-methylsyringol	0.01	0.35	1.21	0.01	0.31	0.98	n.s.
4-vinylphenol	0.01	0.01	0.94	0.01	0.01	0.93	n.s.
acetosyringone	0.15	2.37	7.20	0.15	3.27	6.79	n.s.
coniferyl aldehyde	0.95	5.21	7.85	0.98	4.76	8.20	n.s.
cyclotene	0.01	0.28	1.18	0.01	0.10	0.79	n.s.
ellagic acid	3.37	6.30	10.20	3.55	7.03	13.02	n.s.
esculetin	0.01	0.01	0.45	0.01	0.01	0.38	n.s.
gentisic acid	0.11	0.37	0.42	0.06	0.25	0.39	<i>p</i> <0.05
guaiacol	0.08	0.20	0.30	0.05	0.10	0.31	n.s.
homovanillic acid	0.53	1.75	2.61	0.30	1.79	2.81	n.s.
homovanillic alcohol	0.01	2.10	3.73	0.01	1.95	3.68	n.s.
hydroxytyrosol	0.01	0.11	0.27	0.01	0.19	0.44	n.s.
isoeugenol	0.01	0.01	0.18	0.01	0.01	0.16	n.s.
isopropiosyringone	0.01	3.64	14.20	0.01	2.23	15.70	n.s.
isopropiovanillone	1.84	5.64	10.99	1.88	6.15	10.10	n.s.
protocatechuic acid	0.56	0.87	1.65	0.55	0.92	1.34	n.s.
protocatechuic aldehyde	0.01	0.19	0.35	0.01	0.14	0.34	n.s.
scopoletin	0.01	0.13	0.59	0.01	0.11	0.51	n.s.
synapaldehyde	25.80	51.40	69.78	36.20	49.90	78.00	n.s.
syringaldehyde	3.84	9.63	18.45	2.44	8.72	13.95	n.s.
syringic acid	4.33	9.44	21.14	2.95	10.03	20.32	n.s.
syringol	0.01	0.38	1.94	0.01	0.32	2.32	n.s.
tryptophol	1.15	1.64	2.50	1.06	1.73	3.38	n.s.
tyrosol	4.45	7.55	21.50	3.70	6.90	8.60	n.s.
vanillic acid	4.64	7.30	11.65	3.87	8.04	11.31	n.s.
vanilline	2.41	5.25	10.90	2.50	5.16	10.38	n.s.

n.s.: non statisticamente significativo

BIBLIOGRAFIA.

- Anonymous. 2011. Recueil des méthodes internationales d'analyse des vins et des moûts. Organisation International de la Vigne e du Vin, Paris (F)
- Guillen, A.C., Kechinski C.P., Manfroi V., 2010. The use of ozone in a CIP system in the wine industry. *Ozone: Science & Engineering*, 32, 355-360
- Guzzo F., Cappello M. S., Azzolini M., Tosi E., Zapparoli G., 2011. The inhibitory effects of wine phenolics on lysozyme activity against lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 148(3), 184-190
- Guzzon R., Widmann G., Malacarne M., Nardin T., Nicolini G., Larcher R., 2011. Survey of the yeast population inside wine barrels and the effects of certain techniques in preventing microbiological spoilage. *European Food Research and Technology*, 233(2), 285-291
- Hester T., (2006). New Brett solution arrives in Australia. *Australian and New Zealand Grape Grower and Winemaker*, 512, 77-79
- Jin-Gab K., Ahmed Y.E., Mohammed K.A., 2003. Ozone and its current and future application in the food industry. *Advances in Food and Nutrition Research*, 45, 167-218
- Joshi R., Gangabhairathi R., Venu S., Adhikari S., Mukherjee T., 2012. Antioxidant activity and free radical scavenging reactions of gentisic acid: in-vitro and pulse radiolysis studies. *Free Radical Research*, 46(1), 11-20
- Larcher R., Nicolini G., Bertoldi D., Nardin T., 2007. Determination of 4-ethylcatechol in wine by high-performance liquid chromatography-coulometric electrochemical array detection. *Analytica Chimica Acta*, 609(2), 235-240
- Tristezza M., Lourenco A., Barata A., Brito L., Malfeito-Ferreira M., Loureiro V., 2010. Susceptibility of wine spoilage yeasts and bacteria in the planktonic state and in biofilms to disinfectants. *Annals of Microbiology*, 60(3), 549-556