

**ALMA MATER STUDIORUM - UNIVERSITÀ DI BOLOGNA CAMPUS  
DI CESENA SCUOLA DI AGRARIA E MEDICINA VETERINARIA  
CORSO DI LAUREA IN SCIENZE E TECNOLOGIE ALIMENTARI**

**TITOLO DELLA TESI  
ALTERNATIVE ALL'USO DELL'ANIDRIDE SOLFOROSA**

**Tesi di laurea in Operazioni unitarie**

**Relatore  
Claudio Riponi**

**Presentata da  
Giacomo Cresta**

**Sessione: Terza**

**Anno Accademico 2016/2017**

*La vita è troppo breve  
per bere vini mediocri.*

Johann Wolfgang von Goethe (1749 – 1832)

Introduzione	4
<b>1-Anidride solforosa</b>	6
1.1 Introduzione	
1.2 Caratteristiche tecnologiche dell'anidride solforosa	7
1.3 Legislazione europea	12
1.4 Effetti indesiderati del biossido di zolfo sul vino	14
1.5 Tossicità del biossido di zolfo (SO <sub>2</sub> )	15
<b>2 -Lisozima -</b>	
2.1 Introduzione	19
2.2 Proprietà tecnologiche del lisozima.	20
2.3 Legislazione e normativa europea	25
<b>3- Tannini enologici</b>	27
3.1 Introduzione	
3.2 Classificazione dei tannini	29
3.3 Proprietà tecnologiche	33
<b>4- Chitosano</b>	39
4.1 Introduzione	
4.2 Proprietà tecnologiche	41
4.3 Uso del chitosano in campo enologico	44
Conclusioni	43
Bibliografia	45

# Introduzione.

L'anidride solforosa presenta notevoli vantaggi tecnologici nella produzione vitivinicola, ma allo stesso tempo in essa sono presenti caratteristiche tossiche e limiti di assunzione per l'uomo che sono determinati dalla FAO-O.M.S.

Con l'entrata in vigore del D.Lgs. 144/06 del 23/03/2006, comunemente chiamata "direttiva degli allergeni" diviene importante eliminarne o anche solo ridurre l'impiego.

- L'anidride solforosa, in quanto citata nell'allegato 1B del suddetto decreto, viene definita come allergene e pertanto necessita di una normativa nazionale in materia di etichettatura dei prodotti contenenti allergeni alimentari.

Tale normativa stabilisce il limite, 10 mg/L, sopra al quale deve essere dichiarata in etichetta la presenza di solfiti o anidride solforosa.

L'obbligo è vigente dal 24/10/2005 determinato dal regolamento CE 1991/04.

Dopo la pubblicazione di questa legge è aumentato l'interesse della ricerca di possibili alternative all'anidride solforosa in uso, con l'obiettivo di mantenere le stesse proprietà tecnologiche pur soddisfacendo anche le esigenze salutistiche del consumatore, le caratteristiche dell'alimento e mantenendo sempre la sicurezza alimentare del prodotto finito. Si consideri anche il vantaggio commerciale di poter offrire un prodotto sul quale, nell'etichetta, viene marcata la voce che indica l'assenza di anidride solforosa.

Da parte delle aziende vi è stata e vi è la disponibilità a cercare di ottenere un prodotto senza l'utilizzo di essa, e diverse aziende hanno immesso sul mercato varie tipologie di prodotto, ma non tutti stabili per lunghi periodi. Bisogna poi sottolineare che i lieviti normalmente producono solfiti a diverso dosaggio, pertanto è necessario utilizzare quelli che producono una quantità inferiore ai 10 mg/L.

Nel momento in cui viene introdotta artificialmente l'anidride solforosa non deve superare il limite stabilito e la presenza deve essere sempre dichiarata con l'apposita dicitura “contiene solfiti”.

# CAPITOLO 1

## ANIDRIDE SOLFOROSA

### 1.1 Introduzione

Il principale additivo utilizzato in campo enologico per la prevenzione delle alterazioni del vino è il biossido di zolfo noto come anidride solforosa.

La  $\text{SO}_2$  ( $\text{pm}=64 \text{ g/mole}$ ) è un gas incolore, dal tipico odore acre e pungente che deriva dalla combustione dello zolfo. Presenta un tasso di solubilità in acqua pari a 39:1, ed è molto irritante per le vie respiratorie e gli occhi. È reperibile anche allo stato liquido e solido cristallizzato (fig 1.1). (Ribereau et al, 2004).



Figura 1.1 Sali di anidride solforosa

L'aggiunta di anidride solforosa nel vino è permessa dalla legislazione italiana per valori massimi che variano da 150 mg/l per i vini rossi a 200 mg/l per i vini bianchi e rosati. La  $\text{SO}_2$  può essere utilizzata in forma gassosa, tramite l'utilizzo di bombole compresse, in forma solida (metabilsolfito di potassio) e liquida (acido solforoso).

Nel vino l'anidride solforosa è presente nelle due forme libera e totale; la frazione libera è la più attiva nei confronti dei microrganismi e varia in maniera

inversamente proporzionale al pH. Le forme di anidride solforosa libera presenti nel vino sono:  $\text{H}_2\text{SO}_3$  o solforosa molecolare (frazione non dissociata),  $\text{HSO}_3^-$  o ione bisolfito (frazione semidissociata);  $\text{SO}_3^-$  o ione solfito (frazione completamente dissociata). La forma piú attiva contro i microrganismi è la  $\text{H}_2\text{SO}_3$  e rappresenta il 0,6 – 6,0% della frazione totale. Lo ione bisolfito è la forma piu presente nel vino, ma si lega facilmente ad acetaldeide, glucosio, chinoni, antocianine e cheto-acidi. Infine lo ione solfito è presente solamente in tracce.

La frazione di anidride solforosa totale è la somma delle due frazioni  $\text{SO}_2$  libera e  $\text{SO}_2$  combinata (fig. 2.2). Infatti la  $\text{SO}_2$  forma dei legami con il gruppo carbonilico dei costituenti del vino sopra citati passando alla forma combinata e perdendo quasi totalmente la sua azione antimicrobica. La reazione può essere piú o meno reversibile, dipende dalla molecola che si forma: se la  $\text{SO}_2$  si lega con acetaldeide si forma un composto stabile, mentre se si lega con zuccheri o acidi la reazione è reversibile (Zinnai et al 2005).

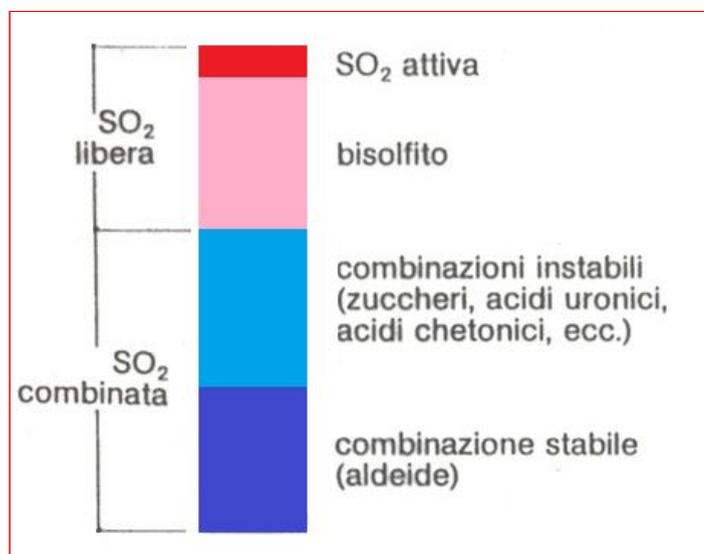


Figura 1.2 Rappresentazione grafica delle frazioni di anidride solforosa

## 1.2 Caratteristiche tecnologiche dell'anidride solforosa

Nella tabella 1.1 sono riportate le principali forme di anidride solforosa libera e le loro proprietà. Riassumendo, le principali proprietà della  $\text{SO}_2$  sono tre:

- 1- Antisettica: le due principali attività antisettiche sono l'azione selezionatrice della microflora dei mosti e l'azione antimicrobica nella conservazione dei vini;
- 2- Antiossidante: in presenza di catalizzatori combina l'ossigeno disciolto; questa lenta reazione consente di proteggere i vini da ossidazioni di natura chimica, come ad esempio l'ossidazione di alcuni polifenoli e di alcune sostanze aromatiche;
- 3- Antiossidasica: inibisce l'effetto, e talvolta ne determina la distruzione, degli enzimi ossidasici nel mosto, tirosinasi e laccasi principalmente.

Ne risulta una protezione per i mosti dalle ossidazioni prefermentative. Il biossido di zolfo può essere aggiunto come antimicrobico nel vino e nel mosto sottoforma di diversi prodotti commerciali: solforosa liquida, soluzione solfitante, metabisolfito di potassio (polvere, granulare o in pastiglie effervescenti). Come detto in precedenza la  $\text{SO}_2$  molecolare nel vino si trasforma in acido solforoso ( $\text{H}_2\text{SO}_3$ ) che in relazione al pH risulterà più o meno salificato. I sali più comuni sono il bisolfito di potassio ed il metabisolfito di potassio rispettivamente con il 53,0% e con il 57,5% di anidride solforosa.

PROPRIETÁ	$\text{SO}_2$ (molecolare)	$\text{HSO}_3^-$ (libera)	R- $\text{SO}_3^-$ (combinata)
Antilievito	+++	+	-
Antibatterica	+++	+	+
Antiossidante	+++	+++	-
Antiossidasica	+++	+++	-
Odore	piccante	nessuno	nessuno
Sapore	piccante	Salato, amaro	nessuno

Tabella 1.1 Proprietà enologiche dell'anidride solforosa

La  $\text{SO}_2$  viene aggiunta nei mosti (tramite solfitazione delle uve) con azione antiossidante, principalmente per inibire le attività della polifenolossidasi (PPO) e della tirosinasi ed evitare le reazioni ossidative non enzimatiche che causano la precipitazione dei flavonoidi (Singleton et al 1985). Il biossido di zolfo presenta un forte potere riducente e viene aggiunto nei mosti appena ottenuti per proteggerli dalle reazioni di ossidazione (fig 1.3), fino a che non inizia la fermentazione.

Nei vini bianchi e rossi la  $\text{SO}_2$  viene impiegata per il suo potere antiossidante. L'azione antiossidante è dovuta alla capacità della  $\text{SO}_2$  di neutralizzare il perossido di idrogeno, un prodotto della reazione di riduzione di  $\text{O}_2$ , evitando le reazioni di ossidazione di etanolo e acetaldeide (Barril et al., 2012; Siomis, 2006). Infatti quando i fenoli si ossidano, reagendo con  $\text{O}_2$ , si forma in soluzione acqua ossigenata che ossida a sua volta i polifenoli e le aldeidi.  $\text{O}_2$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$  vengono ridotti dalla anidride solforosa libera che si ossida a solfato.

Il biossido di zolfo svolge anche un'azione antisettica nei vini, nei confronti di diversi microrganismi. La sua azione antisettica è direttamente proporzionale alla concentrazione di  $\text{SO}_2$  libera presente nel vino, infatti, come citato in precedenza, l'anidride solforosa combinata perde gran parte delle sue proprietà.

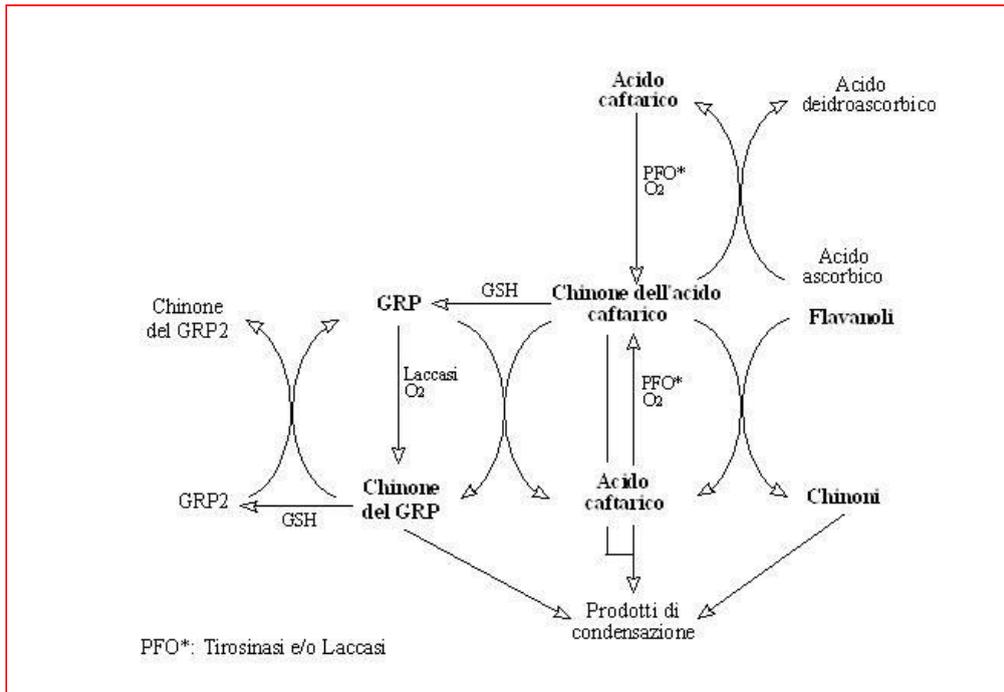


Figura 1.3 Ossidazione dei fenoli nel mosto (Oliveira et al, 2011).

Precedentemente è stato riportato come l'utilizzo della SO<sub>2</sub> prevenga l'ossidazione nei mosti e ne mantenga la stabilità fino ad inizio fermentazione, ma la sua azione continua grazie ai residui, che persistono fino alla fine della fermentazione alcolica, proteggendo il mosto in questa fase delicata, dallo sviluppo di contaminazioni batteriche e le conseguenti produzioni di effetti e molecole indesiderate, ad esempio la produzione di acidità volatile (Barril et al., 2012).

Il biossido di zolfo viene impiegato anche nelle fasi successive alla fermentazione. Infatti contrasta la proliferazione di diverse specie microbiche come lieviti, batteri lattici e malolattici ed inibisce lo sviluppo degli acetobacter evitando variazioni compositive indesiderate. (Siomis, 2006).

L'anidride solforosa viene molto usata nei vini dolci (mutizzazione) per prevenire le fermentazioni secondarie e proteggerli dall'azione microbica dei *Brettanomyces* spp., i maggiori responsabili dei difetti organolettici dei vini

dovuti alla produzione indesiderata di etil-fenoli. Un altro difetto che viene scongiurato dall'utilizzo di  $\text{SO}_2$  è il sentore di svanito.

La solfitazione delle uve rosse favorisce l'estrazione dei pigmenti del vino, azione importantissima per la vinificazione in rosso. Infatti l'anidride solforosa esercita una capacità solvente su antociani, tannini e aromi presenti nelle bucce degli acini d'uva. Questo effetto viene mascherato dalla temporanea combinazione degli antociani con  $\text{SO}_2$  formando dei composti incolore, ma questa reazione è reversibile, quindi, alla fine della fermentazione, il colore degli antociani riapparirà nel vino (fig 1.4).

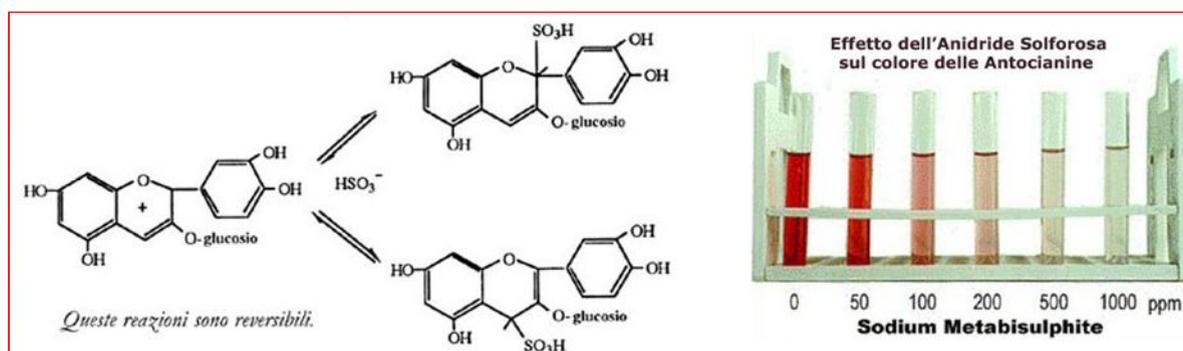


Figura 1.4 Proprietà enologiche dell'anidride solforosa

L'anidride solforosa svolge anche un'azione chiarificante: (1) diretta, se aggiunta ad alte concentrazioni, legandosi ai colloidi di carica negativa come per esempio i tannini, comportandosi da acido e provocandone la flocculazione (2) indiretta, è il metodo recentemente più utilizzato, ed è dovuto all'azione antimicrobica costante esercitata sulla carica batterica e fungina del mosto in fermentazione.

### **1.3 Legislazione europea**

Precedentemente abbiamo riportato come i dosaggi di SO<sub>2</sub> siano severamente regolamentati dalla legislazione europea (regolamenti CE n° 606/2009 e 479/2008). La stessa normativa prevede l'obbligo di scrivere in etichetta la dicitura "contiene solfiti". In particolare l'allegato I B definisce i limiti massimi di biossido di zolfo nei vini rossi pari a 150 mg/l e per i vini bianchi e rosati pari a 200 mg/l.

Il regolamento stabilisce che per i vini con un tenore zuccherino, pari o superiore a 5 g/l (zuccheri semplici) si possono raggiungere i 200 mg/l per i vini rossi e i 250 mg/l per i vini bianchi e rosati (tab. 1.2).

Tipo di vino - Categorie come nel Regolamento (CE) n 606/2009	Limiti di SO2 per il vino convenzionale come nel Regolamento (CE) n 606/2009	Limiti di SO2 per il vino biologico 203/2012	Riduzione di SO2 nel vino biologico	
			Assoluto	Relativo (%)
<b>Vini rossi</b> [Allegato I B - A] paragrafo 1a – <b>zucchero residuo* &lt; 5g/L</b>	150 mg/L	100 mg/L <b>zucchero residuo &lt;2g/L</b> 120 mg/L <b>zucchero residuo* &gt;2g/L and &lt; 5g/L</b>	-50 mg/L -30 mg/L	-33% -20%
<b>Vini rossi</b> [Allegato I B - A] paragrafo 2a – <b>zucchero residuo* ≥ 5g/L</b>	200 mg/L	170 mg/L	-30 mg/L	-15%
<b>Vini bianchi &amp; rosé</b> [Allegato I B - A] paragrafo 1b – <b>zucchero residuo* &lt; 5g/L</b>	200 mg/L	150 mg/L <b>zucchero residuo* &lt;2g/L</b> 170 mg/L <b>zucchero residuo* &gt;2g/L and &lt; 5g/L</b>	-50 mg/L -30 mg/L	-25% -15%
Vini bianchi & rosé [Allegato I B - A] paragrafo 2b – <b>zucchero residuo* ≥ 5g/L</b>	250 mg/L	220 mg/L	-30 mg/L	-12%
<b>Vini speciali</b> [Allegato I B - A] (Lista dei paesi**) <ul style="list-style-type: none"> <li>paragrafo 2 c</li> <li>paragrafo 2 d</li> <li>paragrafo 2 e</li> <li>paragrafo 4 – condizioni meteorologiche***</li> </ul>	300 mg/L 350 mg/L 400 mg/L + 50 mg/L	270 mg/L 320 mg/L 370 mg/L (la stessa CMO + 50 mg/L)	-30 mg/L -30 mg/L -30 mg/L	-10% -8.5% -7.5%
<b>Vini liquorosi</b> [Allegato I B – B] <b>zucchero residuo &lt; 5g/L</b>	150 mg/L	120 mg/L	-30 mg/L	-20%
<b>Vini liquorosi</b> [Allegato I B – B] <b>zucchero residuo ≥ 5g/L</b>	200 mg/L	170 mg/L	-30 mg/L	-15%
<b>Vini spumanti</b> [Allegato I B - C] <ul style="list-style-type: none"> <li>paragrafo 1a – vini spumanti di qualità</li> <li>paragrafo 1b – altri vini spumanti</li> <li>paragrafo 2 – condizioni meteorologiche***</li> </ul>	185 mg/L 235 mg/L +40 mg/L	155mg/L 205mg/L (la stessa CMO + 40 mg/L)	-30 mg/L -30 mg/L	-16% -13%

Per alcuni vini, elencati qui di seguito, il limite massimo può essere di 300 mg/l: Spätlese, Bordeaux supérieur, Graves de Vayres, Côtes de Bordeaux-Saint-Macaire, Premières Côtes de Bordeaux, Côtes de Bergerac, Haut Montravel, Côtes de Montravel, Gaillac, Rosette e Savennières, Allela, Navarra, Penedès, Tarragona e Valencia, Binissalem-Mallorca, Tokai, Tokaji édes szamorodni, Tokaji szàraz szamorodni, i passiti o i vini ottenuti da vendemmia tardiva, Picolit, Moscato di Pantelleria naturale e Moscato di Pantelleria, pozdní sběr, neskorý zber, pozna trgatev, Vin de pays de

Franche-Comté, Vin de pays des coteaux de l'Auxois, Vin de pays de Saône-et-Loire.

Per i vini liquorosi la normativa prevede un limite di 150 mg/l se il tenore di zuccheri è inferiore a 5 g/l e di 200 mg/l se il tenore di zuccheri è pari o superiore a 5 g/l. Negli spumanti il tenore di SO<sub>2</sub> può arrivare a 185 mg/l per tutte le categorie di vini spumanti di qualità e 235 mg/l per gli altri vini spumanti (tab 1.2).

Nel caso della produzione biologica l'anidride solforosa può essere aggiunta, ma non deve superare il limite massimo di 100 mg/l per i vini rossi, 150 mg/l per i vini bianchi e rosati (tab 1.2).

#### **1.4 Effetti indesiderati del biossido di zolfo sul vino**

La SO<sub>2</sub> aggiunta nel vino non svolge solamente un'azione benefica, ma presenta diversi aspetti negativi non soltanto salutistici, come vedremo nel prossimo paragrafo, ma anche relazionati direttamente alle caratteristiche qualitative del vino. L'aggiunta di solfiti ostacola la fermentazione del mosto, infatti i lieviti utilizzati per la vinificazione, nonostante siano ceppi resistenti alla SO<sub>2</sub> faticano nelle fasi iniziali della fermentazione ad adattarsi a questo additivo; ne risulta un allungamento del tempo di fermentazione (Saccheri, 1999).

I peggiori inconvenienti sono dovuti alle aggiunte eccessive di SO<sub>2</sub> che possono causare la comparsa di cattivi odori, difetti sensoriali, aromi sgradevoli del vino durante la conservazione (Li et al, 2008); l'aggiunta sconsiderata di SO<sub>2</sub> va quindi evitata non soltanto per il pericolo di incorrere in sanzioni economiche, ma anche perché causa un abbassamento della qualità del prodotto.

I vini che restano a contatto per lungo tempo con le fecce, in presenza di anidride solforosa e in assenza di ossigeno, assumono degli off-flavour tipici dei composti solforati (mercaptani e idrogeno solforato) come uova marce, con odore pungente e retrogusto sgradevole. Anche il difetto definito di "svanito" è

causato dall'incremento dell'aldeide acetica che si forma nelle condizioni fortemente riducenti descritte precedentemente.

Gli stessi difetti sopra descritti compaiono anche in caso di un mosto povero in sostanze nutritive, nel quale i lieviti, per sopravvivere, sono costretti a degradare diversi composti fra cui i solfiti (Sacheri, 1999).

### 1.5 Tossicità del biossido di zolfo (SO<sub>2</sub>)

L'anidride solforosa può essere tossica e creare irritazioni di vario genere, se inalata o ingerita è rispettivamente corrosiva ed irritante per le vie respiratorie ed il tubo digerente (Romano e Suzzi, 1993).

Il principale effetto negativo dell'anidride solforosa, in individui non affetti da ipersensibilità, avviene indirettamente a carico del metabolismo degli zuccheri (sviluppo del diabete) a causa dell'azione degradativa sulla tiamina (vitamina B1; fig 1.5) e la conseguente sua carenza.

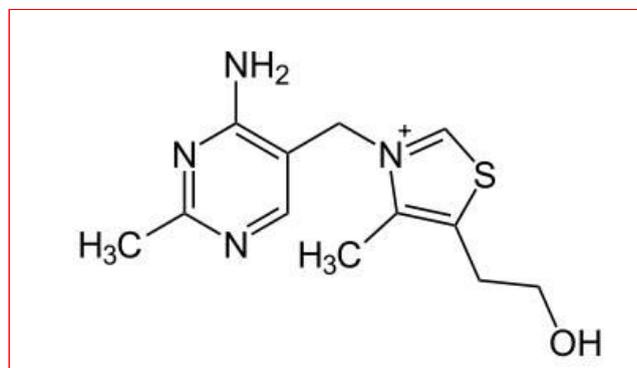


Figura 1.5 Vitamina B1 o Tiamina

Reazioni allergiche ai solfiti si manifestano per assunzioni di dosi molto basse (dell'ordine del milligrammo) e riguardano principalmente i soggetti asmatici (dal 4 al 10 % degli individui). Gli individui affetti da asma devono prestare molta attenzione alla SO<sub>2</sub> ingerita, infatti vanno incontro ad asma, difficoltà respiratoria, fiato corto, respiro affannoso e tosse. Gli asmatici devono quindi limitare il consumo di biossido di zolfo il più possibile poiché le

conseguenze possono essere gravi ed in alcuni casi fatali (Taylor et al, 1986; Herbst-Johnstone et al, 2011).

La Dose Giornaliera Ammissibile (DGA) stabilita dalla Organizzazione Mondiale per la Sanità (OMS) è di 0,7 mg di SO<sub>2</sub> giornalieri per kg di peso corporeo. Quindi facendo un semplice calcolo aritmetico ne consegue che un uomo di 75 kg ha una dose giornaliera ammissibile di 52,5 mg di SO<sub>2</sub> ed in teoria potrebbe bere nell'arco di 24 ore una bottiglia di un vino rosso di qualità, contenente al massimo 50 mg/litro di solforosa.

Non dobbiamo però sottostimare la dose di solforosa assimilata, infatti l'anidride solforosa e i suoi derivati oltre al settore enologico, vengono impiegati come additivo in molti settori del comparto alimentare e si trova in molti alimenti che ingeriamo quotidianamente (tab. 1.3): baccalà, gamberi e conserve, crostacei freschi o congelati, frutta secca, prodotti sott'aceto e sott'olio, marmellate e confetture, aceto, bevande a base di succo di frutta, funghi secchi, farine e fiocchi di patate (Vally e Thompson, 2001).

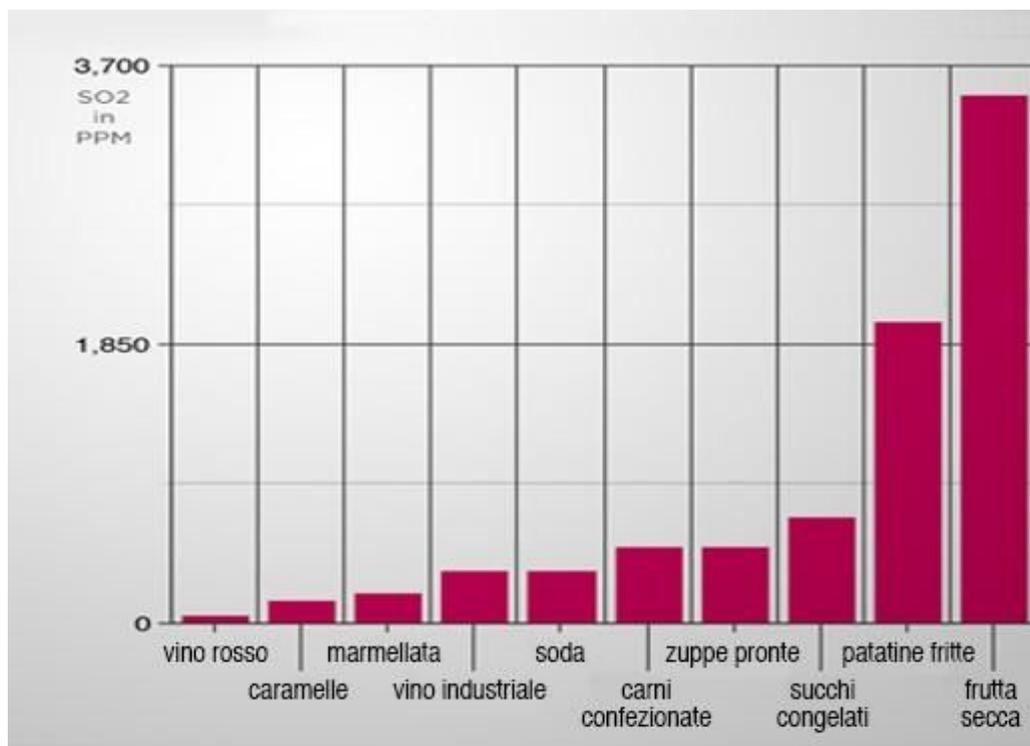


Tabella 1.3 contenuto di SO<sub>2</sub> in ppm in alcuni prodotti alimentari

La conversione dei solfiti in solfati, all'interno del nostro apparato digerente, avviene grazie all'intermediazione di una emoproteina, la solfito-ossidasi, che agisce in ambiente acido (stomaco). Se la dose ingerita di biossido di zolfo supera i 3,5 mg/kg di peso corporeo si va incontro ad avvelenamento acuto. L'irritazione gastrica dipende dal fatto che i solfiti, a reazione decisamente acida, liberano anidride solforosa, che provoca una sensazione dolorosa accompagnata a vomito. Un sintomo frequente dovuto alla ingestione di una dose elevata di anidride solforosa è la sensazione del "cerchio alla testa" che si verifica in seguito all'azione della solfito-ossidasi che utilizza l'ossigeno nella sintesi dei solfati, limitandone l'afflusso al cervello. Questo sintomo non compare con la stessa gravità su tutti gli individui in quanto non tutti gli individui metabolizzano la SO<sub>2</sub> allo stesso modo, infatti ci sono soggetti che sono predisposti geneticamente alla produzione di un enzima che neutralizza la SO<sub>2</sub> ingerita (Romano e Suzzi, 1993; Vally e Thompson, 2001).

A causa degli effetti negativi sulla qualità del prodotto provocate da alte dosi di SO<sub>2</sub> e a causa degli effetti collaterali sulla salute degli esseri umani, si cerca da diversi anni di ridurre il contenuto nei vini. In particolare modo si cerca di sostituirla con altre sostanze che svolgono le stesse azioni o azioni simili (antiossidante, antiossidasica e antibatterica). Sebbene sia molto difficile sostituire un prodotto ad alto spettro di azione come la SO<sub>2</sub>, nei prossimi capitoli vedremo come si sono riscontrati buoni risultati con la lisozima, i tannini, il chitosano, (Sonni et al, 2009; Sonni et al, 2011; Chinnici et al, 2014)

Lavori precedenti hanno mostrato come la lisozima e i tannini da vinificazione possono essere utilizzati come sostituti nel controllo della attività batterica indesiderata e nella ossidazione dei fenoli.

Il lisozima previene lo sviluppo di attività batteriche indesiderate.

Gli esteri, nel loro totale, vengono influenzati dalle diverse aggiunte di tannini, mentre esteri etilici di acidi grassi a media catena e i loro corrispondenti acidi grassi sono stati trovati in quantità maggiore in vini provenienti dalla fermentazione con lisozima.

L'analisi sensoriale ha rivelato una preferenza per i vini a cui sono stati aggiunti lisozima e tannini. Pertanto la combinazione di lisozima e tannini, può rappresentare una valida alternativa all'impiego di  $\text{SO}_2$ . (Sonni et al, 2009)

## CAPITOLO 2

### Liozima

#### 2.1 Introduzione

Il liozima è un enzima delle glicosidasi, di origine animale, costituito da 129 amminoacidi (14,4 kilodalton); svolge un'attività antibatterica attaccando la parete cellulare dei batteri (peptidoglicano) favorendo la rottura del legame beta 1,4 tra l'acido N-acetilmuramico (NAM) e la N-acetilglucosamina (NAG).

Il liozima riduce la carica elettrica negativa superficiale della cellula batterica rendendo più facile il processo di fagocitosi del batterio da parte del sistema immunitario. Il liozima presenta una struttura secondaria con prevalenza di foglietti beta e in minor parte alfa elica (fig 2.1). La sua configurazione tridimensionale, priva di gruppi prostetici (parti delle proteine non polipeptidiche) è garantita dalla presenza di quattro ponti disolfuro.

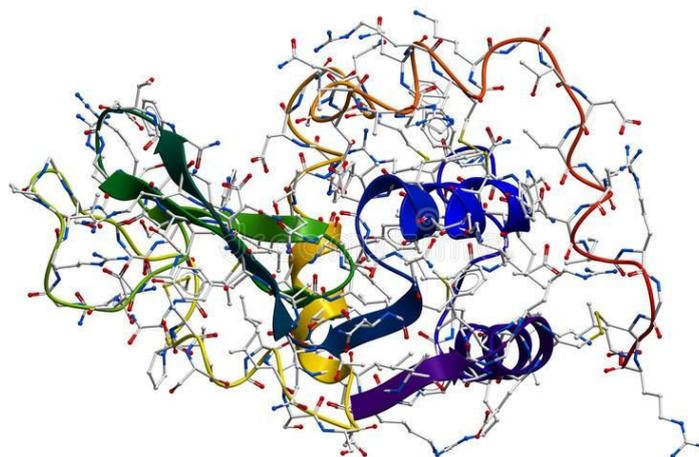


Figura 2.1 Molecola del Liozima

Il liozima si trova in concentrazioni elevate nell'albume d'uovo, ma lo si trova anche in numerose secrezioni animali e umane come lacrime e saliva.

La CEE, con il regolamento numero 2066 del 2001, ha permesso l'aggiunta di lisozima nel vino. L'enzima viene estratto dall' albume, ed è in grado di inibire la crescita dei batteri lattici senza danneggiare i lieviti. Il lisozima viene commercializzato come polvere di colore bianco, che si mantiene anche per più di 5 anni ad una temperatura di 20°C; volge la sua azione antibatterica in un range di pH ottimale che va da 3,0 a 9,0, ma la sua azione è significativa solo sui batteri Gram+ dei quali, come citato in precedenza, distrugge la parete cellulare, e quindi sul lato pratico in campo enologico ha un effetto rilevante solo sui batteri lattici e non sui lieviti e sui batteri acetici (Gerland e Bellachioma, 2006).

## **2.2 Proprietà tecnologiche del lisozima.**

Il lisozima viene utilizzato in campo enologico prevalentemente per:

- 1) arresto della fermentazione malolattica in modalità preventiva ed ottenimento di fermentazioni "pulite" (Gerland e Bellachioma2006);
- 2) bloccare le fermentazioni lattiche e quindi evitare il difetto di “spunto”;
- 3) gestione di fermentazioni stentate o di arresti di fermentazione;
- 4) stabilizzazione microbiologica a seguito della fermentazione malolattica.

Prima dell'utilizzo il lisozima, commercializzato in forma essiccata, deve essere correttamente reidratato, evitando la formazione di schiuma. Il prodotto deve essere miscelato con cura ed in maniera uniforme su tutta la massa da trattare. Infatti se anche soltanto una piccola parte dei batteri non entra a contatto con il lisozima, il trattamento risulterà vano (Gerland e Bellachioma, 2006).

L'aggiunta del lisozima durante l'ammestamento aiuta ad evitare livelli eccessivi di acidità volatile causata dal metabolismo dei numerosi batteri lattici e lactobacilli presenti (fig 2.2), specialmente nel corso di annate particolarmente calde o di uve colpite da botritis e marciumi. In queste condizioni sia per i vini bianchi o rossi è consigliabile utilizzare il lisozima all'inizio della fase di

fermentazione, ad un dosaggio compreso tra lo 0,7 e 2% (Gerland et al, 2006). Infatti il lisozima è in grado di ridurre la competizione dei batteri nei confronti dei lieviti, favorendo quindi la fermentazione alcolica a scapito della produzione di acidità volatile.

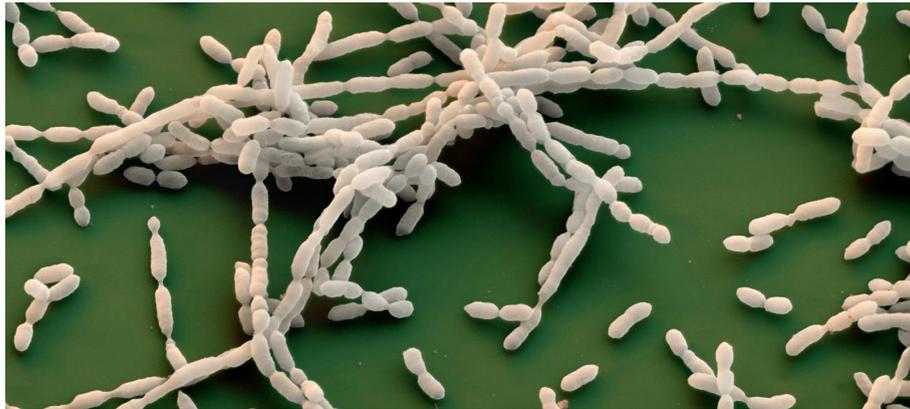


Figura 2.2 Molecola del Lisozima

Le proprietà antibatteriche del lisozima possono essere influenzate negativamente da alcune operazioni di chiarifica del vino. Infatti Amati et al. (1996) hanno scoperto che alcuni agenti di chiarifica come la bentonite e il carbone attivo, se usati in dosi elevate, annullano completamente l'attività dell'enzima sia nei mosti che nei vini, mentre per dosi inferiori ne diminuiscono l'efficacia in maniera direttamente proporzionale. Questo andamento è stato ancor più negativo nei vini ricchi in polifenoli. Al contrario, la gelatina in polvere ed il caseinato di potassio non hanno nessun effetto inibente sull'azione antibatterica del lisozima, anche se utilizzati ad alti dosaggi. Infine altre operazioni di cantina come centrifugazione, filtrazione e refrigerazione non hanno influenzato l'azione del lisozima.

Se il lisozima viene utilizzato nei mosti non chiarificati i solidi presenti in sospensione (per esempio i polifenoli) possono formare forti legami con il lisozima, annullando le sue proprietà, perciò è necessario rimuovere le sospensioni tramite filtrazione o centrifugazione (Delfini, et al. 2004); questo è confermato dal fatto che il lisozima vive più a lungo nei vini bianchi piuttosto

che nei vini rossi. Al contrario della  $\text{SO}_2$ , l'attività antimicrobica del lisozima è maggiore per pH elevati, di conseguenza è più efficace nel prevenire alterazioni nei vini a pH elevato.

Quanto sopra proverebbe dunque una veloce complessazione di lisozima con i colloidali ed i solidi in sospensione.

Durante la fermentazione il lisozima può essere aggiunto per ridurre il contenuto di anidride solforosa ed evitare in questo modo gli effetti negativi della  $\text{SO}_2$ . Il lisozima è in grado di sostituire con successo la  $\text{SO}_2$  nel controllo della fermentazione malolattica. Inoltre il lisozima aggiunto in fermentazione influenza la produzione in alcoli; infatti i mosti fermentati in presenza di lisozima presentano una minor concentrazione di alcoli totali rispetto a quelli fermentati con  $\text{SO}_2$ . Allo stesso modo l' $\text{SO}_2$  favorisce positivamente la produzione degli acidi. I mosti fermentati unitamente con lisozima hanno infine portato ad un vino con una maggiore quantità di esteri etilici a media catena ed i loro corrispondenti acidi grassi (Sonni et al. 2009).

L'analisi sensoriale dei vini a cui è stato aggiunto lisozima, assieme ai tannini enologici, risulta con un profilo aromatico più fruttato.

L'utilizzo del lisozima è quindi una concreta alternativa al biossido di zolfo, e di conseguenza può portare ad aprire nuove possibili nicchie di mercato, facenti leva sulla salubrità dei vini denominati "  $\text{SO}_2$  free" (Sonni et al. 2009).

Nei vini di qualità superiore, per i quali si utilizza un uva molto matura ad elevato grado zuccherino, si incorre spesso in problemi di fermentazione stentate ed arresti di fermentazione, a causa dell'elevato contenuto di alcol e con probabile aumento di acidità volatile causata dai batteri presenti. Il trattamento con  $\text{SO}_2$  si rivela poco attivo sui batteri a pH che vanno da 3,5 a 4,0 e favorisce l'arresto della fermentazione alcolica a causa del suo effetto fungicida sui lieviti (Gerland e Bellachioma, 2006). In questa situazione l'aggiunta di lisozima esercita un'azione battericida senza attaccare i lieviti, impedendo così un incremento di acidità volatile senza correre il rischio di inibire la fermentazione

alcolica. Questa applicazione è molto utilizzata nella produzione di diversi vini: Riesling alsaziano, Pinot Grigio, Gewurztraminer, in particolare per i vini Grands Crus o a vendemmia tardiva caratterizzati da un elevato contenuto alcolico (Gerland e Bellachioma, 2006).

Il trattamento con lisozima (20 g/hl) effettuato a seguito della fermentazione malolattica, consente di abbattere la carica batterica e di conseguenza evitare che vengano metabolizzati altri composti dopo il consumo completo di acido malico (acido citrico, amminoacidi, zuccheri), evitando, quindi, l'incremento di acidità volatile e la produzione di ammine biogene. Inoltre, aumentando la stabilità nei vini rossi, si potrà ritardare l'aggiunta di SO<sub>2</sub> fino al primo travaso, (occorre però prestare attenzione allo sviluppo dei batteri acetici), evitando di bloccare la reazione di complessazione tannini-antociani favorendone un miglioramento del colore.

Uno dei problemi principali è la produzione di ammine biogene dovuto alla presenza di batteri lattici durante fermentazioni anomale o mal gestite. Le ammine biogene sono basi organiche a basso peso molecolare che si trovano in diversi alimenti che contengono gli aminoacidi precursori che, attaccati per decarbossilazione microbica, formano le ammine biogene, ritenute responsabili di vari effetti tossici e reazioni allergiche nell'uomo (Silla Santos, 1996).

Infatti nel vino, specialmente in quelli rossi, sono state trovate diverse ammine biogene non volatili, come istamina, putrescina, cadaverina e tiramina in quantità variabili da pochi mg/l a diverse decine di mg/l, (Gloria et al 1998), fonte di una certa preoccupazione per la salute dei consumatori.

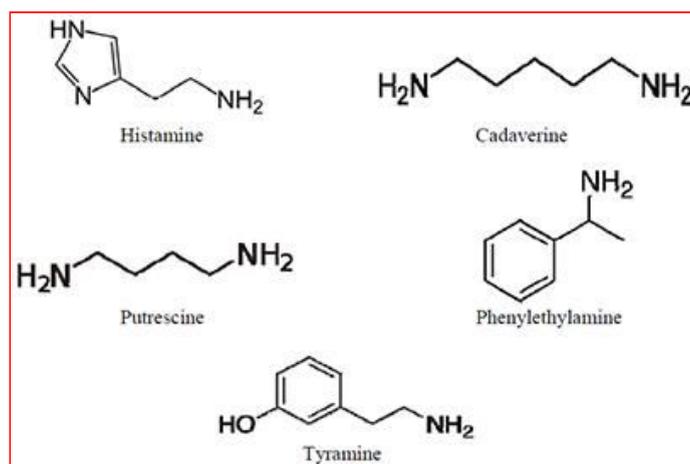


Figura 2.3 Principali ammine biogene

Purtroppo nel vino l'azione tossica delle ammine biogene è potenziata dalla presenza di etanolo, a causa della sua azione inibitrice sulle monoamino-ossidasi intestinali, che si occupano della detossificazione delle ammine biogene nel nostro organismo. La presenza di batteri lattici nei vini è correlata positivamente a contenuti elevati di ammine biogene soprattutto se si tratta di *Lactobacillus* e *Pediococcus* ma anche *Oenococcus oeni*, la principale specie batterica responsabile della fermentazione malolattica (Lounvaut – Funel e Joyeux 1994). Il contenuto di ammine biogene è importante non solo sotto l'aspetto salutistico e di sicurezza alimentare, ma anche come parametro di qualità per i vini di esportazione influenzando anche sul prezzo stesso del vino. Inoltre Svizzera, Giappone e Canada hanno stabilito un valore massimo di 10 mg/l per vini importati. Il livello di ammine biogene, in particolare di istamina dipende essenzialmente dalla fermentazione malolattica dovuta ad alcuni ceppi selvaggi di *Lactobacilli* e all'invecchiamento non controllato. In precedenza abbiamo descritto come l'aggiunta di lisozima nelle prime fasi di vinificazione contribuisca a limitare la produzione di ammine biogene, ma gli stessi effetti positivi sono stati riscontrati quando l'aggiunta dell'enzima è stata effettuata nel vino dopo la fermentazione malolattica (20-25 g/hl); l'impiego di lisozima nel

vino in botti limita significativamente la formazione di istamina durante l'affinamento in barrique.

### 2.3 Legislazione e normativa europea

Il Regolamento CE n 2066/2001, che modifica il Regolamento CE n 1622/2000, definisce le linee guida per l'aggiunta del lisozima nei prodotti enologici. In base a questo regolamento l'enzima può essere aggiunto durante le diverse fasi di vinificazione sia nel mosto di uve, sia al vino in fermentazione che al vino finito. In totale la dose massima utilizzabile non può superare i 50 g/hl.

Un'altra normativa che regola l'utilizzo di lisozima nel vino è la direttiva allergeni (2003/89/CE), che deriva dalla direttiva 2000/13/CE modificata, la quale rende obbligatoria l'indicazione in etichetta della presenza di alcune sostanze a provata attività allergenica.

In Italia direttiva 2000/13/CE è stata recepita dal Regolamento 1991/2004 per quanto concerne il settore enologico, il quale definisce alcune modalità di utilizzo per quanto riguarda la designazione, la presentazione e la protezione dei prodotti. Il lisozima, è una proteina derivata dall'albumina d'uovo e quindi inserita nell'allegato III bis.

- Gli ingredienti che presentano proprietà allergeniche sono rappresentati dai pittogrammi della figura 2.4 ed elencati qui di seguito: (1) Cereali contenenti glutine (cioè grano, segale, orzo, avena, farro, kamut o i loro ceppi ibridati) e prodotti derivati; (2) Crostacei e prodotti a base di crostacei; (3) Uova e prodotti a base di uova; (4) Pesce e prodotti a base di pesce; (5) Arachidi e prodotti a base di arachidi; (6) Soia e prodotti a base di soia; (7) Latte e prodotti a base di latte (compreso il lattosio); (8) Frutta a guscio cioè mandorle (*Amigdalus communis L.*), nocciole (*Corylus avellana*), noci comuni (*Juglans regia*), noci di acagiù (*Anacardium occidentale*), noci pecan (*Carya illinoiesis*), noci del Brasile (*Bertholletia excelsa*), pistacchi (*pistacia vera*), noci del Queensland

(Macadamia temifolia) e prodotti derivati; (9) Sedano e prodotti a base di sedano; (10) Senape e prodotti a base di senape; (11) Semi di sesamo e prodotti a base di semi di sesame; (12) Anidride solforosa e solfiti in concentrazioni superiori a 10 mg\kg o 10 mg\l espressi come S02; (13) Lupino e prodotti a base di lupino; infine (14) Molluschi e prodotti a base di mollusco.



Figura 2.4 Rappresentazione in pittogrammi dei principali allergeni

## CAPITOLO 3

### Tannini enologici

#### 3.1 Introduzione

Negli ultimi anni, sono stati introdotti in commercio nuovi preparati di tannini che presentano importanti proprietà enologiche (sia per la vinificazione in rosso che in bianco) come l'azione "radical-scavenging" e antiossidativa, azione strutturante, protezione e strutturazione del colore, azione aromatizzante, chelazione dei metalli, riduzione della presenza di alcuni tioli (responsabili alterazioni aromatiche) (Citron, 2006).

Pertanto il loro utilizzo nella produzione vitivinicola, in sostituzione dell'anidride solforosa è preso in considerazione attualmente dalla ricerca e in questo testo si vogliono analizzare le caratteristiche positive e negative che possono modificare la produzione vitivinicola.

I tannini sono molecole generalmente voluminose che presentano una massa molecolare molto elevata (fig 3.1), composti dalla polimerizzazione di più molecole fenoliche monomeriche che ne determinano le proprietà a seconda della loro disposizione spaziale all'interno del polimero.

I tannini sono di origine vegetale, e sono presenti in grandi quantità in radici, foglie, cortecce, semi, frutti, dove svolgono principalmente funzioni di protezione e di difesa dei tessuti dall'attacco di parassiti e patogeni (per esempio insetti e funghi).

- Il meccanismo d'azione dei tannini è dovuto alla loro capacità di reagire con i composti proteici che complessano e perdono le proprie funzioni

fisiologiche che normalmente svolgono per il normale funzionamento della cellula.

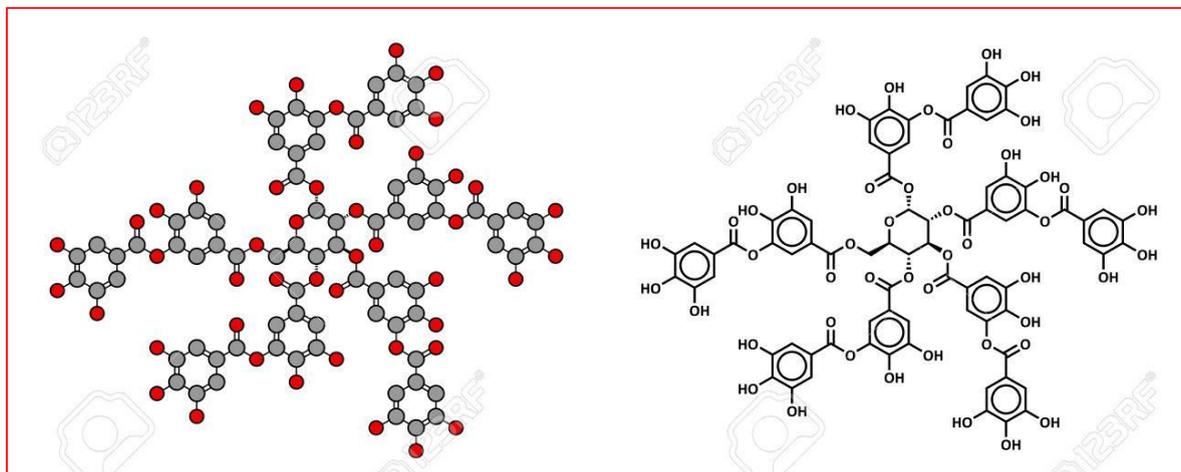


Figura 3.1 Formula di struttura dell'acido tannico

Proprio grazie a questa proprietà vengono impiegati in alcuni processi industriali, soprattutto nell'industria conciaria. I tannini possono anche essere sintetizzati artificialmente tramite reazioni di condensazione fenolo-formaldeide (Citron, 2006).

Alcune decadi fa in enologia il tannino più utilizzato era ottenuto per estrazione dalle galle (fig. 3.2): escrescenze dei tessuti vegetali causate indirettamente dai parassiti (ad esempio insetti come gli imenotteri cinipedi).

- I tannini venivano impiegati con successo per ottenere la chiarifica dei mosti, principalmente in caso di eccesso proteico, sfruttando la loro reattività con le molecole proteiche che legandosi ai tannini danno luogo a formazioni insolubili e fiocose che scendono verso il fondo del vaso vinario e trascinano con sé anche ulteriori sostanze presenti in sospensione nella massa liquida (Ribereau-Gayon et al, 2004).



Figura 3.2 galla di quercia

I tannini estratti dalle galle continuano ad essere utilizzati come agenti chiarificatori, regolati dalla legislazione nazionale ed europea (regolamento CE 1493/99).

### **3.2 Classificazione dei tannini**

In campo enologico si utilizzano principalmente due diverse categorie di tannini: (1) Tannini idrolizzabili, a loro volta suddivisi in gallotannini, la cui idrolisi acida libera acido gallico, ed elagitannini, la cui idrolisi acida libera acido ellagico; (2) Tannini condensati, la cui idrolisi acida libera una antocianina. La classificazione dei tannini ha un significato quasi puramente "convenzionale". Infatti a causa della loro struttura (complessa e variabile) è complicato attribuire ai tannini una precisa famiglia chimica, anche se tutte le molecole tanniniche presentano un carattere chimico comune: la loro reattività verso le molecole proteiche (Vivas et al, 1993).

La famiglia dei tannini idrolizzabili (1) è suddivisa in gallici ed ellagici, che se sottoposti ad attacco acido, liberano rispettivamente acido gallico o acido

ellagico (fig 3.3). Questi composti derivati dai tannini possiedono numerosi gruppi ossidrilici (-OH) che si ossidano facilmente, ciò gli permette di esercitare un forte potere antiossidante (Viva,1993). I tannini idrolizzabili vengono commercializzati in forma non polimerizzata, al massimo di due o tre unità, perché la polimerizzazione li rende non solubili pertanto non utilizzabili.

- I tannini ellagici di colore marrone scuro, possono essere estratti da legno di castagno (*Castanea sativa*) e quercia (*Quercus spp.*) dove sono presenti in grande quantità come ad esempio (castalagina, vescalagina, grandinina e roburina). I più ricchi di acido gallico vengono estratti dal legno di castagno.

Gli elagitannini sono di solito meno astringenti rispetto ai gallici e non sono naturalmente presenti nel vino, a meno che per apporti esterni o derivanti dall'affinamento in botti (Vivas 1993).

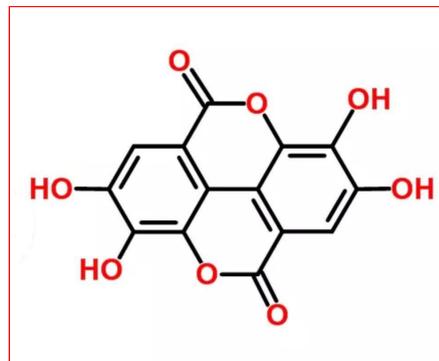


Figura 3.3 acido ellagico

- I tannini gallici presentano un colore più chiaro rispetto agli elagigi e sono meno astringenti; si trovano nel legno di mimosa, nelle galle (fig 3.2) del genere *Quercus*, o nel frutto del mirabolano. Sono tannini contenenti acido di-gallico (fig 3.4) che conferisce una certa amarezza ed una relativa astringenza all'estratto.

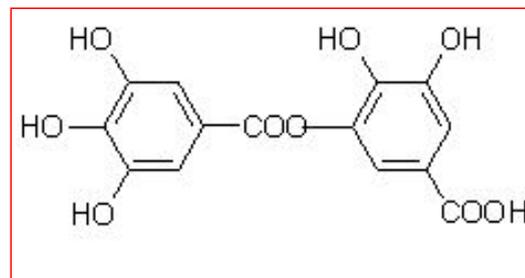


Figura 3.4 acido digallico

- I tannini condensati (2) (classificati anche come proantocianidici o catechinici), naturalmente si trovano nella buccia e nei vinaccioli dell'uva, nel legno di quebracho (*Sehinopsis querbaeho-cotoradoi*) o di mimosa (*Aeacia mearsii*), nelle corteccia del pino marittimo (*Pinus marittima*). La qualità degli estratti è dovuta principalmente all'età degli alberi, dalle zone di provenienza e dalle tecniche di estrazione. A seguito di idrolisi acida liberano antocianine, per questo possono essere denominati con il nome della antocianidina che si libera dopo idrolisi ad esempio procianidina quando si libera cianidina.

I tannini condensati (fig 3.5) sono polimeri costituiti da catene i cui monomeri sono principalmente: catechine (tetraossiflavan-3-olo, legati in C4-C6 o C4-C8) e leucoantociani (3-4 flavan-dioli).

La formazione dei polimeri delle catechine o leucoantociani sono il risultato di reazioni di condensazione con eliminazione di molecole di acqua; le reazioni di condensazioni possono avvenire durante tutti i processi di vinificazione (De Freitas, 2006). I preparati commerciali possono essere di diversi colori: rosso se

vengono estratti dalle uve, marrone per quelli provenienti dal legno e infine arancio per i tannini derivati dalla corteccia di pino marittimo (Citron, 2006).

Quanto detto in precedenza si riferisce alla sostanza: tannino puro, ottenuto con l'utilizzo dei solventi. Però i preparati commerciali, non contengono solo solo tannini, in quanto sarebbe troppo costosa un'estrazione in purezza. Infatti sono molte le variabili che incidono sul contenuto finale del preparato, ad esempio: origine botanica, solvente di estrazione (soluzione etanolo\acqua), velocità e temperatura di estrazione, il metodo di essiccamento dell'estratto (liofilizzazione, evaporazione, atomizzazione). Per cui le preparazioni commerciali contengono, oltre al tannino nativo, anche altre molecole come fenoli, polisaccaridi, saccaridi, cumarine, minerali e sostanze aromatiche.

(Vivas et al,1993).

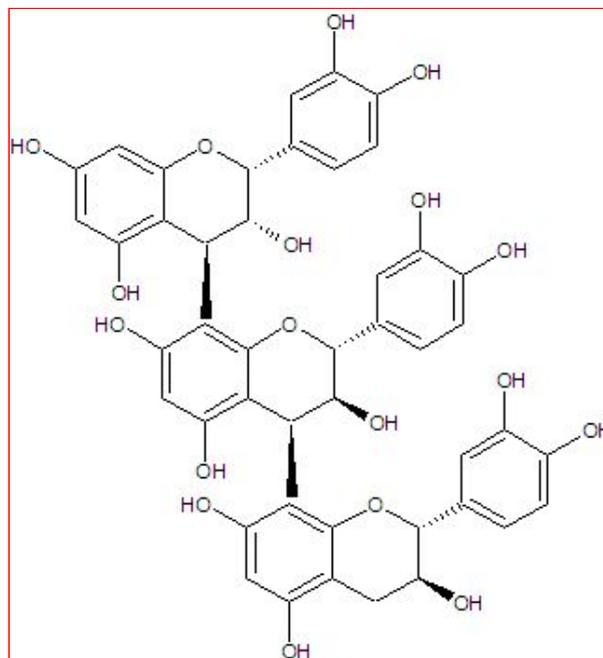


Figura 3.5 proantocianidina

Alcuni estratti vengono prodotti con lo scopo di estrarre anche altre molecole come polisaccaridi e lignine, dal forte contributo sensoriale (derivati dal legno di quercia tostato), utili per aumentare la complessità olfattiva del vino ed aggiunti solitamente nelle fasi finali della produzione (confezionamento).

Il codice enologico internazionale (CEI) definisce pari al 65%, la quantità di sostanza attiva (tannini in purezza) minima che deve essere presente nei preparati commerciali. La composizione finale dell'estratto influenza anche il gusto: la presenza di cumarine o acido di-gallico conferisce sentori di amaro; i polisaccaridi conferiscono al vino delle note dolci e ne aumentano la morbidezza e la struttura.

Il grado di polimerizzazione e di ossidazione dei tannini presenti nell'estratto incidono sulla loro reattività. Infatti i tannini in parte già ossidati presentano una minore elettronegatività e di conseguenza un minor effetto antiossidante e chiarificante (Citron, 2006).

### **3.3 Proprietà tecnologiche**

Le molteplici proprietà chimico fisiche dei tannini li rendono estremamente interessanti per l'utilizzo in campo enologico, le principali proprietà sono

- 1- capacità di combinarsi con le proteine,
- 2- capacità antiossidante,
- 3- stabilizzazione del colore,
- 4- riduzione dei sentori di ridotto
- 5- influenza su struttura e aroma dei vini.

I tannini possono essere aggiunti a partire dal mosto subito dopo la pigiatura o la pressatura, fino al termine della fase di invecchiamento. Il tipo di estratto, la dose di impiego e l'epoca del trattamento dipendono dal prodotto che si vuole ottenere e dalla qualità del vino di cui si dispone (Bosso et al, 2001).

Nei mosti e nei vini sono presenti diverse proteine sia endogene, che esogene o provenienti da microrganismi. Come detto in precedenza i tannini sono molto reattivi nei confronti delle proteine, e formano legami stabili con esse. Nella figura 3.6 possiamo vedere come i tannini in soluzione reagiscono con le proteine presenti e coprecipitano. Il legame avviene tra il gruppo degli idrossili fenolici dei polimeri tannici e l'ossigeno del gruppo cheto-imide (CO-NH-) nella catena proteica.

I meccanismi coinvolti e le diverse reazioni sono innumerevoli e non ancora del tutto conosciuti; ad oggi sono state individuate principalmente interazioni di tipo idrofobico ed idrogeno ed in minor misura di tipo ionico.

L'affinità tra tannini e proteine permane anche al di sopra del punto isoelettrico delle proteine (pH 4; Marquette e Grazietti, 2007).

La carica elettronegativa globale di un tannino proantocianidico è più alta nel caso di molecole con un maggior numero di monomeri. Quindi i tannini a basso peso molecolare presentano una minor reattività, quindi una minore astringenza, se comparati ai tannini più polimerizzati.

Anche per i polimeri più grandi, la reattività nei confronti delle proteine risulta maggiore se tutti i carboni (C) sono a carica elettronegativa. Quindi se il tannino è parzialmente ossidato, presenterà una minor reattività nei confronti delle proteine, dovuta ad una minore carica elettronegativa complessiva.

Sia i vini bianchi che i vini rossi a seguito della pigiatura delle uve rilasciano nel mosto una grande quantità di proteine endogene che possono causare problemi di torbidità.

É noto però che nei vini rossi il problema non si nota in quanto presentano una superiore stabilità proteica. Questo è dovuto al fatto che nei vini rossi sono presenti anche numerosi composti fenolici, tra cui i tannini e le proteine vengono subito legate e stabilizzate (precipitazioni).

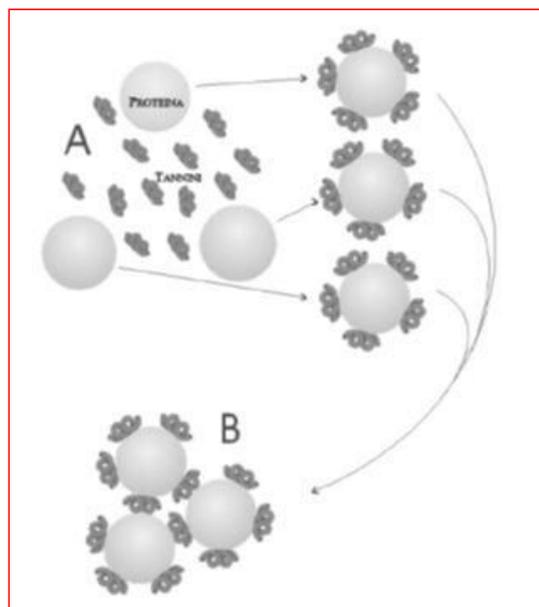


Figura 3.6 Azione dei tannini che in soluzione reagiscono con le proteine e coprecipitano.

Questo avviene grazie all'azione dei tannini estratti in fase precoce durante la macerazione, e sono tannini derivanti dalla buccia dell'acino, meno astringenti e più dotati di caratteristiche positive dal punto di vista strutturale ed organolettico.

É quindi un peccato sacrificare questa frazione tannica pregiata assieme alla precipitazione proteica ed è in quest'ottica che diventa interessante l'utilizzo precoce, in fase di macerazione, dei tannini esogeni (aggiunti come preparati commerciali) che preservano in parte i tannini endogeni anticipandone il legame con le proteine (Marquette et al, 2007).

Durante le fasi di produzione il vino viene inevitabilmente a contatto con l'ossigeno anche se viene immediatamente neutralizzato, soprattutto nei vini rossi, grazie alla presenza delle sostanze fenoliche.

Non tutti i tannini enologici presentano le stesse proprietà antiossidanti, in generale i tannini esogeni (gallotannini ed elagiotannini) reagiscono più prontamente e con maggior efficacia con l'ossigeno, rispetto ai tannini endogeni. Per questa ragione i tannini gallici o ellagici trovano vasto impiego nella protezione dei vini dagli effetti indesiderati dovuti all'ossidazione, in tutte le fasi di vinificazione in particolare quelle a cui il vino viene in contatto con l'ossigeno, come i travasi le filtrazioni ed il confezionamento (Castino, 2004; Bosso et al. 2001).

È stato dimostrato che alcuni composti fenolici del vino, come le procianidine B2 e B4, e del legno di quercia come l'acido gallico e la castalagina, presentano una più spiccata capacità di reagire e catturare radicali liberi che derivano dall'ossigeno molecolare, ( $O_2^{\cdot}$ ) rispetto alla solforosa (Vivas et al. 1997).

I tannini derivati dall'uva partecipano direttamente alle reazioni di polimerizzazione fra tannini ed antociani, formando polimeri colorati che rendono molto più stabile il colore (fig 3.7). Nei vini in cui sono presenti antociani nelle giuste quantità, ma presentano scarsi tenori di polifenoli flavanici, un'addizione di tannini estratti dall'uva permette di rimediare a tale inconveniente favorendo la formazione e la stabilità del colore (Marquette, 2007).

Anche se i tannini gallici ed ellagici non sono in grado di polimerizzarsi direttamente con gli antociani possono comunque esercitare un'influenza positiva sull'intensità del colore dei vini con un altro meccanismo d'azione. Infatti favoriscono la produzione di acetaldeide (tramite ossidazione accoppiata dell'etanolo) che in mezzo acido forma un ponte tra antociani e

tannini o fra due molecole di tannini, favorisce quindi la sintesi di polimeri ad alto peso molecolare, con conseguente colorazione stabile e riduzione dell'astringenza (De Freitas, 2006).



Figura 3.7 effetto dei tannini sul colore

I tannini stabilizzano le tonalità del colore anche nei vini affinati in botti già usate, evitando fenomeni di invecchiamento precoce e di maderizzazione. Ancora, piccole aggiunte a fine fermentazione di tannini estratti da vinaccioli favoriscono la tenuta del colore dei vini rosati (Castino, 2004).

I tannini svolgono un ruolo essenziale anche sulle caratteristiche sensoriali del vino. Quelli estratti dai vinaccioli presentano note più astringenti di quelli estratti dalle bucce, anche se tendono ad evolvere combinandosi sia fra loro, ma anche con antociani e altre molecole presenti nel vino perdendo le loro caratteristiche più aggressive. Infatti lo scopo principale dell'affinamento dei vini rossi è proprio questa lenta evoluzione con arrotondamento del gusto.

Nel caso dei tannini esogeni, il loro effetto sensoriale viene esercitato in modo completamente diverso, infatti, essi non hanno la capacità di unirsi né agli antociani, né ai tannini del vino.

I tannini di galla e di castagno contengono molte sostanze amare e non possono essere utilizzati in dosi elevate; contrariamente i tannini ellagici estratti dalla quercia non presentano questo difetto. I gallo e gli ellagitannini sono relativamente poco astringenti e questa è una qualità.

A seguito dei processi di affinamento dopo un lasso di tempo che va dai 3 ai 6 mesi dall'aggiunta di tannini si osservano effetti positivi su struttura e corpo del vino. Per evitare la sensazione di gusto dissociato è quindi sconsigliabile aggiungere tannini nei vini di pronta beva subito prima del confezionamento. L'aggiunta di tannini a vini di bassa qualità ottenuti nelle annate difficili risulta ancora più efficace (Castino, 1997).

## CAPITOLO 4

### Chitosano

#### 4.1 Introduzione

Il lisozima, in combinazione con i tannini ha fornito buoni risultati. Ma il lisozima è un allergene, e come tale deve essere indicato in etichetta. Pertanto l'attenzione dei ricercatori, si è orientata verso un altro prodotto, potenzialmente sostitutivo del lisozima. Un valido sostituto del lisozima è il **chitosano**, usato per le sue proprietà antimicrobiche, chelanti e antiossidanti.

Nel 2011 l'UE lo ha inserito fra gli additivi ammessi in vinificazione per la stabilizzazione proteica

Il chitosano è un derivato della chitina che si trova in natura nell'esoscheletro dei crostacei (da dove viene più frequentemente estratto) e degli insetti questa sostanza viene considerata un allergene, mentre quello derivato dai funghi NON è un allergene.

Questo polisaccaride viene largamente impiegato nell'industria chimica, nell'industria alimentare ed in misura minore nel settore enologico.

Le principali proprietà del chitosano sono:

- 1) capacità di flocculare lipidi e proteine;
- 2) antimicrobiche e di agglutinazione dei microrganismi;
- 3) antiossidanti e nutrizionali.

Il chitosano è un polisaccaride lineare composto da D-glucosamina e N-acetil-D-glucosamina, legate tramite legami  $\beta(1-4)$ . Il chitosano è solubile in soluzioni acide diluite (acidi acetico o formico); viene ottenuto dalla deacetilizzazione parziale o totale della chitina in condizioni di basicità e ad alte temperature (fig 4.1).

I gruppi funzionali reattivi del chitosano sono tre:

- un gruppo amminico sul secondo carbonio e, rispettivamente sul terzo e sesto carbonio,
- un gruppo ossidrilico primario
- uno secondario.

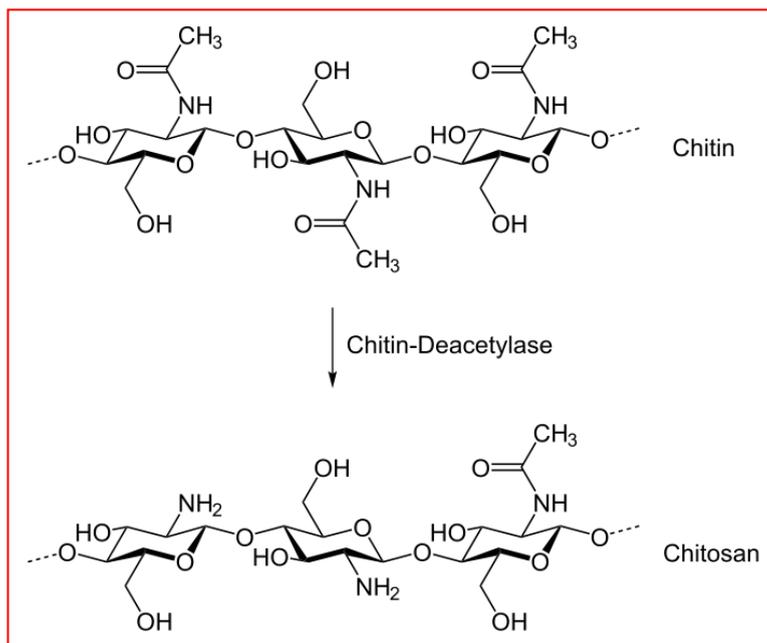


Figura 4.1 Formule di struttura della chitina e del chitosano

Dopo la cellulosa, la chitina è il secondo polimero di origine biologica più abbondante in natura; si trova nella cuticola degli insetti e di altri artropodi, nel guscio dei crostacei e nelle pareti cellulari dei funghi. La chitina viene definita una molecola simile alla cellulosa la quale presenta un gruppo di acetilammina al posto di ogni gruppo idrossile di ogni monomero.

Questo polisaccaride rappresenta il componente strutturale principale dell'esoscheletro degli invertebrati, per questo viene estratto principalmente dagli scarti di lavorazione dell'industria ittica. Sottoponendo la chitina così ottenuta, a modificazioni chimiche, si possono ottenere due diversi oligomeri: il chitosano e la glucosammina.

Questi due derivati trovano vasto impiego nell'industria alimentare. Il chitosano estratto dalla cuticola dei funghi (*Agaricus bisporus* e *Aspergillus niger*; fig 4.2)

presenta un tasso di allergenità minore di quello di origine animale, per questo è più indicato nelle preparazioni alimentari.



Figura 4.2 *Agaricus bisporus* (A) e *Aspergillus niger* (B)

Il chitosano in soluzioni acide presenta un comportamento policationico a causa della pH (6,3) del gruppo amminico del residuo di cisteina causando la flocculazione dei lipidi e delle proteine. Infatti aggiunto nella matrice questo polisaccaride si lega alle molecole cariche negativamente, come ad esempio le proteine, che si trovano allo stato colloidale o presenti all'interno della soluzione formando complessi ad alto peso molecolare e favorendo la flocculazione (Shahidi et al., 1999).

Inoltre, sempre in condizioni acide, il chitosano presenta elevate capacità chelanti nei confronti di numerosi ioni metallici come  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  e  $\text{Cu}^{2+}$  per cui viene quindi utilizzato in diversi settori industriali per il recupero o per la rimozione di metalli. Il chitosano non presenta nè tossicità, nè allergeni (di origine fungina), è facile da utilizzare nelle diverse forme presenti sul mercato (fibre, gel, polvere e membrane) e si ottiene con facilità.

(Spagna et al., 1996).

## 4.2 Proprietà tecnologiche

Il chitosano presenta alcune proprietà tecnologiche molto importanti in campo alimentare, per questo ha riscosso un notevole successo su varie matrici di

diversa natura. Non viene usato solo in campo alimentare, infatti il polimero è biodegradabile e biocompatibile con azione antimicrobica ed emostatica, viene quindi utilizzato con successo anche nei campi biomedico, farmaceutico, biotecnologico e nutrizionale (effetto ipocolesterolemizzante e ipocalorico).

Il chitosano è considerato un prodotto alternativo di origine naturale sostituibile a tanti additivi di sintesi utilizzati per la conservazione e la stabilizzazione degli alimenti:

- 1- produzione di pellicole semipermeabili molto resistenti da utilizzare come film edibili su insaccati (es. mortadella);
- 2- additivo chiarificante e stabilizzante del colore (sottoforma di sali) nei succhi di frutta e nel vino;
- 3- additivo per migliorare la reologia degli alimenti (sostitutivo, emulsionante, extender, addensante ecc.);
- 4- purificazione delle acque potabili dai metalli inquinanti (piombo, cadmio, rame, vanadio, ecc.), pesticidi e PCB (Shahidi et al., 1999);
- 5- riduzione di ocratossina A nel vino e in altre matrici alimentari;
- 6- disacidificante (succhi di frutta; assorbe in maniera selettiva le sostanze acide abbassando il pH anche di 2 unità) (Bornet et Teissedre, 2005);
- 7- protezione nei confronti di *Botrytis cinerea* (fig 4.2) sia dei mosti che delle uve da tavola (Bornet et Teissedre, 2005);
- 8- effetto ipocolesterolemizzante e ipocalorico (dietetico);



Figura 4.2 Uva colpita da Botritis cinerea

- Il chitosano inoltre è in grado di inibire la produzione di tossine e la crescita microbica; infatti abbassa l'attività dell'acqua rendendola indisponibile per la popolazione batterica. Inoltre essendo di carica positiva interagisce con la parete cellulare dei batteri carica negativamente e la disgrega in parte, causando la perdita di componenti intracellulari. Il chitosano è in grado di penetrare il nucleo dei microrganismi e intaccare DNA e inibendo la sintesi di mRNA e di conseguenza di proteine (Kong et al., 2010).

Sono state dimostrate proprietà antiossidanti (per pH minori di 6) per entrambe le forme di chitosano derivate di origine animale o fungina. Il meccanismo di azione antiossidante ad oggi non è ancora del tutto spiegato, in ogni caso sembrerebbe in grado di disattivare i radicali liberi nonostante non possieda gruppi carbonilici o fenolici nella sua struttura chimica. Più piccolo è il polimero maggiore sarà l'effetto antiossidante (Kong et al., 2010).

### 4.3 L'uso del chitosano in campo enologico

L'utilizzo del chitosano in campo enologico è abbastanza recente. Viene utilizzato soprattutto come stabilizzante e antiossidante (Chinnici et al, 2014), e per evitare il difetto dell'imbrunimento. Il prodotto è riciclabile, cioè può essere riutilizzato dopo il trattamento. Il chitosano si presenta sotto forma di una preparazione polverosa di colore bianco, senza odori o sapori di alcun genere. Il suo utilizzo, che non può superare i 100 g/hl, in vinificazione è stato approvato come nuova pratica nel codice enologico l'Organisation Internationale de la Vigne et du Vin (OIV) nel 2009 e dall'Unione Europea con il regolamento CE 609/2009.

- Il chitosano viene utilizzato con successo anche per evitare la casse ferrica e la casse rameica. Inoltre contribuisce anche alla riduzione della popolazione di microbica indesiderata. Questo polimero viene spesso impiegato per il controllo di *Brettanomyces bruxellensis* che agisce come agente di alterazione dei vini in particolare per quelli invecchiati, grazie alla sua capacità di resistere a condizioni difficili (alta gradazione alcolica, carenze nutrizionali, alti tenori di  $S_0_2$ ).
- Si propone il chitosano come possibile additivo capace di coadiuvare o sostituire l'anidride solforosa nella vinificazione ad esempio di vinificazioni mirate all'ottenimento di vini bianchi a ridotto contenuto in solfiti. (Chinnici et al, 2014)

## Conclusioni

A causa degli effetti negativi sulla qualità del prodotto provocate da alte dosi di  $\text{SO}_2$  e a causa degli effetti collaterali sulla salute degli esseri umani, si cerca da diversi anni di ridurre il contenuto nei vini. In particolare modo si cerca di sostituirla con altre sostanze che svolgano le stesse azioni o azioni simili (antiossidante, antiossidasica, antibatterica, stabilizzante del colore e chiarificante).

Sebbene sia molto difficile sostituire un prodotto ad alto spettro di azione come la  $\text{SO}_2$ , abbiamo visto che altri composti come lisozima, tannini enologici e chitosano possono essere degli ottimi sostituti.

Sonni et al (2009) hanno evidenziato che l'utilizzo del lisozima e dei tannini enologici durante la fermentazione alcolica sono una valida alternativa alla anidride solforosa, quindi un concreto punto di partenza per la creazione di vini senza  $\text{SO}_2$ . Ci sono stati effetti positivi anche sulla composizione volatile del vino (alcoli ed esteri etilici) dovuti alla fermentazione dei lieviti in assenza di biossido di zolfo.

- In uno studio di (Sonni et al,2011) è stato riportato come nei vini invecchiati la  $\text{SO}_2$  sia l'agente che abbia condizionato di più la composizione di alcol ed esteri e la loro evoluzione.
- L'uso dei tannini ha mostrato aspetti positivi specialmente nella conservazione degli esteri presenti nel vino fino ad un anno di invecchiamento in botti, agendo come antiossidanti e scavenger di ossigeno. Al contrario i tannini non hanno influenzato l'acidità totale del vino.
- Il chitosano, che non è un allergene, è stato definito da Chinnici et al, (2014) una valida alternativa alla anidride solforosa, quindi un concreto

punto di partenza per la creazione di vini senza SO<sub>2</sub>. Infatti il chitosano ha la capacità di ridurre la tendenza all'imbrunimento dei vini e proteggerli dai processi ossidativi.

Infatti presenta le capacità di

- assorbire i pigmenti bruni ed i loro precursori,
- chelare i metalli evitando lo starter del processo ossidativo,
- svolgere un'azione protettiva verso i radicali liberi
- ritardare l'ossidazione dei tioli e di conseguenza la formazione di cattivi aromi

## **BIBLIOGRAFIA**

Amati A, Chinnici F, Piva A, Arfelli G, Riponi C (1996) – Influence of enological operation on lysozyme activity in winemaking. *Vitic. Enol. Sci.* 51:59-62

Barril C, Clark A C, Scollary G R, (2012) – Chemistry of ascorbic acid and sulfur dioxide as an antioxidant system relevant to white wine. *Analytica Chimica Acta* 732, 186-193.

Bornet A, e Teissedre P L (2005) Interet de l'utilisation de chitine, chitosane et de leurs derives en enologie. *Jou. Int. des scie. De la vigne et du vine.* 39: 199 – 207.

Bosso A, Cavero MC, Serpentino M, Scotti B, Poinsaut P (2001) – Vino e tannini. *Vignevini* 2: 69 – 74.

Castino M (2004) – l'impiego dei tannini in enologia. [www.vignaioli.it/periodicoVP](http://www.vignaioli.it/periodicoVP). 8:ottobre.

Chinnici F, Natali N, Riponi C (2014) – Efficacy of chitosan in inhibiting the oxidation of (+)-catechin in white wines model solutions. *J Agric Food Chem* 62:9868-9875

Citron G (2006) – Composizione dei tannini utilizzati in enologia. *L'informatore agrario* 13:51 – 54

De Feitas V, Matenus N (2006) – Chemical transformations of chetocyanins yielding a variety of colours (review). *Env. Chem. Letters* 4:175 – 183.

Delfini C, Cosimo M, del Prete V, Strano M, Gaetano G, Pagliata A (2004) – Resistancescreening essay of wine lactic acid bacteria on lysozyme: efficacy of lysozyme on unclarified grape must. *J. Agr. Food Chem.* 52:1861-1866

Genrald e Bellachioma (2006) – Nuove acquisizioni per la gestione dell'uso del lisozima nel processo di vinificazione. *L'enologo* 6 : 105-110.

Gloria M, Watson B, Simon-Sarcadi L, Daeschel M (1998) – A survey of biogenic amines in Oregon Pinot noir and Cabernet Sauvignon wine. *Am. J. Enol. Vitic.* 49:279 – 282.

Herbst-Johnstone M, Nicolau L & Kilmartin P A, (2011). Stability of varietal thiols in commercial Sauvignon blanc wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 62, 495-502.

Herbst-Johnstone M, Nicolau L & Kilmartin P A, (2011). Stability of varietal thiols in commercial Sauvignon blanc wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 62, 495-502.

Kong M, Chen X G, Xing K, e Park H J (2010) antimicrobial properties of chitosan and mode of action: a state of art review. *Int. j. food. Mic.* 144: 51 - 63.

Li H, Guo A, e Wang H, (2008) Mechanism of oxidative browning of wine. *Food Chemistry* 108, 1-13.

Lonvaud-Funel A, Joex A (1994) – Histamine production by wine lactic acid bacteria: isolation of histamine producing strain of *Leuconostoc oenos*. *J appl. Bacteriol.* 77:401- 407

Marquette B, Graziatti A (2007) – Ruolo dei tannini nel corso del processo di vinificazione. *Vignevini*, 7\8:82 – 86 .

Oliveira C M, Silva Ferreira A C, Freitas V, de Silva A M S (2011) I meccanismi di ossidazioni nel vino. *Food Research International* 44:1115–1126

Ribereau-Gayon P, Dubordieu D, Doneche B, Lonvaud A (2004) – Trattato di enologia I, (terza edizione). Edagricole.

Romano P and Suzzi G (1993) – Sulfur dioxide and wine microorganisms. *Wine microbiology and biotechnology*, ed by Fleet GH. H.A.P. Victoria, Australia.

Saccheri G (1999) – tecnologie agrarie, industrie enologiche, lattiero casearia, conserviera, olearia, molitoria.

Shaidi F, Vidana Arachidi J K e Jeon Y J (1999) – food applications of chitin and chitosans. *Trend in food science and technology.* 10:37 – 51.

Silla Santos M (1996) – Biogenic amines: their importance in food. *Int. J. Food. Microbol.*, 29:213 – 231

Singleton V, Salgues M, Zaia J e Trousdale (1985) – Caftaric acid disappearance and conversion to products of enzymic oxidations in grape must and wine. *American journal of enology and viticulture*, 36:1, 50-56

Siomis N, Kallithraka S, Makris D P, Kefelas P (2006) – Kinetics of browning onset in white winws: influence of principal redox-active polyphenols and impact on the reducing capacity. *Food chemistry* 94, 98-104.

Sonni F, Bastante CJM, Chinnicci F, Natali N, Riponi C (2009) – Replacement of sulphur dioxide by lizozime and oenological tannins during fermentation: influence on volatile composition of wite wines. *J Sci Food Agric* 89:688-696

Sonni F, Chinnicci F, Natali N, Riponi C (2011) – Pre-fermentative replacement of sulphur dioxide by lizozime and oenological tannins: Effect on the formation and evolution of volatile compound during the bottle storage of wines. *Food Chemistry* 129:1193-1200

Spagna G, Pifferi P G, Rangoni C, Mattivi F, Nicolini G, e Palmorani R (1996) – te stabilizations of white wines by adsorbations of phenolic compound on chitin and chitosan. *Food Res. Int.* 29: 241 – 248.

Taylor SL, Higley NA, Bush RK (1986) – Sulfites in foods: uses, analytical methods, residues, fate, exposure assessment, metabolism, toxicity, and hypersensitivity. *Adv Food Res.* 30:1-76.

Vally H and Thompson P (2001) – Role of sulfite additives in wine induced asthma: single dose and cumulative dose studies. *Thorax.* 56: 763–769.

Vivas N (1997) – Composition et propriets des preparations commerciales de tannins a usage oenologique. *Rev. Oenol.* 84:15 – 21

Vivas N, Chauvet S, Glories Y, Sundraud P (1993) – Caracterisation ec definition des preparations commercialesde tannins oenologiques. *IAA*, 110:705-713

Zinnai A, Venturi F, Calamita Y, Andrich G (2005) – l'anidride solforosa, un additive di largo impiego in enologia. VQ 04-05.