



UNIVERSITA' DI TORINO

Facoltà di Agraria

Corso di Laurea in Viticoltura ed Enologia

Relazione finale

**Additivi enologici per la sostituzione del
biossido di zolfo**

Relatore: Prof. *Vincenzo Gerbi*

Candidato: *Alberto Cane*

Anno accademico

2011/2012

INDICE

Sommario

| | |
|---|----|
| Introduzione..... | 3 |
| Un po' di storia..... | 3 |
| Verso la riduzione/eliminazione..... | 7 |
| La Salute e il vino..... | 8 |
| Solfiti prodotti dai lieviti..... | 10 |
| Determinazione..... | 15 |
| Reattività..... | 16 |
| Proprietà..... | 20 |
| L'ANIDRIDE SOLFOROSA NEL CONTROLLO DELLE POPOLAZIONI MICROBICHE IN VINIFICAZIONE..... | 21 |
| L'ANIDRIDE SOLFOROSA COME AGENTE CHIARIFICANTE..... | 23 |
| LA PROTEZIONE DELLE OSSIDAZIONI..... | 24 |
| LE PROPRIETA' DI DISSOLUZIONE DELLA SO ₂ | 24 |
| GLI EFFETTI ORGANOLETTICI DELLA SO ₂ | 25 |
| Prodotti in sostituzione o a completamento del diossido di zolfo..... | 26 |
| Prodotti ad attività antiossidante: ACIDO ASCORBICO..... | 26 |
| Prodotti ad attività antiossidante: I TANNINI..... | 31 |
| Proprietà ad attività antiossidante: GLUTATIONE..... | 34 |
| Prodotto ad attività antiossidante: NATURALE ALTERNATIVA (AAP)..... | 38 |
| Prodotto ad attività antisettica: ACIDO SORBICO..... | 41 |
| Prodotto ad attività antisettica: DIMETILDICARBONATO (DMDC)..... | 45 |
| Prodotto ad attività antisettica: LISOZIMA..... | 48 |
| Prodotto ad attività antisettica: ACIDI GRASSI A MEDIA CATENA (C8, C10, C12)..... | 50 |
| Conclusioni..... | 53 |
| Bibliografia..... | 54 |
| Sitografia..... | 56 |

Introduzione

L'anidride solforosa è ormai, da oltre un secolo, l'additivo più utilizzato in enologia dato il suo largo spettro d'azione. Viene impiegata sin dalle prime fasi come la pigiatura, per la selezione dei lieviti indigeni, e il suo utilizzo continua per tutto il percorso della vinificazione, sino ad arrivare al momento della chiusura, dove ha lo scopo di prevenire una precoce ossidazione del vino in bottiglia.

A partire dagli ultimi anni del secolo scorso, c'è stata un'evoluzione della regolamentazione e delle pratiche enologiche, tutte volte, a portare un'importante riduzione del tenore di SO₂ nei vini al consumo. Infatti recentemente è stato abbassato il limite legale per poter non avere in etichetta la scritta "contiene solfiti" (introdotta precedentemente da un'altra normativa, la normativa per gli allergeni) portandolo a 10 mg/L ed inoltre, l'OMS (Organizzazione Mondiale della Sanità) ha decretato, come 0,7 mg/Kg di peso corporeo, la dose massima di solfiti assimilabili in un giorno. Data questa sua lieve tossicità anche i consumatori si stanno orientando maggiormente verso vini prodotti senza aggiunti di solfiti o con bassi tenori di solfiti. Per fare ciò, i produttori, stanno sperimentando nuove tecniche per ottimizzare l'utilizzo del diossido di zolfo, dirigendosi sempre più verso l'impiego di additivi di sostituzione o complementari a quest'ultimo.

Attualmente non esiste nessun singolo additivo enologico a così ampio spettro però, il problema potrebbe essere superato usufruendo sinergicamente delle caratteristiche dei vari prodotti. In questa ricerca si è cercato di spiegare pregi e difetti dei diversi additivi grazie ai numerosi studi effettuati dai ricercatori di tutto il mondo.

Un po' di storia...

La diffusione dell'impiego del diossido di zolfo (altrimenti chiamato anidride solforosa o designato semplicemente con la formula SO₂) nella produzione dei vini risale verosimilmente alla fine del XVIII secolo (Ribéreau-Gayon et al., 2007, vol I).

In realtà l'impiego dei fumi di anidride solforosa, prodotta dalla combustione di zolfo elementare o da minerali che lo contengono, per risanare fusti, tini e persino i locali adibiti ad abitazione, è una pratica molto antica. Omero, nell'Odissea (libro XXII), racconta come Ulisse, dopo aver ucciso i Proci, chiese *il solfo salutare e il fuoco per vaporare l'albergo* così da rendere quelle

stanze nuovamente adatte alla vita domestica. Ippocrate attribuiva al *gas solforoso* attività antipestilenziale e Giovenale e Ovidio parlano della proprietà dello *zolfo bruciato a purgar contagi*.

Nonostante la secolare decantata efficacia dei gas liberati dalla combustione dello zolfo, l'utilizzo dell'anidride solforosa in vinificazione è molto più recente. Il senatore conte Vincenzo Dandolo, nel secondo volume del suo trattato di enologia (editore P.G. Silvestri, Milano 1812), scriveva che *"l'acido solforoso è così potente da impedire la fermentazione vinosa del mosto e non lasciare passare il vino da sé solo in alcun caso alla fermentazione acetosa, ancorché esposto a contatto con l'aria"*. Ma è solo in seguito alla pubblicazione nel 1889 degli studi di Müller-Thurgau e dei lavori di Ventre, dei primi del '900, che l'impiego di questo additivo nel processo di vinificazione si affermò in modo definitivo.

Il suo impiego in cantina viene ancora oggi ritenuto indispensabile perché consente, senza dover ricorrere all'uso di mezzi tecnici sofisticati e onerosi, di mantenere sotto controllo lo stato microbiologico e ossidativo di un vino, evitando che si instaurino quegli indesiderati processi microbici e ossidativi che sono in grado di alterare radicalmente le caratteristiche organolettiche del prodotto finito. In realtà l'anidride solforosa svolge un ruolo molto più complesso e articolato: inibizione dell'attività di alcuni enzimi (es. polifenolossidasi); incremento del potere solvente esibito dal mosto-vino nei confronti della materia colorante (antociani); protezione del colore di un mosto-vino; realizzazione di un'azione selettiva e addirittura stimolante, quando impiegata in dosi ridotte, nei confronti della flora blastomicetica.

Le sue numerose proprietà lo rendono uno strumento indispensabile della pratica di cantina.

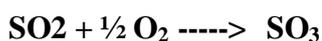
Forse vini possono essere vinificati in assenza totale, o quasi, di SO₂ tuttavia sarebbe sicuramente presuntuoso pretendere di vinificare in questo modo la totalità dei vini prodotti nelle diverse zone viticole del mondo. Non bisogna dimenticare che anche il lievito in fermentazione produce deboli quantità di SO₂. Le dosi sono generalmente inferiori ai 10 mg/l e solo in alcuni casi possono superare i 30 mg/l. L'assenza totale del diossido di zolfo nel vino risulta di conseguenza eccezionale, anche in mancanza di solfitazione.

Sono qui di seguito elencate le principali proprietà del diossido di zolfo:

- è un antisettico, inibisce lo sviluppo dei microrganismi. La sua attività è maggiore nei confronti dei batteri che dei lieviti. A basse dosi l'inibizione è transitoria; dosi elevate provocano la distruzione di una certa percentuale della popolazione microbica; l'efficacia di una determinata dose risulta accresciuta quando si riduce la popolazione iniziale, per

esempio con una filtrazione. Durante la conservazione, l'anidride solforosa si oppone allo sviluppo di tutti i microrganismi (lieviti, batteri lattici, batteri acetici) ed evita, in questo modo, la formazione di intorbidamenti dovuti alla presenza di lieviti, la rifermentazione dei vini dolci, lo sviluppo dei lieviti filmogeni (fioretta) e le diverse alterazioni di origine batterica

- è un antiossidante, esso combina, in presenza di catalizzatori, l'ossigeno disciolto secondo la reazione:



Questa reazione è lenta, consente di proteggere i vini dall'ossidazione di natura chimica, tuttavia è senza effetto nella protezione dei mosti la cui ossidazione di natura enzimatica, è molto più rapida. La SO₂ preserva i vini da una eccessiva ossidazione dei composti fenolici e di alcune sostanze aromatiche; previene la maderizzazione, contribuisce a mantenere un livello di ossidoriduzione sufficientemente basso, favorevole all'evoluzione delle caratteristiche sensoriali durante la conservazione e l'invecchiamento.

- è un antiossidasico, inibisce istantaneamente l'azione degli enzimi ossidasici (tirosinasi, laccasi) e, se necessario, ne consente la successiva distruzione. Attraverso questo meccanismo, la SO₂ protegge i mosti dall'ossidazione, prima dell'avvio della fermentazione. Evita anche la comparsa della casse ossidasica nei vini bianchi e nei vini rossi ottenuti da uve bottrizzate.
- combina l'etanale ed altri composti simili, protegge l'aroma dei vini ed elimina la nota di svanito (Ribéreau-Gayon et al., 2007, vol I).

Sulla quantità di SO₂ da impiegare nei vini si sono sollevate numerose questioni. Occorre assolutamente evitare dosi eccessive, principalmente per ragioni igieniche, e dosi elevate possono interferire anche con l'aroma del vino, provocando l'attenuazione del profumo; dosi ancora superiori trasmetterebbero difetti caratteristici, quali un odore soffocante ed irritante ed una sensazione di bruciore a fine degustazione.

Al contrario, quando la quantità è insufficiente ad assicurare la stabilità totale, un'ossidazione eccessiva o uno sviluppo microbico possono compromettere l'aspetto e la qualità complessiva del vino.

La regolazione delle dosi non è affatto semplice se si considerano i complessi equilibri chimici a cui questa molecola partecipa nel vino: al variare della composizione del mezzo essa si trova sotto forme diverse che possiedono anche proprietà differenti.

I notevoli progressi nella conoscenza della chimica del diossido di zolfo e delle sue proprietà

hanno permesso di razionalizzare il suo impiego nel vino e di diminuire in maniera considerevole le dosi di impiego, regolate dalla legislazione della UE (tabella 1).

L'8 marzo 2012 l'Unione Europea ha emanato il Regolamento di Esecuzione n. 203/2012 che finalmente ha dato i natali al vino biologico e ne ha stabilito le modalità di produzione.

Tra queste, anche i limiti nell'impiego della solforosa, i cui tenori massimi nel prodotto finito devono essere "sensibilmente inferiori" a quelli ammessi nei vini convenzionali:

- il tenore massimo di anidride solforosa non deve superare i 100 mg/L per i vini rossi se il tenore di zuccheri residui è inferiore a 2 g/L
- il tenore massimo di anidride solforosa non deve superare i 150 mg/L per i vini bianchi e rosati se il tenore di zuccheri residui è inferiore a 2 g/L
- per tutti gli altri vini, il tenore di anidride solforosa fissato dall'allegato 1B del regolamento [CE] n° 606/2009 al 1° Agosto 2010 è ridotto di 30 mg/L.

Tab. 1. Livelli massimi di solfiti nelle varie tipologie di vini al consumo. (regolamento [CE] n° 606/2009).

| Tipologia di vino | Limite massimo SO ₂ (mg/L) |
|---|---------------------------------------|
| Vino rosso contenente al massimo 4g/L di zuccheri riduttori | 150 |
| Vino bianco e rosato contenente al massimo 4g/L di zuccheri riduttori | 200 |
| Vino rosso, bianco e rosato contenete più di 4g/L di zuccheri riduttori | 300 |
| Casi eccezionali di alcuni vini bianchi | 400 |

Attualmente, in particolare per motivi di salute del consumatore, si ricerca la possibilità di una ulteriore riduzione dei contenuti autorizzati nei diversi tipi di vini. Ciò dipende sia dal miglioramento nel controllo delle condizioni di impiego di questo prodotto che dalla più approfondita conoscenza delle proprietà chimiche, così come del ruolo enologico della molecola di diossido di zolfo. Può anche essere interessante valutare la possibilità di impiego di prodotti di sostituzione; se si considera la molteplicità degli effetti, totalmente differenti, che il diossido di zolfo possiede, è poco probabile immaginare l'esistenza di un'altra sostanza in grado di assolvere

alle medesime funzioni, senza presentare inconvenienti. Al contrario, si può sicuramente ipotizzare l'esistenza di sostanze in grado di completare l'effetto della SO₂ limitatamente ad alcune delle sue proprietà. L'individuazione di un prodotto o di una tecnica di sostituzione è stata una costante preoccupazione della ricerca enologica.

Verso la riduzione/eliminazione

Diversi studi sono stati condotti nella branca della scienza dell'alimentazione con l'obiettivo dichiarato di sviluppare soluzioni innovative per garantire cibo più sano e salutare.

In enologia, l'attenzione attuale è focalizzata sull'utilizzo del biossido di zolfo, comunemente impiegato come "conservante" per le sue grandi proprietà tecnologiche ormai consolidate (Sonni et al., 2011 a).

Infatti agisce da antiossidante per proteggere i polifenoli del vino dall'ossidazione. Inoltre l'SO₂ inibisce le ossigenasi endogene dei mosti e previene l'insorgenza di fermentazioni indesiderate (ad esempio biossidazione acetica e fermentazione malolattica). Tuttavia c'è un trend generale che sta andando verso la riduzione dell'uso della solforosa nel processo di vinificazione perché, è stato riportato che, dopo alcune dosi di ingestione, potrebbe avere un effetto tossico sulla salute umana, soprattutto per gli individui particolarmente sensibili (Sonni et al., 2009).

E' anche stata valutata la sua riduzione in quanto questo composto si trova in molti cibi come additivo e la sua quantità consumata è cumulativa nell'organismo (Sonni et al., 2011 a).

I cosiddetti solfitanti, che comprendono vari additivi a base di solfito inorganico (E220-228), tra cui il solfito di sodio, il bisolfito di potassio e il metabisolfito, contengono biossido di zolfo (SO₂).

I solfiti vengono addizionati, in virtù delle loro proprietà antiossidanti e antimicrobiche, a numerosi alimenti quali: baccalà, crostacei e cefalopodi freschi (per ritardarne l'invecchiamento) o surgelati, biscotti secchi, snack a base di cereali e patate, patate disidratate, farine e fiocchi di patate, patate sbucciate, gnocchi, ortaggi sott'aceto e sott'olio, funghi lavorati o secchi, frutta secca, canditi, marmellate e confetture, condimenti a base di limone, mostarda, gelatine e zucchero, birra e vino. Inoltre, all'interno dell'apparato digerente, si assiste a una formazione continua di solfiti, anche se in quantità modeste, nel corso della metabolizzazione degli amminoacidi contenenti zolfo.

La Salute e il vino

Negli individui sani, alle dosi comunemente impiegate nell'industria alimentare, l'anidride solforosa è considerata un additivo sicuro; si tratta infatti di un composto naturale, prodotto anche dal nostro organismo durante il metabolismo di alcuni amminoacidi e facilmente inattivato dai sistemi di detossificazione endogeni (grazie agli enzimi solfito-ossidasi che la trasformano nell'innocuo solfato). Nonostante questa sicurezza d'uso, l'anidride solforosa ed i solfiti possono arrecare qualche problema, talvolta grave, alle persone per così dire "sensibili".

I solfiti, dal canto loro, reagiscono con gli acidi sviluppando biossido di zolfo, che ha appunto proprietà sbiancanti, battericide, ma anche fortemente irritanti. Va comunque detto che, una volta aggiunti al prodotto alimentare, i solfiti tendono a combinarsi irreversibilmente con alcuni suoi componenti, divenendo in gran parte inattivi, quindi non soggetti ad evaporazione.

Il contatto dei solfiti alimentari con l'acidità gastrica genera una certa quantità di anidride solforosa, che rappresenta uno dei gas più efficaci nell'indurre attacchi di broncospasmo nei soggetti asmatici.

Sono particolarmente esposti al rischio di subire questo genere di reazioni anche le persone allergiche all'aspirina. In generale, si stima che i solfiti causino problemi a circa lo 0,05-1% della popolazione (a seconda delle fonti e dei dosaggi), con un rischio sensibilmente maggiore per gli individui asmatici (nei quali la prevalenza può raggiungere il 5%). In questo contesto viene usato il termine sensibilità poiché non si può parlare di vera e propria allergia, ma di un'intolleranza che scatena sintomi pseudoallergici, tra cui il caratteristico "cerchio alla testa" (a cui contribuisce ovviamente anche l'alcol). Oltre alle emicranie benigne bisogna aggiungere il già ricordato rischio di crisi asmatiche (broncospasmo), ma anche di orticaria, nausea, vomito, sudorazione intensa, vampate di calore e ipotensione. I sintomi si manifestano generalmente entro 15-30 minuti dall'ingestione.

A prescindere dalla loro provenienza, i solfiti devono essere ossidati a solfati, per divenire atossici.

Nello stomaco, dove il pH è molto basso in fase di digestione, l'ossidazione è molto lenta, mentre risulta assai più rapida nell'intestino e nel sangue (pH subalcalino). L'irritazione gastrica dipende dal fatto che i solfiti, a contatto con i succhi gastrici, a reazione decisamente acida, liberano anidride solforosa, che provoca una sensazione dolorosa accompagnata a vomito se la dose di anidride solforosa ingerita supera i 3,5 mg/kg di peso corporeo (avvelenamento acuto). La trasformazione in seno ai tessuti dell'organismo dei solfiti (SO_3^{2-}) in solfati (SO_4^{2-}) avviene grazie all'intermediazione di una emoproteina (solfito-ossidasi) che contiene molibdeno,

abbondante soprattutto nel fegato e nei reni, localizzata nello spazio mitocondriale intermembrana. La sensazione di *cerchio alla testa* che si può verificare dopo ingestione di una dose significativa di anidride solforosa sembrerebbe legata proprio all'azione di questa emoproteina che, impiegando, sia pure in quantità limitata, l'ossigeno nella formazione dei solfati, ne limiterebbe l'afflusso al cervello, che reagirebbe con la nota sintomatologia dolorosa. La SO₂ presenta una certa **tossicità acuta** a breve termine e **cronica** a lungo termine e per questo sono stati condotti esperimenti per quantificarne il giusto dosaggio.

La **tossicità acuta** è stata studiata sugli animali: i solfiti risultano debolmente tossici per assorbimento in un'unica dose. In funzione della specie animale la DL 50 (dose letale per il 50% degli individui) risulta compresa tra 0,7 e 2,5 mg di SO₂ per kg di peso corporeo. Il solfito di sodio avrebbe così una tossicità acuta prossima a quella di prodotti inoffensivi, come il carbonato monosodico (bicarbonato di sodio) o il cloruro di potassio.

La **tossicità cronica** è stata studiata, sempre sugli animali, attraverso il regolare assorbimento, per molte generazioni, di un alimento contenente 1,5 g di SO₂/kg. Sono stati riscontrati tre tipi di complicazioni: la carenza di tiamina dovuta alla sua distruzione ad opera del diossido di zolfo, modificazioni istologiche dello stomaco ed accrescimento rallentato degli animali. Questo studio ha permesso di fissare la dose massima priva di tossicità per il ratto a 72 mg/kg di peso corporeo. Questo valore ha condotto l'OMS a fissare la DGA (dose giornaliera ammissibile) a 0,7 mg di SO₂ per kg di peso corporeo. Per quanto riguarda la tossicità nell'uomo, gli studi realizzati rilevano la comparsa di sintomi di intossicazione (nausee, vomito, irritazione gastrica) per dosi elevate di assorbimento (4 g di solfito di sodio in un'unica dose); non è stato osservato alcun effetto secondario fornendo 400 mg di diossido di zolfo per 25 giorni. L'eventuale tossicità per l'uomo è stata sovente attribuita alla ben nota capacità dei solfiti di distruggere la tiamina o vitamina B₁, tuttavia si è osservato che tale reazione è debole ad un pH prossimo a 2, corrispondente a quello dello stomaco (Ribéreau-Gayon et al., 2007, vol I).

Il timore di potenziali rischi di reazioni allergiche ha dettato che, dal 25 novembre 2005, secondo la Direttiva CE 2003/89, in tutto il territorio europeo non è più consentita l'immissione in commercio di vino che non rechi in etichetta la dicitura "contiene solfiti" o "contiene anidride solforosa" per concentrazioni superiori a 10 mg SO₂/kg o 10 mg SO₂/l.

Il vino destinato alle esportazioni dovrà riportare l'avvertenza suddetta nella lingua del paese in cui il prodotto sarà commercializzato (<http://www.infowine.com>).

Inoltre l'UE ha posto dei limiti sul quantitativo massimo di solforosa che può essere presente nel vino. (tabella 1)

Solfiti prodotti dai lieviti

Questo limite di 10 mg/L è sempre stato un po' un problema per chi volesse produrre vini privi di solfiti perché, durante la fermentazione alcolica, i lieviti producono naturalmente anidride solforosa (SO_2) come intermedio metabolico nella riduzione dei solfati. I ceppi di lieviti si possono classificare in basso produttori di SO_2 (e.g. *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus*) e in alto produttori (e.g. *Saccharomyces bayanus* Sacardo). Certi ceppi di lieviti possono produrre fino a 300 mg/L solfiti durante la fermentazione. Dott e Trüper nel 1976 hanno descritto che la solfito reductasi dei ceppi di lieviti che producono solfiti potrebbe essere alterata. Come conseguenza i solfiti (SO_2) si accumuleranno nella cellula e infine potranno essere rilasciati nel mosto. Ulteriori evidenze sulle mutazioni come possibile spiegazione per la produzione dei solfiti non sono state confermate. Oggi i produttori di lievito disidratato considerano questa importante proprietà del lievito durante il processo di selezione. Solo se il produttore di vino vuole indurre una fermentazione spontanea, non c'è garanzia sulle proprietà del lievito. La maggior parte dei ceppi di lievito oggi in commercio si possono considerare dei basso produttori di SO_2 , visto che producono fino a 20 mg/L di SO_2 totale. Solo pochi ceppi sembrano avere una produzione più alta (fino a 80 mg/L di SO_2) (Werner et al., 2010).

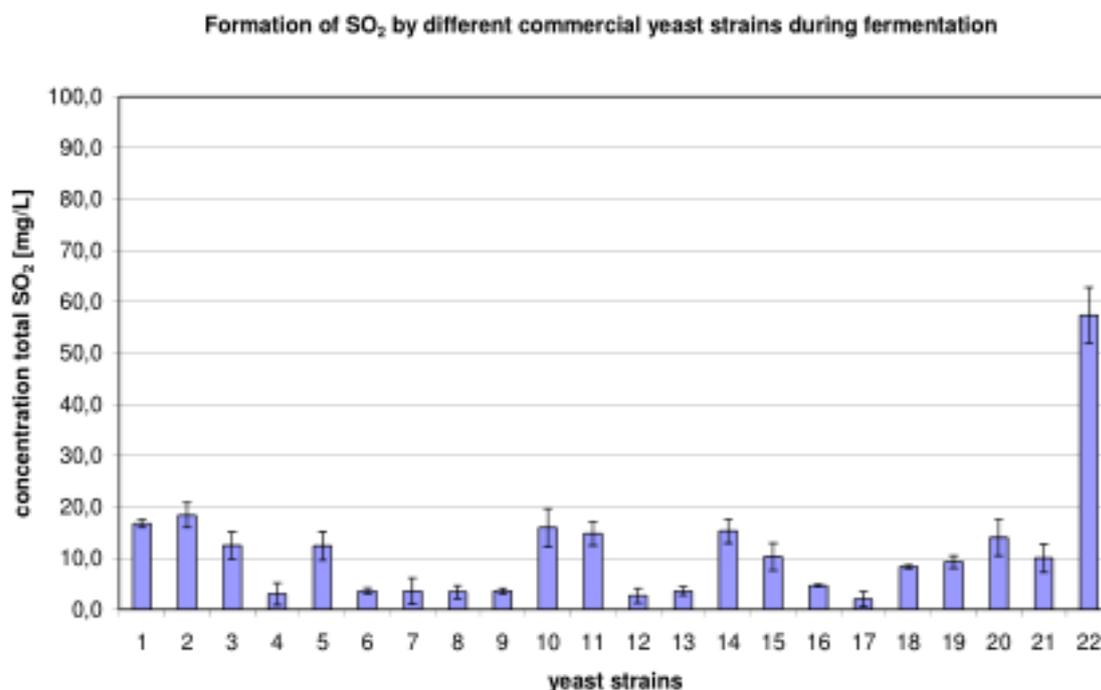
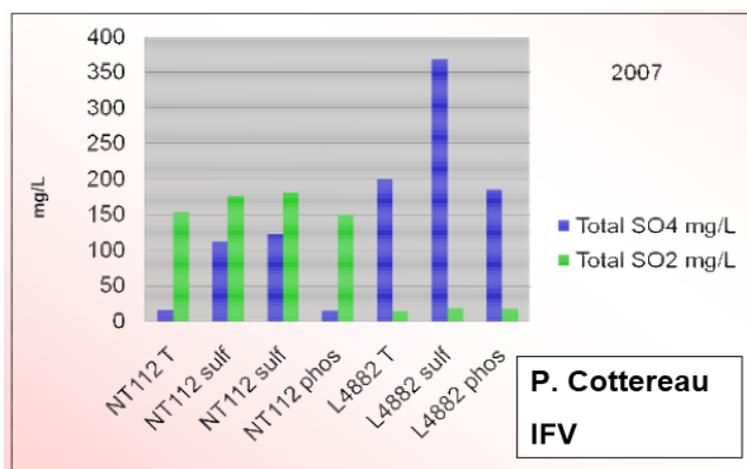


Fig. 1. Produzione di SO_2 da parte di 22 ceppi di lievito commerciale durante la fermentazione. Valore medio di tre repliche. (Werner et al., 2010).

La figura 1 mostra la produzione di SO₂ da parte di 22 ceppi commerciali di lievito usati in Europa e forniti dai principali produttori dei microrganismi. Le fermentazioni sono state effettuate con mosto di Riesling del 2007, che è stato pastorizzato per eliminare i microrganismi indesiderati. La temperatura è stata di 18°C, il mosto è stato inoculato con 30 g/hL di lievito secco. La reidratazione è stata fatta con acqua (35°C) per 25 minuti. I risultati mostrano essenzialmente due gruppi di lieviti. Uno produce meno di 10 mg/L di SO₂ totale, l'altro fra i 10 e i 20 mg/L. Solo un ceppo di lievito raggiunge i 57 mg/L di solforosa totale.



Tesi 1-4: lievito 1 (alto produttore; NT112);
 tesi 5-7: lievito 2 (basso produttore; L4882);
 tesi 5: controllo; tesi 2, 3 e 6: aggiunta
 ammonio solfato, tesi 4 e 7: aggiunta
 ammonio fosfato. Fonte: IFV.

Fig. 2. Produzione di SO₂ da parte di due diversi lieviti commerciali durante la fermentazione alcolica in mosto addizionato di ammonio solfato e ammonio fosfato.

http://www.darapri.it/immagini/nuove_mie/eserc_nuova/comeridurreSO2.pdf

La figura 2 mostra che la concentrazione di solfato gioca un ruolo importante per la produzione di SO₂ durante la fermentazione alcolica. Il solfato è presente nel mosto naturalmente o può essere introdotto dall'aggiunta di ammonio solfato, in qualità di nutriente. In alternativa l'ammonio può essere aggiunto come ammonio fosfato. Come mostra il risultato in figura 2, non tutti i lieviti hanno la stessa capacità di produrre SO₂ a partire da SO₄.

Il lievito 2 non utilizza il solfato in quantità rilevante, né se presente in forma naturale che aggiunta. Questo spiega perché può essere considerato un basso produttore di SO₂.

Il lievito 1 mostra un'alta capacità di produrre SO₂ a partire da SO₄, anche se il solfato è presente solo naturalmente nel mosto. Questo lievito può essere considerato un alto produttore di SO₂. La solforosa prodotta dal lievito verrà in seguito legata da alcuni composti. In questo modo sarà inclusa nella stima della solforosa totale nel vino, che è regolamentata da un limite, ma non sarà disponibile come SO₂ libera e attiva. Il consumo finale di SO₂ in uno specifico vino è

determinato da molti suoi composti, come l'acetaldeide, il 2-chetoglutarato e piruvato, ma anche dalla quantità di zucchero. Solo attraverso un'adeguata aggiunta di solforosa, il vino risulterà infine protetto da una certa quantità di SO₂ libera e attiva (Werner et al., 2010).

Ci sono dei fattori che si rendono responsabili dell'aggiunta di dosi sempre maggiori di solforosa nei vini, come ad esempio la produzione di prodotti secondari da parte del lievito.

L'acetaldeide è probabilmente il più conosciuto perchè la sua presenza in forma libera influenza in modo significativo le caratteristiche sensoriali di un vino. In questo caso, causa una nota di "ossidato" che viene spesso considerata un difetto. Essa viene apprezzata solo in specifiche tipologie di vino. Oltre all'acetaldeide, molti altri composti carbonilici possono agire da leganti per la SO₂ nel vino. Più alta è la concentrazione totale di composti leganti, più bassa è la quantità di SO₂ libera e attiva nel vino finito, a parità di solforosa aggiunta (Werner et al., 2010).

Prove sperimentali hanno dimostrato che la produzione naturale dei tre composti leganti la SO₂, acetaldeide, piruvato e 2-chetoglutarato, dipende dal ceppo di lievito e dalla composizione naturale del mosto. Per quanto riguarda la composizione nutrizionale del mezzo, la tiamina gioca un ruolo base sulla formazione di composti leganti la SO₂. Essa agisce come coenzima della piruvato decarbossilasi, la quale diminuisce la concentrazione degli ultimi intermedi nella via di consumo degli zuccheri del lievito. Certi fattori come il trattamento termico del mosto o l'attività della Botrytis sulle uve possono diminuire la naturale concentrazione di tiamina nel mosto. La figura 3 mostra l'effetto dell'aggiunta di nutrienti (ammonio e tiamina) sulla concentrazione di composti leganti la SO₂ in un mosto pastorizzato di Riesling dopo la fermentazione alcolica (Werner et al., 2010).

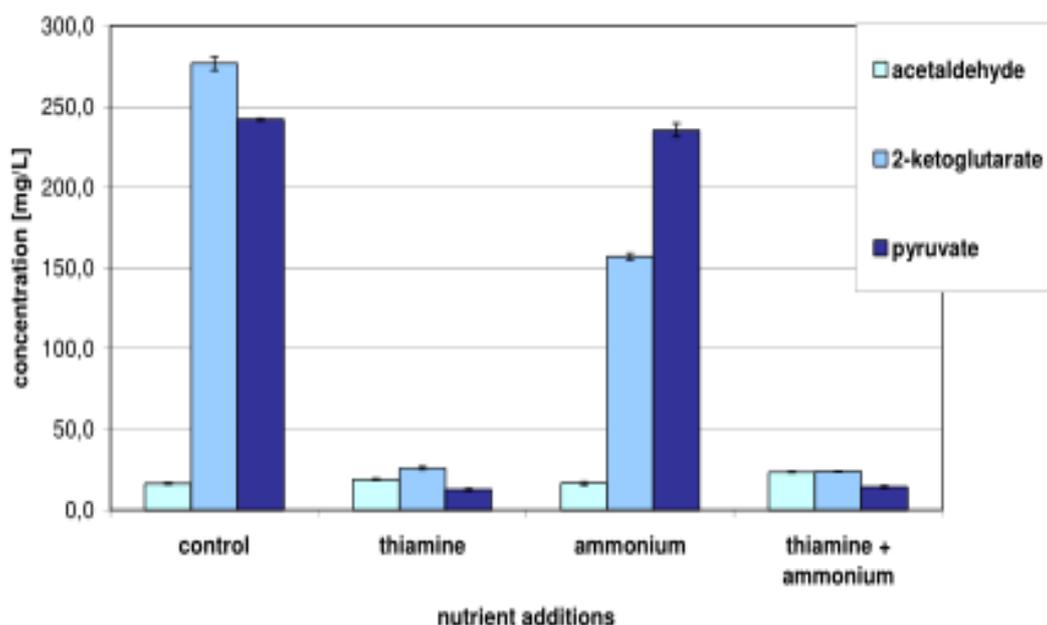


Fig.3. Effetto dell'aggiunta di ammonio-idrogenofosfato (0.5 g/L) e tiamina (0.6 mg/L) sulla concentrazione di acetaldeide, piruvato e 2-chetoglutarato nel vino finito. La fermentazione è stata effettuata da *Saccharomyces cerevisiae* in un mosto pastorizzato di Riesling. Valore medio di tre repliche. (Werner et al., 2010).

L'alta concentrazione di composti leganti la SO_2 nel vino di controllo può essere spiegata dalla pastorizzazione del succo, che è stata necessaria per eliminare i microrganismi indesiderati. L'effetto positivo dell'ammonio e della tiamina sulla riduzione dei composti leganti la SO_2 può essere dimostrata molto chiaramente. La concentrazione di queste sostanze può essere notevolmente abbassata, anche se esse non possono essere eliminate. In aggiunta l'attività di fermentazione dei lieviti può essere anche migliorata da entrambi i composti. In funzione della diversa concentrazione dei composti carbonilici nel vino, ogni prodotto richiede una differente quantità di SO_2 , affinché sia garantita una sufficiente qualità e stabilizzazione. Gli zuccheri riduttori, come glucosio e fruttosio, che sono presenti nei vini dolci, aumentano il potenziale legante in maniera significativa. Inoltre il valore di pH e la temperatura del vino giocano un ruolo importante in relazione all'equilibrio fra solforosa libera e legata (Werner et al., 2010).

Durante lo studio sul rimpiazzamento dell'anidride solforosa con lisozima e tannini enologici nei vini bianchi (Sonni et al., 2009), sono stati utilizzati 2 ceppi selezionati di *Saccharomyces cerevisiae* bassi produttori di solforosa (ceppo 333 e ceppo 1042 dell'Università di Bologna). Le cellule inoculate erano ad una concentrazione iniziale di 1.5×10^6 CFU mL^{-1} e le fermentazioni sono state prodotte in tripla copia.

Come si può notare dalla figura 3, la SO₂ totale dei campioni senza aggiunta dei solfiti (0.4-1.4 mg/L), ha confermato che entrambi i ceppi erano bassi produttori di solforosa. (tab. 2.)

L' anidride solforosa totale è stata determinata con il metodo ufficiale OIV (Sonni et al., 2009).

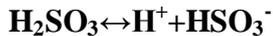
Tab. 2. parametri enologici generali dei vini finali fermentati con ceppo 333 e 1042. (Sonni et al., 2009).

| Parameter | Must | Strain 333 | | | |
|--|--------|-----------------|-----------------|--------------------------|-------------------|
| | | SO ₂ | Lysozyme | SO ₂ + tannin | Lysozyme + tannin |
| DO 420 nm | 0.181 | 0.037 ± 0.001 | 0.046 ± 0.001 | 0.042 ± 0.002 | 0.052 ± 0.002 |
| PFT (mg L ⁻¹) | 101.36 | 109 ± 0.94 | 112 ± 10.98 | 122 ± 4.09 | 113 ± 5.21 |
| Density | 1.0706 | 0.9921 ± 0.0002 | 0.9926 ± 0.0002 | 0.9921 ± 0.0002 | 0.9924 ± 0.0001 |
| pH | 3.08 | 3.01 ± 0.02 | 3.05 ± 0.00 | 3.03 ± 0.02 | 3.04 ± 0.02 |
| Total acidity (g L ⁻¹ tartaric acid) | 5.66 | 6.09 ± 0.19 | 5.81 ± 0.05 | 6.20 ± 0.09 | 6.00 ± 0.08 |
| Volatile acidity (g L ⁻¹ acetic acid) | - | 0.24 ± 0.00 | 0.23 ± 0.02 | 0.21 ± 0.03 | 0.21 ± 0.10 |
| Degree alcoholic (%) | - | 10.49 ± 0.08 | 10.48 ± 0.06 | 10.67 ± 0.12 | 10.59 ± 0.08 |
| Dry extract (g L ⁻¹) | - | 15.97 ± 0.29 | 17.47 ± 0.58 | 16.70 ± 0.17 | 17.33 ± 0.46 |
| Total SO ₂ (mg L ⁻¹) | - | 48.00 ± 1.60 | 0.43 ± 0.18 | 46.40 ± 1.39 | 0.75 ± 0.18 |
| Acetaldehyde (mg L ⁻¹) | - | 29.8 ± 0.91 | 6.49 ± 0.17 | 28.8 ± 1.24 | 4.99 ± 0.58 |
| Lysozyme (mg L ⁻¹) | - | - | 213 ± 27.77 | - | 200 ± 14.83 |
| Malic acid (g L ⁻¹) | 2.57 | 2.21 ± 0.18 | 2.19 ± 0.03 | 2.32 ± 0.05 | 2.04 ± 0.22 |
| | | | | Strain 1042 | |
| DO 420 nm | - | 0.022 ± 0.003 | 0.066 ± 0.004 | 0.027 ± 0.002 | 0.071 ± 0.003 |
| PFT (mg L ⁻¹) | - | 114 ± 0.55 | 111 ± 2.48 | 118 ± 2.71 | 120 ± 2.50 |
| Density | - | 0.9922 ± 0.0001 | 0.9922 ± 0.0002 | 0.9927 ± 0.0002 | 0.9922 ± 0.0002 |
| pH | - | 2.99 ± 0.00 | 3.00 ± 0.01 | 3.00 ± 0.00 | 3.00 ± 0.00 |
| Total acidity (g L ⁻¹ tartaric acid) | - | 7.83 ± 0.04 | 6.93 ± 0.04 | 7.85 ± 0.10 | 7.14 ± 0.22 |
| Volatile acidity (g L ⁻¹ acetic acid) | - | 0.22 ± 0.02 | 0.16 ± 0.02 | 0.23 ± 0.02 | 0.16 ± 0.02 |
| Degree alcoholic (%) | - | 11.08 ± 0.28 | 10.26 ± 0.32 | 11.14 ± 0.10 | 10.57 ± 0.48 |
| Dry extract (g L ⁻¹) | - | 18.23 ± 0.60 | 15.83 ± 0.57 | 19.63 ± 0.29 | 16.70 ± 1.01 |
| Total SO ₂ (mg L ⁻¹) | - | 39.00 ± 1.22 | 0.75 ± 0.18 | 40.00 ± 0.46 | 1.39 ± 0.18 |
| Acetaldehyde (mg L ⁻¹) | - | 15.6 ± 2.28 | 5.04 ± 0.77 | 23.5 ± 5.08 | 5.22 ± 0.50 |
| Lysozyme (mg L ⁻¹) | - | - | 132 ± 3.97 | - | 113 ± 1.59 |
| Malic acid (g L ⁻¹) | - | 2.64 ± 0.33 | 2.48 ± 0.11 | 2.87 ± 0.18 | 2.61 ± 0.15 |

Determinazione

- Definizioni

Si chiama anidride solforosa l'anidride solforosa presente nel mosto o nel vino nelle forme seguenti: H_2SO_3 , HSO_3^- il cui equilibrio dipende dal pH e dalla temperatura:



H_2SO_3 rappresenta la solforosa molecolare, indicata come SO_2 in quanto in acqua non esiste la sua presenza, se non in piccolissima parte, essendo l'equilibrio nettamente spostato verso SO_2 .

Si chiama anidride solforosa totale l'insieme delle varie forme di anidride solforosa presenti nel vino allo stato libero o combinato (Elenco e descrizione dei metodi di analisi, regolamento (CE) n. 606/2009).

Il **metodo ufficiale** CEE prevede:

- Anidride solforosa libera e totale su vini e mosti

L'anidride solforosa viene trascinata da una corrente di aria o di azoto e viene fissata ed ossidata per gorgogliamento in una soluzione diluita neutra di perossido di idrogeno.

L'acido solforico formato viene dosato con una soluzione titolata di idrossido di sodio.

L'anidride solforosa libera viene estratta dal vino per trascinamento a freddo (10 °C).

L'anidride solforosa totale viene estratta dal vino per trascinamento a caldo (100 °C circa).

- Mosti concentrati rettificati

L'anidride solforosa totale è estratta per trascinamento a caldo (circa 100 °C) del mosto rettificato concentrato previamente diluito (Elenco e descrizione dei metodi di analisi, regolamento (CE) n. 606/2009).

Questi sono i metodi ufficiali CEE, ma solitamente le cantine e i laboratori determinano l'anidride solforosa con un metodo più rapido e meno costoso:

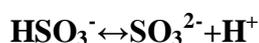
L'anidride solforosa libera viene dosata mediante titolazione iodometrica diretta. Si dosa quindi l'anidride solforosa combinata mediante titolazione iodometrica effettuata dopo idrolisi alcalina.

Sommandola all'anidride solforosa libera, si ottiene l'anidride solforosa totale.

La normativa CEE fa notare che nei vini sono presenti altre sostanze, oltre all'SO₂, che vengono ossidate dallo iodio in ambiente acido. Per dosaggi precisi sarebbe bene valutare la quantità di iodio consumata da tali sostanze. (Gibertini elettronica S.R.L., 2007).

Reattività

In soluzione acquosa questo composto si ripartisce in tre forme tra loro in equilibrio e più precisamente come molecola indissociata, l'acido solforoso (H₂SO₃ o SO₂H₂O), che essendo biprotico darà origine, attraverso i relativi equilibri di dissociazione (pK_{a1} = 1,78; pK_{a2} = 7,06) (fig 4), allo ione bisolfito (HSO₃⁻) e allo ione solfito (SO₃²⁻):



Queste tre forme H₂SO₃, HSO₃⁻ e SO₃²⁻ costituiscono, per definizione, la "SO₂ libera".

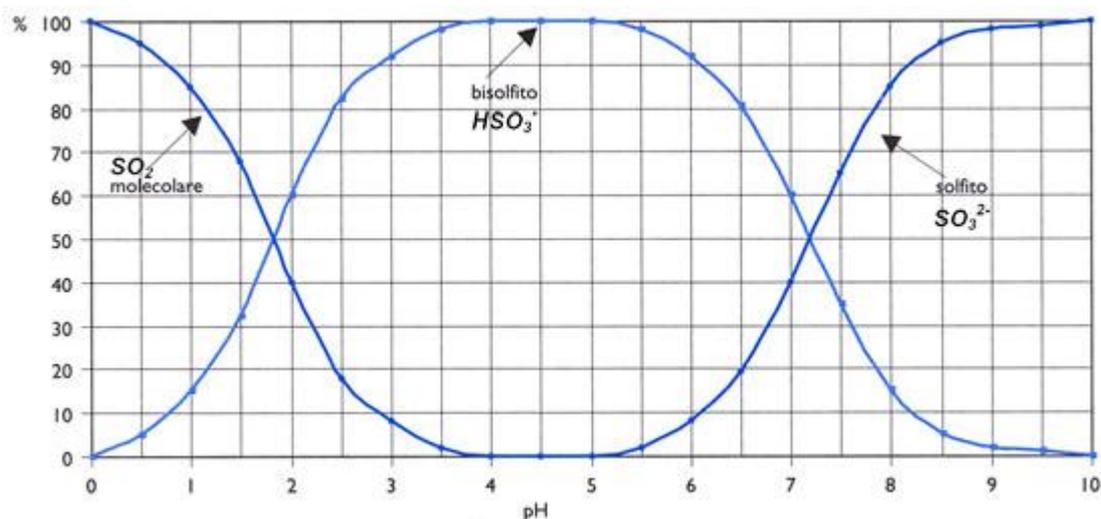


Fig. 4. distribuzione delle forme di anidride solforosa in funzione del pH del vino.

(http://www.darapri.it/immagini/nuove_mie/eserc_nuova/anidridesolforosa.htm).

Poiché la neutralizzazione di un acido comincia approssimativamente ad un $\text{pH}=\text{pK}-2$, il solfito neutro (SO_3^{--}) non è presente al pH del vino. La prima funzione acida risulta, invece, parzialmente neutralizzata, il grado di neutralizzazione dipende dal pH. La conoscenza della proporzione tra acido libero (o SO_2 attiva o molecolare) e bisolfito (HSO_3) è importante, poiché la parte essenziale delle proprietà enologiche viene attribuita al primo (soprattutto microbiologiche) (Ribéreau-Gayon et al., 2007, vol I).

La tabella 3 riporta i valori della SO_2 molecolare e dello ione bisolfito calcolati, per una serie di valori di pH corrispondenti a diversi tipi di vino.

Tab. 3. Valori percentuali di SO_2 molecolare e di bisolfito in funzione del pH (a 20°C) in soluzione acquosa. (Ribéreau-Gayon et al., 2007, vol I).

| pH | SO_2 molecolare | Bisolfito (HSO_3) |
|-----------|--|--|
| 3,00 | 6,06 | 94,94 |
| 3,10 | 4,88 | 95,12 |
| 3,20 | 3,91 | 96,09 |
| 3,30 | 3,13 | 96,87 |
| 3,40 | 2,51 | 97,49 |
| 3,50 | 2,00 | 98,00 |
| 3,60 | 1,60 | 98,40 |
| 3,70 | 1,27 | 98,73 |
| 3,80 | 1,01 | 98,99 |
| 3,90 | 0,81 | 99,19 |
| 4,00 | 0,64 | 99,36 |

Inoltre il valore della pK dipende dalla temperatura e dal tenore alcolico (tab 4), come pure dalla forza ionica, cioè dalla concentrazione dei sali.

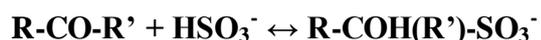
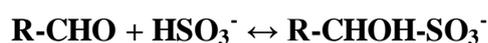
L'influenza della temperatura assume una particolare importanza durante il riscaldamento dei vini nel corso del quale il tenore in SO_2 libera può aumentare del doppio ed anche più. La liberazione del diossido di zolfo accentua, in modo significativo, l'efficacia del riscaldamento e contribuisce a spiegare come la sterilizzazione dei vini possa essere ottenuta, al momento dell'imbottigliamento, con temperature relativamente basse, comprese, ad esempio, tra 45 e 50°C (Ribéreau-Gayon et al., 2007, vol I).

Tab. 4. valore della pK1 in funzione della gradazione alcolica e della temperatura. (Ribéreau-Gayon et al., 2007, vol I).

| Alcol (% in volume) | Temperatura (°C) | | | | | | | |
|---------------------------|---------------------|------|------|------|------|------|------|------|
| | 19 | 22 | 25 | 28 | 31 | 34 | 37 | 40 |
| 0 | 1.78 | 1.85 | 2.00 | 2.14 | 2.25 | 2.31 | 2.37 | 2.48 |
| 5 | 1.88 | 1.96 | 2.11 | 2.24 | 2.34 | 2.40 | 2.47 | 2.56 |
| 10 | 1.98 | 2.06 | 2.21 | 2.34 | 2.44 | 2.50 | 2.57 | 2.66 |
| 15 | 2.08 | 2.16 | 2.31 | 2.45 | 2.54 | 2.61 | 2.67 | 2.76 |
| 20 | 2.18 | 2.26 | 2.41 | 2.55 | 2.64 | 2.72 | 2.78 | 2.86 |

Data la presenza di un numero elevato di composti di diversa natura, l'anidride solforosa disciolta in un mosto/vino tende a interagire con una molteplicità di componenti, per cui si ritrova in forma sia libera sia combinata, in proporzioni variabili in funzione della composizione e delle condizioni chimico-fisiche del mezzo.

I bisolfiti possiedono la proprietà di fissarsi alle molecole aventi un gruppo carbonilico secondo una reazione reversibile:



queste nuove forme rappresentano il diossido di zolfo combinato, o **SO₂ combinata** come viene definita in enologia, e la somma di quest'ultima più **SO₂ libera** dà la **SO₂ totale** (Ribéreau-Gayon et al., 2007, vol I).

Un'importante aliquota della solforosa totale tende, infatti, a legarsi ad alcuni composti e in particolare a quelli che presentano una funzione carbonilica (aldeidica o chetonica). La frazione combinata, in forme più o meno stabili, non sviluppa né l'odore né il gusto caratteristico del gas solforoso e non è più in grado di ossidarsi riducendo lo iodio, finché non ritorna nella sua forma libera. La SO₂ combinata non possiede le proprietà della SO₂; pertanto è senza interesse enologico, senonché è da tener in conto durante il dosaggio. Questa inattivazione è il risultato di equilibri chimici con numerose sostanze caratterizzate ciascuna da una "costante di dissociazione" K_d (tab 5).

La posizione di equilibrio delle reazioni di formazione di queste combinazioni è data da questa relazione, che associa le concentrazioni molari delle diverse molecole:

$$\frac{[R - CHO][HSO_3^-]}{[R - CHOH - SO_3^-]} = K$$

Quando K ha un valore basso, uguale o inferiore a $0,003 \times 10^{-3}$ M significa che la forma combinata è pari a 100 volte la forma libera.

Se invece, K ha un valore elevato, uguale o superiore a 30×10^{-3} M, la forma libera è 100 volte più concentrata della forma combinata, cioè la combinazione è modesta e molto poco stabile (Ribéreau-Gayon et al., 2007, vol I).

Tab. 5. valori di k_d e percentuale di combinazione calcolati dalle principali molecole identificate nei mosti/vini. (Ribéreau-Gayon et al., 2007, vol I).

| COMPOSTO | COSTANTE K_d | PERCENTUALE DI COMBINAZIONE |
|----------------------------|-------------------------|-----------------------------|
| Glucosio | 900×10^{-3} | 0,08 |
| Arabinosio | 40×10^{-3} | 1,8 |
| Malvidina-3-glucoside | $0,06 \times 10^{-3}$ | 93 |
| Malvidina-3,5-diglucoside | $0,044 \times 10^{-3}$ | 95 |
| Acido piruvico | $0,3 \times 10^{-3}$ | 72 |
| Acido-2-chetoglutarico | $0,5 \times 10^{-3}$ | 61 |
| Acido-D-galatturonico | 17×10^{-3} | 4,4 |
| Acido-D-glucuronico | 50×10^{-3} | 1,5 |
| Acido-2-chetogluconico | 1800×10^{-3} | 0,0 |
| Acido-2,5-dichetogluconico | $0,4 \times 10^{-3}$ | 66 |
| Xilosone | $1,4 \times 10^{-3}$ | 36 |
| Acetaldeide | $0,0024 \times 10^{-3}$ | Oltre 99 |

Per riassumere nella figura 5 vengono riportate le diverse forme in cui l'anidride solforosa è presente nel vino. A sinistra, si trova la "SO₂ attiva" la cui area di separazione (a) da HSO₃⁻ è mobile in funzione del pH. A destra, l'acido aldeidosolforoso rappresenta la frazione di SO₂ combinata con l'etanale: essendo basso il suo valore di K, questa combinazione è molto stabile e dipende dal tenore in etanale; la linea di separazione (c) è pressochè definitiva. Al contrario, la linea di separazione (b) tra il "diossido di zolfo libero" e il "diossido di zolfo combinato ad altre

sostanze” è mobile, al variare della temperatura e della dose di SO₂ libera essa si sposta in un senso o nell’altro.

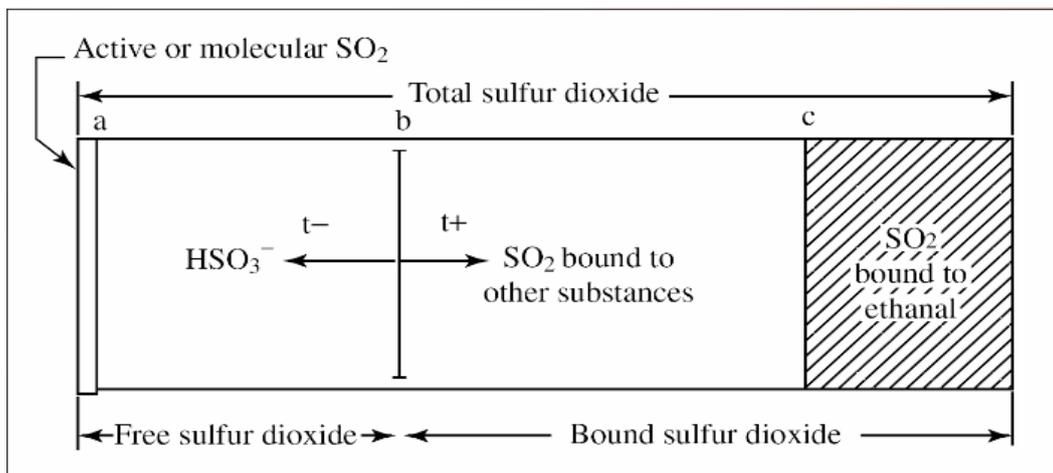


Fig. 5. schema che rappresenta le diverse forme del diossido di zolfo nel vino. (Ribéreau-Gayon et al., 2007, vol I).

Proprietà

Il suo impiego in cantina viene ancora oggi ritenuto indispensabile perché consente, senza dover ricorrere all'uso di mezzi tecnici sofisticati e onerosi, di mantenere sotto controllo lo stato microbiologico e ossidativo di un vino, evitando che si instaurino quegli indesiderati processi microbici e ossidativi che sono in grado di alterare radicalmente le caratteristiche organolettiche del prodotto finito. In realtà l'anidride solforosa svolge un ruolo molto più complesso e articolato: inibizione dell'attività di alcuni enzimi (es. polifenolossidasi); incremento del potere solvente esibito dal mosto-vino nei confronti della materia colorante (antociani); protezione del colore di un mosto-vino; realizzazione di un'azione selettivante e addirittura stimolante, quando impiegata in dosi ridotte, nei confronti della flora blastomicetica.

Bisogna, inoltre, considerare che le diverse forme del diossido di zolfo non intervengono nello stesso modo su ciascuna delle sue proprietà (tab 6) (Ribéreau-Gayon et al., 2007, vol I).

Tab. 6. proprietà delle diverse forme di diossido di zolfo che vengono sfruttate durante la conservazione dei vini. (Ribéreau-Gayon et al., 2007, vol I).

| Proprietà | SO ₂ | HSO ₃ ⁻ | R-SO ₃ ⁻ |
|--|--|-------------------------------|---|
| Antilievito | + | Debole | 0 |
| Antibatteriche | + | Debole | Debole |
| Antiossidanti | + | + | 0 |
| Antiossidasiche | + | + | 0 |
| Miglioramento delle caratteristiche sensoriali: - Potenziale redox - Neutralizzante nei confronti dell'etanale | + | + | 0 + |
| Effetto organolettico proprio dell'SO ₂ | Odore pungente, gusto di SO ₂ | Privo di odore, salato, amaro | Privo di odore e privo di gusto alle dosi normali |

L'ANIDRIDE SOLFOROSA NEL CONTROLLO DELLE POPOLAZIONI MICROBICHE IN VINIFICAZIONE

La SO₂ ha la capacità di inibire o di distruggere, in funzione della dose utilizzata, i lieviti e i batteri. È particolarmente attiva sui lieviti contaminanti e i batteri acetici presenti sulle uve sane o poco ammuffite. Distruggendo i lieviti poco efficaci, la solfitazione favorisce lo sviluppo dei ceppi attivi, indigeni o aggiunti: questo spiega sia il leggero ritardo all'avvio con successiva accelerazione di queste fermentazioni dopo solfitazione (fig. 6).



Fig. 6. Influenza sulla velocità della fermentazione alcolica della solfitazione iniziale dei mosti.

(http://www.darapri.it/immagini/nuove_mic/eserc_nuova/anidridesolforosa.htm).

Il diossido di zolfo possiede un'azione fungistatica a pH elevati ed a basse dosi e un'azione fungicida a pH bassi ed a dosi più elevate (dovuto alla maggior presenza di SO₂ molecolare). La forma HSO₃⁻ presenta un'azione soltanto fungistatica. Ciascun ceppo di lievito, inoltre, possiede una sensibilità propria nei confronti delle diverse forme di diossido di zolfo.

L'attività della solforosa libera nei confronti dei batteri lattici risente dell'effetto del pH più di quanto non avvenga per l'attività nei confronti dei lieviti. Attualmente si sa che anche la frazione combinata all'etanale e all'acido piruvico possiede un'attività antibatterica. Si tratta di un'azione diretta della molecola di SO₂ combinata e non dipende dalla liberazione, ad opera dei batteri, di SO₂ libera dalla forma combinata. Sembra che il diossido di zolfo combinato all'etanale (o all'acido piruvico) possieda un'attività antibatterica da 5 a 10 volte più debole di quella della solforosa libera, tuttavia bisogna considerare che la sua concentrazione può risultare da 5 a 10 volte maggiore (Ribéreau-Gayon et al., 2007, vol I).

L'attività antisettica svolta dall'anidride solforosa varia in funzione sia della composizione del mezzo di reazione sia del microrganismo considerato, e appare dovuta alla sua capacità di interagire con i ponti a disolfuro presenti nelle proteine, che vengono prima ridotti e quindi scissi, e con i gruppi carbonilici presenti in molte strutture molecolari e, in particolare, nell'acetil-Co-A.

La quantità di etanolo presente in soluzione appare positivamente correlata all'azione antisettica svolta dalla SO₂, che può essere impiegata in quantità più contenute. Un incremento di temperatura induce, invece, due effetti tra loro contrastanti: mentre da un lato produce un effetto sinergizzante per cui concorre a limitare l'attività microbica, dall'altro riduce la solubilità della SO₂ nel mezzo di reazione, favorendone la liberazione nell'atmosfera. Operando a temperature prossime a quella ambiente, è questo secondo effetto a prendere il sopravvento, per cui un aumento di temperatura tende a limitarne l'attività antisettica. Per quanto riguarda la variabilità di effetto dovuta alle caratteristiche peculiari del microrganismo considerato, occorre specificare come ogni specie o ceppo microbico esibisca una sua specifica resistenza all'azione dell'anidride solforosa. Ad esempio, i lieviti resistenti alla SO₂ sono in grado di ridurre l'interazione con l'acetil-Co-A, stimolando la produzione di glutatione e cisteina, composti che, contenendo zolfo allo stato ridotto, sono in grado di legarsi con l'anidride solforosa, limitando così l'inattivazione degli altri metaboliti presenti nel liquido cellulare.

Tuttavia è possibile osservare come i microrganismi contraddistinti da dimensioni più ridotte risultino generalmente più sensibili all'azione di questo antisettico per cui il rapporto superficie

cellulare/volume può essere assunto come un valido parametro per prevederne la sensibilità alla SO₂. Infatti i batteri, che appaiono contraddistinti da un elevato rapporto superficie/volume, risultano effettivamente meno resistenti dei lieviti, che evidenziano un valore di questo rapporto più contenuto, e tra i lieviti, gli apiculati appaiono meno resistenti degli ellittici. È sulla base di queste considerazioni che si può spiegare il maggior effetto inibente indotto da una analoga addizione di SO₂ sulla fermentazione malolattica rispetto a quella alcolica.

La SO₂ agisce sui microrganismi con numerosi meccanismi complementari:

- fuori della cellula, la SO₂ reagisce con le sostanze nutritive della cellula formatesi in occasione della respirazione e della fermentazione, con alcuni lipidi e riduce l'ossigeno disponibile;
- la SO₂ molecolare (H₂SO₃) si fissa sulle membrane cellulari e perturba il loro funzionamento;
- all'interno della cellula, la SO₂ reagisce con i diversi enzimi (ATP, NAD), con gli amminoacidi solforati, con i composti carbonilici, con la tiamina e con diversi lipidi e proteine.

Questa molteplicità di meccanismi spiega sia la polivalenza della SO₂ sia le difficoltà nel sostituirla.

L'ANIDRIDE SOLFOROSA COME AGENTE CHIARIFICANTE

L'anidride solforosa appare in grado di esplicare un'azione chiarificante agendo in modo sia diretto sia indiretto. Se è presente in quantità elevate tende a comportarsi come un acido, apportando cariche positive al mezzo di reazione, che possono neutralizzare le cariche dei colloidali a carica negativa presenti in sospensione (tannini), inducendone la flocculazione; questo meccanismo diviene significativo solo nel corso della preparazione dei mosti muti, perché solo in questa occasione si raggiungono le necessarie elevate concentrazioni di SO₂. Dati i più ridotti tenori di SO₂ impiegati di norma in vinificazione, la sua azione chiarificante risulta prevalentemente indiretta, per cui, agendo sulla velocità di sviluppo della popolazione dei lieviti, essa tende a ritardare l'avvio della fermentazione e quindi della conseguente produzione tumultuosa dell'anidride carbonica. Lo sviluppo gassoso rappresenta un fenomeno che mal si accorda con la defecazione di un mosto, particolarmente quando questa è fortemente desiderata, come nel corso di una vinificazione in bianco.

Durante la macerazione, l'acidità delle soluzioni generate dalla presenza dell'anidride solforosa facilita la dissoluzione dei composti fenolici presenti nelle bucce. Infatti la SO₂ addizionata al pigiato tende a favorire l'idrolisi di alcuni costituenti della membrana cellulare delle bucce, riducendone la resistenza al trasferimento di materia e incrementando così la velocità di

diffusione dei diversi componenti in queste racchiusi e, in particolare, degli antociani e dei tannini.

LA PROTEZIONE DELLE OSSIDAZIONI

Il consumo di ossigeno ad opera della SO_2 è lento e corrisponde alla reazione:



Un litro di mosto o di vino saturo di aria, che contiene circa 8 mg d'ossigeno/L, ossida 32 mg di SO_2 e produce 49 mg d'acido solforico. Questo aumento può rinnovarsi molte volte nel corso della vinificazione e dell'affinamento del vino, che comporta ogni volta una diminuzione di pH di circa 0,05. Questa reazione chimica è lenta, occorrono molti giorni alla SO_2 per consumare l'ossigeno disciolto nel vino e inoltre, questa ossidazione necessita la presenza di catalizzatori, in particolare ioni ferro e rame. Ora, nel mosto che è molto ossidabile, la protezione deve essere ottenuta in modo rapido e la solfitazione consente effettivamente di conseguire questo risultato. Si può, tuttavia, ipotizzare che il diossido di zolfo non svolga, durante la vinificazione, un'azione antiossidante, cioè non consumi a proprio vantaggio l'ossigeno che in questo modo non è più in grado di ossidare gli altri composti del mosto (Ribéreau-Gayon et al., 2007, vol I). Nel caso di mosti non solfitati, si osserva un rapido consumo di tutto l'ossigeno, in 4-20 minuti (per azione enzimatica). In questo caso la solfitazione blocca questo consumo molto rapidamente, in 1-6 minuti circa, non per reazione diretta con ossigeno ma per il blocco degli enzimi ossidativi. La sua azione è più lenta in presenza di laccasi.

Durante la vinificazione in bianco senza macerazione, la velocità di assorbimento dell'ossigeno risulta maggiore nei mosti solfitati, mentre nella vinificazione in rosso con macerazione la velocità di assorbimento dell'ossigeno è maggiore nei mosti in cui non vi è stata fatta aggiunta di SO_2 . Questo sembrerebbe evidenziare come il potere antiossidante dovuto alle sostanze disciolte nel mosto-vino e, in particolare, ai componenti polifenolici (non flavonolici e antocianici), risulti probabilmente più elevato di quello espresso dalla stessa anidride solforosa.

LE PROPRIETA' DI DISSOLUZIONE DELLA SO_2

Accelerando la necrosi delle cellule dell'uva, la SO_2 facilita la liberazione del loro contenuto. L'effetto è particolarmente importante sulle cellule della buccia, ricche in antociani, tannini e aromi. Questo effetto di dissoluzione degli antociani è mascherato dalla rapida decolorazione, solo momentanea, che deriva da una trasformazione delle molecole degli antociani rossi che

passano a una forma incolore. Il risultato globale è una maggiore estrazione rafforzata da una protezione contro l'ossidazione: si ottengono vini più colorati e meno aranciati.

GLI EFFETTI ORGANOLETTICI DELLA SO₂

La SO₂ è ben nota per la sua caratteristica sensazione pungente. È percepita nei vini con valori compresi tra 20 e 60-80 mg/L di SO₂ libera, in funzione del pH e dunque della SO₂ molecolare, della ricchezza aromatica complessiva ma anche secondo la sensibilità e/o l'addestramento dei consumatori e con l'opinione a priori del degustatore. Questo odore sgradevole costituisce un'eccellente protezione contro un impiego della SO₂ in quantità elevate.

Al contrario di questo specifico carattere organolettico sgradevole, la SO₂ ha un effetto positivo insostituibile: combinando le aldeidi, fra cui l'etanal o acetaldeide presente in tutti i vini, elimina il carattere di "svanito", caratteristica dei vini ossidati, carenti in SO₂. Il carattere aldeidico è sgradevole in tutti i vini, con l'eccezione dei vini di tipo Jerez che rappresentano una produzione limitata assieme ai "vini sotto velo" e ad altri vini di tipo Rancio. Questa reazione SO₂-aldeide è insostituibile in enologia.

La SO₂ contribuisce anche ad attenuare o eliminare gli aromi sgradevoli derivati dalle uve ammuffite.

Si osserva e si misura anche l'effetto protettivo diretto della SO₂ sugli aromi che derivano dai composti sensibili all'ossidazione, quale l'aroma di Sauvignon. Per tutti i vini, l'assenza di SO₂ comporta evoluzioni aromatiche generalmente poco apprezzate.

Prodotti in sostituzione o a completamento del diossido di zolfo

Allo scopo di ridurre le dosi di impiego del diossido di zolfo sono state studiate nuove sostanze da utilizzare in associazione o in sostituzione ad esso, in grado di surrogare almeno una delle sue proprietà o di potenziarne l'efficacia.

Tutte questi prodotti possono essere raggruppati in due grandi categorie: **prodotti ad attività antisettica** e **prodotti ad attività antiossidante**.

In linea generale, per condurre vinificazioni a bassi livelli di solfiti, dobbiamo agire essenzialmente su tre aspetti:

- Ottimizzazione delle fermentazioni, cioè utilizzare lieviti selezionati a bassa produzione di solfiti, agire sulla nutrizione azotata e per ridurre il tempo di permanenza senza protezione dall' SO_2 , valutare il co-inoculo lieviti-BML
- Equilibrio red-ox, cioè effettuare vinificazioni in riduzione, o nel caso contrario in iperossigenazione (da valutare in base alla tipologia di vino) e la possibilità di utilizzo di antiossidanti naturali
- Evitare contaminazioni microbiche con uve sane, l'igene, filtrazione tangenziale, flash pastorizzazione, co-inoculo, liozima

Prodotti ad attività antiossidante: ACIDO ASCORBICO

L'L-acido ascorbico o vitamina C si trova nei frutti e in piccole quantità nell'uva (circa 50 mg/L), tuttavia esso scompare nel corso della fermentazione e dei primi arieggiamenti: in genere i vini ne sono sprovvisti.

Una delle proprietà essenziali dell'acido ascorbico in enologia risiede nella sua caratteristica di sostanza riducente.

L'impiego dell'acido ascorbico è stato autorizzato per proteggere dalle ossidazioni i succhi di frutta, la birra e le bevande gassose; il suo utilizzo non solleva obiezioni di ordine medico. Oggi l'acido ascorbico viene impiegato nella maggior parte dei paesi vinicoli con un limite massimo nei vini al consumo di 250 mg/L, quasi sempre in associazione al diossido di zolfo: le dosi di impiego sono comprese tra 50 e 200 mg/L. essendo perfettamente solubile in acqua (330 g/L), il suo utilizzo non pone problemi, la soluzione deve essere preparata al momento dell'impiego e omogenizzata efficacemente alla massa evitandone l'ossigenazione .

La grande sensibilità dell'acido ascorbico all'ossidazione gli garantisce un'efficacia pratica soltanto quando il contatto con l'aria è limitato. In altre parole, l'acido ascorbico consente una buona protezione da modesti e saltuari arieggiamenti, ma non nei confronti di un'ossidazione forte e continua. Il suo effetto si limita alla protezione del vino da una debole ossidazione, ad esempio quella dovuta all'imbottigliamento, mentre non ha alcuna efficacia durante la conservazione prolungata in vasche o fusti (Ribéreau-Gayon et al., 2007, vol I).

Il comportamento dell'acido ascorbico nei vini è assai diverso da quello della SO_2 ; anzitutto non ha alcun potere antisettico, non inattiva gli enzimi ossidativi, è molto più labile. Anche il suo meccanismo d'azione è fondamentalmente differente, trattandosi di un tipico prodotto autossidante. Ciò significa che quest'acido capta direttamente l'ossigeno molecolare in soluzione nel mosto o vino, in presenza di catalizzatori metallici (ferro e specialmente rame). La SO_2 , invece, non è autossidabile; reagisce soltanto con corpi o composti ossidanti (RO_2). Ossidandosi l'acido ascorbico si trasforma in acido L-deidroascorbico praticamente inattivo e dà origine ad acqua ossigenata o perossido di idrogeno. Trattasi in effetti di un processo di deidrogenazione o eliminazione di idrogeno per intervento dell'ossigeno molecolare (fig 7).

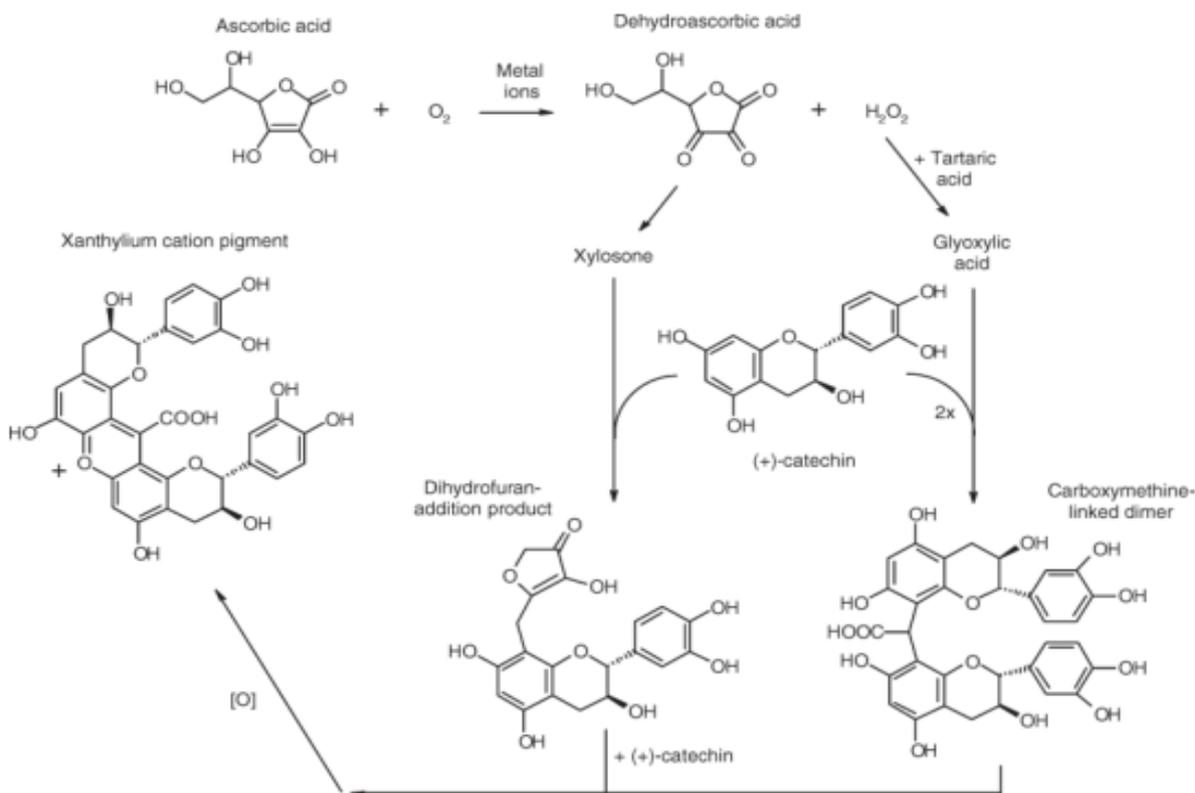


Fig. 7. Ossidazione dell'acido ascorbico nel vino e reazioni dei suoi prodotti di degradazione. (Sonni et al., 2011 b).

Si tratta di un sistema redox in cui la forma ossidata è costituita dall'acido deidroascorbico.

Questa reazione è teoricamente reversibile, tuttavia l'acido deidroascorbico, instabile scompare.

I due elettroni che si liberano nel corso della reazione servono a ridurre alcuni composti del vino, in particolare lo ione ferrico:



Si spiega in questo modo l'efficacia dell'acido ascorbico nella prevenzione della casse ferrica, provocata esclusivamente dagli ioni Fe^{3+} .

In presenza di ossigeno, l'ossidazione dell'acido ascorbico porta alla formazione di acqua ossigenata, potente ossidante in grado di svolgere un'azione profonda sui costituenti del vino. Per proteggere il vino nei confronti di questo potente ossidante è necessario aggiungere una quantità sufficiente di diossido di zolfo libero che costituisce il substrato preferenziale dell'acqua ossigenata (Ribéreau-Gayon et al., 2007, vol I).

Mentre il perossido di idrogeno può determinare reazioni dannose per il vino, specialmente in presenza di cationi metallici, l'acido deidroascorbico è un composto instabile ed è conosciuto per i suoi prodotti di degradazione. Di particolare interesse è lo **xylosone**, il quale è stato recentemente identificato, in un sistema modello di vino, come un pigmento precursore in presenza di flavan-3-olo. Lo xylosone infatti, è comunemente conosciuto come intermedio di degradazione dell'acido ascorbico, portando alla formazione di 3-idrossi-2-pirone e acido-2-furoico (Barril et al., 2012).

Inoltre lo xylosone può legarsi ai flavonoidi derivanti da bucce e semi (+-catechine) con la formazione prima di un intermedio, MHF-8-catechina, e poi del **catione xantillo**. Questo pigmento è di colore giallo ed è uno dei responsabili del classico "colore ossidato" dei vini. In altri sistemi di vino modello, contenenti composti derivanti dalla polpa, principalmente acidi non-flavonoidici (acido caffeico), possono combinarsi anch'essi con (+)-catechina, determinando però un colore bruno/aranciato piuttosto che giallo (Sonni et al., 2011 b).

È stato rilevato ancora che "a latere" della autossidazione dell'acido ascorbico si possa svolgere una reazione secondaria per ossidazione diretta dello stesso acido da parte del rame bivalente con formazione, anche in questo caso, di acqua ossigenata, sia pure in misura fortemente minore. Pertanto l'acido ascorbico aggiunto ai vini potrebbe avere effetto contrario a quello desiderato, vale a dire comportarsi da agente pro-ossidante!

Tanto è vero che il perossido formatosi se non tempestivamente neutralizzato, andrebbe ad ossidare direttamente ed in modo energico sostanze e strutture organiche del vino, come

polifenoli, tannini, acido tartarico, alcoli, ecc., favorendo quelle alterazioni e modificazioni organolettiche proprie dei fenomeni ossidativi. Per tale ragione, del resto, nelle esperienze passate questo trattamento aveva suscitato non poche perplessità per i suoi risultati incerti e talvolta del tutto negativi.

L'anidride solforosa che non è, come abbiamo ricordato, un composto autossidabile, ma entra invece prontamente in reazione con l'acqua ossigenata all'atto della sua formazione, passando ad acido solforico ed infine a solfati. In questo modo il perossido viene sottratto in tempo ad altre reazioni ossidanti. Questo problema può anche essere by-passato con l'utilizzo di tannino d'uva, come "Scavenger alternativo": è ben noto che i tannini sono in grado di ridurre l'attività dei radicali liberi (come il superossido e il perossido di idrogeno), e per questo motivo essi possono essere utilizzati in combinazione con l'acido ascorbico al fine di sostituire una delle proprietà dei solfiti, cioè l'aggiunta durante la pigiatura (durante la vinificazione in bianco) (Zironi et al., 2009).

Ora il comportamento e la perfetta sincronia di reazioni fra acido ascorbico ed anidride solforosa sono stati opportunamente sfruttati dalla tecnica enologica nell'intento di deossigenare il vino, particolarmente bianco, nella fase finale di lavorazione del medesimo o immediatamente prima dell'imbottigliamento. Non è cosa da poco se si pensa alla quasi impossibilità pratica di giungere a quest'ultima operazione senza arieggiamenti di sorta.

Il diossido di zolfo e l'acido ascorbico presentano, dunque, differenti proprietà antiossidanti.

Il primo possiede un effetto ritardato, ma stabile, che si protrae nel tempo, anche dopo una nuova ossidazione e non interviene sulla casse ferrica che si manifesta rapidamente dopo un arieggiamento. Il secondo ha un effetto immediato; può proteggere in modo istantaneo dai danni di un brusco arieggiamento (casse ferrica); la sua azione è durevole nella misura in cui il vino è conservato al riparo dall'aria.

L'effetto deossigenante, ossia la quantità di ossigeno atmosferico sottratto che possa trovarsi in soluzione nel vino, è rilevante, quando si consideri che il rapporto di combinazione tra acido ascorbico ed ossigeno è all'incirca di 100:18. Ciò vuol dire che 5 g/hl di acido ascorbico fissano mg 900 di O₂ (9 mg/L). Una quantità di ossigeno addirittura superiore a quella di saturazione (circa 8 mg/L) in un vino conservato da lungo tempo fuori contatto dell'aria, vale a dire partendo da un contenuto zero di ossigeno molecolare in dissoluzione.

Ora il calcolo di cui sopra è meramente teorico; in realtà le cose si svolgono in maniera più complessa, per cui l'efficacia deossigenante del prodotto risulta più modesta; ma è vero anche che questa "perdita", rispetto ai valori teorici, viene in buona parte recuperata, con effetti, per

altri versi, positivi. In particolare l'acido ascorbico tende a proteggere il ferro ridotto (Fe^{2+}) dalle ossidazioni e a ridurre il ferro in forma ossidata (Fe^{3+}) a ferroso, con conseguenze estremamente positive, quando si ponga mente al ruolo nefasto che lo ione ferrico rappresenta nel contesto dei fenomeni di ossidazione.

Questo fatto, soprattutto, non è senza interessanti ripercussioni sul potenziale di ossido-riduzione (rH). Infatti addizionando acido ascorbico ad un vino, conservato da tempo al riparo dall'aria, e sottoponendolo ad arieggiamento, l'aumento dell'rH si verifica in modo lento e limitato, a differenza di quanto accade nei campioni-test.

Se analogamente l'acido ascorbico viene aggiunto ad un vino preventivamente arieggiato, cioè ad elevato potenziale ossido-riduttivo, la caduta di questo è rapida e sensibile, mentre è assai lenta nello stesso vino non trattato. Se la disponibilità di SO_2 difetta o manca del tutto, il perossido non "riciclato" dallo stesso acido ascorbico ossigena (di preferenza in presenza di ioni ferro) l'acido tartarico trasformandolo in acido diossimaleico, vale a dire in un composto "autossidante". E da qui, quando il vino venga a contatto con l'aria, in acido diossitartarico, il cui accumulo, in questa vicenda ossido-riduttiva, conferisce al prodotto una sgradevole sensazione di frutta stramatura. Possiamo aggiungere ancora che il ricorso a questo riducente tende ad abbassare sensibilmente la presenza di SO_2 libera nei vini; un fatto questo che va tenuto presente. Sebbene precedentemente si supponeva che il diossido di zolfo fosse legato significativamente ai prodotti di degradazione dell'acido ascorbico, l'esperimento condotto da Célia Barril et al., ha dimostrato che l'acido deidroascorbico e i suoi seguenti prodotti di degradazione non sono fortemente legati con l' SO_2 . Questo è stato osservato dal consumo delle concentrazioni molarie rispettivamente di solforosa "libera e totale" con quelle dell'acido ascorbico. Dapprima il consumo era vicino ad 1:1, poi si è notato che i prodotti di degradazione dell'acido ascorbico sono solo leganti deboli del biossido di zolfo e quest'ultimo è stato rilasciato durante determinazione libera anidride solforosa. Infatti, con le misurazioni effettuate, attraverso FIAstarTM, analizzatore di iniezione di flusso multi-canale, e non con il classico metodo iodometrico, il campione viene acidificatosi è visto che possono liberare anidride solforosa dato che si trova in complessi debolmente legati (Barril et al., 2012).

Prodotti ad attività antiossidante: I TANNINI

I tannini comunemente utilizzati in enologia appartengono a due gruppi:

Tannini idrolizzabili che si possono distinguere in gallotannini, la cui idrolisi acida libera acido gallico, ed ellagitannini, la cui idrolisi acida libera acido ellagico.

Tannini condensati (a cui appartengono anche i tannini dell'uva) detti anche tannini proantocianidici, la loro idrolisi acida libera una antocianina.

I tannini idrolizzabili possiedono numerosi gruppi ossidrilici (OH) suscettibili di essere ossidati, ciò li rende nel complesso molto ossidabili, quindi con un forte potere antiossidante nei confronti delle altre molecole presenti nel mezzo. Le forme polimerizzate dei tannini idrolizzabili non sono solubili pertanto non rientrano nelle preparazioni commerciali di tannini.

I tannini condensati sono costituiti da catene di flavan-3-olo, originate grazie alla formazione di legami C4-C6 o C4-C8. Le interazioni dei tannini con le proteine e con gli altri composti sono in parte legate alla formazione di cariche elettronegative dovute alla proprietà di queste molecole di delocalizzare gli elettroni sull'anello fenolico.

ORIGINE DEI TANNINI

I gallotannini possono provenire da legno di mimosa, da noci di galle (ipertrofia di tessuti vegetali generata dalla puntura di un insetto), da frutti come il mirabolano.

Gli ellagitannini derivano essenzialmente dal legno di rovere o di castagno.

I tannini condensati o proantocianidici sono in generale estratti a partire da vinaccioli, da vinacce o da legni esotici (Quebracho).

Sembra che l'origine del legno non sia una garanzia di qualità, le differenze qualitative dipendono soprattutto dall'età degli alberi, dalle zone di provenienza e dal tipo di estrazione effettuata.

Per quanto riguarda i tannini enologici, l'estrazione è realizzata solitamente con acqua o con vapore ed in piccola parte anche con alcool o con soluzioni idroalcoliche. Il tipo di solvente utilizzato al momento dell'estrazione, la temperatura a cui viene fatta e la durata condizionano la solubilità ma anche la ricchezza polifenolica degli estratti. In effetti un tannino estratto con acqua risulta particolarmente solubile in acqua, per contro quello estratto con acqua calda rischia di essere parzialmente insolubile in acqua fredda.

Esistono differenti metodi per la caratterizzazione dei tannini, il tracciamento dello spettro di assorbimento per spettrofotometria UV/visibile permette di determinare molto rapidamente la

natura dei tannini. I gallotannini hanno un'assorbanza che aumenta da 250 nm fino a 275-280 nm, poi diminuisce fino al visibile.

Gli ellagitannini presentano uno spettro decrescente da 250 nm fino al visibile.

I tannini condensati presentano una diminuzione dell'assorbanza da 250 fino a 260 nm circa, poi questa aumenta fino ad un massimo di 280 nm per diminuire in seguito fino al visibile. Questo metodo semplice permette in alcuni casi di determinare anche la composizione di miscele di tannini in quanto lo spettro di assorbimento di una miscela corrisponde praticamente alla somma delle curve caratteristiche dei singoli tannini (Laffort oenologie, 2000).

POTERE ANTIOSSIDANTE

L'ossidabilità è una caratteristica della funzione fenolica; essa conferisce a queste sostanze proprietà protettive contro ossidazioni, particolarmente nelle uve e nei vini rossi e può avvenire per via chimica o enzimatica.

Lo studio delle proprietà ossido-riduttive dei polifenoli presenta, inoltre, un sicuro interesse, a motivo delle loro implicazioni farmacologiche e nutrizionali. Queste molecole hanno la proprietà di neutralizzare i radicali ossigenati responsabili della degradazione dei tessuti, legata all'invecchiamento o all'eventuale sviluppo di tumori.

I meccanismi ossidativi messi in gioco sono complessi, soprattutto in mezzo acido, la luce, la temperatura, la presenza di idroperossidi e di certi metalli favoriscono la formazione di radicali ossigenati. L'ossigeno molecolare O_2 , possiede una struttura di un biradiale; esso può diventare un radicale idroperossido HO_2^\bullet o un anione superossido $O_2^{\bullet-}$ da cui ha origine una grande varietà di radicali liberi ossigenati. I perossidi formati possono provocare la degradazione ossidativa delle proteine e di numerose altre molecole (carboidrati, lipidi insaturi etc.). I polifenoli (tannini), per la loro facile ossidabilità, occorrono all'eliminazione dei radicali liberi (Ribéreau-Gayon et al., 2007, vol I).

Studi specifici condotti sul **potere antiossidante** dei tannini, hanno messo in evidenza che la catechina, elemento di base dei tannini proantocianidinici, ha un potere antiossidante 5 volte superiore a quello dell'acido ascorbico.

Per quanto riguarda l'interazione con l'acido ascorbico differenti prove hanno dimostrato che esso agisce in maniera addizionale con le catechine, ossia una miscela acido ascorbico/catechina rivela un potere antiossidante pari alla somma dei poteri antiossidanti dei singoli composti.

Per quanto riguarda l'**inibizione della laccasi** le sperimentazioni eseguite hanno evidenziato che il maggior potere inibitore di questa attività è dato, dopo la SO_2 , dai gallotannini a cui seguono in

ordine decrescente gli ellagitannini ed tannini proantocianidici ; in termini invece di protezione del colore i tannini a maggiore effetto sono i tannini proantocianidinici a cui seguono i gallotannini ed i tannini ellagici, la SO₂ non ha nessun effetto protettivo (Laffort oenologie, 2000).

Per capire quale tipo di tannino sia più idoneo all'inibizione della laccasi, presente su uve attaccate da *Botrytis cinerea*, sono state organizzate alcune prove di laboratorio (fig.8).

E' stato preso un mosto d'uva rossa, suddiviso in 6 aliquote di cui una (T) lasciata tal quale ha rappresentato il testimone, le altre tute addizionate di 5 unità laccasi/mL sono state trattate con i seguenti prodotti:

- (T lacc) solo laccasi,
- (T SO₂) + 6 g/hl di SO₂,
- (TG) + 25 g/hl di gallotannini,
- (TE) + 25 g/hl di ellagitannini,
- (TP) + 25 g/hl di tannini proantocianidinici

Sono state determinate le tre componenti dell'intensità colorante dopo 1 e 48 ore.

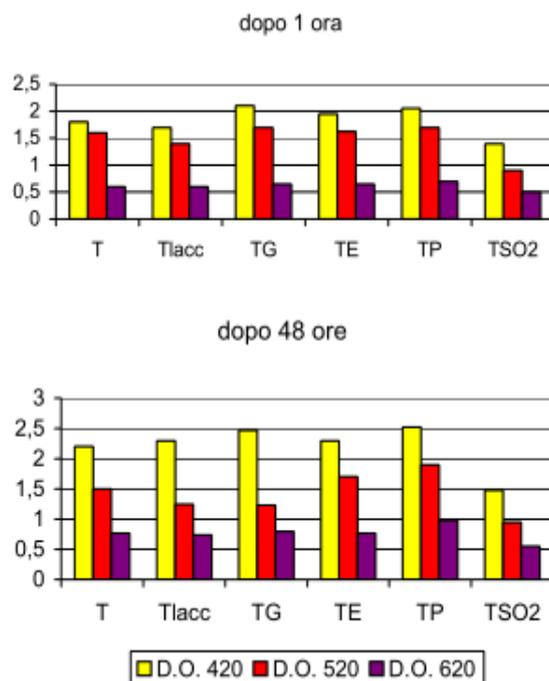


Fig. 8. effetto tannini su laccasi dopo 1 e 48 ore. (Laffort oenologie, 2001).

Osservando le varie prove, dopo 1 ora, in confronto al testimone appare evidente come la maggior perdita di colore si abbia nel campione addizionato con SO₂, è noto che l'SO₂ ha potere decolorante nei confronti degli antociani.

Il campione con laccasi fa registrare un abbassamento di tutte e tre le componenti, i tre campioni addizionati di tannini dopo 1 ora fanno registrare un certo aumento della componente gialla (D.O. 420 nm) mentre le altre componenti restano sostanzialmente confrontabili al testimone. L'aumento nel giallo è certamente dovuto in piccola parte all'assorbimento stesso da parte dei tannini e soprattutto all'assorbimento da parte dei loro composti di ossidazione. Ripetendo le stesse dopo 48 ore si può vedere come il campione con SO₂ si è mantenuto il più decolorato. Nel testimone è aumentata la componente gialla e diminuita la componente rossa, ossia si è verificata una certa ossidazione. Questo è ancora più evidente nel campione (T lacc). Nei campioni in cui abbiamo tannini, rispetto alla prima osservazione, la componente gialla è aumentata, ed è aumentata più che nel testimone, la componente rossa non è diminuita, anzi si registra un leggero aumento più evidente nel caso dei tannini proantocianidici, ove si registra anche un aumento della componente violetta. Si può pensare che la laccasi porta all'ossidazione dei tannini esogeni ma lascia intatti gli antociani che sembrano godere di una buona protezione.

Se si verifica l'attività laccasi nei sei campioni si vede che in effetti l'SO₂ ha un buon potere di inibizione di questa attività, potere che però tende a diminuire nel tempo; tra i tannini i più inibenti risultano i tannini gallici, i più attivi nella protezione del colore i tannini proantocianidici.

Volendo quindi arrivare ad una conclusione possiamo dire che certamente sui vini bianchi, per proteggerli nei confronti della laccasi, conviene impiegare tannini gallici, sui vini rossi tannini proantocianidici che oltre ad inibire la laccasi proteggono e stabilizzano gli antociani (Laffort oenologie, 2001).

Proprietà ad attività antiossidante: GLUTATIONE

Il glutatione ridotto (GSH) non è ancora stato ammesso come additivo del vino da parte dell'OIV. È un costituente naturalmente presente nel vino, protegge il vino dalle ossidazioni. Questo composto è capace di ridurre gli o-chinoni (fig. 9), derivanti dall'ossidazione enzimatica catalizzata da polifenolo ossidasi (PPO) sugli acid idrossicinnamili tartarici, prevenendo così la

loro polimerizzazione e la formazione di pigmenti bruni. Dalla reazione tra GSH e il chinone dell'acido caffarico si genera acido 2-S-glutationil caffarico, noto con il nome di Grape Reaction Product (GRP) che non è un substrato di PPO e limita l'imbrunimento. Il GSH rallenta l'impoverimento aromatico agendo da competitore nella riduzione dei chinoni per mezzo degli aromi tiolici. Il tripeptide protegge alcuni composti volatili, come il linalolo, nel corso della conservazione in bottiglia, in particolare quando è presente acido caffeico in concentrazione 15-30 mg/L. Il GSH impedisce la formazione del sotolone, uno tra i principali composti responsabili dell'invecchiamento atipico dei vini bianchi, e il 2-amminoacetofenone. Possiede anche un effetto positivo sul colore che risulta più stabile nel corso dell'invecchiamento (Franceschetti et al., 2011).

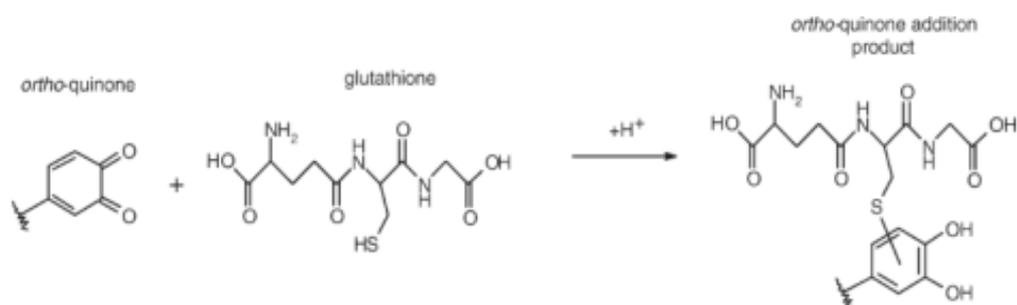


Fig. 9. Reazione del glutatione con o-chinoni. (Sonni et al., 2011 b).

L'attività antiossidante dei composti fenolici è correlata alla vicinanza delle funzioni di-idrossiliche. Le specie reattive all'ossigeno, presenti nel vino in alcune condizioni ossidative, possono reagire con un radicale semi-chinone derivante dai fenoli che quindi rappresentano un naturale antiossidante del vino. I composti fenolici possono essere ossidati nel mosto per via enzimatica in presenza di PPO il cui meccanismo di azione e alcuni dei composti ottenuti sono descritti in letteratura. Nel vino, i fenoli possono essere il substrato dell'enzima laccasi e di ossidazioni non enzimatiche; queste ultime, se intense, possono portare all'imbrunimento dei vini bianchi. Numerosi studi sono stati effettuati al fine di capire e approfondire le interazioni che coinvolgono tioli, fenoli e ossigeno nel vino, concentrando l'attenzione sull'acido caffeico e sui composti che derivano da esso. Tali studi sono stati condotti in sistemi modello con diversi valori di pH e mostrano il ruolo chiave posseduto dai tioli nei meccanismi ossidativi.

Le interazioni che hanno luogo tra GSH, SO₂, ossigeno ed il loro effetto sui fenoli nel vino bianco non sono descritte in letteratura, così come l'andamento del consumo di ossigeno durante l'invecchiamento (Franceschetti et al., 2011).

I meccanismi di accumulo di questo composto nell'uva non sono ben conosciuti. Sembra che la nutrizione azotata nel vigneto abbia un'influenza significativa. Sono stati paragonati i tenori in glutatione dei mosti che avevano concentrazioni di azoto assimilabile differenti (valutati con il metodo della formaldeide). Nei mosti carenti in azoto (concentrazione inferiore a 160 mg/l), il tenore in glutatione risulta essere più basso, nelle loro condizioni di estrazione, cioè in assenza di ossigeno e in presenza di quantità elevate di SO₂ (10 g/Hl) (Tabella 7). Inoltre apporti di azoto, sotto forma di nitrato d'ammonio, in vigneti che presentano sintomi di carenza, permettono di trovare tenori di glutatione paragonabili a quelli di testimoni naturalmente ricchi (Dubordieu et al., 2003).

Tab. 7. Incidenza della nutrizione azotata del vigneto sul tenore di glutatione dei mosti di uve a bacca bianca. (Dubordieu et al., 2003).

| | Mosto 1 | Mosto 2 | Mosto 3 | Mosto 4 | Mosto 5 | Mosto 6 | Mosto 7 | Mosto 8 |
|--|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| Azoto assimilabile (mg/L) | 62 | 244 | 76 | 202 | 224 | 56 | 187 | 42 |
| Glutazione (mg/L) | 12 | 28 | 17 | 28 | 25 | 6 | 22 | 4 |
| Glutazione dopo pigiatura (mg/L) | 11,5 | 5,8 | 3,1 | 24,5 | 2,5 | 6 | 18 | 7,3 |

Circa la metà del glutatione presente negli acini d'uva viene trasformato in disolfuro nel corso della pigiatura. Malgrado l'elevata reattività del glutatione nei confronti dell'ossigeno e dei composti fenolici del mosto, è stata messa in evidenza la presenza di glutatione in forma ridotta nei mosti di uve bianche, estratti secondo le normali condizioni della pratica. Le concentrazioni riscontrate nei diversi mosti analizzati variano da qualche milligrammo a una ventina di milligrammi per litro (Tabella 7).

Il glutatione, che rappresenta più del 95% del pool intracellulare dei tioli a basso peso molecolare nelle cellule di lievito, è indispensabile per la loro moltiplicazione. Se si segue l'evoluzione del tenore di glutatione del mosto durante la fermentazione alcolica, si può vedere inizialmente una diminuzione della sua concentrazione. Dopo qualche giorno di fermentazione, il tenore di glutatione aumenta di nuovo nel mosto. Questo aumento progressivo della

concentrazione di glutatione si osserva dopo il solfitaggio del vino, per poi stabilizzarsi circa un mese dopo il completamento della fermentazione alcolica. Sembra che il lievito utilizzi il glutatione disponibile nel mosto durante la fase di crescita e che poi lo liberi alla fine della fermentazione alcolica. E' verosimile che il glutatione venga liberato dal lievito contemporaneamente al pool di aminoacidi, all'inizio dell'autolisi. Fino a quando il vino è a contatto delle fecce, esso acquisisce all'inizio della maturazione un "potenziale riduttore". Sembra esistere, in determinate condizioni di vinificazione, una correlazione tra il tenore iniziale del glutatione del mosto e il tenore di glutatione nel vino un mese dopo la fine della fermentazione alcolica (Dubordieu et al., 2003).

L'arricchimento di glutatione nei vini alla fine della fermentazione alcolica, conferisce loro un "potere riducente". Molti vini bianchi secchi da selezione sono conservati diversi mesi in barrique, spesso sulle fecce, prima di essere imbottigliati. Quando le fecce vengono tolte dal vino, il tenore di glutatione diminuisce rapidamente e in modo significativo durante la sua conservazione. Questo fenomeno è accentuato nel caso vengano usate barriques nuove, dove i fenomeni ossidativi sono più importanti. Qualsiasi sia il modo in cui viene conservato il vino, si osserva una perdita significativa del "potere riducente" del vino. La conservazione dei vini sulle fecce consente di conservare il tenore di glutatione. In tali condizioni, la diminuzione del "potenziale riducente" del vino risulta essere più lento e meno importante. Questo fa pensare che la liberazione del glutatione da parte delle fecce nel corso della conservazione dei vini possa in parte spiegare il fenomeno della conservazione dell'aroma fruttato dei vini giovani, limitandone l'ossidazione (Dubordieu et al., 2003).

Dai dati ottenuti da D. Franceschetti et al. si conferma che i composti antiossidanti investigati, quali GSH e SO₂, e la composizione del vino stesso possono aumentare il consumo di ossigeno. Il GSH può essere considerato un valido sostituto SO₂ ed assicura una protezione simile contro l'insorgere di fenomeni ossidativi; un maggior controllo della vinificazione potrebbe preservare maggiori concentrazioni di GSH, limitando di conseguenza l'uso di SO₂ ed i problemi di salute ad essa correlati. Comunque dall'esperimento il diossido di zolfo risulta essere il miglior additivo per la riduzione dell'imbrunimento durante l'ossidazione. Quando entrambi i composti sono aggiunti, il consumo di ossigeno è più veloce e l'insorgenza dei fenomeni ossidativi potrebbe essere limitata. In particolare, la presenza di quantità più elevate di SO₂ limita l'aumento del livello di glutatione ossidato (GSSG) e del valore di assorbanza. Ben nota è, infatti, la capacità di SO₂ di ridurre i fenoli ossidati (Danilewicz et al., 2008). Comunque,

l'incremento dei contenuti di GSSG e GRP non è sufficiente a spiegare la diminuzione della concentrazione di GSH, che si potrebbe degradare o precipitare. Anche il rame svolge un ruolo essenziale nei processi ossidativi, correlato non solo con l'ossigeno, ma anche con GSH e SO₂. Ricerche più approfondite dovrebbero essere focalizzate sul ruolo che il rame gioca nell'ossidazione del vino e sui composti che derivano dall'auto-ossidazione dei fenoli per una maggiore comprensione dei meccanismi che avvengono nel corso dell'invecchiamento del vino bianco (Franceschetti et al., 2011).

Prodotto ad attività antiossidante: NATURALE ALTERNATIVA (AAP)

Un nuovo prodotto, non ancora legalmente permesso, è stato creato ed introdotto come stabilizzante dei processi di vinificazione. Le affermazioni del fabbricante sono state: accelerazioni delle varie fasi del processo di vinificazione in modo non tossico, sostituzione dei tradizionali trattamenti chimici, migliori caratteristiche organolettiche e conservazione del prodotto finale.

Questo prodotto è stato descritto come un energico antiossidante di origine naturale e contiene principalmente estratto di rafano nero (*Raphanus niger*) e acido ascorbico. *R. niger* è una varietà del rafano nero ed è stato utilizzato fin dall'antichità nella medicina popolare contro molte malattie. La pianta contiene composti antibatterici ed antifungine, inibendo la crescita di *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, e *Pneumococci*. L'obiettivo primario dello studio condotto da M.-I. Salaha et al., è stato quello di valutare l'uso di un'alternativa antiossidante naturale (AAP) durante la vinificazione in rosso, sia in combinazione con la solforosa che senza. Sono poi stati valutati alcuni parametri qualitativi dei vini rossi quali: intensità colorante, tonalità, polifenoli totali, antociani, attività antiossidante e i classici parametri enologici (alcol, pH, acidità totale e volatile etc.).

Nel presente studio sono state condotte 4 vinificazioni: due con singole varietà e due co-vinificazioni. Le uve appartenenti alla vendemmia 2005 sono state suddivise nelle seguenti vinificazioni: 1-Cabernet Sauvignon del Peloponneso (CS), 2-Mouvérdre del Peloponneso (Mo), 3-Cabernet Sauvignon, Cabernet Franc e Merlot (Mix 1) e 4-Cabernet Sauvignon, Carignan e Syrah (mix 2). Per ogni vinificazione la massa è stata suddivisa in 4 lotti ed ad ognuno di questi sono stati aggiunti i seguenti prodotti: (a) 20mg/l SO₂ e 0.7ml/l AAP, (b)

50mg/l SO₂ e 0.3ml/l AAP, (c) 70mg/l SO₂ e (d) 1ml/l AAP. I vini sono stati poi analizzati 4 mesi dopo lo stoccaggio.

Le condizioni A e D hanno mostrato i più alti carichi di tonalità, mentre al contrario, le condizioni B e C hanno avuto i più alti valori di acidità totale, acido tartarico e malico e solforosa libera e totale (tab. 8).

Tab.8. Parametri dei vini rossi ottenuti con i diversi trattamenti. (Salaha et al, 2008).

Composition of red wines produced with different treatments

| Treatment | Alcohol (%vol) | Volatile acid ^a | Tartaric acid (g/l) | Malic acid (g/l) | Cl | Tonality | ID | Total phenols ^b (mg/l) | Flavanols ^c (mg/l) |
|---------------------------|----------------|----------------------------|---------------------|------------------|------------|-----------|-----------|-----------------------------------|-------------------------------|
| Cabernet Sauvignon | | | | | | | | | |
| A | 14.45±0.17 | 0.63±0.00 | 1.9±0.01 | 0.5±0.01 | 16.02±0.01 | 0.66±0.01 | 22.8±0.3 | 1930±38.6 | 3495±139.9 |
| B | 14.42±0.16 | 0.52±0.01 | 2.1±0.00 | 0.8±0.02 | 15.75±0.28 | 0.61±0.02 | 23.4±0.21 | 1965±34.3 | 2940±117.5 |
| C | 14.74±0.17 | 0.54±0.00 | 2.2±0.01 | 0.7±0.03 | 18.04±0.18 | 0.60±0.01 | 25.2±0.24 | 2150±41.8 | 3645±144.2 |
| D | 14.00±0.16 | 0.56±0.02 | 1.8±0.02 | 0.9±0.00 | 17.30±0.39 | 0.60±0.00 | 23.6±0.21 | 2030±29.4 | 2640±98.3 |
| Mourvèdre | | | | | | | | | |
| A | 10.83±0.31 | 0.63±0.03 | 2.2±0.02 | 0.3±0.00 | 8.34±0.31 | 0.71±0.02 | 24.9±0.29 | 1295±26.1 | 1695±50.8 |
| B | 10.63±0.28 | 0.45±0.01 | 2.2±0.03 | 1.4±0.00 | 7.16±0.21 | 0.67±0.03 | 27.8±0.3 | 1375±25.4 | 2105±48.1 |
| C | 12.09±0.29 | 0.46±0.01 | 2.3±0.00 | 1.4±0.01 | 10.97±0.24 | 0.61±0.00 | 26.8±0.28 | 1600±30.8 | 3030±39.2 |
| D | 11.00±0.20 | 0.75±0.01 | 2.4±0.01 | 0.2±0.01 | 8.87±0.18 | 0.76±0.02 | 23.9±0.21 | 1365±27.2 | 2345±47.3 |
| Mixture 1 | | | | | | | | | |
| A | 11.61±0.13 | 0.24±0.02 | 2.3±0.03 | 1.6±0.01 | 10.52±0.14 | 0.75±0.03 | 26.8±0.23 | 1180±21.4 | 2435±73.1 |
| B | 11.93±0.15 | 0.23±0.01 | 2.5±0.03 | 1.3±0.01 | 11.17±0.24 | 0.63±0.01 | 24.1±0.23 | 1140±22.1 | 2710±25.2 |
| C | 11.63±0.13 | 0.25±0.00 | 2.4±0.01 | 1.4±0.00 | 12.82±0.17 | 0.62±0.01 | 29.7±0.31 | 1320±19.4 | 2805±48.4 |
| D | 11.40±0.15 | 0.43±0.02 | 2.3±0.01 | 0.1±0.03 | 9.90±0.11 | 0.66±0.01 | 25.8±0.21 | 1070±20.3 | 1825±51.3 |
| Mixture 2 | | | | | | | | | |
| A | 12.25±0.22 | 0.33±0.03 | 2.0±0.02 | 0.5±0.01 | 6.52±0.21 | 0.78±0.02 | 13.7±0.18 | 1470±13.4 | 2130±61.4 |
| B | 12.13±0.23 | 0.37±0.00 | 2.3±0.00 | 0.4±0.01 | 6.82±0.23 | 0.69±0.00 | 16.7±0.31 | 1440±24.8 | 2225±58.6 |
| C | 12.41±0.18 | 0.43±0.01 | 2.2±0.01 | 1.7±0.01 | 7.42±0.07 | 0.60±0.00 | 19.5±0.22 | 1490±27.1 | 2000±59.5 |
| D | 12.15±0.27 | 0.44±0.01 | 1.8±0.03 | 0.2±0.00 | 7.05±0.18 | 0.84±0.01 | 14.8±0.23 | 1430±26.9 | 1550±46.0 |

^a Acetic acid (g/l).

^b Gallic acid.

^c Catechin.

Come previsto, poiché la fermentazione malolattica è fortemente influenzata dalla presenza di SO₂, si è verificata più facilmente durante i trattamenti con bassi dosaggi di quest'ultima e così anche per i bassi livelli di acido malico nonché di acidità totale. Solitamente la fermentazione malolattica causa un incremento dell'acidità volatile, quindi nei vini con bassi livelli di SO₂ ci si aspettava un'elevata quantità di acidi volatili, cosa che non si è verificata. Indipendentemente dai trattamenti A, B, C e D l'acidità volatile era al di sotto dei range considerati accettabili dal mercato.

I vini trattati con larghe dosi di AAP hanno mostrato una tendenza all'ossidazione.

I vini ottenuti dalla singola varietà Cabernet Sauvignon, a prescindere dal trattamento utilizzato, hanno mostrato i più alti valori di intensità colorante e polifenoli totali, forse dovuti dal contenuto polifenolico della varietà significativamente più alti, offrendo una maggior protezione antiossidante.

Sono stati poi valutati l'attività antiradicalica (Ar) e il potere riducente (Pr). Entrambi i valori hanno trovato il loro picco massimo nei campioni trattati sotto le condizioni C. Per i campioni trattati solamente con SO₂ e solo AAP non sono state trovate differenze significative per quanto riguarda i valori di Ar. Al contrario, per quanto riguarda i valori del Pr, sono state riscontrate differenze notevoli. Il potenziale antiossidante dei vini rossi dipende in larga misura dal loro contenuto di flavanoli totali, nonché dalla struttura chimica dei singoli flavanoli che contengono. La concentrazione dei flavanoli totali maggiore è stata riscontrata nel trattamento C, supportando quest'ipotesi.

Infine è stato valutato il profilo antocianico di questi vini. Vini trattati con solo SO₂ avevano i più alti valori su tutti gli antociani misurati mentre, vini trattati solamente con AAP, avevano valori veramente poco carichi (tab. 9), in quando l'SO₂ oltre a svolgere un'azione antiossidante aiuta l'estrazione dei pigmenti durante la macerazione.

Tab. 9. Contenuto antociani nelle diverse tipologie di vino. (Salaha et al, 2008).

Anthocyanin content (in mg/l) of red wines^a produced with different treatments

| Treatment | Delphinidin | Cyanidin | Petunidin | Peonidin | Malvidin | Malvidin acetate | Malvidin coumarate | Total anthocyanins |
|---------------------------|-------------|-----------|------------|------------|-------------|------------------|--------------------|--------------------|
| Cabernet Sauvignon | | | | | | | | |
| A | 16.63±0.04 | ND | 22.19±0.50 | 14.35±0.28 | 260.51±0.44 | 96.29±0.43 | 25.23±0.23 | 504 |
| B | 20.75±0.05 | 2.04±0.04 | 22.41±0.39 | 23.73±0.36 | 266.77±0.56 | 73.15±0.26 | 28.05±0.11 | 510 |
| C | 16.60±0.11 | ND | 24.77±0.28 | 16.84±0.42 | 266.06±0.35 | 105.90±0.32 | 28.29±0.28 | 557 |
| D | 13.66±0.04 | ND | 20.24±0.18 | 12.70±0.24 | 225.54±0.38 | 83.38±0.28 | 22.20±0.15 | 474 |
| Mourvèdre | | | | | | | | |
| A | 13.79±0.23 | 2.50±0.06 | 30.66±0.25 | 13.64±0.37 | 187.95±0.53 | 16.94±0.43 | 16.09±0.14 | 300 |
| B | 8.42±0.18 | 1.49±0.01 | 20.78±0.16 | 10.58±0.28 | 148.15±1.05 | 10.52±0.33 | 9.38±0.18 | 230 |
| C | 32.56±0.30 | 7.39±0.28 | 61.07±1.00 | 29.71±0.24 | 362.45±0.41 | 44.22±0.17 | 33.85±0.45 | 624 |
| D | 19.03±0.11 | 4.86±0.15 | 35.40±0.26 | 15.57±0.22 | 200.84±0.50 | 18.20±0.31 | 16.22±0.16 | 343 |
| Mixture 1 | | | | | | | | |
| A | 6.62±0.03 | ND | 12.53±0.03 | 12.53±0.01 | 204.57±0.39 | 69.18±0.05 | 19.94±0.04 | 360 |
| B | 8.52±0.02 | ND | 14.20±0.01 | 14.42±0.01 | 269.30±0.29 | 97.26±0.07 | 28.66±0.04 | 490 |
| C | 7.87±0.05 | ND | 12.47±0.03 | 14.37±0.01 | 281.88±0.17 | 111.04±0.11 | 32.61±0.04 | 512 |
| D | 5.88±0.03 | ND | 9.15±0.02 | 9.44±0.02 | 191.49±0.04 | 67.71±0.33 | 18.89±0.06 | 337 |
| Mixture 2 | | | | | | | | |
| A | 11.59±0.35 | ND | 27.37±0.03 | 14.02±0.31 | 306.24±0.24 | 53.03±0.11 | 31.33±0.38 | 488 |
| B | 8.28±0.18 | ND | 22.86±0.17 | 12.11±0.39 | 298.92±0.96 | 49.62±0.30 | 34.47±0.38 | 467 |
| C | 13.91±0.16 | ND | 29.92±0.02 | 20.04±0.18 | 367.49±0.53 | 64.37±0.25 | 43.87±0.16 | 601 |
| D | 9.71±0.27 | ND | 24.03±0.37 | 13.39±0.12 | 285.47±0.40 | 50.25±0.45 | 27.70±0.30 | 459 |

^a HPLC determination of anthocyanins for each cultivar was performed in triplicate (n = 3). Results are given as mean±SD.

Anche l'intensità colorante è risultata maggiore nei campioni con sola solforosa. Pertanto secondo M.-I. Salaha et al. l'uso dell'SO₂ in vinificazione è imprescindibile, però potrebbe essere aggiunto a prodotti naturali più salutari (Salaha et al, 2008).

Prodotto ad attività antisettica: ACIDO SORBICO

L'acido sorbico presenta due doppi legami:



Esistono 4 isomeri, ma soltanto uno, l'isomero trans-trans è utilizzato in enologia. Visto la sua efficacia e l'assenza di tossicità, il suo impiego è autorizzato in numerosi paesi dell'UE, alla dose massima di 200 mg/L in soluzione acquosa è distillabile in corrente di vapore, si ritrova nel distillato di vino dove contribuisce alla sovrastima dell'acidità volatile. La sua pKa è di 4,75; questa molecola nel vino si trova essenzialmente sotto forma di acido libero (tab 10).

Tab. 10. Percentuale di dissociazione dell'acido sorbico a diversi valori di pH. (Dr. Murli Dharmadhikari, AA).

| pH | Percentuale % di dissociazione |
|------|--------------------------------|
| 7.00 | 0.6 |
| 6.00 | 6.0 |
| 5.80 | 7.0 |
| 5.00 | 37.0 |
| 4.75 | 50.0 |
| 4.40 | 70.0 |
| 4.00 | 86.0 |
| 3.70 | 93.0 |
| 3.00 | 98.0 |

L'acido sorbico è poco solubile in acqua, mentre è solubile in etanolo (tab. 11). 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. Dissolvendo 270 g/L di sorbato di potassio in acqua si ottiene una soluzione di 200 g/L di acido sorbico (Ribéreau-Gayon et al., 2007, vol I).

Tab. 11. Percentuale di solubilità dell'acido sorbico. (Dr. Murli Dharmadhikari, AA).

| Solvent | % Solubility Sorbic Acid | % Solubility Potassium Sorbate |
|----------------|--------------------------|--------------------------------|
| Water | | |
| 20°C (68°F) | 0.16 | 58.20 |
| 50°C (112°F) | 0.55 | 61.00 |
| 100°C (212°F) | 4.00 | 64.00 |
| Ethanol | | |
| 5% | 0.16 | 57.40 |
| 100% | 12.90 | 2.00 |
| Sucrose | | |
| 10% | 0.15 | 58.00 |
| 40% | 0.10 | 45.00 |
| 60% | 0.08 | 28.00 |

Alcune precauzioni devono essere prese al momento dell'aggiunta al vino e sono sintetizzate qui sotto (Dr. Murli Dharmadhikari, AA):

- Il sorbato di potassio può incrementare il tenore di potassio nel vino e determinare precipitazioni tartariche
- La solubilità del sorbato di potassio è influenzata dalla temperatura, tuttavia, non può essere addizionato a vini freddi
- Il vino deve essere miscelato molto bene dopo l'aggiunta per evitare precipitazioni
- L'acido sorbico dovrebbe essere coniugato sempre con l'anidride solforosa
- Certi lieviti e i batteri non sono inibiti dall'acido sorbico
- Vino correttamente chiarificato (conteggio lievito basso), pH basso, e alcool relativamente alto aiuterebbero a ridurre la quantità di acido sorbico necessari per controllare efficacemente i lieviti
- Inoltre l'acido sorbico non dovrebbe essere mai considerato come un sostituto per lo scarso igiene in cantina

L'azione antimicrobica dell'acido sorbico è esclusivamente contro muffe e lieviti; alle concentrazioni utilizzate nel vino non riesce ad inibire né batteri lattici né acetici (sarebbero necessarie dosi da 0,5 a 1 g/L). Per questo non può essere utilizzato mai da solo, ma deve essere sempre associato ad un prodotto ad attività antibatterica (es. diossido di zolfo) .

Data la dose massima utilizzabile esplica un'azione fungistatica più che fungicida e i migliori risultati sul controllo dei lieviti nei vini dolci è stata riscontrata quando le concentrazioni erano intorno a 10^3 - 10^4 cell/mL (Ribéreau-Gayon et al., 2007, vol I).

I lieviti inibiti dall'acido sorbico comprendono specie dei generi: Brettanomyces, Candida, Hansenula, Pichia, Saccharomyces, Torulaspora e Zygosaccharomyces (tab. 12). L'effetto inibitorio però, su ceppi di lievito non è uniforme. Alcune specie sono più tolleranti di altri. Ad esempio, secondo Pitt (1974), una concentrazione di acido sorbico dello 0,06 % di acido sorbico con il 10 % di zucchero non è bastata ad inibire lo Zygosaccharomyces bailii (Dr. Murli Dharmadhikari, AA).

Tab. 12. Inibizione dell'acido sorbico sui diversi ceppi di lieviti. (Dr. Murli Dharmadhikari, AA).

| Name of test organism | pH value | Minimum inhibitory concentration in ppm |
|-----------------------------------|-----------|---|
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 3.0 | 25 |
| <i>Saccharomyces ellipsoideus</i> | 3.5 | 50 - 200 |
| <i>Saccharomyces spec.</i> | 3.2 - 5.7 | 30 - 100 |
| <i>Hansenula anomala</i> | 5.0 | 500 |
| <i>Brettanomyces versatilis</i> | 4.6 | 200 |
| <i>Byssochlamys fulva</i> | 3.5 | 50 - 250 |
| <i>Rhodotorula spec.</i> | 4.0 - 5.0 | 100 - 200 |
| <i>Torulopsis holmii</i> | 4.6 | 400 |
| <i>Torula l lipolytica</i> | 5.0 | 100 - 200 |
| <i>Kloeckera apiculata</i> | 3.5 - 4.0 | 100 - 200 |
| <i>Candida krusei</i> | 3.4 | 100 |
| <i>Candida lipolytica</i> | 5.0 | 100 |

L'acido sorbico inibisce anche la crescita di muffe. Alcune delle specie importanti sopresse da acido sorbico appartengono generi Alternaria, Botrytis, Cladosporiwn, Fusariwn, Mucor, Penicilliwn, Rhizopus, Trichoderma.

Diversi microrganismi possono metabolizzare l'acido sorbico in particolare quando è presente in piccole concentrazioni. Per questo motivo, non è un conservante adatto ad alimenti con elevati conta microbica. Per trarre il massimo vantaggio dalla azione antimicrobica dell' acido sorbico, è

importante chiarificare bene il vino e mantenere la conta microbica più bassa possibile nel vino in bottiglia. Va sottolineato che l'acido sorbico inibisce lieviti e muffe, ma non i batteri lattici e acetici. Infatti, i batteri lattici possono metabolizzare l'acido sorbico e produrre composti off-flavours.

L'azione antimicrobica di acido sorbico è dovuta alla sua influenza inibitoria su vari enzimi nella cellula microbica. Gli enzimi inibiti da acido sorbico sono i seguenti (Dr. Murli Dharmadhikari, AA):

- Gli enzimi coinvolti nel metabolismo dei carboidrati, come enolasi e lattato deidrogenasi.
- Enzimi del ciclo dell'acido citrico come malato deidrogenasi, isocitrato deidrogenasi, chetoglutarato deidrogenasi, succinato deidrogenasi, e fumarasi.
- Diversi enzimi contenenti gruppo SH, e altri enzimi quali catalasi e perossidasi.

L'INFLUENZA SULLE CARATTERISTICHE SENSORIALI

Numerose esperienze hanno dimostrato che, quando l'acido sorbico è utilizzato correttamente, in condizioni normali di conservazione, non provoca modificazioni nell'evoluzione del vino e nel processo di affinamento in bottiglia.

La comparsa nei vini di un odore sgradevole, intenso e persistente, che ricorda quello del geranio è stato subito attribuito ad una contaminazione batterica, nello specifico di batteri lattici.

In vini non ben stabilizzati microbiologicamente, numerosi ceppi di batteri lattici sono in grado di metabolizzare l'acido sorbico trasformandolo nel suo alcol corrispondente, responsabile dell'odore di geranio (molecola molto odorosa, con soglia di percezione sotto il µg/L).

Fortunatamente gli interventi necessari ad evitare questo inconveniente (impiego razionale dell' SO_2) sono oggi ben conosciuti e questo problema risulta praticamente scomparso (Ribéreau-Gayon et al., 2007, vol I).

Prodotto ad attività antisettica: DIMETILDICARBONATO (DMDC)

Il dimetildicarbonato, il cui impiego nei vini è stato di recente permesso dall'Unione europea, pur avendo una conosciuta casistica di utilizzo su altri alimenti, è poco conosciuto dagli operatori dell'enologia. Si tratta fondamentalmente di un antisettico utilizzabile per garantire la stabilità microbiologica finale dei vini. Il regolamento Ce n° 2165 del 20 dicembre 2005 ha approvato "l'aggiunta del dimetildicarbonato (Dmdc) ai vini per garantirne la stabilizzazione microbiologica, entro certi limiti e a condizioni da determinare". L'uso di questo antisettico, testato ed approvato a livello mondiale, è già consentito, nell'ambito della Comunità europea, nell'industria alimentare; in Italia in particolare ne è da tempo ammesso l'utilizzo per il trattamento di "bevande aromatizzate analcoliche, vino dealcolizzato, concentrato di tè liquido" nella quantità massima introdotta di 250 mg/kg, alla condizione che nell'alimento non siano presenti residui rilevabili dell'antisettico stesso (Grazietti, 2006).

Il dimetildicarbonato (Dmdc, dimetilestere dell'acido dicarbonico, dimetilpirocarbonato, E 242), peso molecolare 134,09 – formula bruta C₄H₆O₅ – è rappresentato dalla formula di struttura riportata in figura 10.

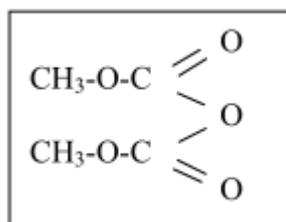
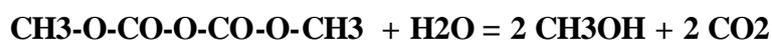


Fig. 10. Formula chimica DMDC. (Grazietti, 2006).

A pressione atmosferica e 20 °C di temperatura si presenta liquido, incolore, con leggero odore pungente. Non estremamente volatile (pressione di vapore 0,07 KPa a 20 °C), massa volumica 1,25 g/cm³, punto di solidificazione 17 °C, è caratterizzato da tendenza al surraffreddamento (overcooling); a pressione ordinaria bolle a 82 °C. Infiammabile, punto di infiammabilità (flash point) 85 °C, per l'uomo è irritante per contatto con la pelle, moderatamente tossico per ingestione ed altamente tossico se inalato. A contatto con il vino il Dmdc si idrolizza abbastanza rapidamente (da 5 a 7 ore a seconda della temperatura) secondo una reazione principale che porta alla formazione di 2 moli di metanolo e 2 moli di anidride carbonica per mole di dimetildicarbonato immessa, secondo lo schema:



Altre reazioni secondarie ipotizzabili nel processo di degradazione del Dmdc (molto meno favorite dai fattori compositivi e di pH del vino) possono essere le seguenti:

- DMDC + R-OH ---> metil-etil-carbonato
- DMDC + NH3 ---> metil-carbammato
- DMDC + Amminoacido ---> derivato metossicarbossilico

Tutte queste reazioni hanno mostrato, nei test svolti, di non superare mai la soglia di percezione. L'azione antimicrobica a largo spettro del Dmdc si esplica nei confronti di lieviti, miceti e batteri ed è ascrivibile all'attività della sostanza come tale, prima dell'idrolisi.

Tale potere antisettico risulta essere fortemente correlato alla reattività del dimetildicarbonato nei confronti delle proteine, interverrebbe quindi sui microrganismi per inattivazione enzimatica.

Uno dei meccanismi proposti indicherebbe una azione di metossicarbossilazione della funzione istidinica nella gliceraldeide-3-fosfato-deidrogenasi e nell'alcol-deidrogenasi. Data la reazione di idrolisi che coinvolge il Dmdc immesso in un substrato acquoso, un importante aspetto, da considerare con estrema attenzione, è certamente quello relativo al residuo in metanolo determinato dal trattamento con dimetildicarbonato, considerata la tossicità dell'alcol metilico ed i limiti di legge in vigore. A titolo esemplificativo si riportano in tab.13 le quantità teoriche di alcol metilico risultanti per idrolisi in funzione della dose di Dmdc utilizzata nel vino (Grazietti, 2006).

Tab. 13. Produzione metanolo da DMDC. (Grazietti, 2006).

| Dose DMDC (mg/L) | Metanolo risultante da idrolisi | |
|---------------------|---------------------------------|--------|
| | (mg/L) | (mL/L) |
| 50 | 23.90 | 0.030 |
| 65 | 31.07 | 0.039 |
| 80 | 38.24 | 0.048 |
| 95 | 45.41 | 0.057 |
| 110 | 52.58 | 0.066 |
| 125 | 59.75 | 0.076 |
| 140 | 66.92 | 0.085 |
| 155 | 74.09 | 0.094 |
| 170 | 81.26 | 0.109 |
| 185 | 88.43 | 0.112 |
| 200 | 95.60 | 0.121 |

Dal punto di vista della legislazione il recente Regolamento Ce n° 643 del 27 aprile 2006 ha precisamente fissato ambiti e limitazioni di utilizzo del dimetildicarbonato per i vini, nei termini che si possono in questo modo riassumere:

- Quantitativo massimo stabilito pari a 200 mg/l; assenza di residui della sostanza come tale nel prodotto immesso sul mercato.
- Il dimetildicarbonato può essere aggiunto al vino esclusivamente al fine di garantire la stabilizzazione microbiologica del vino in bottiglia contenente zuccheri fermentescibili.
- L'aggiunta deve essere effettuata solo poco prima dell'imbottigliamento.
- Possono essere sottoposti a tale trattamento soltanto i vini aventi un tenore di zucchero pari o superiore a 5 g/l.

Il Dmdc deve essere utilizzato esclusivamente abbinato ad un apposito dispositivo di dosaggio che lo incorpori in maniera uniforme e proporzionale al flusso del prodotto da trattare, resista alla corrosione provocata dal Dmdc allo stato puro, sia munito di serbatoio di stoccaggio, ugello e sistema di iniezione dotati di speciali riscaldatori per evitarne il congelamento; di dispositivo di ventilazione incorporato e di possibilità di controllo delle prestazioni.

Le basse temperature all'imbottigliamento esaltano l'efficacia del dimetildicarbonato, rallentandone l'idrolisi e prolungandone di conseguenza i tempi di azione; vanno al contrario evitati tutti quei trattamenti post-imbottigliamento che, provocando il riscaldamento, accelerano l'idrolisi del dimetildicarbonato e ne diminuiscono il tempo di attività.

Per mettere a confronto l'attività antimicrobica di questo prodotto con quella della solforosa sono state realizzate da R.T. Threlfall and J.R. Morris prove in parallelo utilizzando succhi d'uva e vini semi-dolci a pH diversi (3.0, 3.2, 3.4 e 3.6), con concentrazione crescenti di DMDC (0, 50, 100 e 200 mg/l) e di SO₂ (0, 10, 25 e 50 mg/l). Dopo aver contaminato i mezzi con una popolazione di 500-700 ufc/ml di *Saccharomyces bayanus*, è stata seguita l'evoluzione della popolazione dei lieviti. I risultati mostrano che è possibile ottenere livelli accettabili di protezione impedendo lo sviluppo dei lieviti e quindi del processo fermentativo in bottiglia, a qualsiasi pH, applicando trattamenti combinati di DMDC e SO₂ rispettivamente di 100:50 mg/l nei mosti e 50:10 nei vini dolci (tab. 14). Tali livelli hanno consentito il pieno controllo della popolazione nonostante gli elevati livelli di contaminazione iniziale (Threlfall and Morris, 2002).

Tab.14. Effetto dell'SO₂ e del DMDC sulle popolazioni di lieviti nel mosto e nel vino. (Threlfall and Morris, 2002).

| - Effect of sulfur dioxide (SO ₂) and dimethydicarbonate (DMDC) at different pH levels on yeast counts expressed as log ₁₀ of colony forming (cfu)/mL at 30 d in a juice stored at 20 °C. | | | | | | - Effect of sulfur dioxide (SO ₂) and dimethydicarbonate (DMDC) at different pH levels on yeast counts expressed as log ₁₀ of colony forming (cfu)/mL at 30 d in a semi-sweet wine stored at 20 °C. | | | | | |
|--|------------------------|-------------|-----------------|------|-----|--|------------------------|-----------------|------|-----|-----|
| pH | SO ₂ (mg/L) | DMDC (mg/L) | | | | pH | SO ₂ (mg/L) | DMDC (mg/L) | | | |
| | | 0 | 50 | 100 | 200 | | | 0 | 50 | 100 | 200 |
| 3.0 | 0 | 6.26 | 6.67 | NG | NG | 3.0 | 0 | 6.79 | 4.90 | NG | NG |
| | 10 | 6.36 | 6.49 | 7.23 | NG | | 10 | 7.18 | NG | NG | NG |
| | 25 | 6.32 | NG ^a | NG | NG | | 25 | NG ^a | NG | NG | NG |
| | 50 | 6.23 | NG | NG | NG | | 50 | NG | NG | NG | NG |
| 3.2 | 0 | 6.08 | 6.79 | 7.26 | NG | 3.2 | 0 | 6.98 | 5.93 | NG | NG |
| | 10 | 6.08 | 7.41 | 6.90 | NG | | 10 | 6.99 | NG | NG | NG |
| | 25 | 6.18 | 7.30 | 7.26 | NG | | 25 | NG | NG | NG | NG |
| | 50 | 6.69 | NG | NG | NG | | 50 | NG | NG | NG | NG |
| 3.4 | 0 | 6.78 | 7.32 | 7.32 | NG | 3.4 | 0 | 7.15 | 6.61 | NG | NG |
| | 10 | 6.54 | 6.62 | NG | NG | | 10 | 7.20 | NG | NG | NG |
| | 25 | 6.60 | 7.65 | NG | NG | | 25 | 6.66 | NG | NG | NG |
| | 50 | 6.18 | 7.20 | NG | NG | | 50 | NG | NG | NG | NG |
| 3.6 | 0 | 6.72 | 7.56 | NG | NG | 3.6 | 0 | 7.15 | 7.30 | NG | NG |
| | 10 | 6.57 | 7.41 | NG | NG | | 10 | 7.23 | NG | NG | NG |
| | 25 | 6.76 | 7.57 | NG | NG | | 25 | 7.26 | NG | NG | NG |
| | 50 | 6.97 | 7.18 | NG | NG | | 50 | NG | NG | NG | NG |

^a No growth: lowest level of detection was < 1 cfu/mL of the juice. Yeast counts at inoculation of pH 3.0, 3.2, 3.4, and 3.6 were 493, 558, 575, and 565 cfu/mL, respectively.

^a No growth: lowest level of detection was < 5 cfu/mL of the semi-sweet wine. Yeast counts at inoculation of pH 3.0, 3.2, 3.4, and 3.6 were 593, 580, 758, and 725 cfu/mL, respectively.

Prodotto ad attività antisettica: LISOZIMA

Il lisozima, prodotto derivante dall'albumine d'uovo, è un enzima con attività muramidasi, in grado di distruggere i batteri denominati Gram+, quali i batteri lattici del vino; si tratta di una sostanza naturale cristallizzata che, a basse dosi, è in grado di provocare la lisi dei batteri, cioè la dissoluzione della loro parete cellulare. Questo prodotto è privo di azione sui batteri acetici del vino e ciò non sorprende dato il loro carattere Gram-. Al contrario, essi confermano, impiegando un prodotto cristallizzato, la distruzione pressoché totale dei batteri lattici; a partire da 4 mg/L la distruzione risulta elevata in 24 ore, tempo necessario per raggiungere il punto di massima attività (tab. 15).

Tab. 15. effetto del lisozima sulla carica batterica dei vini. (Ribéreau-Gayon et al., 2007, vol I).

| Dosi di lisozima (mg · L ⁻¹) | Vino rosso 18 000 000 | | Vino rosso 520 000 | | Vino bianco 20 000 |
|--|-----------------------|-----------|--------------------|-----------|--------------------|
| | Dopo 4 h | Dopo 24 h | Dopo 4 h | Dopo 24 h | Dopo 24 h |
| 4 | 2 600 000 | 2 300 | 490 000 | 12 000 | 30 |
| 8 | 1 430 000 | 2 250 | 200 000 | 8 000 | 10 |
| 12 | 19 700 | 1 750 | 4 200 | 2 400 | 40 |
| 16 | 15 800 | 2 000 | 4 700 | 2 700 | 10 |

L'aumento della dose di lisozima accelera la lisi dei batteri, ma modifica poco il numero delle cellule resistenti. Qualunque sia la dose, non si arriva mai alla distruzione totale delle cellule e non si può in questo modo ottenere la sterilizzazione completa del vino.

L'impiego del lisozima si è progressivamente e largamente diffuso nell'industria lattiero casearia: è stato provato che esso non presenta tossicità per l'uomo. La diffusione di questo prodotto ha determinato la sua riscoperta in campo enologico a partire dal 1990.

Il lisozima è una proteina composta da 125 aminoacidi (peso molecolare pari a 14,6 Kda). La sua azione è quasi immediata, ma, nelle condizioni del vino (pH), viene rapidamente eliminato per precipitazione o inattivato (per esempio a seguito di un trattamento con bentonite).

Contrariamente alla SO₂ l'attività del lisozima cresce quando il pH sale (Ribéreau-Gayon et al., 2007, vol I).

La prevenzione della fermentazione malolattica nei vini bianchi non pone generalmente problemi maggiori, salvo nel caso di vini ricchi di batteri e con un pH elevato, come ad esempio i vini di pressa. Tuttavia l'impiego del lisozima consente di ottenere lo stesso risultato impiegando dosi ridotte di SO₂ (da 4 a 5 g/hL). La cinetica della fermentazione alcolica non viene influenzata da questa aggiunta.

Il lisozima essendo una proteina viene inattivato dalla bentonite il cui trattamento deve essere posticipato. Allo stesso modo, i vini trattati con il lisozima reagiscono al test del calore, indice della loro instabilità proteica. Tuttavia la casse proteica si manifesta in condizioni termiche (50 °C) che non corrispondono a quelle normali che si verificano durante il trasporto e la conservazione dei vini (Ribéreau-Gayon et al., 2007, vol I).

Lo studio condotto da Eveline J. Bartowsky et al. riguarda l'impatto del lisozima sulle proprietà chimiche e sensoriali di vini rossi (Cabernet Sauvignon e Shiraz) e bianchi (Riesling) del commercio.

L'aggiunta di lisozima a questi vini ha dato effetti nulli o insignificanti sul contenuto in alcool, anidride solforosa libera e totale, acidità titolabile e pH. Il lisozima mantiene il 75-80% di attività nel Riesling dopo sei mesi dall'aggiunta, mentre nel Cabernet Sauvignon e nel Shiraz dopo due giorni dall'aggiunta l'attività residua non è più misurabile.

L'aggiunta di lisozima in entrambi i vini rossi provoca un rapido decremento iniziale (superiore al 17%) dell'intensità colorante e delle sostanze fenoliche contenute, con la formazione di un precipitato leggero. La riduzione nel colore del vino rosso è stata anche notata dal panel di assaggiatori.

Quando è aggiunto a un vino bianco, il lisozima non causa un incremento in composti bruni in sei mesi di invecchiamento, ma induce instabilità al calore, indicando che i vini bianchi possono richiedere stabilizzazione proteica dopo essere stati trattati con lisozima. La valutazione sensoriale effettuata che un test triangolare rivela che, durante il periodo di sei mesi di invecchiamento, il trattamento con lisozima non causa cambiamenti significativi dell'aroma o del gusto nei vini bianchi e rossi testati (Bartowsky et al., 2004).

La Commissione Europea ha stabilito una nuova Direttiva 2007/68/CE del 27 novembre 2007 (che modifica la Direttiva 2000/13/CE) e prevede che i vini messi sul mercato o etichettati dopo del 31 maggio 2009 debbano riportare in etichetta se sono stati trattati con lisozima, perché possibile allergene per le persone sensibili.

Per il trattamento con il lisozima non si possono superare i 500 mg/L.

Prodotto ad attività antisettica: ACIDI GRASSI A MEDIA CATENA (C8, C10, C12)

Gli acidi grassi (HFA) come l'acido ottanoico (acido caprilico, C8), decanoico (acido caprinico, C10) e l'acido dodecanoico (acido laurico, C12) appartengono al gruppo degli acidi grassi saturi a media catena. Questi acidi, in enologia, hanno un effetto inibitorio nei confronti della fermentazione alcolica e malolattica. (Baroň e Bábiková, 2011). Alcuni acidi grassi insaturi a lunga catena (C16 e 18) sono attivatori della fermentazione. Al contrario, altri acidi grassi saturi a catena più corta, in particolare gli acidi C6, C8 e C10 svolgono un'importante azione di inibizione nei confronti dei lieviti (Ribéreau-Gayon et al., 2007). Essi si formano dal lievito stesso durante la fermentazione alcolica e possono creare difficoltà nel completamento del processo fermentativo, infatti un loro incremento è quasi sempre legato a problemi fermentativi. Date le loro proprietà inibitive legate anche alla totale innocuità verso l'uomo, hanno portato all'idea che gli acidi grassi potessero essere utilizzati come alternativa o come completamento della solforosa nella stabilizzazione dei vini (Baroň e Bábiková, 2011). Sono possibili diverse formulazioni compatibilmente con il fatto che il loro tenore totale aggiunto al vino non superi i 10 mg/L. questi acidi possiedono, alla concentrazione indicata, un effetto fungicida che completa quello del diossido di zolfo. Si ritiene che, per la mutizzazione dei vini dolci, 150 mg/L di SO₂ + 9 mg/L di acidi grassi abbiano la medesima efficacia di 250 mg/L di SO₂. Il risparmio nell'impiego dell'SO₂ non costituisce, dunque, un aspetto trascurabile. Si consiglia di aggiungere prima gli acidi grassi e, quindi, di effettuare la solfitazione dopo 24 ore: in queste condizioni,

l'apporto di SO₂ avviene quando i lieviti sono fortemente, se non completamente, inattivati (Ribéreau-Gayon et al., 2007).

Il grosso vantaggio di quest'approccio è che gli HFA aggiunti al vino sono assorbiti e assimilati da parte della parete del lievito e solo una piccola parte viene esterificata. Infatti, alcuni studi hanno comparato la concentrazione di HFA e dei loro esteri in vini precedentemente trattati e hanno mostrato valori tra 2,6 e 12,4 mg/L per quanto riguarda gli acidi grassi (valori normali) e valori tra 0,2 e 0,81 mg/L per gli esteri etilici, senza nessun incremento della componente volatile.

Il più probabile meccanismo di azione è il passaggio attraverso diffusione passiva degli acidi grassi nella membrana plasmatica dei lieviti. Le molecole dissociate di HFA si diffondono nella membrana fosfolipidica e disattivano l'interazione lipide-lipide e lipide-proteina, creando una fatale modificazione nella disposizione della membrana. Tale modifica riguarda un aumento della permeabilità e successivo cambio nella produzione di enzimi e sistemi di trasporto. Questi lieviti interessati non sono più in grado di continuare a convertire il glucosio in etanolo e, infine, moriranno.

L'acido decanoico (C10) è più tossico di acido caprilico (C8), ma la sua tossicità effettiva è in realtà inferiore a quella prevista, perché è meno solubile. La spiegazione di questo fenomeno è che sostanze liposolubili con una dimensione maggiore di una certa lunghezza della catena, possono essere considerate meno tossiche, di molecole più piccole, nei confronti della membrana plasmatica. Inoltre, a basse concentrazioni, gli acidi grassi con catene più lunghe hanno la tendenza di formare dei coaguli (Baroň e Bábiková, 2011).

L'efficienza degli HFA sull'arresto della fermentazione alcolica è stato testato da Mojmir Baroň e Petra Bábiková. Per quest'esperimento è stato utilizzato un mosto della varietà "Riesling Italice" con pH di 3,12 e una concentrazione zuccherina iniziale di 212 g/L. Una volta arrivati a 50 g/L di zuccheri residui, l'aliquota di vino è stata suddivisa in più campioni e ad ognuno di essi è stato aggiunto una formulazione diversa di acidi grassi, con diverse concentrazioni : 0, 5, 10, 40 mg/L (sia in combinazione con SO₂ che senza). L'esperimento ha confermato che l'aggiunta di HFA in mosto in fermentazione causa una rapida inibizione dell'attività metabolica dei lieviti, con la conseguente loro diminuzione e il successivo arresto fermentativo. La percentuale di cellule morte dopo 24 ore nel vino trattato con HFA (48,5%) è stata quasi il doppio rispetto alla variante non trattata (25,4%). Il trattamento con la combinazione di HFA e 60 mg / l di anidride solforosa ha dato risultati ancora migliori (dipendente dalla quantità di HFA: dal 32,9% al 77,0%). Con soli HFA si è raggiunto il 90 % di cellule morte dopo sette

giorni, mentre con la combinazione $\text{SO}_2 + \text{HFA}$ lo stesso risultato è stato raggiunto nei primi tre giorni (fig 11).

I migliori effetti di inibitori lieviti e batteri lattici del vino sono stati raggiunti con una miscela di HFA C8, C10 e C12 nel rapporto di 02:07:01. Questa miscela è stata disciolta in 70% vol. di etanolo con una concentrazione di 10 g per 100 ml.

Alla fine dell' esperimento è stato detto che l'aggiunta di HFA nel mosto o vino può ridurre significativamente il dosaggio di altri additivi come l'anidride solforosa e acido sorbico. Inoltre questo metodo può ridurre efficacemente i costi per la produzione di vini con zuccheri residui (Baroň e Bábiková, 2011).

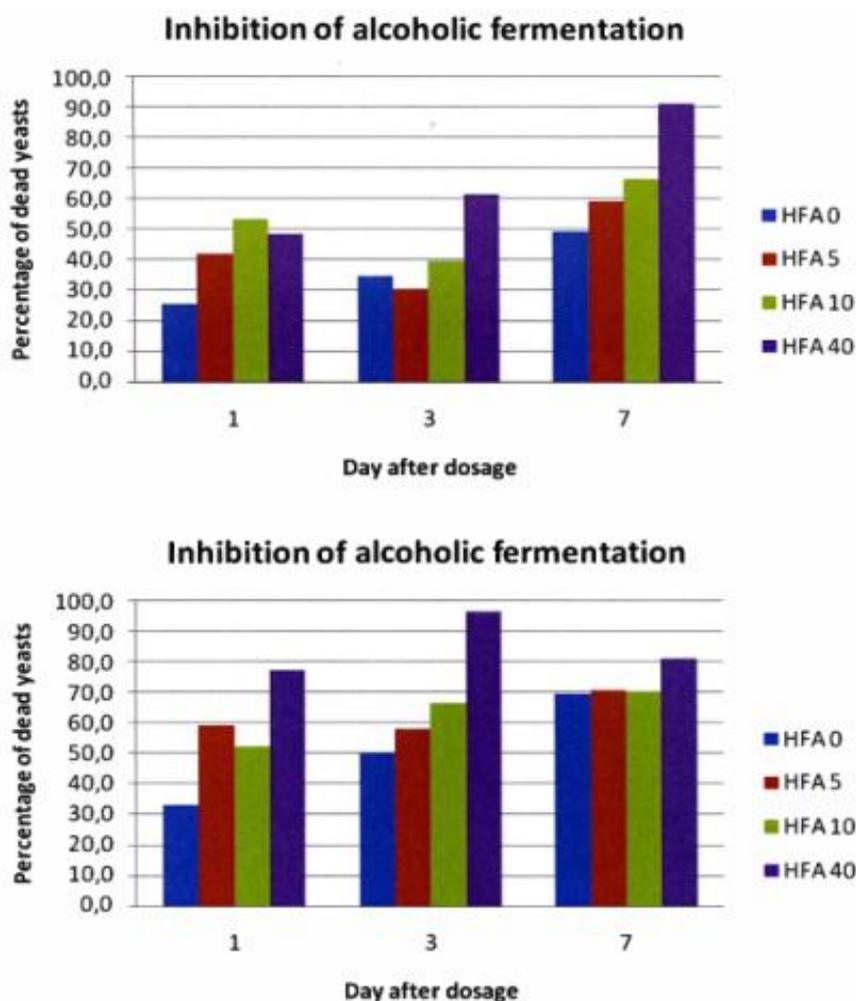


Fig. 11. monitoraggio cellule morte di lieviti dopo dosaggio di HFA (1a) e dopo $\text{SO}_2 + \text{HFA}$ (1b). (Baroň e Bábiková, 2011).

Conclusioni

In questa ricerca si è discusso dei principali additivi, utilizzati durante la vinificazione, in grado di sostituire parzialmente o nella totalità la solforosa.

La sostituzione o la riduzione dell' SO_2 nel vino deve essere fatta con prodotti che possono garantire sia la sicurezza microbiologica, sia una certa protezione contro l'ossidazione, cercando di mantenere inoltre, il più possibile inalterate le sue proprietà organolettiche di partenza. Le metodologie presentate non sono nocive per la salute e presentano promettenti proprietà che permettono di considerarle come metodi alternativi per la conservazione del vino in sostituzione di SO_2 . Con questo non si vuol dire che la solforosa non dev'essere più utilizzata perché particolarmente nociva per l'uomo anzi, con le concentrazioni presenti nel vino (via via sempre minori con il passare degli anni), non determina nessun problema sulla salute, se non disturbi nelle persone sensibili. Stessa cosa però si potrebbe dire per alcuni additivi trattati precedentemente. Il lisozima anch'esso è considerato un possibile allergene, il DMDC rilascia nel vino metanolo durante la sua idrolisi e la possibile formazione di radicali liberi dai sottoprodotti dell'acido ascorbico. Tutti questi problemi però non sussistono (fatta eccezione per il lisozima) perché anch'essi sono utilizzati ad una concentrazione tale che, non possono generare pericoli. Oggi il mercato (o forse la moda) chiede sempre più vini con tenori di diossido di zolfo minori se non addirittura assenti. Creare un vino senza solforosa è possibile, prestando però, ancor più attenzione di quanta dovrebbe essere usata per una cosiddetta vinificazione "normale". C'è da dire che gli additivi precedentemente citati hanno mostrato buone caratteristiche negli esperimenti condotti. Ottima la capacità antiossidante dell'acido ascorbico e dei tannini, molto buona anche quella del glutatione, prodotto non ancora ammesso, soprattutto nelle prime fasi della vinificazione. Per quanto riguarda l'aspetto microbiologico sia lisozima, sia DMDC e sia l'acido sorbico hanno mostrato efficaci capacità antisettiche. Creare un vino senza solfiti quindi è possibile, senza però non tralasciare il fatto che tutti questi additivi hanno mostrato le loro migliori capacità sempre in combinazione con il diossido di zolfo. Per concludere possiamo dire che nonostante i risultati promettenti, l'effetto conservazione dei vini con SO_2 è molto più lungo e fino ad ora nessun altro metodo riportato sembra essere in grado, di per sé, di sostituire completamente l'uso di SO_2 . Continua la sfida per la comunità accademica e per le industrie del vino nel cercare di produrre vini nuovi e sani che soddisfino le moderne esigenze dei consumatori di vino, ma non avendo ancora trovato un valido sostituto, tutti questi additivi andrebbero utilizzati per ridurre le dosi di solforosa nei vini, non per eliminarla.

Bibliografia

A.A.V.V. (2000). Tannini ad uso enologico. Laffort- info, numero 3, 1-5.

A.A.V.V. (2001). Impiego dei tannini enologici in vinificazione. Laffort- info, numero 15, 1-5.

Baroň M. e Bábiková P. (2011). Saturated higher fatty acids as a means of inhibiting alcoholic fermentation and sulphur dioxide reduction in wine. *Mitteilungen Klosterneuburg*, 61, 3, 158-165.

Barril C., Clarka 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, SI, 186-193.

Bartowsky E. J., Costello P. J., Villa A. e Henschke A. P.. (2004). The chemical and sensorial effects of lysozyme addition to red and white wines over six months' cellar storage. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 10, 2, 143-150.

Dubourdieu D. e Lavigne-Cruege V. (2003). Il ruolo del glutatione sull'evoluzione aromatica dei vini bianchi secchi. *www.infowine.com – rivista internet di viticoltura ed enologia*, 2003, n.7, 1-8.

Fracassetti D., Vanzo A., Lisjak K., Tirelli A., du Toit W. (2011). Effetto del glutatione e dell'anidride solforosa sull'ossidazione dei fenoli nel vino bianco. *www.infowine.com – rivista internet di viticoltura ed enologia*, 2011, n.11/1, 1-10.

GIBERTINI ELETTRONICA S.R.L. (2007). *Metodi di analisi dei vini e delle bevande spiritose*. GIBERTINI, Novate (MI), 101-110.

Grazietti A. (2008). Utilizzi enologici del dimetildicarbonato. *www.infowine.com – rivista internet di viticoltura ed enologia*, n.10/2, 1-6.

Publicazione a norma dell'articolo 15, paragrafo 2, del regolamento (CE) n. 606/2009 della Commissione, del 10 luglio 2009 sull'elenco e descrizione dei metodi di analisi.

Ribéreau-Gayon P., Durbourdieu D., Donèche B. e Lonvaud A. (2007). Trattato di enologia: Microbiologia del vino e Vinificazioni (volume I). EDAGRICOLE, Bologna, 199-246.

Ribéreau-Gayon P., Durbourdieu D., Donèche B. e Lonvaud A. (2007). Trattato di enologia: Chimica del vino, Stabilizzazione e Trattamenti (volume II). EDAGRICOLE, Bologna, 176.

Salaha M.-I., Kallithraka S., Marmaras I., Koussissi E. e Tzourou I. (2008). A natural alternative to sulphur dioxide for red wine production: Influence on colour, antioxidant activity and anthocyanin content. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21, 8, 660-666.

Sonni F., Bastante M. J. C., Chinnici F., Natali N. e Riponi C. (2009). Replacement of sulfur dioxide by lysozyme and oenological tannins during fermentation: influence on volatile composition of white wines. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89, 4, pp 688-696.

Sonni F., Chinnici F., Natali N. e Riponi C. (2011 a). Pre-fermentative replacement of sulphur dioxide by lysozyme and oenological tannins: effect on the formation and evolution of volatile compounds during the bottle storage of white wines. *Food Chemistry*, 129, 3, 1193-1200.

Sonni F., Clark A. C., Prenzler P. D., Riponi C. e Scollary G. R., (2011 b). Antioxidant Action of Glutathione and the Ascorbic Acid/Glutathione Pair in a Model White Wine. *J. Agric. Food Chem.*, 59, 8, 3940–3949.

Threlfall R.T. e Morris J.R. (2002). Using Dimethyldicarbonate to Minimize Sulfur Dioxide for Prevention of Fermentation from Excessive Yeast Contamination in Juice and Semi-Sweet Wine. *Journal of Food Science*, 67, 7, 2758-2762.

Werner M., Rauhut D., Cottureau P. (2010). Produzione di solfiti da parte del lievito. www.infowine.com – rivista internet di viticoltura ed enologia, 2010, n.5/3, 1-5.

Zironi R., Comuzzo P., Tat L. e Scobioala S. (2009). Strategie per la riduzione dell'SO₂ nelle prime fasi della vinificazione. www.infowine.com – rivista internet di viticoltura ed enologia, 2009, n.12/2, 1-9.

Sitografia

http://www.darapri.it/immagini/nuove_mie/eserc_nuova/acidoascorbico.htm

http://www.darapri.it/immagini/nuove_mie/eserc_nuova/anidridesolforosa.htm

<http://www.extension.iastate.edu/wine/sites/www.extension.iastate.edu/files/wine/SorbicAcid1.pdf> (Murli Dharmadhikari)

<http://www.my-personaltrainer.it/nutrizione/solfiti.html>