

*I meccanismi dell'azione antimicrobica dei chitosani sono noti, ma come interagiscono con la microflora enologica? Test della FEM hanno rilevato che *S. bayanus* e *T. delbruekii* sono risultati incapaci di completare il consumo di zucchero in presenza di chitosano*

12 CHITOSANI TESTATI SU PERFORMANCE FERMENTATIVE

L'efficacia dei chitosani varia con le specie microbiche

>> **Raffaele Guzzon, Tiziana Nardin, Roberto Larcher**

Nell'industria enologica il principale agente antimicrobico è l'anidride solforosa, ma i rischi per la salute che questa molecola porta con sé, unitamente a oggettivi limiti tecnici alla sua efficacia, hanno spinto alla ricerca di alternative per il controllo microbiologico. Tra queste vi sono i chitosani, molecole hanno fatto il loro ingresso nell'industria enologica solo pochi anni fa, divenendo oggi uno strumento attualissimo, apparentemente poliedrico ed efficace, tanto da rendere interessante un'indagine più approfondita sulla interazione tra chitosani e microflora enologica, utile e alterativa.

I chitosani sono polimeri policationici lineari composti da monomeri di D-glucosamina e N-acetil-D-glucosamina, distribuiti casualmente e collegati da legami β -(1→4).

In agricoltura la loro azione antimicrobica è stata impiegata nella produzione di biopesticidi, per la sintesi di rivestimenti protettivi di alimenti e materiali agricoli, per le loro proprietà antiossidanti e chiarificanti. In enologia i chitosani sono stati dapprima impiegati come chiarificanti, per poi sfruttarne l'azione antimicrobica contro lieviti alterativi, come *Brettanomyces*, e più recentemente verso i batteri lattici.

Il loro impiego è interessante perché abbinano a un'elevata efficacia una sostanziale insensibilità alle variazioni di pH e sono in larghissima parte eliminati dal vino, al termine del trattamento.

I meccanismi dell'azione antimicrobica dei chitosani sono noti. In sintesi, in ambiente acido una larga parte dei gruppi amminici in posizione C-2 è dissociata. L'elevata carica cationica favorisce la reazione tra chitosani e componenti della parte cellulare, soprattutto dei batteri Gram- che presentano un'elevata carica anionica nei lipopolisaccaridi presenti sulle strutture cellulari esterne. Nei batteri Gram+ si osserva la reazione tra chitosani e gruppi anionici del peptidoglicano. Il grado di acetilazione del chitosano e il pH influenzano la reattività, dunque l'azione antimicrobica, che aumenta notevolmente a pH inferiori a 5, l'intervallo di acidità della maggior parte delle bevande fermentate, tra cui il vino. Un'altra variabile che regola l'azione dei chitosani è il loro peso molecolare. Queste molecole, oltre a causare danni alla parte cellulare dei batteri, esplicano un'azione deleteria anche sulle cellule fungine, sono in grado di alterare il doppio strato fosfolipidico della membrana e di penetrare all'interno della cellula, alterandone il pH grazie ai loro gruppi amminici e facendosi trasportatori di metalli pesanti, tossici per i microrganismi.

12 CHITOSANI SOTTO ESAME

La sempre maggiore diffusione in enologia di queste molecole ha spinto gli autori a testarne l'efficacia, in differenti condizioni, non solo su microrganismi alterativi, ma anche su microrganismi utili alla vinificazione. La ricerca ha preso in considerazione 12 chitosani re-

T.1 PARAMETRI CHIMICI DEI CHITOSANI IMPIEGATI NELLO STUDIO (1)

Chitosano	Glucani residui (%)	Viscosità (cP)	Densità (g/mL)	Origine	DD (%)	DA (%)	Mw (KDa)	Solubilità (%)
1	8,4	3,39	0,9	Fungina	74,3	25,7	157	<5
2	2,2	2,87	0,3	Animale	75,2	24,8	20,5	<5
3	8,8	3,25	0,9	Fungina	74,0	26,0	277	<5
4	0,5	65,1	0,5	Animale	68,5	31,5	3910	<5
5	0,4	79,0	0,4	Animale	76,8	23,2	949	<5
6	8,6	3,37	0,9	Fungina	75,4	24,6	250	<5
7	1,9	3,82	0,3	Animale	75,8	24,2	35,5	<5
8	0,4	52,4	0,4	Animale	78,0	22,0	730	<5
9	7,9	2,65	0,8	Fungina	71,1	28,9	365	<5
10	0,4	22,5	0,4	Animale	81,7	18,3	398	<5
11	13	1,64	1,0	Fungina	72,0	28,0	69,3	<5
12	11	3,20	0,9	Fungina	75,8	24,2	19,6	<5

(1) I parametri sono determinati secondo i metodi Oiv di riferimento e secondo una metodica cromatografica ionica applicata alla porzione solubile del polimero. **DD** = grado di diacetilazione; **DA** = grado di acetilazione; **Mw** = peso molecolare; **KDa** = Kdalton.

periti sul mercato i quali, prima dei test microbiologici, sono stati sottoposti a una accurata caratterizzazione utilizzando sia i metodi proposti dall'Organizzazione internazionale della vigna e del vino (Oiv), sia una nuova metodica basata sulla cromatografia ionica applicata alla porzione solubile del polimero.

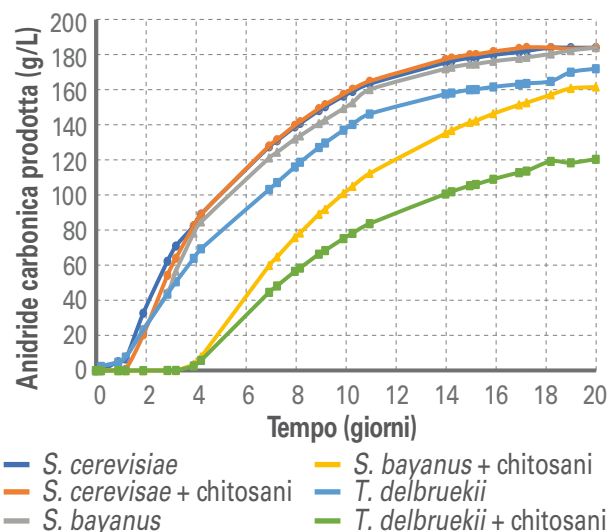
I dati (tabella 1) hanno confermato la sostanziale corrispondenza di tutti i prodotti ai requisiti Oiv, ma anche la solubilità di una porzione compresa tra, l'1,5 e il 2 % dei chitosani, variabile in funzione del tenore di etanolo e del pH. L'analisi dei profili cromatografici ha rivelato la possibilità di distinguere tra chitosani di origine fungina o animale, carattere di fondamentale importanza, non solo per l'efficacia come agente microbiologico del polimero, ma anche per la sicurezza alimentare, dato che i chitosani di origine animale, e più specificamente da crostacei, sono riconosciuti come potenziali allergeni.

I CHITOSANI ALLA PROVA

La prima questione che è stata indagata riguarda la tossicità dei chitosani verso diverse specie di microrganismi di interesse enologico. La tabella 2 indica i microrganismi coinvolti nello studio, alcuni dei quali, come *Saccharomyces* spp., *T. delbruekii* e *Oenococcus oeni*, sono essenziali nella vinificazione, altri come i batteri acetici e i lieviti ossidativi (*Candida* spp., *Pichia* spp.) sono talvolta coinvolti nella produzione di bevande fermentate, così come *Lactobacillus* spp. *B. bruxellensis*, *S. pombe* e *S. ludwigii* sono generalmente considerati microrganismi alterativi. L'efficacia dei chitosani commerciali testati nell'abbattere la popolazione microbica sembra essere fortemente correlata a caratteri specie specifici (tabella 2).

Nell'esperimento condotto con costante agitazione del mezzo di coltura, i chitosani sono rimasti ben dispersi e sono risultati pienamente attivi nei confronti dei microrganismi. In queste condizioni, molte specie di lievito non hanno mostrato cellule vitali alla fine del test. I lieviti con la migliore attitudine fermentati-

G.1 ANDAMENTO DELLA FERMENTAZIONE ALCOLICA CONDOTTA DALLE 3 PRINCIPALI SPECIE DI LIEVITO DI INTERESSE ENOLOGICO IN PRESENZA DI CHITOSANI (1)



(1) Dati espressi come CO₂ prodotta. Dati medi di 3 misurazioni. Test Anova one-way + Tukey test, p = 0,05.

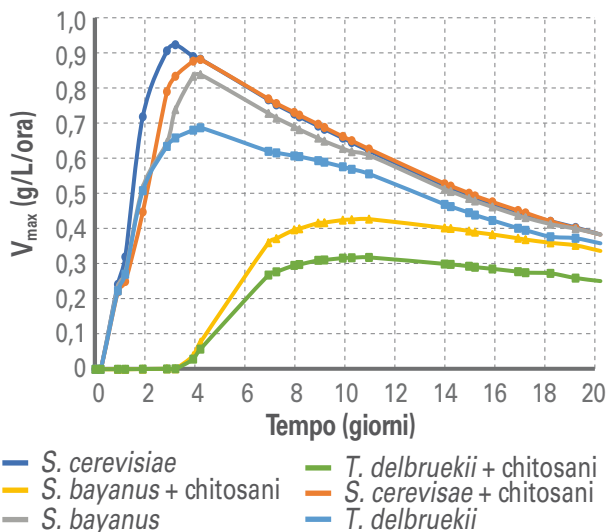
L'ELEVATO VIGORE FERMENTATIVO *S. CEREVISIAE* FA SÌ CHE NON VI SIA UN RILEVANTE RALLENTAMENTO DELLA FERMENTAZIONE ALCOLICA, DOVUTO ALLA PRESENZA DI CHITOSANO. PER GLI ALTRI DUE LIEVITI TESTATI, L'EFFETTO DELL'AGGIUNTA DI CHITOSANI È DELETERIA



va e più elevato tasso di crescita, *S. cerevisiae* e *T. delbrueckii*, hanno dimostrato una notevole resistenza ai chitosani, come per altro già osservato da altri autori. I grafici 1 e 2 mostrano l'evoluzione della CO₂ dovuta alla fermentazione alcolica condotta con 3 lieviti di interesse enologico, *S. cerevisiae*, *S. bayanus*

e *T. delbrueckii*. Sebbene nel test precedente sia stata osservata una notevole mortalità di *S. cerevisiae* in presenza di chitosani, il suo elevato vigore fermentativo fa sì che non vi sia un rilevante rallentamento della fermentazione alcolica, dovuto alla presenza di chitosano, a parte l'allungamento della fase di latenza dovuto probabilmente all'iniziale inattivazione di una parte della popolazione di lieviti. Per gli altri due lieviti testati, l'effetto dell'aggiunta di chitosani è deleteria. Nelle prove testimone, senza aggiunta di chitosano, l'evoluzione della fermentazione alcolica condotta da *S. bayanus* è simile a quella di *S. cerevisiae*, fatta eccezione per una fase di latenza leggermente maggiore. *T. delbrueckii* ha mostrato la velocità di fermentazione più bassa e non è stato capace di consumare completamente gli zuccheri, ma questo comportamento era atteso in quanto l'applicazione enologica di questo microrganismo è legata alla sua osmotolleranza e attività enzimatica secondaria, non alla sua efficienza di fermentazione. L'aggiunta di chitosano porta a un significativo peggioramento delle prestazioni fermentative in termini di fase di latenza e velocità massima di fermentazione. Inoltre, *S. bayanus* e *T. delbrueckii* sono risultati incapaci di completare il consumo di zucchero in presenza di chitosano, con un residuo rispettivamente del 20 e del 40% degli zuccheri inizialmente presenti. Si può ipotizzare che l'alterazione delle prestazioni dei lieviti venga promossa sia dai movimenti convettivi causati dalla fermentazione alcolica, che mantengono i chitosani dispersi nel mezzo, aumentandone l'efficacia come abbiamo visto nelle precedenti prove in agitazione continua, sia dall'accumulo di etanolo, che coopera con chitosani nell'alterazione della

G.2 EVOLUZIONE DELLA VELOCITÀ MASSIMA (V_{MAX}) DELLA FERMENTAZIONE ALCOLICA



L'AGGIUNTA DI CHITOSANO PORTA A UN SIGNIFICATIVO PEGGIORAMENTO DELLE PRESTAZIONI FERMENTATIVE IN TERMINI DI V_{MAX} DI FERMENTAZIONE PER *S. BAYANUS* E *T. DELBRUECKII* CHE, INOLTRE, SONO RISULTATI INCAPACI DI COMPLETARE IL CONSUMO DI ZUCCHERO IN PRESENZA DI CHITOSANO, CON UN RESIDUO RISPETTIVAMENTE DEL 20 E DEL 40% DEGLI ZUCCHERI INIZIALMENTE PRESENTI

permeabilità cellulare.

Il grafico 3 sintetizza gli esperimenti eseguiti per verificare l'effetto dei chitosani commerciali sulle 3 principali specie di batteri lattici di interesse nell'industria enologica. Secondo quanto osservato nel caso dei lieviti, emerge una diversa sensibilità delle specie testate. *Oenococcus oeni* non ha mostrato alcun rallentamento della degradazione dell'acido malico dovuto all'aggiunta di chitosani nel terreno di crescita. Al contrario, la presenza di chitosani ha alterato il comportamento di *Lactobacillus plantarum* e *Pediococcus pentosaceus*. Il ceppo di *Lactobacillus* ha completato la fermentazione malolattica, in presenza di chitosani, con un ritardo di alcuni giorni rispetto al test senza polimero, mentre nel caso di *Pediococcus* la degradazione dell'acido malico non è stata conclusa. Al contrario di quanto osservato nel caso dei lieviti, la velocità di crescita appare indipendente dalla sensibilità al chitosano, in quanto tra le tre specie *O. oeni* è sicuramente la meno vigorosa. L'efficienza nella degradazione dell'acido malico sembrerebbe correlata positivamente alla resistenza all'azione del chitosano; questa osservazione è spiegabile considerando le alterazioni che il polimero provoca nella membrana batterica, dato che la fermentazione malolattica è strettamente basata sull'equilibrio tra citoplasma e ambiente, mediato dai trasportatori di membrana. Al di là delle ipotesi sul meccanismo di resistenza, il risultato di questo test è sicuramente interessante perché i chitosani possono prevenire l'alterazione dei vini, frequentemente indotte da lattobacilli e pediococchi, senza inibire la fermentazione malolattica condotta da *O. oeni*.

T.2 EFFETTO DELL'AGGIUNTA, CON E SENZA AGITAZIONE, DI CHITOSANI A TERRENI SINTETICI (YM MEDIUM) CONTENENTI DIFFERENTI POPOLAZIONI MICROBICHE

Specie	Test con agitazione continua (log cell(Ufc)/mL)	Test statici senza agitazione (log cell(Ufc)/mL)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (¹)	7,4 ± 6,5	8,2 ± 7,4
<i>Saccharomyces bayanus</i> (¹)	2,7 ± 1,5	7,5 ± 6,7
<i>Brettanomyces bruxellensis</i> (²)	n.d.	5,6 ± 4,7
<i>Torulasporea delbruekii</i> (¹)	7,6 ± 6,8	8,1 ± 7,6
<i>Oenococcus oeni</i> (²)	6,8 ± 5,4	5,0 ± 5,3
<i>Pediococcus damnosus</i> (¹)	6,6 ± 6,0	5,2 ± 4,8
<i>Lactobacillus plantarum</i> (¹)	3,6 ± 3,4	3,5 ± 2,4
<i>Acetobacter aceti</i> (²)	6,7 ± 6,2	6,1 ± 5,1
<i>Gluconobacter oxidans</i> (²)	6,8 ± 6,3	6,5 ± 5,0
<i>Schizosaccharomyces pombe</i> (¹)	n.d.	7,7 ± 6,7
<i>Candida stellata</i> (¹)	n.d.	6,5 ± 6,7
<i>Pichia anomala</i> (¹)	1,9 ± 2,2	8,1 ± 7,5
<i>Saccharomycodes ludwigii</i> (¹)	n.d.	7,6 ± 7,7
Media ± dev. standard	6,9 ± 7,2	7,6 ± 7,7

(¹) Misurati a 3 giorni dall'aggiunta di chitosani; (²) misurati a 7 giorni dall'aggiunta di chitosani. Ufc = unità formanti colonia. n.d. = non determinabile (<2 unità log). Concentrazione nominale iniziale 7 log cell/mL. Dati medi ± deviazione standard (dati medi di 3 misurazioni).

T.3 RIDUZIONE DELLA CRESCITA DELLA POPOLAZIONE MICROBICA DOVUTA ALLA PORZIONE SOLUBILE DI CHITOSANI

Specie	Test senza chitosani	Chitosano (³)				
		3	6	4	11	12
log cell/mL						
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (¹)	7,80	3,48	3,91	n.d..	n.d.	6,80
<i>Saccharomyces bayanus</i> (¹)	7,28	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Torulasporea delbruekii</i> (¹)	7,46	n.d.	2,62	n.d..	n.d.	n.d.
<i>Brettanomyces bruxellensis</i> (²)	7,34	n.d.	n.d.	n.d..	n.d.	n.d.
<i>Oenococcus oeni</i> (²)	7,54	5,30	5,53	5,64	5,70	5,08
<i>Lactobacillus plantarum</i> (¹)	7,60	5,43	5,79	5,36	5,60	5,18

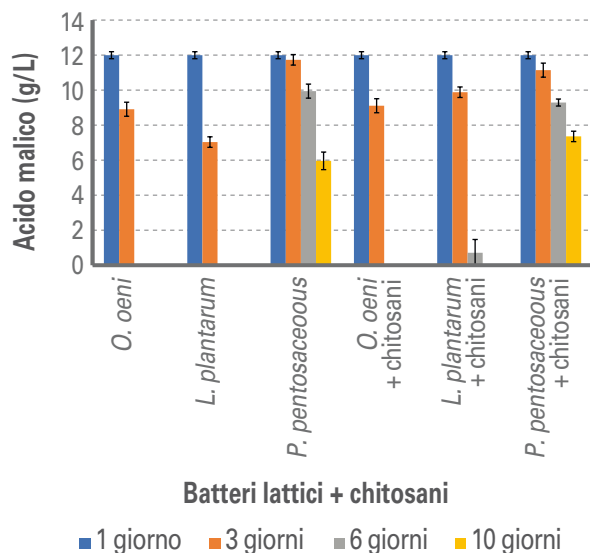
Tempo di incubazione: (¹) 3 giorni; (²) 7 giorni. n.d. = non determinabile (<2 unità log). (³) Test condotti in YM medium (pH 3,50; 7% glucosio; 10% alcol) con un inoculo iniziale di microrganismi pari a 2 log cell/mL. I numeri dei chitosani si riferiscono ai campioni di tabella 1.

IL RUOLO DELLA FRAZIONE SOLUBILE

L'esperimento di cui alla tabella 3 indaga l'effetto della porzione solubile di chitosano sui microrganismi, per capire se un trattamento con chitosani sulle uve o nelle prime fasi della produzione del vino possa interferire con le fermentazioni enologiche. L'esperimento può dare anche indicazioni riguardo alla protezione a lungo

termine del vino, eventualmente garantita dai chitosani, tenendo presente che la solubilità di questi polimeri non supera il 2% della quantità inizialmente aggiunta al vino. Le evidenze sperimentali (tabella 3) dimostrano come la presenza di una frazione solubile residua di chitosano abbia una notevole efficacia nel ridurre l'attività fermentativa di tutte le specie di lievito considerate, ad

G.3 DEGRADAZIONE DELL'ACIDO MALICO
CONDOTTA DALLE 3 PRINCIPALI SPECIE
DI BATTERI LATTICI IN PRESENZA
DI CHITOSANI



La barra sopra gli istogrammi indica la media (dati medi di 3 misurazioni) + deviazione standard. Test Anova one-way + Tukey test, p = 0,05.

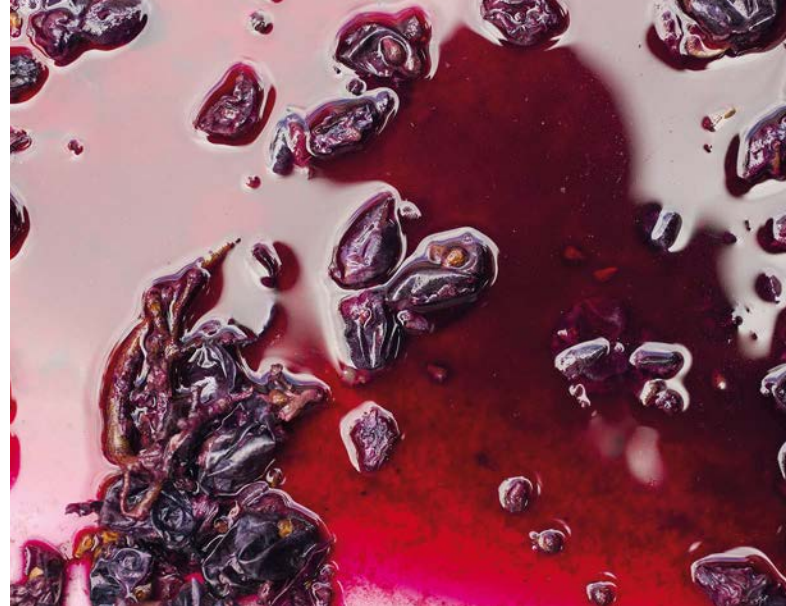
OENOCOCCUS OENI NON HA MOSTRATO ALCUN RALLENTAMENTO DELLA DEGRADAZIONE DELL'ACIDO MALICO DOVUTO ALL'AGGIUNTA DI CHITOSANI. AL CONTRARIO DI *LACTOBACILLUS PLANTARUM* E *PEDIOCOCCUS PENTOSACEUS*: IL PRIMO HA COMPLETATO LA FERMENTAZIONE MALOLATTICA CON UN RITARDO DI ALCUNI GIORNI, MENTRE CON *PEDIOCOCCUS* LA DEGRADAZIONE DELL'ACIDO MALICO NON È STATA CONCLUSA

eccezione di alcuni formulati commerciali di chitosano prodotti da funghi che consentono lo sviluppo, seppur modesto, di *S. cerevisiae* e *T. delbrueckii*. Per i batteri, in accordo con i test precedenti, l'effetto dei chitosani non è così evidente come nel caso dei lieviti, dato che la popolazione diminuisce di circa due ordini di grandezza, senza tuttavia annullarsi.

Certamente, le popolazioni microbiche residue osservate possono provocare, in condizioni adeguate, una eccessiva ricontaminazione del vino. Dunque, non è possibile affermare che i chitosani siano in grado di garantire stabilità microbica a lungo termine. Tuttavia, il loro utilizzo precoce, prima della conclusione della fermentazione alcolica e malolattica deve essere valutato con attenzione per non incontrare problemi

Glossario

YM MEDIUM È UN TERRENO DI CRESCITA SELETTIVA A BASSO pH, UTILE PER LA COLTIVAZIONE DI LIEVITI, MUFFE O ALTRI ORGANISMI RESISTENTI AGLI ACIDI O ACIDOFILI



nell'avvio della fermentazione malolattica. Ulteriori studi in condizioni reali, cioè utilizzando mosto d'uva, saranno necessari per confermare le complesse interazioni tra chitosani e microrganismi.

INTERAZIONE CON LIEVITI E BATTERI

In conclusione, i chitosani sono un agente promettente per un controllo efficace dei microrganismi alterativi in ambito enologico. Contribuiscono inoltre al miglioramento della sicurezza alimentare dei vini, perché riducono l'accumulo di composti tossici, come le ammine biogene, dovuto all'attività dei microrganismi alterativi, senza residuare nel prodotto poiché quasi il 98% del chitosano è stato facilmente rimosso dal mezzo dopo il trattamento. Tuttavia, il presente studio dimostra la potenziale attività inibitoria dei chitosani verso i microrganismi coinvolti nelle fermentazioni enologiche, sottolineando la necessità di un uso attento di questo polimero, in particolare nelle prime fasi del processo di

produzione enologica. La massima efficacia del chitosano è stata osservata in prove condotte in costante agitazione; questa osservazione indica che l'azione antimicrobica dei chitosani sia da imputare principalmente alla loro tossicità e non alla separazione fisica indotta dal polimero delle cellule dal vino. I chitosani sono

dunque un potente strumento di controllo contro le alterazioni microbiche del vino; un'attenta validazione nei confronti delle specie microbiche di interesse e nelle specifiche condizioni d'uso è tuttavia necessaria per sfruttare al meglio le loro potenzialità.

**Raffaele Guzzon, Tiziana Nardin
Roberto Larcher**

Fondazione Edmund Mach, San Michele all'Adige (Trento)



www.viteevino.it



Edizioni L'Informatore Agrario

Tutti i diritti riservati, a norma della Legge sul Diritto d'Autore e le sue successive modificazioni. Ogni utilizzo di quest'opera per usi diversi da quello personale e privato è tassativamente vietato. Edizioni L'Informatore Agrario S.r.l. non potrà comunque essere ritenuta responsabile per eventuali malfunzionamenti e/o danni di qualsiasi natura connessi all'uso dell'opera.