



DIPARTIMENTO DI SCIENZE AGRARIE ALIMENTARI E AMBIENTALI

CORSO DI LAUREA IN: SCIENZE E TECNOLOGIE AGRARIE

ANIDRIDE SOLFOROSA IN ENOLOGIA: TRATTAMENTI FISICI,
CHIMICI E BIOLOGICI CHE RIDUCONO IL SUO UTILIZZO.

SULFUR DIOXIDE IN OENOLOGY: PHYSICAL, CHEMICAL AND
BIOLOGICAL TREATMENTS THAT REDUCE ITS USE

TIPO TESI: Compilativa

Studente:
NICOLÒ BORGOGELLI

Relatore:
DOTT.SSA DEBORAH PACETTI

ANNO ACCADEMICO 2022-2023

SOMMARIO

ELENCO DELLE FIGURE	3
ACRONIMI E ABBREVIAZIONI.....	4
INTRODUZIONE E SCOPO DELLA TESI	6
CAPITOLO 1 GENERALITÀ DELL'ANIDRIDE SOLFOROSA.....	7
1.1 Generalità e forme nel vino	7
1.2 Attività antiossidativa.....	9
1.3 Attività antiossidante	10
1.4 Attività antisettica.....	11
1.4.1 Attività contro lieviti	12
1.4.2 Attività contro i batteri	12
1.5 Effetto sui caratteri sensoriali dei vini.....	13
1.6 Effetti negativi.....	13
1.7 Legislazione.....	14
CAPITOLO 2 TRATTAMENTI ALTERNATIVI ALL'ANIDRIDE SOLFOROSA	15
2.1 Trattamenti fisici	15
2.1.1 Alte pressioni (HPP).....	15
2.1.2 Campi elettrici pulsati (CEP)	17
2.2 Trattamenti chimici	18
2.2.1 Acido sorbico	19
2.2.2 Lisozima	19
2.2.3 Dimetildicarbonato (DMDC)	21
2.2.4 Chitosano.....	22
2.2.5 Acido ascorbico.....	24
2.3 Trattamenti biologici	25
2.3.1 Batteriocine	25
2.3.2 Tossine killer.....	26
CONCLUSIONI	27
BIBLIOGRAFIA	29

ELENCO DELLE FIGURE

Figura 1-1 Equilibrio chimico della SO ₂ quando il metabisolfito di potassio viene aggiunto nel vino	8
Figura 1-2 Metabolismo dello zolfo nelle cellule del lievito <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	9
Figura 1-3 Imbrunimento enzimatico nel mosto d'uva.....	10
Figura 1-4 Reazione di ossidazione non enzimatica nel vino	11
Figura 2-1 Schema che mostra l'inattivazione delle cellule di lievito e batteri attraverso il trattamento delle alte pressioni.....	16
Figura 2-2 Inattivazione delle cellule di lievito e di batteri attraverso i campi elettrici	17
Figura 2-3 Struttura chimica dell'acido sorbico.....	19
Figura 2-4 Struttura chimica del lisozima	20
Figura 2-5 Struttura chimica del DMDC.....	21
Figura 2-6 Struttura chimica di chitina e chitosano.....	22
Figura 2-7 Meccanismi d'azione antimicrobica del chitosano proposti	23
Figura 2-8 Struttura chimica dell'acido ascorbico	24

ACRONIMI E ABBREVIAZIONI

SO ₂	Anidride solforosa/Diossido di zolfo
OMS	Organizzazione Mondiale della Sanità
UE	Unione Europea
Na ₂ SO ₃	Solfito di sodio
NaHSO ₃	Bisolfito di sodio
Na ₂ S ₂ O ₅	Metabisolfito di sodio
K ₂ S ₂ O ₅	Metabisolfito di potassio
CaSO ₄	Solfito di calcio
Ca(HSO ₃) ₂	Bisolfito di calcio
KHSO ₃	Bisolfito di potassio
HSO ₃ ⁻	Ione bisolfito
H ₂ S	Acido solfidrico
SO ₃ ²⁻	Solfito neutro
O ₂	Ossigeno
SO ₃	Anidride solforica/triossido di zolfo
MLF	Fermentazione malolattica
LAB	Batteri di acido lattico
AAB	Batteri di acido acetico
HPP	High Pressure Processing (Alte pressioni)
CEP	Campi elettrici pulsati
EFSA	Autorità Europea per la sicurezza alimentare
DMDC	Dimetildicarbonato
OIV	Organizzazione Internazionale della Vigna e del Vino
OTA	Ocratossina A

DNA	Acido desossiribonucleico
mRNA	RNA messaggero
RNA	Acido ribonucleico
VLP	Virus like particles

INTRODUZIONE E SCOPO DELLA TESI

Il diossido di zolfo, o anidride solforosa, è una molecola largamente utilizzata non solo nella vinificazione ma in generale in tutta l'industria agroalimentare. La diffusione del suo impiego nella produzione dei vini risale verso la fine del XVIII secolo.

Il suo largo uso è correlato al suo grande spettro di azione:

- è un antisettico, inibisce lo sviluppo di microrganismi;
- è antiossidante, ovvero in presenza di ossigeno, legandosi ad esso, diminuisce i processi ossidativi nel vino;
- è antiossidasico, agisce contro gli enzimi ossidasici e si combina con alcuni composti, di conseguenza protegge l'aroma del vino.

Tuttavia, la crescente preoccupazione di reazioni allergiche, associate all'eccessivo uso dell'anidride solforosa nel vino e l'interesse del consumatore verso prodotti più salutari, hanno spinto la ricerca a trovare delle alternative da applicare nella vinificazione.

Inoltre, visto il largo uso di questo composto nei diversi prodotti alimentari, l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) ha consigliato la riduzione del diossido di zolfo nei settori agroalimentari dove il suo utilizzo, contribuisce significativamente ad un accumulo giornaliero nell'organismo. Il vino, in quanto bevanda quotidianamente consumata, rientra nella tabella dei prodotti indicati dall'OMS. (Tedesco et al., 2022)

Nel corso degli anni diversi autori, effettuando studi su diverse tecnologie chimiche, fisiche, e biologiche, in base ai risultati ottenuti, le hanno poi proposte come alternative all'uso di SO₂ nel processo di vinificazione. Alcune di queste tecnologie sono attualmente utilizzate in enologia; altre invece sono applicate in altri settori agroalimentari.

Lo scopo di questa tesi è l'illustrazione delle tecnologie studiate recentemente, evidenziando potenzialità, utilità e limiti, e cercare di capire se queste alternative siano in grado di diminuire o sostituire totalmente l'uso del diossido di zolfo nella vinificazione.

Capitolo 1

GENERALITÀ DELL'ANIDRIDE SOLFOROSA

1.1 Generalità e forme nel vino

L'anidride solforosa (SO_2) è un composto chimico utilizzato come conservante per i prodotti agroalimentari da molti anni. Anche se l'uso di SO_2 viene dai tempi antichi, si pensa che il primo uso nell'industria agroalimentare sia cominciato nei primi anni del XVIII secolo.(PASTEUR, L., 1866)

Dopodiché il suo uso ha seguito quello dei cibi, specialmente quelli con pH bassi, come succhi di frutta e prodotti fermentati (P. Ribéreau-Gayon, 2017a).

La SO_2 è aggiunta al mosto d'uva o al vino in forma liquida o gassosa; in Europa e Svizzera, le forme di SO_2 che possono essere usate come additivi sono diossido di zolfo (SO_2), solfito di sodio (Na_2SO_3), bisolfito di sodio (NaHSO_3), metabisolfito di sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$), metabisolfito di potassio ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_5$), solfito di calcio (CaSO_4), bisolfito di calcio ($\text{Ca}(\text{HSO}_3)_2$) e bisolfito di potassio (KHSO_3) (Guerrero and Cantos-Villar, 2015). Le aggiunte al vino sono sempre indicate in mg/L, o in g/hL di anidride, qualunque sia la forma effettivamente impiegata. L'effetto dell'aggiunta è il medesimo, a prescindere dalla forma impiegata; l'equilibrio che si stabilisce tra le diverse forme dipende dal pH, dalla presenza di molecole che si combinano con il diossido di zolfo e la temperatura (Ribéreau-Gayon, 2017).

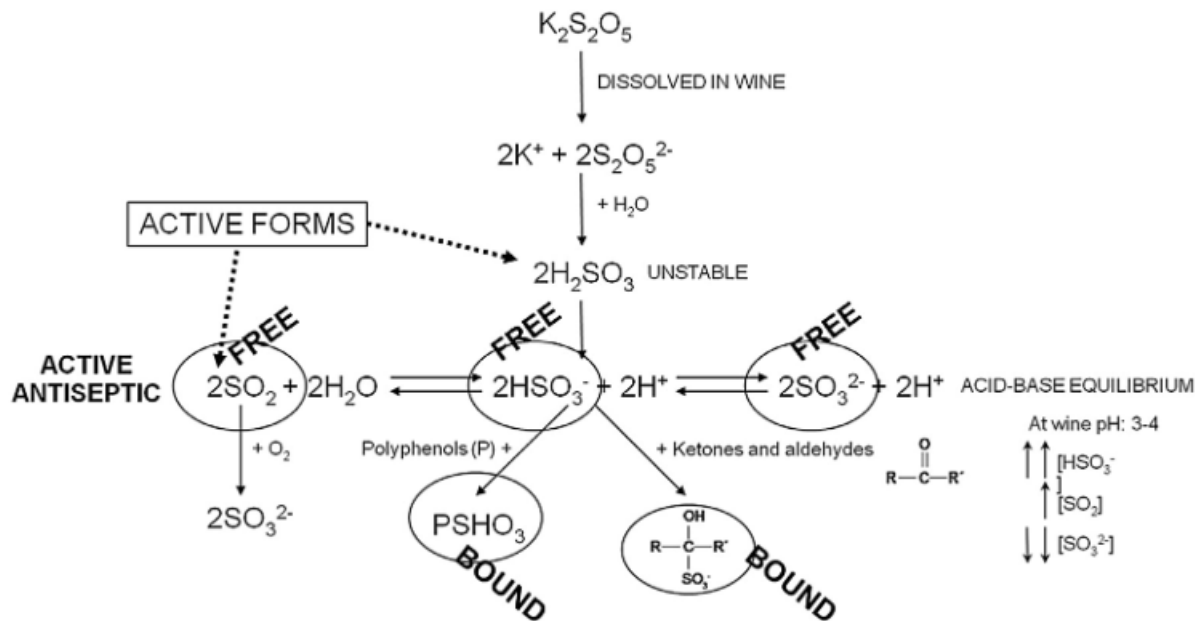


Figura 1-1 Equilibrio chimico della SO_2 quando il metabisolfito di potassio viene aggiunto nel vino (Guerrero and Cantos-Villar, 2015)

La SO_2 nel vino la troviamo in diverse forme che possiedono proprietà diverse, ma che si possono raggruppare in due forme principali: SO_2 combinata, ovvero che si lega ad altri composti presenti nel mosto o nel vino, oppure nella forma libera, cioè che non si lega agli altri composti, come SO_2 o SO_2 molecolare, ione bisolfito (HSO_3^-) o solfito neutro (SO_3^{2-}), anche se quest'ultima forma si riscontra a pH maggiori di 3.5, quindi non nel vino.

(Fig. 1-1)

La SO_2 libera insieme alla SO_2 combinata danno insieme la SO_2 totale. Rispetto alla libera, la combinata possiede proprietà antisettiche e antiossidanti molto meno importanti o quasi nulle. La concentrazione delle forme della SO_2 libera, SO_2 molecolare (SO_2 ; H_2SO_3), ione bisolfito (HSO_3^-) e solfito neutro (SO_3^{2-}) dipende principalmente dal pH, mentre per la SO_2 combinata dipende dalla quantità dei composti con cui si combina: ad esempio la SO_2 combinata con l'etanale è molto stabile e dipende dal tenore in etanale. Infine al variare della temperatura del vino abbiamo uno spostamento della SO_2 libera e della SO_2 combinata (Ribéreau-Gayon, 2017).

L'anidride solforosa è presente non solo nel vino come prodotto aggiunto durante la vinificazione, ma è anche prodotta dal metabolismo dei lieviti durante la fermentazione alcolica, la cosiddetta “ SO_2 biologica”. Infatti, i lieviti usano il zolfo presente nel mosto per la sintesi di aminoacidi, e i livelli prodotti di solfiti dai lieviti sono altamente ceppo-dipendenti.

Alla fine della fermentazione alcolica, i lieviti producono solfiti e solfuri. Una quantità eccessiva di questi composti può causare problemi nei vini finiti perché i solfuri possono portare off-flavors (es: odore di uova

marce) e i solfiti ad alte concentrazioni possono ritardare l'insorgenza della MLF a causa dell'inibizione dei LAB (Tedesco et al., 2022).

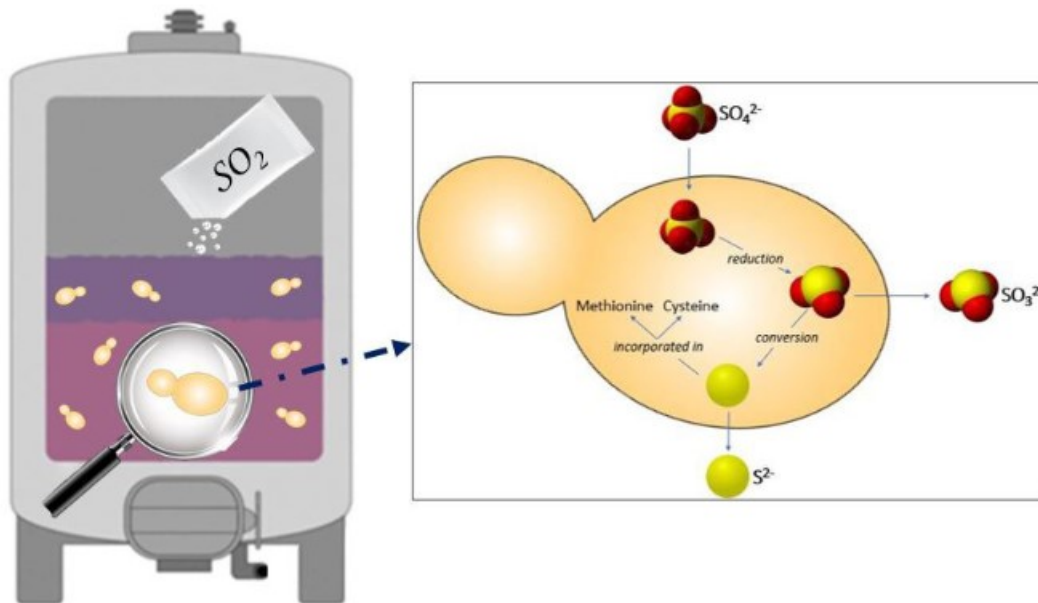


Figura 1-2 Metabolismo dello zolfo nelle cellule del lievito *Saccharomyces cerevisiae*
(Tedesco et al., 2022)

1.2 Attività antiossidativa

Molti componenti del vino, inclusi fenoli, alcuni metalli, tirosine e aldeidi, sono suscettibili alle ossidazioni durante il processo di vinificazione e portano prodotti indesiderabili che ne influenzano negativamente la composizione chimica e sensoriale.

I processi ossidativi possono essere classificati come enzimatici e non enzimatici: i primi si svolgono all'interno del mosto d'uva mentre i secondi all'interno delle uve, del mosto e del vino.

Le ossidazioni enzimatiche sono operate da una serie di enzimi; il più importante è la *polifenolo ossidasi*, la più importante *ossidoreduttasi* responsabile dell'imbrunimento, seguita da *tirosinasi*, *laccasi* e *perossidasi* (Oliveira et al., 2011).

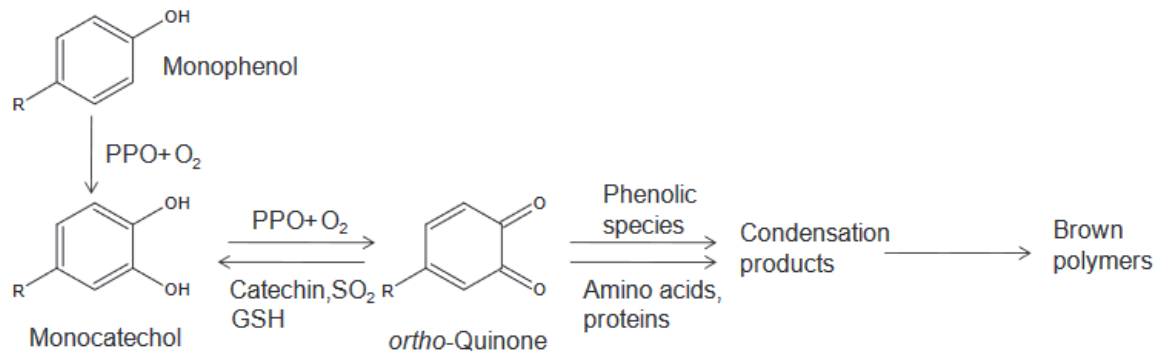


Figura 1-3 Imbrunimento enzimatico nel mosto d'uva (Li et al., 2008)

L'aggiunta di SO₂ inibisce istantaneamente l'azione degli enzimi ossidativi, e se necessario, ne consente la successiva distruzione.

Attraverso questo meccanismo, la SO₂ protegge i mosti dall'ossidazione, prima dell'avvio della fermentazione. Evita la comparsa delle casse ossidative nei vini bianchi e nei vini rossi ottenute da uve bottrizzate (Ribéreau-Gayon, 2017).

1.3 Attività antiossidante

L'ossidazione non enzimatica, anche chiamata ossidazione chimica, accade attraverso una serie di percorsi legati ai fenoli, uno di questi è l'ossidazione dei fenoli e la successiva polimerizzazione dei prodotti ossidati. Altre strade coinvolgono reazioni di polimerizzazione tra fenoli e altri composti presenti nel vino, inclusa la condensazione con acetaldeide o acido gliossilico (derivato dall'ossidazione dell'acido tartarico). (Li et al., 2008)

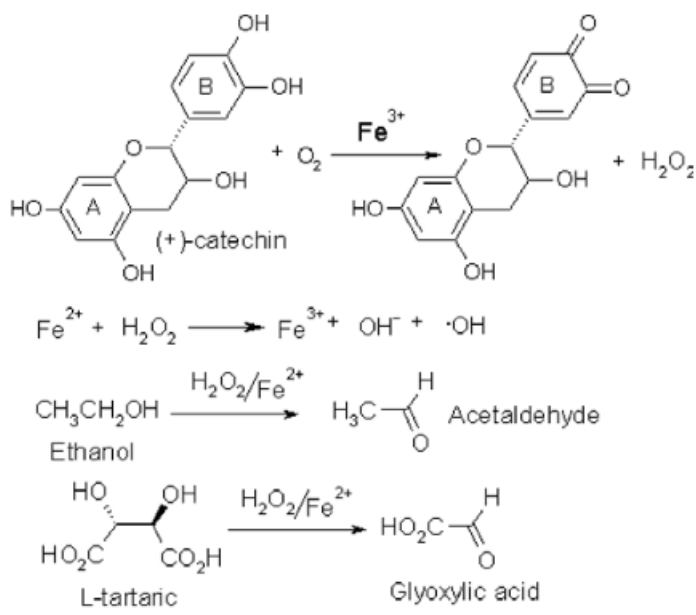
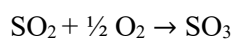


Figura 1-4 Reazione di ossidazione non enzimatica nel vino (Li et al., 2008)

L'anidride solforosa si combina con l'ossigeno disciolto secondo la seguente reazione:



È una reazione lenta e protegge i vini dall'ossidazione chimica. Nel mosto, che è molto ossidabile, la protezione deve essere ottenuta in modo rapido e la solfitazione permette di raggiungere questo risultato. Preserva i vini da un'eccessiva ossidazione dei composti fenolici e di alcune sostanze aromatiche, contribuendo a mantenere un livello di ossidoriduzione sufficientemente basso, favorevole all'evoluzione delle caratteristiche sensoriali durante la conservazione e durante l'invecchiamento (Ribéreau-Gayon, 2017).

1.4 Attività antisettica

L'anidride solforosa inibisce lo sviluppo di microrganismi come lieviti, batteri di acido lattico (LAB) e batteri di acido acetico (AAB). La sua azione previene la formazione di lieviti indigeni, fermentazioni secondarie indesiderate, sviluppo di lieviti *Brettanomyces*, sviluppo di lieviti micodermi, responsabili della "fioretta" del vino e diverse alterazioni di origini batteriche. (Guerrero and Cantos-Villar, 2015; Ribéreau-Gayon, 2017).

1.4.1 Attività contro lieviti

L'aggiunta di SO₂ nel mosto d'uva serve principalmente a inibire la crescita di lieviti non-*Saccharomyces* prevalenti in questa fase. È stato riscontrato che, in fermentazione spontanea, concentrazioni di SO₂ totale superiore a 40 mg/L compromette lo sviluppo della maggior parte di questi lieviti, ad eccezione di *Hanseniaspora osmophila* e *Candida* spp., mentre concentrazioni sotto 40 mg/L inibiscono lo sviluppo di *Metschnikowia* spp., e concentrazioni tra 60 e 100 mg/L inibiscono lo sviluppo di *Torulaspora*. *Zygosaccharomyces bailii*, *Schizosaccharomyces pombe*, e *Saccharomyces ludwigii* sono descritti come specie altamente tolleranti alla SO₂, mentre *Kloeckera apiculata* e *Hansenula anomala* sono altamente sensibili a questo composto (Tedesco et al., 2022).

L'aggiunta di SO₂ nel vino finale contribuisce principalmente a controllare lieviti appartenenti al genere *Dekkera/Brettanomyces*. Questi lieviti sono molto dannosi per la produzione del vino in quanto sono in grado di resistere in ambienti poveri di nutrienti, colonizzare e contaminare attrezzature da cantina, e produrre elevate quantità di composti indesiderabili, come acido acetico, etilfenoli, e tetraidrofenoli, responsabili di odori nel vino descritti come “cuoio bagnato”, “stalla” e “sudore di cavallo”.

(Suárez et al., 2007).

1.4.2 Attività contro i batteri

La SO₂, oltre ad agire contro i lieviti indesiderati, possiede anche un'attività antibatterica sia nel mosto che nel vino finale, anche se il meccanismo di azione non è ancora del tutto chiarito.

I batteri sono debolmente inibiti dalla SO₂ legata, che esercita un'attività antibatterica 5-10 volte inferiore rispetto alla SO₂ libera, anche se quella legata può essere 5-10 volte più abbondante rispetto alla libera.

Quest'attività coinvolge principalmente LAB e AAB.

Per quanto riguarda i AAB, le specie predominanti nelle uve, specialmente sulle bucce con uno stato sanitario non ottimale, sono ceppi del genere *Gluconobacter*, *Acetobacter*, *Gluconoacetobacter*, e *Komagataeibacter* (Mamlouk and Gullo, 2013).

I più frequenti LAB nel vino sono specie appartenenti al genere *Oenococcus*, *Pediococcus* e *Lactobacillus*.

Oenococcus oeni, il principale responsabile della fermentazione malolattica nel vino, è in grado di superare condizioni di stress (pH basso, alto contenuto di etanolo), ma è altamente sensibile alla SO₂, e questo è un fatto positivo nella produzione dei vini bianchi, dove solitamente la MLF non è desiderata (Tedesco et al., 2022).

1.5 Effetto sui caratteri sensoriali dei vini

L'anidride solforosa utilizzata può causare alcuni effetti indesiderati, come caratteristiche sensoriali negative nel vino, che neutralizza l'aroma o può essere una fonte per la formazione di solfiti.

Un uso eccessivo può avere un impatto negativo sulla qualità del vino, e durante la conservazione, potrebbe assumere un aspetto nuvoloso (Li et al., 2008).

Nella vinificazione in rosso, si ritiene che la solfitazione favorisce la dissoluzione dei minerali, acidi organici e composti fenolici (antociani e tannini) che costituiscono le sostanze coloranti dei vini rossi.

L'azione dissolvente è dovuta alla distruzione delle cellule della buccia che così cedono più facilmente i loro costituenti solubili, anche se il suo effetto potrebbe essere sovrastimato nel caso delle uve sane: il colore intenso dei vini ottenuti da mosti solfitati è probabilmente dovuto, anche nel caso di uve poco ammuffite, alla migliore protezione nei confronti della cassa ossidativa (Ribéreau-Gayon, 2017).

1.6 Effetti negativi

Nonostante i numerosi vantaggi del uso della SO₂ nella vinificazione, bisogna anche considerare una serie di problematiche che possono insorgere, sia per la qualità del vino che per i consumatori.

Nel caso della qualità del vino succede che durante la fermentazione alcolica, in presenza di dosi eccessive di SO₂ e pochi nutrienti nel mosto, i lieviti degradano l'anidride solforosa, con la formazione di off-flavors legati alla formazione di composti solforati, come l'acido solfidrico (H₂S) che si forma in assenza di ossigeno nel vino ed è associato al difetto del vino noto come "uova marce".

Per quanto riguarda gli effetti sul consumatore, l'industria del vino sta cercando di venire incontro alle richieste di ridurre la quantità di SO₂ aggiunta al vino, specialmente da quando è stato associato ad alcuni rischi per la salute, come reazioni allergiche da parte di individui solfato-sensibili (Tedesco et al., 2022).

La maggior parte degli individui non asintomatici possono tollerare fino a 5 ppm, mentre individui sensibili reagiscono negativamente all'ingestione di quantità di solfiti compresi tra 10 e 50 mg e possono manifestare sintomi, inclusi dermatiti, orticaria angioedema, dolore addominale, diarrea, broncocostrizioni, e anafilassi.

Gli asmatici possono essere esposti ad un rischio più elevato di avere reazioni ai solfiti contenuti nei cibi (Vally et al., 2009).

Di conseguenza, l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) ha stimato un'assunzione giornaliera di SO₂ di 0.7 mg per kg di peso corporeo, e la Comunità europea ha imposto limiti alle dosi di SO₂ applicate nei diversi cibi (“WHO_TRS_891.pdf,” n.d.).

1.7 Legislazione

Le diverse forme di SO₂ che si possono utilizzare in Europa e Svizzera come additivi agroalimentari sono etichettate con la lettera “E” seguita poi dai numeri che vanno da 220 a 228.

Quindi le diverse forme di SO₂ sono: E 220 (anidride solforosa), E 221 (sodio solfito), E 222 (bisolfito di sodio), E 223 (metabisolfito di sodio), E 224 (metabisolfito di potassio), E 226 (solfito di calcio), E 227 (bisolfito di calcio) infine E 228 (bisolfito di potassio) (Guerrero and Cantos-Villar, 2015).

Per quanto riguarda la vinificazione, il Regolamento Europeo (Regolamento UE No. 606/2009 e No. 479/2008) ha stabilito le dosi massime di SO₂ totali contenute nel vino, che sono 150 mg/L per i vini rossi e 200 mg/L per i bianchi, rosé o rosati, e nei vini che contengono un residuo zuccherino di 5 g/L.

Queste dosi possono essere aumentate di 50 mg/L quando lo zucchero contenuto nel vino (glucosio e fruttosio) eccede 5 g/L, raggiungendo le quote di 200 mg/L per i vini rossi e 250 mg/L per i vini bianchi.

Il Regolamento Europeo No. 203/2012 stabilisce dosi massime per vini biologici di 100 mg/L per i vini rossi, e 150 mg/l per vini bianchi e rosati. In più, il Regolamento obbliga a etichettare le bottiglie di vino con la frase “contiene solfiti”, quando la concentrazione di SO₂ supera le quantità di 10 mg/L. (Tedesco et al., 2022).

Anche se l'anidride solforosa è un composto con numerosi vantaggi nella vinificazione, specialmente a livello microbiologico, l'aumento dell'attenzione verso prodotti più “salutari”, cioè liberi da additivi chimici da parte dei consumatori, sta incoraggiando la ricerca verso trattamenti alternativi per poter ridurre il suo utilizzo.

In più, considerando il largo uso di questo composto nell'industria agroalimentare, il rischio è correlato da un eccessivo accumulo giornaliero, e l'OMS ha consigliato la riduzione in quei settori dove è previsto un'assunzione giornaliera, e quindi anche nel vino, dove la SO₂ è largamente usata in un prodotto molto consumato (Tedesco et al., 2022).

Capitolo 2

TRATTAMENTI ALTERNATIVI ALL'ANIDRIDE SOLFOROSA

2.1 Trattamenti fisici

Negli ultimi due decenni, importanti processi non termici sono aumentati nell'industria agroalimentare e anche nella vinificazione; queste tecnologie sono state studiate e testate da molti ricercatori. Le caratteristiche che accomunano queste tecnologie è che non causano grandi cambiamenti nel colore, gusto e qualità del vino rispetto ai trattamenti termici (come la pastorizzazione).

Nel caso di trattamenti fisici non termici, quelli maggiormente studiati e applicati sono le alte pressioni e i campi elettrici pulsati, utilizzati per la stabilizzazione del vino.

2.1.1 Alte pressioni (HPP)

La tecnica delle alte pressioni consiste nell'espore, a freddo, alimenti ad alte pressioni (da 100 a 600 Mpa) per tempi variabili (da 5 a 20 minuti).

Questo procedimento, può essere utilizzato per prolungare la shelf-life degli alimenti o per modificare le funzionalità tecnologiche di alcuni ingredienti alimentari.

L'impiego di questo trattamento è ancora limitato a causa del costo ancora elevato.

Tuttavia esistono applicazioni industriali sui succhi di frutta in Francia e in diversi Paesi europei, sugli insaccati in Spagna e in Francia, sulle confetture, il riso cotto in Giappone e sul guacamole negli Stati Uniti.

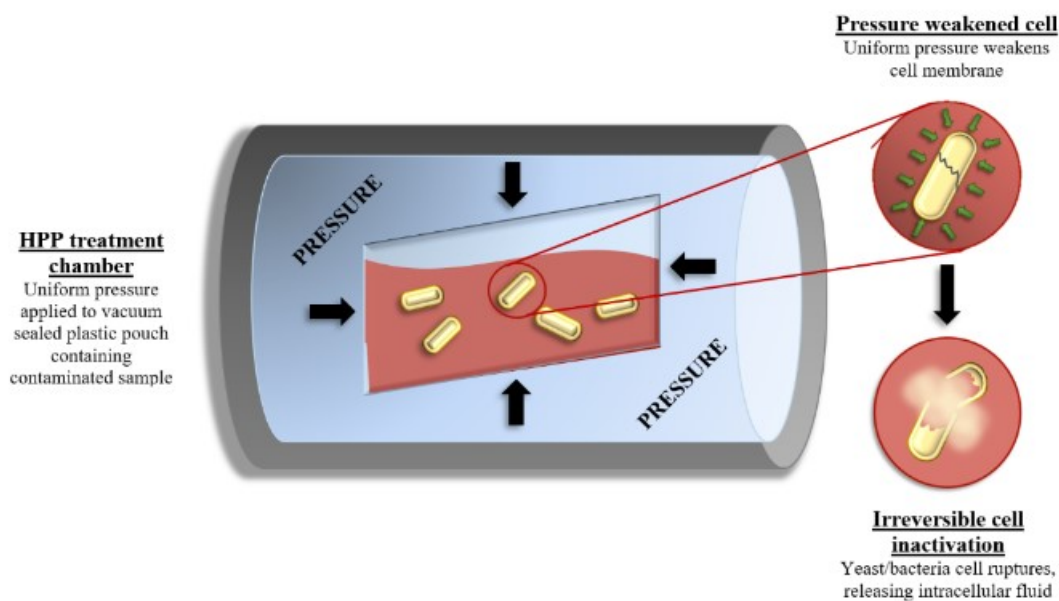


Figura 2-1 Schema che mostra l'inattivazione delle cellule di lievito e batteri attraverso il trattamento delle alte pressioni (Silva and van Wyk, 2021)

Le alte temperature inducono modificazioni delle membrane cellulari che rappresentano una delle principali cause di mortalità dei microrganismi. I lieviti e le muffe vengono inattivati da pressioni tra i 200 e 300 MPa. La maggior parte dei batteri sottoforma vegetativa sono inattivati da pressioni comprese tra i 400 e i 600 MPa. La tecnica della pressurizzazione consiste nell'applicare una pressione su di un liquido contenente i prodotti da sottoporre al trattamento. Per i prodotti da sottoporre al trattamento è possibile applicare direttamente la pressione operando in un sistema continuo.

Da un punto di vista ambientale, il principale vantaggio del procedimento è legato alla possibilità di conservare alcuni prodotti senza ricorrere ai trattamenti termici. L'impiego delle alte pressioni permette la conservazione delle caratteristiche naturali del vino senza determinarne apprezzabili cambiamenti della qualità del vino (Ribéreau-Gayon, 2018).

Alcuni autori (Santos et al., 2013) hanno riportato che HPP applicato ai vini rossi senza SO₂ avevano migliori proprietà sensoriali rispetto a quelli con SO₂ aggiunta, e gli stessi autori hanno mostrato che il colore, il gusto e altre caratteristiche sensoriali non hanno riscontrato cambiamento nei vini rossi dopo l'applicazione del metodo, ma che potrebbero insorgere dopo 6 mesi di conservazione. In particolare, hanno confrontato dei vini pressurizzati a diversi valori, uno a 425 Mpa e 500 Mpa con vini non trattati e vini con SO₂ e hanno riscontrato che quelli trattati avevano una composizione antocianica, dopo 9 mesi di conservazione inferiore rispetto all'vino non trattato (54-60 mg/L contro 124-128 mg/L), con conseguente cambiamento del colore del vino, da rosso intenso a un rosso più tenue. In più anche la quantità dei fenoli totali riscontrata alla fine dei 12 mesi di conservazione era diversa: il vino non trattato, quelli trattati con 425 e 500 Mpa avevano rispettivamente 21%, 27% e 15% in meno di fenoli totali rispetto al vino con SO₂, mentre quest'ultimo aveva un'attività antiossidante incrementata del 15% rispetto al periodo iniziale. In un altro studio, sempre dagli stessi autori, è emerso che nel vino trattato a pressioni di 500 e 600 Mpa (5 e 20 minuti) c'è stato abbassamento del contenuto

di antociani del 13-14%, in particolare di delphinidina, petunidina e malvidina, rispettivamente del 10%, 13-15% e 13-15%. Un ulteriore abbassamento è stato riscontrato anche per gli acidi fenolici del 8-11%, per via di un abbassamento del contenuto di acido gallico (11% per quello trattato a 500 MPa e 22% per quello a 600 MPa) e acido caffeico (8% e 6% in meno rispetto a quelli non trattati), e flavonoli del 14-19% in particolare i flavan-3-oli se confrontati con vini non pressurizzati (Santos et al., 2016).

Mentre un altro studio ha riportato che l'HPP applicata nei vini bianchi senza solfiti portava alla formazione di imbrunimento e una minore quantità di sostanze fenoliche utilizzando pressioni tra 425 e 500 MPa (per 5 minuti) rispetto ai vini non trattati e con SO₂ aggiunta dopo un anno di conservazione in bottiglia (Briones-Labarca et al., 2017).

2.1.2 Campi elettrici pulsati (CEP)

È una tecnologia che consiste nel sottoporre il prodotto ad impulsi elettrici (da 5 a 20) di breve durata (da 1 a 20 minuti) e con un voltaggio da 1 (molto debole) a 40 kV/cm (molto forte).

L'esposizione di una cellula ad un campo elettrico esterno determina una differenza di un potenziale elettrico tra una parte e l'altra della sua membrana.

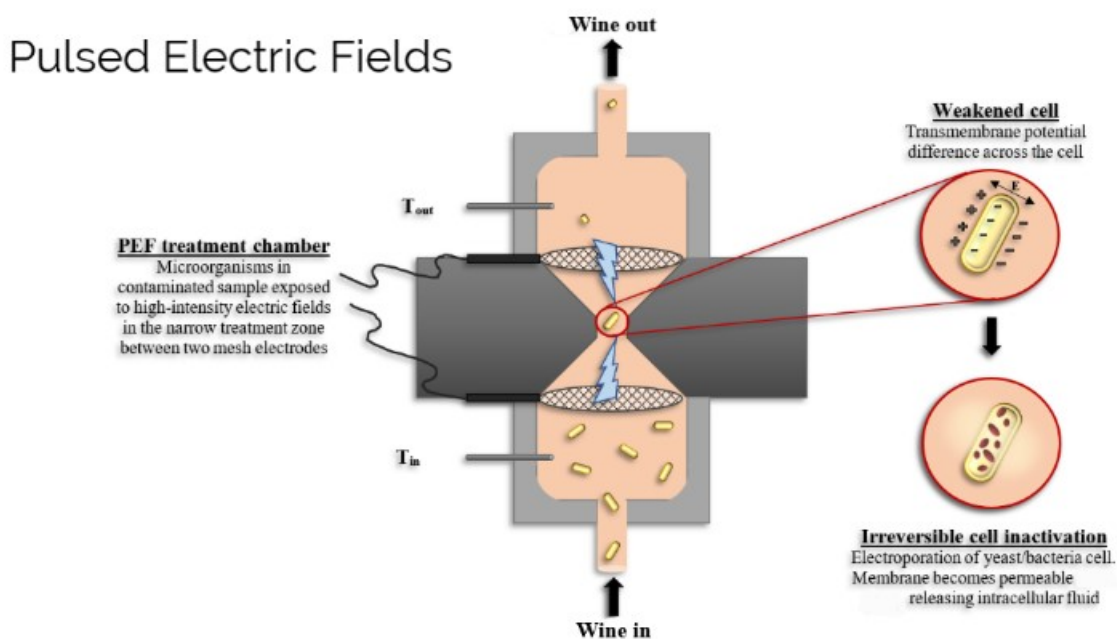


Figura 2-2 Inattivazione delle cellule di lievito e di batteri attraverso i campi elettrici (*Silva and van Wyk, 2021*)

Quando questo campo elettrico è molto intenso (valori maggiori di 10 kV/cm), determina un potenziale di membrana di molto superiore a quello naturale della cellula. Se il potenziale transmembrana raggiunge un valore critico, a causa dei fenomeni di repulsione tra le molecole della membrana, si ha la comparsa di pori nella membrana cellulare che ne aumentano la permeabilità.

La formazione irreversibile di pori provoca la migrazione verso l'esterno del contenuto cellulare, determinando così, la morte della cellula (Ribéreau-Gayon, 2018).

I parametri che influenzano l'efficacia dei CEP sono numerosi: composizione del prodotto (forza ionica, pH); temperatura del prodotto, natura dei microrganismi (i lieviti sono più sensibili dei batteri, i cocchi più sensibili dei bacilli), dimensione delle cellule (maggiori sono le dimensioni, più le cellule sono sensibili), stato fisiologico delle cellule (più sensibili in fase di crescita), intensità del campo elettrico applicato, durata del trattamento e frequenza degli impulsi, forma della pulsazione. (Ribéreau-Gayon, 2018).

Questa tecnologia è stata testata nel mosto e nel vino e sono stati osservati buoni risultati nell'inattivazione di lieviti e LAB: in uno studio, (González-Arenzana et al., 2019) condotto su campioni di vino rosso spagnolo è stato osservato che i CEP inattivano i lieviti *Brettanomyces/Dekkera*, responsabili del difetto del vino descritto come “stalla” o “sudore di cavallo” nel vino invecchiato in lungo periodo senza che siano state riscontrate deviazioni sensoriali.

In particolare, dopo 5 mesi *Brettanomyces* e *Dekkera* sono stati riscontrati nei campioni di controllo mentre solo *Dekkera* è stato riscontrato in quello trattato con il CEP, mentre al nono mese solo *Brettanomyces* è stato trovato nel vino trattato.

In un altro studio molto recente (Delso et al., 2023), sono stati usati i CEP su Chardonnay, con SO₂ aggiunta al mosto prima della fermentazione in modo da prevenire ossidazioni e inattivare lieviti non-*Saccharomyces* e far crescere lieviti solfito tolleranti *Saccharomyces* che sono usati per la fermentazione. I risultati ottenuti nello studio dimostrano che aumentare la temperatura sotto i 50°C per un brevissimo periodo (<0.5 s) durante il trattamento non incidono significativamente i parametri qualitativi del vino, come l'aroma e il colore. mentre controllava in maniera ottimale la popolazione di lieviti per 4 mesi. L'unica differenza riscontrata tra i vini trattati e i vini con SO₂ sono stati i valori di etil-succinato e etil-fenilacetato che risultavano più elevati nei vini trattati. Queste molecole, descritte come fruttato e al floreale, sono associate all'autolisi dei lieviti e gli autori suggeriscono che la concertazione più elevata può essere causata dall'elettroporazione dei lieviti, che ne innesca l'autolisi.

Infine gli autori suggerivano che la SO₂ poteva essere evitata se la tecnologia CEP veniva combinata con altri additivi chimici che hanno proprietà antiossidanti ma non antimicrobiche.

2.2 Trattamenti chimici

Diversi conservanti chimici sono stati identificati per ridurre il livello di SO₂ che si usano nella produzione del vino. È stato recentemente suggerito che l'uso di composti chimici come dimetildicarbonato, lisozima, chitosano, etc.. possono prevenire l'ossidazione del vino e l'inibizione di microrganismi indesiderati. (Kalkan Yıldırım and Darıcı, 2020).

2.2.1 Acido sorbico

È un acido grasso insaturo a corta catena, poco solubile in acqua (1,6 g/L a 20°C; 5,0 g/L a 50°C) ma solubile in etanolo (112 g/L a 20°C). Le soluzioni madri per il trattamento dei vini si trovano sotto forma di sali di sodio e di potassio, molto solubili in acqua. Il sorbato di potassio contiene il 75% di acido sorbico.

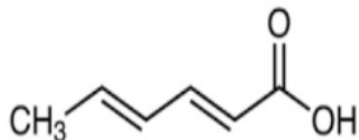


Figura 2-3 Struttura chimica dell'acido sorbico (Tedesco et al., 2022)

La dose avente azione fungicida, che consente di arrestare una fermentazione in atto (mutizzazione), è relativamente elevata, pari a 5 g/L e a partire da 0,5 g/L si osserva un rallentamento della fermentazione che si arresta prima dell'esaurimento degli zuccheri (Ribéreau-Gayon, 2018).

Il Regolamento UE No 606/2009 impone una concentrazione limite di acido sorbico nel vino in commercio di 200 mg/L (Tedesco et al., 2022).

L'acido sorbico, oltre che sui lieviti fermentativi classici, agisce nei confronti dei lieviti che si sviluppano alla superficie del vino formando un velo di fioretta (*Candida*). Dosi di 150 mg/L di acido sorbico assicurano la conservazione, per un periodo di tre settimane, di vini rossi di 10° alcolici, mentre dosi più elevate possono essere necessarie per conservare il vino per periodi più lunghi.

Le proprietà antibatteriche dell'acido sorbico sono invece molto meno marcate: non svolge alcuna attività nei confronti dei LAB, i batteri dell'acido lattico e degli AAB, i batteri dell'acido acetico e sarebbero necessarie dosi da 0,5 a 1 g/L per osservare qualche influenza.

Di conseguenza l'acido sorbico non può essere impiegato da solo, in quanto esercita un'azione contro i lieviti e non ostacola la crescita dei batteri, mentre la SO₂ svolge la funzione opposta, ovvero favorire i lieviti a discapito dei batteri.

Per concludere quindi, questa molecola rappresenta sicuramente un coadiuvante del diossido di zolfo ma non un vero prodotto di sostituzione (P. Ribéreau, D. Dubourdieu, B. Donèche, A. Lonvuard, n.d.).

2.2.2 Lisozima

Si tratta di un enzima della classe delle idrolasi, isolato dalle uova bianche, che è stato proposto per ridurre o anche sostituire la SO₂. La sua base proteica è costituita da una catena polipeptidica di 129 aminoacidi, caratterizzato dal peso molecolare di circa 14.4 kDa con un punto isoelettrico di 10.7, e quattro ponti solfati presenti in questa molecola che permette un'alta stabilità termica dell'enzima (P. Ribéreau, D. Dubourdieu, B. Donèche, A. Lonvuard, n.d.).

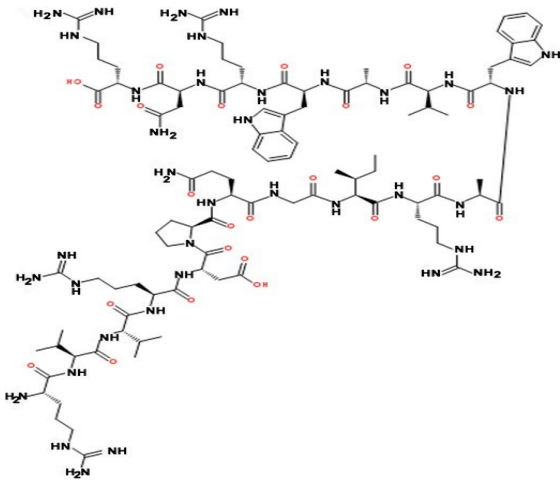


Figura 2-4 Struttura chimica del lisozima (Wang et al., 2016)

È in grado di causare la lisi della parete batterica, portandone la morte; in particolare, rompe i legami glicosidici tra acido N-acetilmuramico e N-acetilglucosamina nella parete batterica dei batteri Gram-positivi.

Per questo motivo il lisozima risulta efficace contro i batteri Gram-positivi ma lo è scarsamente o per nulla contro i batteri Gram-negativi (nel vino questi ultimi sono principalmente AAB) e contro i lieviti.

I batteri Gram-positivi responsabili della contaminazione del mosto appartengono al genere *Pediococcus* spp., *Lactobacillus* spp., le specie *Leuconostoc mesenteroides*, e *Oenococcus oeni*, quest'ultimo è più sensibile rispetto ai *Lactobacillus* e *Pediococcus*, che resistono a concentrazioni più elevate.

Il controllo dei LAB è utile nella vinificazione in bianco, dove l'aggiunta di 125-250 mg/L di lisozima inibisce la fermentazione malolattica (MLF), e nella vinificazione in rosso permette di evitare l'aumento dell'acidità volatile e per la regolazione ottimale della fermentazione malolattica.. (Tedesco et al., 2022).

Per quanto riguarda il suo uso, il Regolamento CE No.606/2009 ammette un'aggiunta massima di 500 mg/L nel mosto, mentre nei vini, la dose deve essere considerata come cumulativa, prendendo in considerazione ogni aggiunta al mosto.

L'EFSA ha pubblicato un parere scientifico sul lisozima, in cui il Panel conclude che i vini trattati con il lisozima nelle condizioni di utilizzo possono innescare reazioni allergiche indesiderate su individui sensibili.

I vini trattati con lisozima sono oggetto di etichettatura specifica, in applicazione delle disposizioni del Regolamento UE No 1266/2010 della Commissione del 22 dicembre 2010 che modifica la Direttiva 2007/68/CE per quanto riguarda gli obblighi in materia di etichettatura dei vini (P. Ribéreau, D. Dubourdieu, B. Donèche, A. Lonvuard, n.d.).

2.2.3 Dimetildicarbonato (DMDC)

Si tratta di un composto organico, presente a temperatura ambiente come un liquido incolore che possiede proprietà antimicrobiche. Nel vino, il DMDC è velocemente idrolizzato in metanolo e anidride solforosa in 12-24 ore (P. Ribéreau, D. Dubourdiou, B. Donèche, A. Lonvuard, n.d.).

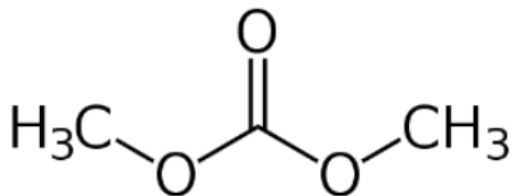


Figura 2-5 Struttura chimica del DMDC (Tedesco et al., 2022)

Il composto reagisce con gruppi amminici di alcuni enzimi nelle cellule microbiche, come l'*alcol deidrogenasi* e *gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi*, provocando la carbonilazione dei residui nucleici e infine la morte cellulare (Tedesco et al., 2022). L'applicazione più comune di questo composto è l'aggiunta ai vini poco prima dell'imbottigliamento. Il suo uso è consigliato insieme alla SO₂ in quanto il DMDC non ha proprietà antiossidanti, e a concentrazioni autorizzate, risulta inefficace contro i batteri.

L'attività antimicrobica dipende da temperatura, pH, contenuto di etanolo, specie microbiche e concentrazione iniziale. Le specie più sensibili sono *Z. baili*, *Zygoascus hellenicus*, e *Lachancea thermotolerans*, mentre altre specie come *Sch. pombe*, *D. bruxellenensis*, *S. cerevisiae*, e *Pichia guilliermondii* sono anche loro sensibili, ma a concentrazioni di DMDC leggermente più alte (Tedesco et al., 2022).

Altri studi, hanno valutato l'efficacia dell'aggiunta del limite legale di DMDC contro diversi tipi di lieviti associati alle uve e vino, confermando l'alta sensibilità per *Zygosaccharomyces* spp, mentre altre specie come *Candida*, *Metschnikowia*, si è visto che l'aggiunta non garantisce la stabilità microbiologica per il lungo periodo. (Zuehlke et al., 2015).

L'aggiunta di DMDC al vino è autorizzata dal 2001 dall'OIV, l'Organizzazione Internazionale della Vigna e del Vino, con i seguenti obiettivi: raggiungere la stabilità microbiologica in bottiglia di vino che contiene zuccheri fermentescibili e prevenire lo sviluppo di lieviti contaminanti e di batteri lattici.

Nell'Unione Europea, è autorizzato dal 2006 ad una dose massima di 200 mg/L nel vino e 250 mg/L nelle bevande non fermentate (P. Ribéreau-Gayon, 2017a).

L'aggiunta non deve provocare il superamento del contenuto massimo in metanolo nel vino raccomandato dall'OIV e il vino non può essere commercializzato finché il DMDC risulta rilevabile.

Sul piano tossicologico, la formazione di metanolo rappresenta il problema principale in quanto si tratta di una sostanza molto tossica, anche a concentrazioni molto basse. La decomposizione del DMDC produce anche carbammato di etile, di metile e di metil-etile, molecole odorose ma le cui concentrazioni sono insufficienti

per modificare l'aroma del vino in modo significativo (P. Ribéreau, D. Dubourdiou, B. Donèche, A. Lonvuard, n.d.).

2.2.4 Chitosano

È il derivato principale della chitina, un biopolimero composto da unità di N-acetilglucosamina collegate da legami β (1-4). Questo polisaccaride è il più abbondante in natura dopo la cellulosa, e si trova principalmente nei molluschi, crostacei (la principale fonte di commercio), funghi e insetti.

Il chitosano si ottiene per rimozione dei gruppi acetili tramite reazione di deacetilazione e, rispetto alla chitina è una forma più solubile (Tedesco et al., 2022).

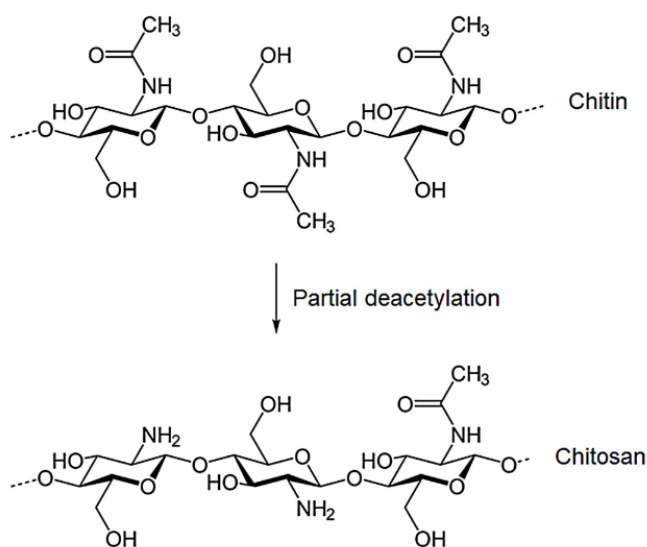


Figura 2-6 Struttura chimica di chitina e chitosano (Baris et al., 2023)

È stato accettato dalla Commissione Europea (Reg CE 53/2011) per essere utilizzato nella vinificazione per il trattamento dei vini, oppure per coadiuvare l'azione dei chiarificanti nei vini e nei mosti.

In questo settore è ammesso solamente il chitosano di origine fungina, derivante da *Aspergillus niger*, in modo da evitare potenziali reazioni allergiche, correlate al consumo di materiale crostaceo.

Recentemente è stato ammesso nella vinificazione anche chitosano estratto da *Agaricus bisporus*, anche se la sua conoscenza e il comportamento enologico non sono stati ancora investigati (Baris et al., 2023).

L'OIV ha autorizzato l'uso del chitosano in differenti dosi per le seguenti applicazioni:

- Aggiunta di 100 g/hL per prevenire la cassa proteica nel vino, e ridurre la concentrazione di metalli pesanti.

- Dosi di 500 g/hL sono autorizzate per ridurre ogni contaminazione prodotta da ocratossina A (OTA), una micotossina che può essere presente nel vino a dosi massime di 2 µg/L, prodotta dai funghi del genere *Aspergillus* e *Penicillium*.
- Dosi di 10 g/hL possono essere usate per ridurre la concentrazione di microrganismi indesiderati.

L'attività antisettica del chitosano non è ancora chiara del tutto. Alcuni autori hanno proposto diversi meccanismi d'azione; l'ipotesi più accreditata è l'interazione elettrostatica tra le cariche positive del chitosano e le cariche negative degli acidi teicoici presenti nella parete cellulare dei batteri Gram-positivi.

Queste interazioni causano una serie di reazioni, incluso un aumento della permeabilità, squilibrio osmotico, interferenze con la catena di trasporto degli elettroni, e morte cellulare (Castro Marín et al., 2019) (Verlee et al., 2017).

Altri autori hanno proposto che il chitosano, una volta assorbito dalla cellula batterica, interagisca con il suo DNA, causando un'inibizione della trascrizione del DNA, la sintesi di mRNA, e perciò la sintesi delle proteine (Galván Márquez et al., 2013).

Un altro meccanismo proposto è quello secondo cui il chitosano forma uno strato sulla superficie cellulare del lievito che impedisce l'entrata di nutrienti all'interno della cellula, portando quindi la morte cellulare.

Infine, altri autori hanno osservato che il chitosano chela micronutrienti e ioni metallici importanti per la stabilità della membrana esterna nei batteri Gram-negativi (Kong et al., 2010; Tedesco et al., 2022).

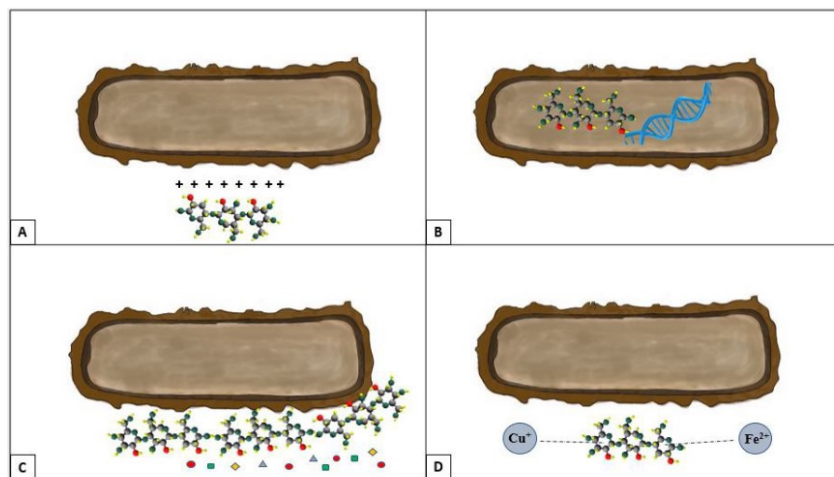


Figura 2-7 Meccanismi d'azione antimicrobica del chitosano proposti (Tedesco et al., 2022)

Per quanto riguarda la sua attività contro i lieviti nel vino, il chitosano mostra generalmente un effetto inibitorio più elevato nei lieviti non-*Saccharomyces* rispetto a *S.cerevisae*. Questo aspetto è importante da considerare, in quanto permette la corretta gestione della fermentazione alcolica; è stato riscontrato che solo dosi superiori ai livelli permessi dall'OIV nella vinificazione hanno un'azione biocida verso *Saccharomyces cerevisae*.

Invece per l'inibizione di lieviti non-*Saccharomyces*, è stato riscontrato che dosi di chitosano di 400 mg/L nella maggior parte delle specie presenti nel mosto di uve a bacca nera, hanno un'azione inibitoria inferiore rispetto a 50 mg/L di SO₂ aggiunta (Picariello et al., 2020).

Tra le specie non-*Saccharomyces* ci si concentra principalmente verso il genere *Brettanomyces/Dekkera*. Alcuni autori hanno investigato sul ruolo del chitosano, utilizzato per prevenire la contaminazione del vino rosso da parte di *B.bruxellensis* nella fase di invecchiamento in barrique, e hanno riportato che se il "batonnage", la tecnica che consiste nel rimescolamento del vino in fase di affinamento sulle fecce, si applica dopo l'aggiunta di chitosano, aiuta a limitare la crescita di *B. bruxellensis* (Nardi et al., 2022).

Per quanto invece riguarda l'azione antibatterica del chitosano è stata studiata da alcuni autori, ma su prodotti diversi dal vino e dal mosto, (succhi di mela, sambuco) e hanno riportato che con l'aggiunta di 0.3 g/L si riduce la quantità di cellule di LAB. In più le diverse specie di batteri lattici hanno diverse sensibilità al chitosano: *Lactobacillus* spp. hanno mostrato una resistenza più elevata rispetto a *Pediococcus* spp. Ad oggi ci sono pochi dati sull'attività contro i batteri dell'acido acetico e al momento indicano che l'aggiunta di 400 mg/L di chitosano possono ridurre la popolazione di *Acetobacter* similmente a quanto può fare l'aggiunta di 60 mg/L SO₂ (Tedesco et al., 2022).

2.2.5 Acido ascorbico

Conosciuto anche come Vitamina C, è un acido che si trova in piccole quantità nell'uva (circa 50 mg/L di succo) e nei frutti e scompare nel corso della fermentazione. Quindi in genere, i vini finiti ne sono sprovvisti.

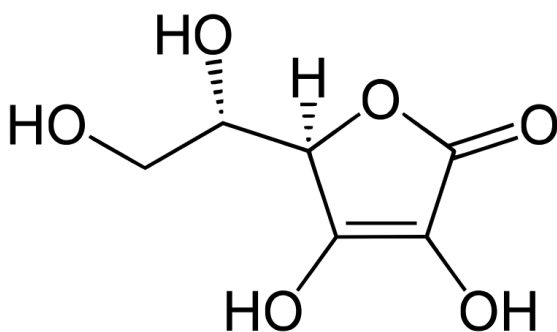


Figura 2-8 Struttura chimica dell'acido ascorbico (Wikipedia)

L'impiego dell'acido ascorbico è stato autorizzato in Francia nel 1962, per proteggere dalle ossidazioni i succhi di frutta, birra e bevande gassate. Oggi viene impiegato nella maggior parte dei paesi viticoli ad una dose massima di 150 mg/L in associazione al diossido di zolfo, in cui le dosi impiegate vanno da 50 a 100 mg/L.

È impiegato nella vinificazione come antiossidante, in quanto reagisce con l'ossigeno e forma acido deidroascorbico e acqua ossigenata, quest'ultima è un potente ossidante a cui basta aggiungere una quantità sufficiente di diossido di zolfo libero, che rappresenta il substrato preferito dell'acqua ossigenata.

La SO₂ e l'acido ascorbico presentano differenti proprietà antiossidanti: la prima ha un effetto ritardato ma stabile che si protrae nel tempo. Il secondo invece ha un effetto immediato: protegge dagli arieggiamenti improvvisi (casse ferrica) ma non ha una buona protezione quando si verifica un'ossidazione forte o continua. Quindi, nel lato pratico, risulta utile alla protezione dei vini durante la fase di imbottigliamento, in cui si verificano deboli ossidazioni, ma ha poca utilità durante la conservazione prolungata in vasche o in fusti.

L'aggiunta di acido ascorbico è autorizzata dall'OIV dal 2001 per proteggere le sostanze aromatiche dell'uva dall'influenza dell'ossigeno dell'aria. In alcuni paesi, l'acido ascorbico viene impiegato, in associazione con il diossido di zolfo per inibire l'ossidazione dei mosti di uve bianche, in particolare si usa per la protezione delle uve raccolte, perché, a differenza della SO₂, non favorisce il processo di macerazione.

Questo tipo di impiego non è previsto dalla legislazione della UE, che dal 2009 autorizza l'aggiunta di acido L-ascorbico unicamente ai vini ad una dose massima di 250 mg/L (P. Ribéreau-Gayon, 2017).

2.3 Trattamenti biologici

2.3.1 Batteriocine

Sono peptidi, provenienti da alcune specie di batteri di acido lattico che possiedono attività antimicrobica, usate per prevenire lo sviluppo di contaminazioni batteriche.

Le due batteriocine più usate nell'industria agroalimentare sono nisina e pediocina, prodotte da specifici LAB. È stato riscontrato che agiscono principalmente su la membrana citoplasmatica dei batteri Gram-positivi, rendendo le loro membrane permeabili ai piccoli composti ionici, che portano alla lisi cellulare, mentre la loro efficacia contro i batteri Gram-negativi è molto ridotta, e dipende dalle specie.

La nisina, sintetizzata dalla specie batterica *Lactococcus lactis* è l'unica batteriocina che può essere ottenuta commercialmente, è ed stato riscontrato che è in grado di inibire la crescita dei batteri. Sono stati studiati gli effetti della nisina sulla crescita dei batteri lattici e acetici e lieviti, mostrando che la nisina ha un effetto contro i batteri dell'acido lattico nel vino; in particolare si è visto che *Oenococcus oeni* è più sensibile alla nisina, con una concentrazione inibitoria minima di 0.024 µg/mL, mentre altre specie di LAB hanno una concentrazione inibitoria minima di 12.5 µg/mL.

Per quanto riguarda i lieviti, si è visto che le concentrazioni di nisina necessarie per poter vedere un effetto inibitorio sono superiori a 400 µg/mL. (Kong et al., 2010).

È importante sottolineare che l'aggiunta delle batteriocine al vino non è ancora autorizzato, ma diversi autori facendo studi preliminari, hanno riscontrato che l'aggiunta, insieme ad altri additivi alimentari come il DMDC,

che possiede attività inibitoria contro i lieviti, rappresenta una buona premessa per prevenire lo sviluppo di microrganismi indesiderati e, di conseguenza, sostituire la SO₂ (Santos et al., 2012).

2.3.2 Tossine killer

Si tratta di sostanze tossiche, di natura proteica, sintetizzate da alcuni lieviti che hanno un'attività antimicrobica contro lieviti o dello stessa specie oppure contro specie diverse, che sono sensibili.

Questo fenomeno, chiamato fattore killer, è stato scoperto su *S.cerevisiae* ma è stato riscontrato anche su altri generi, come *Hansenula*, *Candida*, *Kloeckera*, *Hanseniaspora*, *Pichia*.

Questo fattore killer è stato associato alla presenza nel citoplasma di molecole di RNA a doppia elica, chiamate VLP (virus like particles), che sono di due tipi: M e L.

Il genoma M codifica per la tossina (K) e per il fattore di immunità (R). Il genoma L codifica per una RNA polimerasi e il capsido proteico che incapsula i due genomi. Per poter esprimere il fattore killer (K⁺R⁺) è necessaria la presenza di tutti e due i genomi, in quanto il genoma L serve al mantenimento dell' M.

I ceppi sensibili non producono la tossina e non sono resistenti (K⁻R⁻) mentre i ceppi cosiddetti "neutri" (K⁻R⁺) sono insensibili ad una data tossina, che non la producono e che presentano il fattore di immunità.

Si conoscono quattro tipi di attività killer da parte dei ceppi di *S.cerevisiae* corrispondenti alle tossine K1, K2, K28 e Klus e le azioni principali delle tossine si esplicano con: maggior permeabilità della membrana cellulare dei lieviti sensibili, arresto del ciclo cellulare e attività beta-glucanasica sulla parete cellulare.

(P. Ribéreau-Gayon, 2017b).

Il primo utilizzo dei lieviti nella vinificazione, sfruttando la capacità del fattore killer risale agli anni '60, quando è stato riscontrato che ceppi di *S.cerevisiae* erano in grado di rilasciare tossine killer e inibire altri ceppi di *S.cerevisiae*, che permetteva di selezionare ceppi di lieviti che possiedono prestazioni migliori in termini di fermentazione. Nel corso degli anni si è cominciato ad utilizzare ceppi killer a sfruttarli come agenti bioprotettori contro i lieviti indigeni e diversi autori hanno riscontrato il fattore killer anche su lieviti non-*Saccharomyces* come *Candida*, *Pichia*, *Metschnikowia*, *Zygosaccharomyces* e sono stati proposti varie tossine killer prodotte da ceppi di questi lieviti contro altri, il che permette di ridurre l'utilizzo di SO₂ per il controllo di lieviti selvaggi e la bioprotezione dell'uva raccolta, del mosto o del vino (vedi LAFFORT).

Ad esempio è stato riscontrato che due tossine killer prodotte da *Kluyveromyces wickerhamii* e *Wickerhamomyces anomalus* hanno mostrato attività antimicrobica contro *B.bruxellensis* . Altri invece hanno dimostrato che la tossina killer SeKT, prodotta da *Saccharomyces eubayanus* nel vino , potrebbe essere usata per il biocontrollo di quattro lieviti contaminanti, che sono *B.bruxellensis*, *Pichia membranifaciens*, *Pichia guilliermondii* e *Pichia manshurica*.

Infine, l'uso di ceppi killer nella produzione di vini spumanti è stato proposto per accelerare il tempo di maturazione, quindi accelerare l'autolisi del lievito nella fermentazione secondaria negli spumanti.

(Gianvito et al., 2022)

CONCLUSIONI

In generale, la ricerca ha fatto molti passi avanti per quanto riguarda la scoperta di composti alternativi che possono essere utilizzati in enologia per diminuire l'uso del diossido di zolfo.

Diversi trattamenti sono stati studiati, alcuni si utilizzano già e molti altri sono sottoposti a studi con risultati preliminari. La difficoltà maggiormente riscontrata è l'applicazione in cantina di trattamenti fisici, che richiedono strutture da adattare ai vari impianti, mentre quelli chimici risultano più duttili e hanno costi molto minori. In più, i risultati osservati con questi metodi fanno capire che non sono applicabili per la conservazione dei vini per periodi più lunghi di 6 mesi. Un altro aspetto da tenere conto dei trattamenti fisici è che hanno bisogno di un'ottimizzazione in termini di consumo energetico per arrivare ad uno sviluppo industriale.

Per quanto riguarda i trattamenti chimici, sono più comodi da utilizzare, in quanto sono facilmente trasportabili e non necessitano di strutture apposite per il loro utilizzo in cantina.

In questo momento risulta più pratico utilizzare l'anidride solforosa insieme al DMDC prima dell'imbottigliamento, in quanto la prima possiede proprietà antiossidanti che permettono al vino in fase di maturazione di proteggersi dai fenomeni ossidativi e contro i batteri contaminanti, mentre il secondo non possiede le proprietà sopra descritte ma possiede funzioni antimicrobiche contro alcuni lieviti contaminanti che possono causare difetti al vino in bottiglia.

Un'altra possibile soluzione per diminuire l'anidride solforosa può essere quella di sostituirla con lieviti non-*Saccharomyces* che sfruttano il fenomeno dei lieviti killer nell'uva raccolta, perché se la SO₂ viene utilizzata per fermare le fermentazioni spontanee causate dai lieviti presenti sulle bucce dopo la raccolta, questi invece colonizzano il substrato per impedire il consumo di zuccheri e di azoto e quindi blocca le fermentazioni in atto. Il chitosano rappresenta invece la molecola più promettente nella ricerca di un possibile sostituto della SO₂ in alcuni casi: risulta utile, a dosi permesse, contro i lieviti non-*Saccharomyces*, quindi è un buon prodotto da utilizzare nella fase di maturazione del vino. Allo stesso tempo servono altri studi per fare chiarezza sul suo meccanismo di azione e sulla sua possibile utilità contro i batteri che al momento non risulta nota.

In questo momento, tutti gli studi esprimono all'unanimità l'impossibilità della presenza di un solo composto che sostituisca interamente la SO₂, perché le funzioni che svolge contemporaneamente il diossido di zolfo non si riscontrano sui singoli composti descritti. Ma gli autori consigliano di utilizzare questi composti in maniera complementare tra di loro, in modo da eliminare l'uso di SO₂ in alcune fasi della vinificazione, oppure di associarli con la SO₂.

Al termine di questo elaborato, risulta che ad oggi, l'anidride solforosa rimane indispensabile nel processo di vinificazione, e che la sua sostituzione completa non è possibile, perché le azioni che svolge contemporaneamente non sono state riscontrate nei singoli trattamenti sopra descritti. Per la maggior parte degli autori citati, la conclusione più plausibile resta di utilizzare i questi trattamenti in associazione tra di loro o con la SO₂.

BIBLIOGRAFIA

- Baris, F., Castro Marín, A., Pinheiro, A.C.D.A.S., Tappi, S., Chinnici, F., 2023. Efficacy of fungoid chitosans from *Aspergillus niger* and *Agaricus bisporus* in controlling the oxidative browning of model white wines. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 86, 103381. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2023.103381>
- Briones-Labarca, V., Perez-Wom, M., Habib, G., Giovagnoli-Vicuña, C., Cañas-Sarazua, R., Tabilo-Munizaga, G., Salazar, F.N., 2017. Oenological and Quality Characteristic on Young White Wines (*Sauvignon Blanc*): Effects of High Hydrostatic Pressure Processing. *Journal of Food Quality* 2017, 1–12. <https://doi.org/10.1155/2017/8524073>
- Castro Marín, A., Culcasi, M., Cassien, M., Stocker, P., Thétiot-Laurent, S., Robillard, B., Chinnici, F., Pietri, S., 2019. Chitosan as an antioxidant alternative to sulphites in oenology: EPR investigation of inhibitory mechanisms. *Food Chemistry* 285, 67–76. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.01.155>
- Delso, C., Berzosa, A., Sanz, J., Álvarez, I., Raso, J., 2023. Pulsed electric field processing as an alternative to sulfites (SO₂) for controlling *saccharomyces cerevisiae* involved in the fermentation of Chardonnay white wine. *Food Research International* 165, 112525. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2023.112525>
- Galván Márquez, I., Akuaku, J., Cruz, I., Cheetham, J., Golshani, A., Smith, M.L., 2013. Disruption of protein synthesis as antifungal mode of action by chitosan. *International Journal of Food Microbiology* 164, 108–112. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.03.025>
- Gianvito, P.D., Englezos, V., Rantsiou, K., Cocolin, L., 2022. Bioprotection strategies in winemaking. *International Journal of Food Microbiology* 364, 109532. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2022.109532>
- González-Arenzana, L., López-Alfaro, I., Gutiérrez, A.R., López, N., Santamaría, P., López, R., 2019. Continuous pulsed electric field treatments' impact on the microbiota of red Tempranillo wines aged in oak barrels. *Food Bioscience* 27, 54–59. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2018.10.012>
- Guerrero, R.F., Cantos-Villar, E., 2015. Demonstrating the efficiency of sulphur dioxide replacements in wine: A parameter review. *Trends in Food Science & Technology* 42, 27–43. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2014.11.004>
- Kalkan Yıldırım, H., Darıcı, B., 2020. ALTERNATIVE METHODS OF SULFUR DIOXIDE USED IN WINE PRODUCTION. *J microb biotech food sci* 9, 675–687. <https://doi.org/10.15414/jmbfs.2020.9.4.675-687>

- Kong, M., Chen, X.G., Xing, K., Park, H.J., 2010. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review. *International Journal of Food Microbiology* 144, 51–63. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.09.012>
- Li, H., Guo, A., Wang, H., 2008. Mechanisms of oxidative browning of wine. *Food Chemistry* 108, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.10.065>
- Mamlouk, D., Gullo, M., 2013. Acetic Acid Bacteria: Physiology and Carbon Sources Oxidation. *Indian J Microbiol* 53, 377–384. <https://doi.org/10.1007/s12088-013-0414-z>
- Nardi, T., Vagnoli, P., Minacci, A., Gautier, S., Sieczkowski, N., 2022. Evaluating the impact of a fungal-origin chitosan preparation on *Brettanomyces bruxellensis* in the context of wine aging. *Wine Studies* 1. <https://doi.org/10.4081/ws.4574>
- Oliveira, C.M., Ferreira, A.C.S., De Freitas, V., Silva, A.M.S., 2011. Oxidation mechanisms occurring in wines. *Food Research International* 44, 1115–1126. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.03.050>
- P. Ribéreau, D. Dubourdieu, B. Donèche, A. Lonvuard, n.d. I prodotti ed i processi che agiscono a complemento del diossido di zolfo, in: *Trattato di enologia*. Edagricole, pp. 237–257.
- PASTEUR, L., 1866. *Etudes sur le vin*. Imprimerie Imperiale, Paris, France. Imprimerie Imperiale, Paris, France.
- Picariello, L., Rinaldi, A., Blaiotta, G., Moio, L., Pirozzi, P., Gambuti, A., 2020. Effectiveness of chitosan as an alternative to sulfites in red wine production. *Eur Food Res Technol* 246, 1795–1804. <https://doi.org/10.1007/s00217-020-03533-9>
- Ribéreau-Gayon, 2017. L'impiego del diossido di zolfo (anidride solforosa) nel trattamento dei mosti e dei vini, in: *Trattato di enologia*. 1, *Microbiologia del vino e vinificazioni*. Edagricole, Milano, pp. 201–206.
- Ribéreau-Gayon, P., 2018. *Trattato di enologia*. 2, *Chimica del vino, stabilizzazione e trattamenti*, 4. ed. italiana. ed. Edagricole, Milano.
- Ribéreau-Gayon, P., 2017a. *Trattato di enologia*, 4. ed. ed. Edagricole, Milano.
- Ribéreau-Gayon, P., 2017b. *fattore killer*, in: *Trattato di enologia*. Edagricole, Milano, pp. 22–23.
- Santos, M.C., Nunes, C., Cappelle, J., Gonçalves, F.J., Rodrigues, A., Saraiva, J.A., Coimbra, M.A., 2013. Effect of high pressure treatments on the physicochemical properties of a sulphur dioxide-free red wine. *Food Chemistry* 141, 2558–2566. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.05.022>
- Santos, M.C., Nunes, C., Jourdes, M., Teissedre, P.-L., Rodrigues, A., Amado, O., Saraiva, J.A., Coimbra, M.A., 2016. Evaluation of the potential of high pressure technology as an enological practice for red wines. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 33, 76–83. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2015.11.018>
- Santos, M.C., Nunes, C., Saraiva, J.A., Coimbra, M.A., 2012. Chemical and physical methodologies for the replacement/reduction of sulfur dioxide use during winemaking: review of their potentialities and limitations. *Eur Food Res Technol* 234, 1–12. <https://doi.org/10.1007/s00217-011-1614-6>
- Silva, F.V.M., van Wyk, S., 2021. Emerging Non-Thermal Technologies as Alternative to SO₂ for the Production of Wine. *Foods* 10, 2175. <https://doi.org/10.3390/foods10092175>

Suárez, R., Suárez-Lepe, J.A., Morata, A., Calderón, F., 2007. The production of ethylphenols in wine by yeasts of the genera *Brettanomyces* and *Dekkera*: A review. *Food Chemistry* 102, 10–21. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.03.030>

Tedesco, F., Siesto, G., Pietrafesa, R., Romano, P., Salvia, R., Scieuzo, C., Falabella, P., Capece, A., 2022. Chemical Methods for Microbiological Control of Winemaking: An Overview of Current and Future Applications. *Beverages* 8, 58. <https://doi.org/10.3390/beverages8030058>

Vally, H., Misso, N.L.A., Madan, V., 2009. Clinical effects of sulphite additives. *Clinical & Experimental Allergy* 39, 1643–1651. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2009.03362.x>

Verlee, A., Mincke, S., Stevens, C.V., 2017. Recent developments in antibacterial and antifungal chitosan and its derivatives. *Carbohydr Polym* 164, 268–283. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.02.001>

Wang, S., Hu, X., Tan, L., Liao, Q., Chen, Z., 2016. Colorimetric detection of lysozyme based on its effect on the growth of gold nanoparticles induced by the reaction of chloroauric acid and hydroxylamine. *Microchim Acta* 183, 3135–3141. <https://doi.org/10.1007/s00604-016-1969-2>

WHO_TRS_891.pdf, n.d.

Zuehlke, J. m., Glawe, D. a., Edwards, C. g., 2015. Efficacy of Dimethyl Dicarboxylate Against Yeasts Associated with Washington State Grapes and Wines. *Journal of Food Processing and Preservation* 39, 1016–1026. <https://doi.org/10.1111/jfpp.12315>