



DALLA RICERCA SOLUZIONI
CONTRO LE CONTAMINAZIONI MICROBICHE

CHITOSANI E OZONO

consigli e modalità d'uso in cantina

>> **Raffaele Guzzon**

Il controllo microbiologico in cantina, inteso come contrasto a microrganismi alterativi della qualità del vino, è problema antico, ma di straordinaria attualità. Il rinnovamento delle cantine italiane a cavallo degli anni Duemila e il progresso nelle competenze tecniche sembravano aver messo da parte molte «malattie del vino» combattute da generazioni di enologi. Oggi ci troviamo a dover affrontare nuovamente alcune di queste problematiche e nuove difficoltà legate al mutare delle condizioni agro-climatiche e alle richieste dei consumatori.

Alcuni degli strumenti impiegati in passato non sono più accettabili per le produzioni enologiche di qualità, come i trattamenti di pastorizzazione. Altri strumenti rivelano nelle condizioni attuali una modesta efficacia, come nel caso dell'anidride solforosa, o risultano sconvenienti all'impiego per la scarsa accettabilità da parte dei consumatori, si pensi al lisozima o ad altri preservativi con potenziali rischi per persone sensibili. Fortunatamente nuove tecnologie sono a disposizione degli enologi per contrastare problematiche emergenti sia riguardo al controllo microbiologico nei vini sia per la sanificazione degli impianti e delle cantine.

I CHITOSANI: MICRORGANISMI CONTRO MICRORGANISMI

I chitosani sono polimeri composti da unità di D-glucosamina e N-acetil-D-glucosamina distribuite in maniera casuale e collegate da legami β -(1→4).

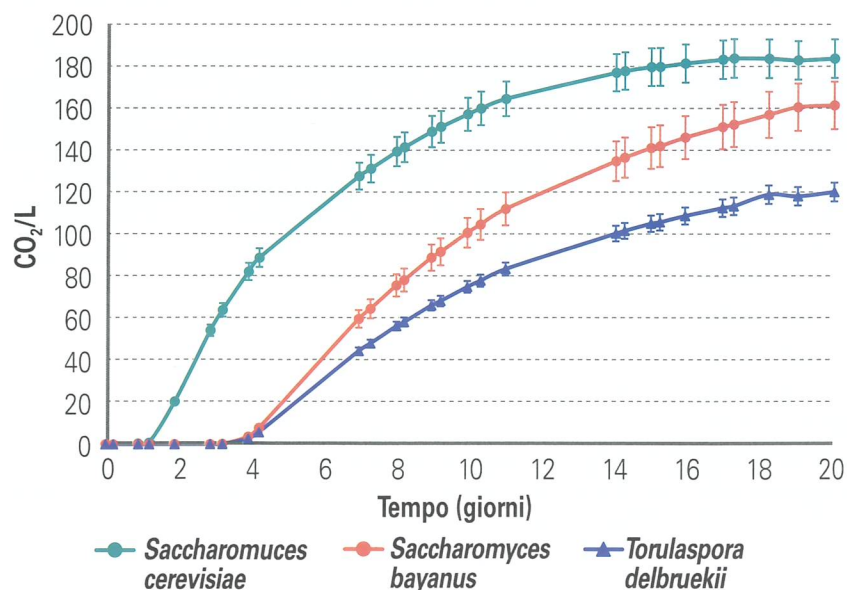
Sono molecole diffuse in natura e con diversi scopi industriali. Trovano applicazioni nella nutrizione umana, come agenti antibatterici o coadiuvanti di farmaci. In agricoltura la proprietà antimicrobica dei chitosani è sfruttata nella produzione di coating bioattivi per la protezione di alimenti e mangimi e nel trattamento delle acque. In enologia i chitosani sono uti-

Nuove tecnologie sono a disposizione degli enologi per contrastare problematiche emergenti sia riguardo al controllo microbiologico nei vini sia per la sanificazione degli impianti e delle cantine; tra questi i chitosani e l'ozono sembrano essere i più promettenti

lizzati da anni come agenti chiarificanti, come antiossidanti e chelanti verso i metalli pesanti. Più recentemente osservazioni empiriche ne hanno dimostrato la spiccata attività antimicrobica nelle condizioni enologiche, utile a contrastare i microrganismi alterativi tra cui *Brettanomyces bruxellensis*.

L'uso del chitosano in enologia è interessante perché questi non è influenzato dalla composizione del mezzo, nell'intervallo chimico che caratterizza i vini, e non perde efficacia al crescere del pH come avviene invece per l'anidride solforosa. Buona parte dei chitosani sono rimossi al termine del trattamento, si calcola che meno del 5% si solubilizzi, e non sussistono rischi per la salute umana se queste molecole sono ottenute da funghi.

G.1 ANDAMENTO DELLA FERMENTAZIONE ALCOLICA CONDOTTA CON TRE DIFFERENTI LIEVITI, IN PRESENZA DI 0,5 G/L DI CHITOSANI



Test condotti in terreno sintetico con un alcol potenziale di 12° alcolici.

SOLO *S. CEREVISIAE* HA TERMINATO LA FERMENTAZIONE ALCOLICA. QUESTO SUGGERISCE DI UTILIZZARE CON PRUDENZA I CHITOSANI PRIMA DELLA CONCLUSIONE DELLE FERMENTAZIONI ENOLOGICHE PER NON INCAPPARE IN ARRESTI DI FERMENTAZIONE.

T.1 CONCENTRAZIONE CELLULARE (CELLULE/ML)
MISURATA DOPO INCUBAZIONE DI LIEVITI
E BATTERI DI INTERESSE ENOLOGICO
IN PRESENZA DI CHITOSANI (0,5 G/L)

Specie	Test dinamico	Test statico
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	$2,6 \times 10^7$	$1,60 \times 10^8$
<i>Saccharomyces bayanus</i>	490	$3,20 \times 10^7$
<i>Brettanomyces bruxellensis</i>	No sviluppo	$4,0 \times 10^5$
<i>Torulasporea delbruekii</i>	$4,4 \times 10^7$	$1,3 \times 10^8$
<i>Oenococcus oeni</i>	$6,6 \times 10^6$	$1,0 \times 10^5$
<i>Pediococcus damnosus</i>	$4,4 \times 10^6$	$1,6 \times 10^5$
<i>Lactobacillus plantarum</i>	3.500	3.200
<i>Acetobacter aceti</i>	$5,5 \times 10^6$	$1,3 \times 10^6$
<i>Gluconobacter oxidans</i>	$6,6 \times 10^6$	$3,2 \times 10^6$
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	No sviluppo	$5,0 \times 10^7$
<i>Candida stellata</i>	No sviluppo	$3,1 \times 10^6$
<i>Pichia anomala</i>	95	$1,3 \times 10^8$
<i>Saccharomycodes ludwigii</i>	No sviluppo	$4,0 \times 10^7$

Concentrazione cellulare iniziale: 1×10^7 cell/mL. Il test è stato ripetuto in modalità dinamica (continua agitazione del mezzo di coltura) e statica.

SI EVIDENZIA COME NELLA PROVA STATICA LA POPOLAZIONE CELLULARE RISULTI MISURABILE PER TUTTI I MICRORGANISMI, PROBABILMENTE A CAUSA DELLO SVILUPPO DI CELLULE SUPERSTITI. NEL TEST DINAMICO IL CHITOSANO SI DIMOSTRA MOLTO EFFICACE VERSO DIVERSI LIEVITI CONTAMINANTI.

Quali sono i meccanismi attraverso cui i chitosani esplicano la loro attività antimicrobica? Sicuramente l'effetto chiarificante di queste molecole ha un ruolo rilevante in quanto, in un vino in conservazione, favoriscono la separazione delle cellule restando sul fondo del vaso vinario. In questo modo lo scambio con la massa del vino è minore e dunque i processi metabolici sono rallentati. Tuttavia i chitosani svolgono anche una diretta azione contro i microrganismi. A pH acidi i gruppi amminici della glucosammina sono in larga parte carichi positivamente, capaci di reagire con componenti della parete batterica. Nel caso dei batteri Gram negativi si tratta dei lipopolisaccaridi, nel caso dei batteri Gram positivi la reazione avviene con il peptidoglicano di cui queste forme microbiche sono ricche. La reazione chimica tra chitosani e componenti della cellula batterica ne causa una progressiva degradazione, alterandone gli scambi con l'esterno. Pare inoltre che i chitosani possano veicolare all'interno della



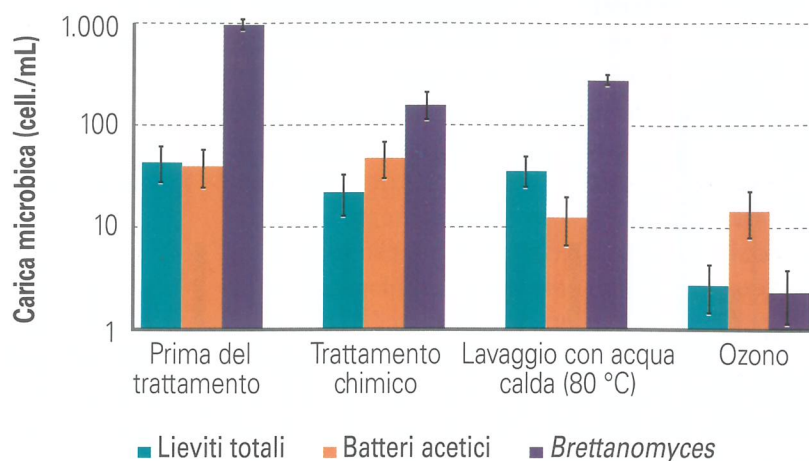
cellula molecole tossiche, come i metalli pesanti. Vi sono poi evidenze della capacità dei chitosani di interferire con l'attività di muffe e lieviti. Anche in questo caso la distruzione cellulare avviene mediante l'alterazione della permeabilità della membrana cellulare, per l'interazione dei gruppi amminici del polimero con la porzione carica negativamente dei fosfolipidi. Altri autori hanno osservato la capacità dei chitosani di interferire con la sintesi cellulare. I chitosani impiegati nell'industria biotecnologica derivano dai crostacei, data la grande abbondanza e i costi modesti. Tuttavia il rischio di allergicità e la presenza di impurità, come il sodio, non li rendono raccomandabili nell'industria agroalimentare.

I CHITOSANI AMMESSI IN ENOLOGIA

L'Organizzazione internazionale della vite e del vino ha autorizzato all'impiego nel vino solo i chitosani di origine fungina, principalmente ricavati da *A. niger*. L'Oiv ha indicato i parametri chimico/fisici utili a discriminare i chitosani fungini da quelli di altra origine, recentemente sono stati pubblicati metodi strumentali, basati sull'analisi isotopica di queste molecole. In enologia i chitosani trovano oggi principale applicazione nel contrasto a *Brettanomyces bruxellensis*

durante le fasi post-fermentative. Si suggerisce di aggiungere il polimero alla massa di vino contaminata con un'accurata dispersione e travasare, separando il residuo contenente cellule e chitosani, dopo 7-10 giorni. Non vi è evidenza che un trattamento prolungato danneggi il vino, ma è stato osservato che i chitosani separano efficacemente le cellule dal vino senza tuttavia inattivarle completamente se la contaminazione è molto elevata. Soste lunghe potrebbero portare a una nuova contaminazione del vino, come osservato nell'esperimento in tabella 1 dove nel test privo di agitazione i chitosani tendono a depositarsi sul fondo del contenitore, lasciando spazio allo sviluppo delle cellule superstiti nel mezzo di coltura. Dunque i chitosani ben si prestano a un contrasto a contaminazioni da parte di *Brettanomyces* non eccessivamente alte, rilevate dunque con controlli tempestivi, prima di un abbondante sviluppo di questo lievito. Se la carica cellulare dovesse superare le migliaia di cellule per millilitro di vino è opportuno convergere su

G.2 EFFICACIA DI DIFFERENTI TRATTAMENTI DI SANIFICAZIONE DI BARRIQUES



Esperienza condotta in una cantina della regione Trentino-Alto Adige. Dati (media ± deviazione standard, n = 5) ottenuti campionando l'acqua di lavaggio utilizzata dopo il trattamento (50 L/botte).

SI OSSERVA UNA PARZIALE EFFICACIA DEL TRATTAMENTO CHIMICO E DEL VAPORE CHE RIESCONO A RIDURRE CIRCA DEL 50% LA POPOLAZIONE MICROBICA. L'OZONO SI RIVELA DECISAMENTE PIÙ EFFICACE, SOPRATTUTTO VERSO *BRETTANOMYCES* SP.

una filtrazione in quanto il trattamento con chitosani potrebbe non essere risolutivo (tabella 2). Visto il successo nel controllo del Brett oggi i chitosani sono

testati per il controllo batterico e vi sono esperienze di applicazione anche in vigna e nelle fasi pre-fermentative. Certamente queste applicazioni destano interesse, ma debbono essere valutate con cura in quanto non è ancora ben noto l'effetto dei chitosani sui microrganismi utili e le prime evidenze in questo senso non sono confortanti (grafico 1).

OZONO: SANIFICAZIONE SENZA RESIDUI

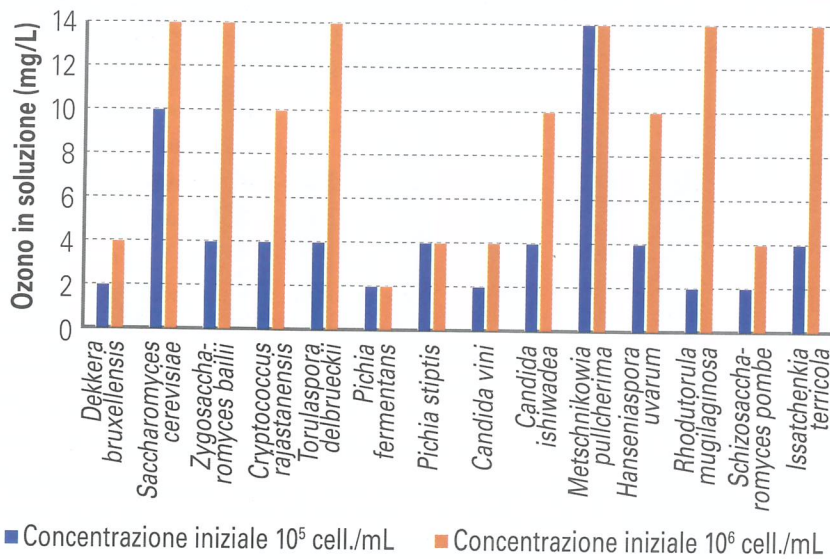
L'ozono è una forma triatomica, instabile, dell'ossigeno. Tende a degradarsi liberando ossigeno nella forma nativa e forme radicaliche che reagendo con componenti essenziali della cellula, come le molecole cicliche e i doppi legami, causano danni irreparabili e dunque la morte dei microrganismi. Il tempo di vita breve, nell'ordine dei 30 minuti

T.2 CONTAMINAZIONI DI *BRETTANOMYCES* NEI VINI, INTERVENTI DA ATTUARE IN FUNZIONE DELLA CONCENTRAZIONE MICROBICA E DI FENOLI VOLATILI RILEVATA

Livello di contaminazione	Concentrazione <i>Brettanomyces</i> (cell./mL)	Concentrazione fenoli volatili (mg/L)	Intervento
Trascurabile	<50	Assenti	Controlli periodici, solfitazione al prossimo travaso
Bassa	50-500	Assenti	Trattamento con chitosani al 1° travaso se entro 30-40 giorni. Se la temperatura del vino è >20 °C o vi è residuo zuccherino trattamento immediato con chitosani
Alta	50-5.000	<0,7	Trattamento immediato con chitosani e solfitazione del vino limpido. Verifica entro 60 giorni dell'effetto del trattamento con indagine microbiologica
Grave	>5.000	>0,7	Filtrazione del vino con filtro a porosità nominale minore di 5 micron. Eventuale trattamento con carboni per rimuovere i fenoli volatili

G.3

CONCENTRAZIONE DI OZONO NECESSARIA AD ABBATTERE LA CARICA MICROBICA PRESENTE IN UNA SOLUZIONE MODELLO



Test svolto su differenti lieviti e batteri di interesse enologico, tempo di contatto 30 minuti.

SI EVIDENZIA UNA VARIABILE RESISTENZA ALL'OZONO TRA LE SPECIE TESTATE, DATO CHE SONO NECESSARIE CONCENTRAZIONI DIFFERENTI PER INATTIVARE I MICRORGANISMI PRESENTI. LA PULIZIA PRIMA DELLA SANIFICAZIONE, ABBATTENDO UN CONSISTENTE NUMERO DI MICRORGANISMI, È CONDIZIONE ESSENZIALE PER OTTIMIZZARE L'EFFICACIA DEL BIOCIDA.

a temperatura ambiente, dell'ozono fa sì che questa molecola sia un agente sanitizzante molto utile nell'industria alimentare in quanto efficace e privo di residui. L'uso diretto nel vino o in generale su alimenti fluidi sensibili all'ossidazione è invece impossibile in quanto vi sarebbero danni irreparabili degli stessi. Come tutti i sanificanti basati sull'azione ossidante, l'ozono tende a degradarsi a contatto con la sostanza organica e dunque le superfici da trattare devono essere ben pulite. Di contro, questa molecola è aspecifica e dunque attiva contro tutte le forme microbiche, dai virus alle muffe. Esperienze pregresse in diversi ambiti agroalimentari, tra cui gli alimenti di IV e V gamma, le celle di stagionatura, il trattamento di acque, hanno fatto sì che circa una decina di anni fa la tecnologia fosse esportata anche in enologia. Il principale limite dell'ozono è che deve essere prodotto direttamente all'uso, ma oggi la disponibilità di generatori efficienti e dai consumi energetici moderati ne fanno un'alternativa molto interessante ai trattamenti termici, in grado di ottenere analoghi effetti sanitizzanti, ma con minori costi energetici e minori danni ai materiali (grafico 2). Esperienze condotte anche dall'autore hanno dimostrato che l'ozono è attivo verso molte forme microbiche alterative di interesse enologico e in particolare contro *B. bruxellensis*. Il legno, ma anche l'acciaio dei quali i vasi vinari e gli impianti di imbottigliamento sono costituiti, non subiscono danni rilevanti da trattamenti, anche drastici, con questo gas. Ad oggi l'Oiv autorizza l'ozono per la sanificazione dei vasi vinari mentre è ancora vietato l'impiego sulle uve. Questo è decisamente un



peccato dato che esistono evidenze, e applicazioni simili in altri ambiti agroalimentari, che dimostrano come l'ozono non danneggi l'uva integra appena raccolta, ma possa abbattere la carica microbica superficiale favorendone la conservabilità sia fresca sia durante l'appassimento.

Addirittura alcuni autori hanno osservato che l'ozono agirebbe sul metabolismo dell'acino stimolando l'accumulo di polifenoli.

METODO D'USO DELL'OZONO

Prima di tutta la superficie da trattare deve essere ben pulita da residui organici e devono essere eliminati i residui di tartrati che potrebbero proteggere i microrganismi. Nel caso si intenda usare ozono gassoso sarà opportuno asciugare anche le superfici dato che un film d'acqua superficiale potrebbe ostacolare il contatto dell'ozono con i microrganismi. Se si intende invece utilizzare ozono sciolto in acqua è necessario raffreddare bene il serbatoio per aumentare la quantità di gas che può sciogliersi e verificare la curva di accumulo di ozono nell'acqua che dovrà prima ossidare la sostanza organica presente nel fluido.

Il trattamento delle superfici, solitamente di vasi vinari, dovrà essere protratto per un tempo adeguato, in funzione della contaminazione microbica e solitamente nell'ordine di alcune decine di minuti (grafico 3). È opportuno monitorare la curva di concentrazione dell'ozono all'uscita del vaso vinario, o dell'impianto, da trattare in modo da verificare quando la concentrazione si sia stabilizzata, segno che la sostanza organica presente è stata eliminata e, con una omogenea concentrazione di ozono, inizia l'azione antimicrobica. Al termine del trattamento non è necessario alcun altro intervento se non un accurato arieggiamento dei contenitori o al limite, un rapido risciacquo con acqua. Ecco dunque due strumenti che ben rispondono alle esigenze del controllo microbiologico e che si aggiungono all'arsenale nelle mani degli enologi per intervenire sui vini e in cantina rispondendo alle nuove criticità e alle esigenze di salubrità e sostenibilità che avanzano anche nel settore enologico.

Raffaele Guzzon

Centro di trasferimento tecnologico
Fondazione Edmund Mach
San Michele all'Adige (Trento)

TECNOLOGIA SENZA LIMITE
LIMITLESS TECHNOLOGY

cima
ATOMIZZATORI-IMPOLVERATORI

SCOPRI LA
NOSTRA GAMMA

www.cima.it

f in y

CREDIT: WWW.HUSTARDEN