



ISTITUTO STATALE D'ISTRUZIONE, SUPERIORE
"PAOLINO D'AQUILEIA"

TESI DI SPECIALIZZAZIONE
DEL CORSO DI VITICOLTURA ED ENOLOGIA

Miglioramento della qualità e salubrità dei vini mediante l'impiego di demetallizzanti

Candidato:
Giovanni QUALIZZA

Classe:
6[^]E

Anno scolastico 2017/2018

Indice

1	Le fonti degli ioni metallici all'interno dei mosti	1
2	Metalli all'interno dei mosti	3
3	Problematiche dei metalli nel mosto	5
3.1	Impatto del rame sul metabolismo dei lieviti	5
3.2	Prova sperimentale sulla resistenza del lievito "Laffort X5" a dosi crescenti di rame	7
3.2.1	Preparazione del lievito	7
3.2.2	Preparazione del terreno con CuSO ₄	8
3.2.3	Conclusioni dell'esperimento	9
3.3	Metalli in vinificazione come cofattori delle ossidazioni	10
3.3.1	Precipitazione e perdita degli aromi varietali	11
3.3.2	Casse e intorbidimenti dovuti alla presenza dei metalli	12
3.3.3	Casse rameica	13
4	Importanza dei metalli nella vitalità del lievito	15
5	Demetallizzazione biologica della fermentazione	17
6	Molecola PVI – PVP: aspetti chimici	19
7	Effetti positivi derivanti dall'aggiunta di PVI – PVP	21
7.1	Aumento del potenziale aromatico dopo l'utilizzo di PVI-PVP e glutazione in sinergia	22
7.2	Altri aspetti positivi dopo l'aggiunta di PVI-PVP in sinergia	24

Elenco delle tabelle

1.1	Quantità di metalli presenti in un mosto campione.	1
3.1	Monitoraggio della popolazione di lieviti sviluppata con diverse aggiunte di solfato di rame, in scatola Petri.	6
3.2	Numero di UFC (unità formanti colonie) visualizzate su scatola Petri a diluizione 10 – 5.	9
5.1	Contenuto in rame [<i>mg/L</i>] durante il corso della vinificazione.	18
7.1	Variazione in % positiva e negativa dei principali aromi contenuti nel campione analizzato prima e dopo il trattamento con PVI-PVP.	23

Elenco delle figure

2.1	Classificazione dei mosti esaminati in relazione al contenuto di rame (Ricerca del Laboratorio <i>Sofralab</i>).	3
3.1	Diminuzione della densità del mezzo, che si interpreta con una diminuzione del suo tenore zuccherino, in funzione dello scorrere del tempo di fermentazione.	6
3.2	Due scatole Petri a confronto con diversi quantitativi di rame.	7
3.3	Scatola Petri contenente la dose massima di rame testata.	8
3.4	Formazione dei chinoni, molecole negative ed implicate nelle reazioni di ossidazione dei vini.	10
3.5	Scatole Petri a confronto con varie dosi di rame aggiunte.	11
3.6	Trasformazione da tiolo inodoro a tiolo odoroso.	11
3.7	Chelazione dell'aroma con lo ione rame e perdita dell'aroma.	12
3.8	Nel grafico si considerano due molecole aromatiche tipiche del Sauvignon 4MMP e A3MH su vino finito non demetallizzato e su un vino finito invece depauperato in precedenza degli ioni metallici.	13
7.1	Rimozione in % dei vari elementi dopo il trattamento con PVI-PVP su due vini. A (campione con $5\text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ di ferro e $0.5\text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ di rame), B (campione con $15\text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ di ferro e $1\text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ di rame).	22
7.2	Variazione aromatica prima e dopo il trattamento.	23

Introduzione

L'enologia non è sempre stata come la conosciamo noi oggi, nel corso degli anni sono state introdotte innovazioni e sostituzioni. Era comune l'impiego di ottone, rame e ferro per la fabbricazione di recipienti e delle attrezzature di cantina: tali materiali conferivano un apporto significativo di metalli al mosto in trasformazione e al vino in affinamento.

Con l'enologia moderna si inizia ad utilizzare l'acciaio inossidabile: ciò permette di avere un sempre minor apporto di metalli al mosto durante le fasi di trasformazione. Il fenomeno ha permesso di ridurre sensibilmente la necessità di intervenire con i demetalizzanti su mosti e vini per alcuni anni. Con l'avvento di nuovi sistemi di lotta per la difesa della vite, quali biologico e convenzionale, torna necessario l'utilizzo di demetalizzanti per contenere le quantità di metalli che interferiscono sensibilmente sulla qualità dei vini finiti. Infatti negli ultimi anni la qualità dei vini è molto migliorata e attualmente si pone particolare attenzione a tutti quei fattori che possono diminuirla. Siccome ridurre la quantità di trattamenti a base di metalli in vigneto per la difesa della vite è chiaramente difficile, si ricercano sistemi che permettano di diminuire significativamente i residui di tali trattamenti sulle uve, così da garantire minori problemi in fasi di vinificazione e assicurare un vino di qualità.

Capitolo 1

Le fonti degli ioni metallici all'interno dei mosti

Nonostante gli obblighi europei per la riduzione dell'uso del rame, questo risulta ancora alla base della lotta alla peronospora soprattutto nei vigneti coltivati a biologico, un fenomeno sempre più in aumento. Infatti nell'agricoltura biologica, non utilizzando prodotti sistemici di sintesi con un'elevata efficacia, si è obbligati a utilizzare alte dosi di zolfo e rame provocando così numerosi problemi.

Nelle annate più piovose, nelle uve vendemmiate che arrivano in cantina si riscontrano contenuti di rame molto elevati che possono variare da 2 mg/kg a 10 mg/kg di uva, superando molto spesso il limite di legge.

Talvolta l'enologo si rassicura del fatto che il quantitativo di metalli sia nei limiti di legge e quindi sottovaluta l'effetto tossico di tali metalli sui lieviti e sull'andamento fermentativo, andando incontro a molti problemi ossidativi e fermentativi che si manifestano anche molto sotto i limiti di legge.

Il rame è sicuramente il metallo che crea più problemi all'interno del mosto, ma non bisogna sottovalutare ferro, alluminio e piombo, presenti in minori quantità, ma comunque significativi.

I metalli all'interno del mosto possono essere di natura esogena o endogena, infatti la pianta può assorbire dal terreno una quantità più o meno abbondante di metalli sotto forma di micro elementi a seconda della disponibilità nel terreno; in genere l'assorbimento non supera 1 mg/L anche se spesso il quantitativo di rame nei suoli coltivati a vite arriva a 1300 mg/kg di terreno (la vite riscontra problemi di tossicità già oltre i 200 mg/kg). Il rame spesso viene trattenuto all'interno del terreno e così non è permessa la dilavazione e percolazione dello stesso.

Metalli	Simbolo	Quantità di metalli (mg/L)
Ferro	Fe	3, 10
Rame	Cu	1, 70
Piombo	Pb	3, 30
Zinco	Zn	4, 01

Tabella 1.1: Quantità di metalli presenti in un mosto campione.

La fonte più abbondante dei metalli all'interno dei mosti deriva soprattutto dai trat-

tamenti fitosanitari, indispensabili per affrontare la lotta contro peronospora e oidio. Per diminuire la quantità di residui da prodotti fitosanitari è opportuno rispettare il tempo di carenza, ossia il numero minimo di giorni che deve intercorrere tra la data in cui è stato eseguito il trattamento con fitosanitari e la data di raccolta dei prodotti. Nella coltivazione della vite si tende a rispettare con facilità i tempi di carenza: il prodotto viene attaccato molto meno a partire dall'invasatura e quindi la necessità di intervenire con i trattamenti è ridotta.

I trattamenti però si fissano sul grappolo in fase di pre chiusura. Durante la diraspatura e la pigiatura il mosto viene a contatto con i raspi e le bucce e avviene il dilavamento del rame nel mosto.

Il quantitativo dei residui nei mosti dipende molto dal clima dell'annata di produzione e dalle pratiche enologiche come ad esempio la criomacerazione. Durante la criomacerazione infatti il contatto con le bucce è più lungo rispetto alle vinificazioni standard, con un rilascio maggiore dei metalli nel mosto. Si è visto che la quantità di residui di fitofarmaci è tanto più elevata quanto più l'annata è stata piovosa e quindi più numerosi sono stati gli interventi in campagna. Molte volte si riscontrano più problemi nei mosti biologici che in quelli convenzionali riguardo la tossicità dei metalli.

Vale la pena chiedersi a volte se intraprendere la via del biologico sia una buona scelta viste le problematiche dei metalli anche sul corpo umano, soprattutto per quanto riguarda alluminio e piombo, anche perché ancora non si conoscono a fondo le problematiche del rame sull'organismo.

Capitolo 2

Metalli all'interno dei mosti

Il limite di legge dei metalli in molti Paesi Europei, come l'Italia, non esiste sui mosti, ma soltanto per i vini finiti pronti al consumo.

La sicurezza del consumatore è sempre più in primo piano, infatti si cerca sempre più di diminuire i livelli di questi metalli all'interno del prodotto finito destinato al consumo.

L'Unione Europea ha abbassato il valore massimo di piombo legale nei vini da 0,2 mg/L a 0,15 mg/L e il livello massimo di rame a 0,1 mg/L.

Sofralab ha elaborato uno studio in Francia da cui risulta che su 400 mosti in fermentazione il 38% dei campioni presenta una concentrazione di rame superiore al limite di legge, senza contare i mosti con contenuto di rame nei limiti di legge, ma comunque con una quantità di rame troppo alta per garantire la qualità del prodotto finito. In questi casi la demetallizzazione deve essere effettuata obbligatoriamente per poter avviare il prodotto alla vendita.

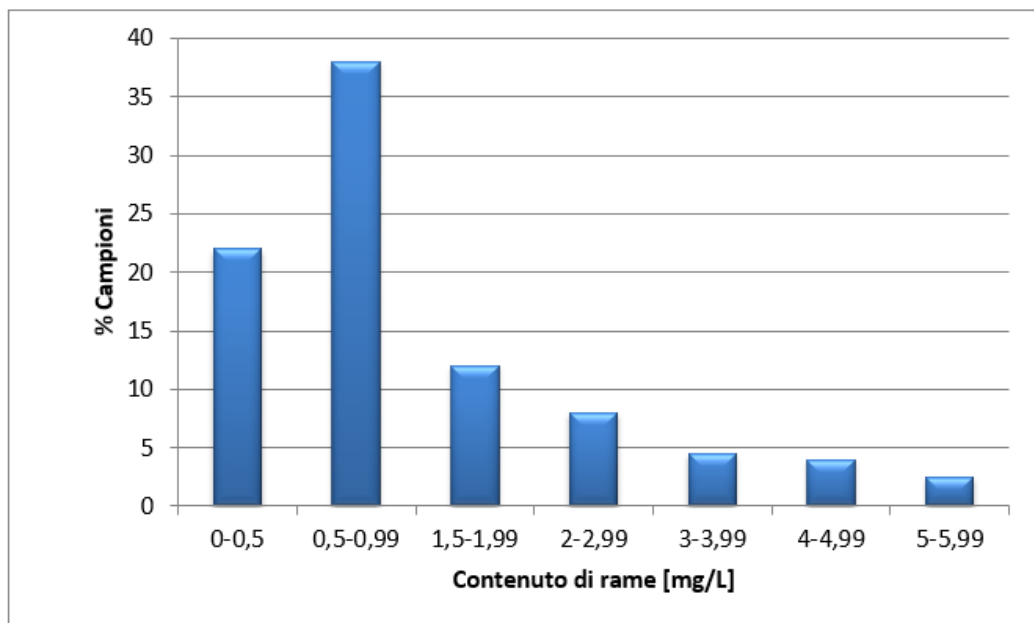


Figura 2.1: Classificazione dei mosti esaminati in relazione al contenuto di rame (Ricerca del Laboratorio *Sofralab*).

Capitolo 3

Problematiche dei metalli nel mosto

3.1 Impatto del rame sul metabolismo dei lieviti

Decenni di studi sono stati effettuati sugli andamenti dei processi fermentativi al fine di individuare i fattori che ne limitano o condizionano lo sviluppo della fermentazione.

Non è solo importante la resa in alcol, infatti fermentazioni stentate o che si arrestano possono costituire un danno rilevante per l'organizzazione e l'economia della cantina.

L'attenzione risulta incentrata verso il processo fermentativo, la produzione di aromi secondari e preservazione dei primari. Un lievito che sta bene e fermenta bene produrrà anche buoni aromi e fermentazioni più pulite.

Un arresto di fermentazione si ha quando la fermentazione si blocca prima che tutto lo zucchero disponibile sia convertito in alcol e anidride carbonica.

In questo paragrafo prenderemo in considerazione l'effetto del rame sull'andamento fermentativo.

Gran parte dei metalli pesanti presenti nel mosto attuano un effetto tossico verso i lieviti, batteri e i microrganismi in generale. Gli studi disponibili sull'interferenza dei fitofarmaci sulla fermentazione sono ancora limitati, ma oltre al contenuto in ioni metallo prendono in considerazione anche le molecole derivanti dalla degradazione del principio attivo all'interno del prodotto (metaboliti). Il rame può trovarsi in forma ionica, molecolare e complessa.

La forma ionica Cu^{2+} in particolare ha un'attività fungicida. Gli ioni provengono dalla reazione con la CO_2 dell'aria con sali di rame poco solubili in natura. Con questa reazione la solubilità aumenta di molto e il composto rimane solubile per alcuni giorni prima di precipitare naturalmente.

Alcuni anni fa infatti è stata inserita nelle tabelle tecniche di alcuni lieviti la voce "sensibilità al rame" e così facendo si sono evidenziate tre categorie di lieviti: molto sensibili, mediamente sensibili e non sensibili.

Nella Tab. 3.1 si dimostra la tossicità del rame su alcuni tipi di lieviti fatti crescere su terreni solidi arricchiti con CuSO_4 in diverse concentrazioni (8 *mg/L*, 12 *mg/L*, 16 *mg/L*) e rispettivamente in ordine crescente si valuta la tossicità del lievito in base alla sua sopravvivenza.

Questo ci permette di osservare che una concentrazione fino a 8 *mg/L* di CuSO_4 non influenza in modo significativo la vitalità dei lieviti testati e una concentrazione

#	Campione senza Cu	Con 8 mg/L CuSO ₄ aggiunti	Con 12 mg/L CuSO ₄ aggiunti	Con 16 mg/L CuSO ₄ aggiunti
1	3,10	3,27	1,80	0
2	7,95	7,33	6,10	0
3	2,29	2,14	1,60	0
4	1,90	2,21	1,23	0
5	3,53	2,24	2,154	0
6	2,00	1,98	2,21	0
7	3,60	3,36	3,10	0
8	3,86	4,10	0	0

Tabella 3.1: Monitoraggio della popolazione di lieviti sviluppata con diverse aggiunte di solfato di rame, in scatola Petri.

invece di 16 mg/L è letale per i lieviti testati.

I dati relativi all'aggiunta di 12 mg/L, di 16 mg/L di CuSO₄ sono più rari nella realtà: ci servono solo per valutare il comportamento del lievito.

Nella praticità di esperienze effettuate in cantina durante la fermentazione si è notato che mosti con un alto quantitativo di metalli rispetto a un mosto demetallizzato si comportavano in maniera differente, sintomo di tossicità dei lieviti al rame.

Si sono effettuati test di micro vinificazione su un campione standard di mosto contenente circa 1 mg/L di rame, e un secondo test dopo una demetallizzazione parziale tramite un polimero chelante di materiali pesanti.

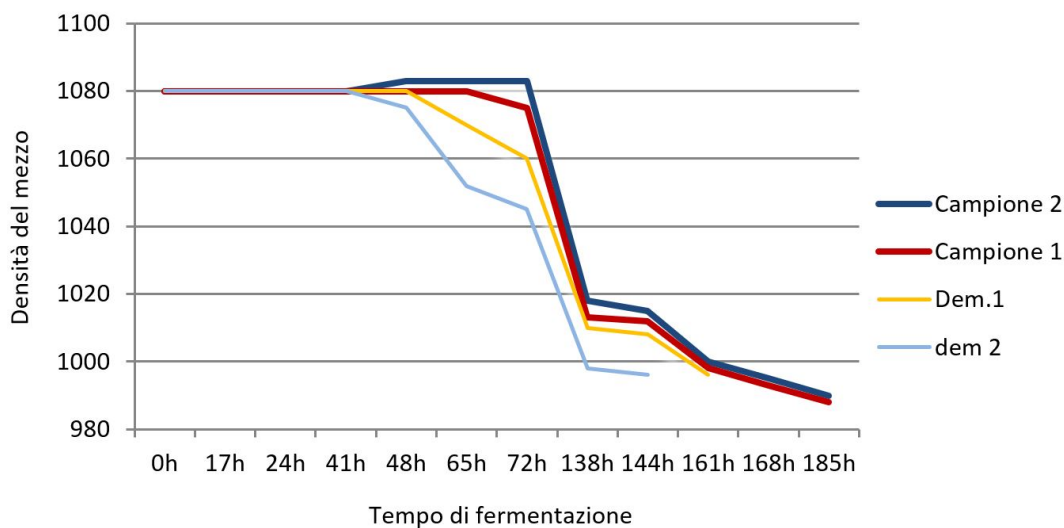


Figura 3.1: Diminuzione della densità del mezzo, che si interpreta con una diminuzione del suo tenore zuccherino, in funzione dello scorrere del tempo di fermentazione.

I risultati ottenuti sono diversi e indicano che il mosto demetallizzato ha una fase iniziale di latenza molto più breve e la fermentazione per arrivare a completamento degli zuccheri fermentati ci metteva 48 ore in meno rispetto al mosto standard.

In sostanza la fermentazione degli zuccheri in assenza di mezzo con quantità di metalli ad azione antisettica parte prima e termina prima.

Il rame risulta avere effetti negativi in quanto causa la morte delle cellule durante la fase logaritmica di crescita esponenziale.

Il lievito nella prima fase deve abituarsi e fronteggiare la tossicità ai metalli presenti, così perdendo in accrescimento e moltiplicazione.

Dal grafico in Fig. 3.1 si conclude che seppure il mezzo dei campioni 1 e 2 contenga 1 mg/L (valore nei limiti di legge) la fermentazione procede con una peggiore cinetica fermentativa.

L'obiettivo che ogni enologo si pone infatti è quello di terminare la fermentazione in tempi brevi e con bassissimi residui zuccherini, nonché con l'assenza di odori e sapori sgradevoli in modo da evitare problemi di alcun genere.

3.2 Prova sperimentale sulla resistenza del lievito "Laffort X5" a dosi crescenti di rame

Per questa tesi ho voluto approfondire in modo diretto la tossicità del rame su lievito con prove microbiologiche condotte in laboratorio al fine di verificare quanto presente in letteratura e avere conferma dal punto di vista pratico.

3.2.1 Preparazione del lievito

Si è deciso per tale esperimento l'utilizzo di lievito "Laffort X5", tra i più in uso nelle vinificazioni in bianco, e soprattutto utilizzato nella vinificazione del Sauvignon per esprimere la sua nota tiolica.

Si è iniziato preparando le dosi seguendo le indicazioni di etichetta 25 g/hL , per praticità si sono calcolate le dosi per un quantitativo di circa 500 mL .

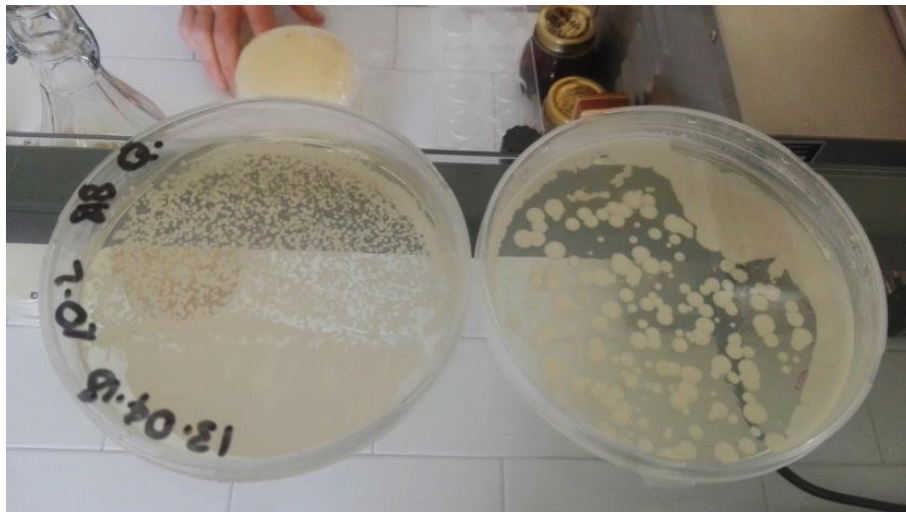


Figura 3.2: Due scatole Petri a confronto con diversi quantitativi di rame.

Si è proceduto alle fasi di reidratazione e attivazione del lievito facendo molta attenzione a rispettare le tempistiche e le temperature ottimali per questo ceppo di *Saccharomyces cerevisiae*.

È stata quindi eseguita la reidratazione a 37°C per circa 15 minuti prima di procedere alle diluizioni.

Si è poi decisa la diluizione ottimale da adottare per rendere significativo l'esperimento.

Infatti è importante inoculare su scatola Petri la giusta quantità di cellule in modo da ottenere lo sviluppo di colonie ben distinte, evitando un numero eccessivo delle stesse, che ne renderebbe difficoltosa la conta. Dopo numerosi tentativi a diverse concentrazioni si è deciso quindi di diluire di cinque volte ($10 - 5$) il lievito attivato.

3.2.2 Preparazione del terreno con CuSO_4

Si è deciso di inoculare il rame in fase di preparazione del terreno in modo da imitare la presenza di rame all'interno di un mosto. Infatti un inoculo unico superficiale, rame più lievito, non sarebbe stato significativo per quanto riguarda i risultati. Sulla base di studi delle concentrazioni di rame riscontrate sui mosti del Friuli Venezia Giulia, si è deciso di utilizzare dosi crescenti di rame.

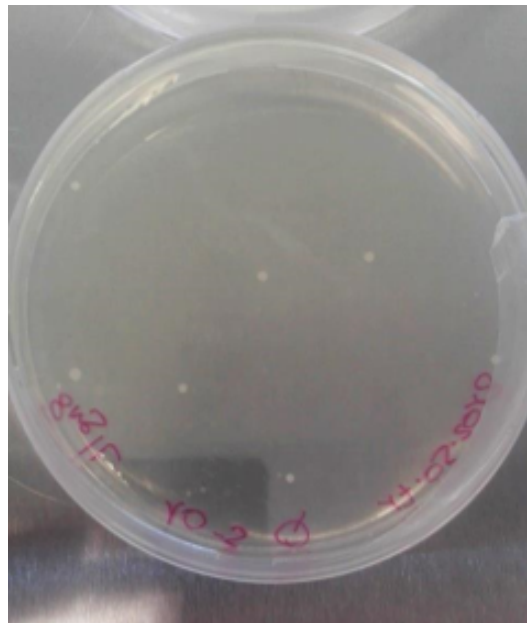


Figura 3.3: Scatola Petri contenente la dose massima di rame testata.

Le tre dosi seguono il valore medio di rame riscontrato nei mosti ($3,23 \text{ mg/L}$), un valore tra i più alti riscontrati (16 mg/L) e un valore intermedio ai due (5 mg/L). Tali valori sono i valori di rame metallo che devono risultare su un litro di prodotto.

Il solfato di rame utilizzato per l'esperimento contiene circa $1/3$ di rame metallo, quindi tramite i pesi molecolari si è calcolata la dose di solfato di rame da inoculare per ottenere con precisione le dosi sopra citate.

Secondo la procedura una volta preparato il terreno, bisogna sterilizzarlo in autoclave in modo da evitare contaminazione esterne in fase di crescita delle colonie.

Essendo poco certi dell'effetto che il calore ha sul rame, si è deciso di procedere nel seguente modo:

- filtrazione sterile del solfato di Cu mediante l'uso di siringhe dotate di filtro $0.2 \mu\text{m}$;
- inoculo nel terreno appena preparato prima della sua solidificazione.

Una volta pronti terreno e diluizioni si è effettuato l'inoculo superficiale di 1 mL di prodotto (in tre scatole Petri per ciascuno dei tre dosaggi diversi di Cu).

Una volta inoculato il terreno con il lievito a diluizione $10 - 5$, si posizionano i

terreni in incubatrice a 20°C per 1 giorno in modo da ottenere uno sviluppo ottimale delle colonie.

3.2.3 Conclusioni dell'esperimento

Ogni prova con rame è stata effettuata su tre scatole Petri in modo da ottenere un certo risultato.

Talvolta il numero di colonie su tre scatole Petri inoculate in maniera identica, risultava molto diverso, il risultato doveva essere scartato e la prova andava ripetuta.

Ad ogni modo, anche nelle scatole petri scartate, si poteva osservare che il numero di colonie risultava sempre molto inferiore là dove il rame era presente rispetto alle scatole contenenti soltanto terreno di coltura standard.

Nella tabella seguente si riportano i valori trovati nelle 4 tesi dell'esperimento.

Terreno tal quale	3,25 mg/L Cu	8 mg/L Cu	50 mg/L Cu
254	180	120	12
205	145	100	7
266	157	140	0

Tabella 3.2: Numero di UFC (unità formanti colonie) visualizzate su scatola Petri a diluizione 10 – 5.

Si nota anche dalla tabella come, a dosi crescenti di rame il lievito si moltiplica con maggiore difficoltà e produce un numero inferiore di colonie.

Si nota infatti già un dimezzamento del numero di colonie con 8 mg/L , dose spesso presente nei mosti. Si è deciso di non superare i 50 mg/L in quanto oltre questa dose non si sarebbero sviluppate colonie.

Si vede inoltre come i dati, all'interno della singola prova, siano confrontabili.

3.3 Metalli in vinificazione come cofattori delle ossidazioni

I metalli in genere all' interno del mosto funzionano come catalizzatori di ossidazione chimica o enzimatica, ad esempio accelerando l'effetto delle polifenolossidasi come laccasi e tirosinasi presenti in quantità più o meno elevate nelle uve.

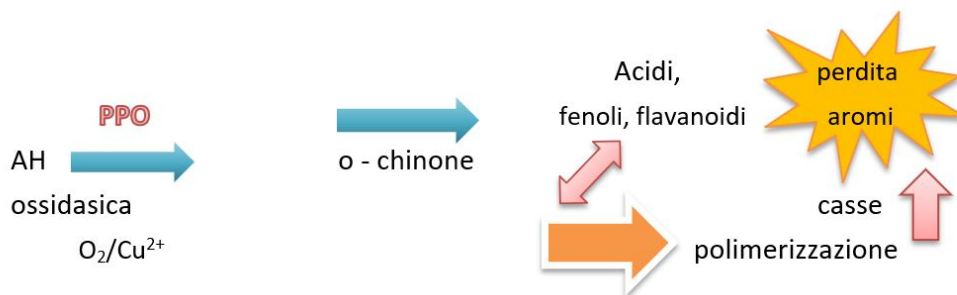


Figura 3.4: Formazione dei chinoni, molecole negative ed implicate nelle reazioni di ossidazione dei vini.

Le polifenolossidasi, una volta presenti nell'uva e poi nel mosto, basano la loro reazione ossidativa su due fattori principali: ossigeno e metallo (catalizzatore dell'ossidazione).

Dal punto di vista dell'interazione dell'ossigeno con i componenti chimici del mosto e del vino risulta che tale elemento non è un buon ossidante nella sua forma molecolare, ma richiede un'attivazione per via enzimatica o causata dalla presenza di metalli pesanti.

Nelle prime fasi della vinificazione e ancor più in presenza di metalli nel mosto si formano dei chinoni, a partire da acido caftarico o flavanoli, avvengono reazioni di combinazione indotte dall'acetaldeide e processi di degradazione delle antocianine.

Ad esempio l'acido caftarico viene ossidato in presenza delle PPO a orto chinone (primario), che poi ossidando nuovamente le catechine diventa ortochinone secondario. L'ortochinone secondario poi reagisce con acidi fenolici e flavani formando prodotti di condensazione che possono poi polimerizzare ulteriormente.

Avviene così una serie di ossidazioni a catena che poi si riversano su aromi e antociani facendoli precipitare perdendo gran parte del patrimonio aromatico varietale e una parte del colore.

La soluzione per evitare ossidazioni incontrollate è la rimozione di uno dei due fattori chiave. Come sappiamo, l'ossigeno durante la fermentazione non può essere totalmente rimosso in quanto implicato in diversi processi fermentativi.

Lo scopo della demetallizzazione preventiva ha il compito in questo caso di eliminare il catalizzatore (metallo) così da fermare le reazioni ossidative e la formazione dei chinoni.

Come vedremo nei paragrafi successivi, la demetallizzazione totale non è possibile, una parte degli orto chinoni quindi si formerà in ogni caso e si dovrà agire in maniera combinata con il glutatone che ha la capacità di inibire l'orto chinone a continuare la catena di ossidazioni.

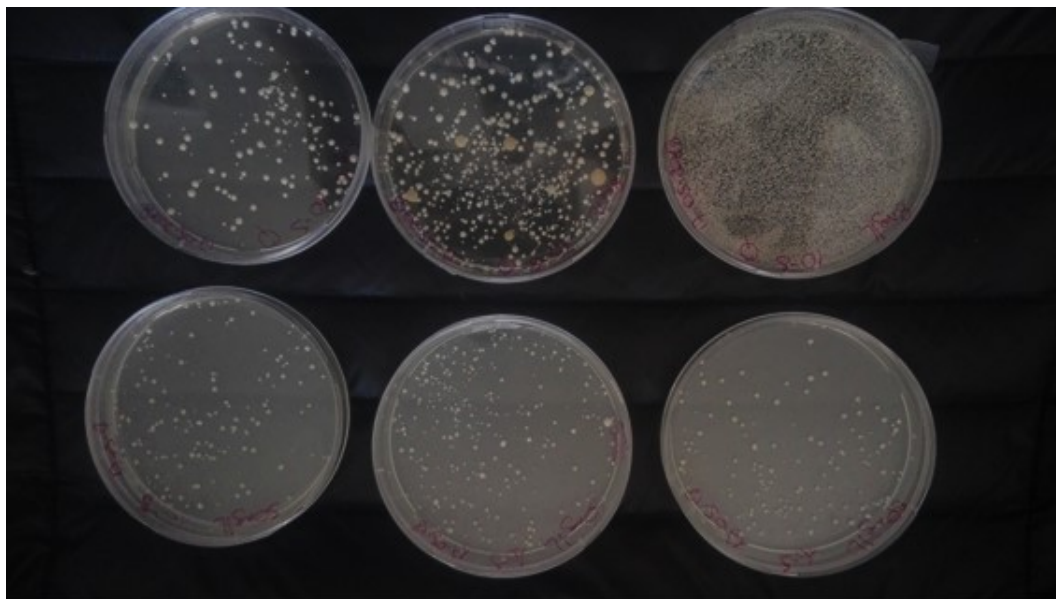


Figura 3.5: Scatole Petri a confronto con varie dosi di rame aggiunte.

3.3.1 Precipitazione e perdita degli aromi varietali

La qualità organolettica dei vini oggi giorno è sempre più ricercata e a questo riguardo bisogna mantenere, preservare ed estrarre gli aromi varietali. È studiato che a fine fermentazione soltanto una piccolissima parte dei precursori aromatici diventa un aroma odoroso: bisogna quindi fare in modo che la piccolissima parte presente e già trasformata non svanisca.

Come vedremo in seguito gli aromi vengono, in presenza dei metalli, ossidati o legati e precipitano, perdendo una buona parte del patrimonio aromatico. Nell'uva prima dell'inizio della fermentazione troviamo gli aromi varietali primari che non sono legati agli zuccheri e quindi da subito odorosi e sono anche i primi ad essere a rischio precipitazione ad opera degli ioni ferrosi.

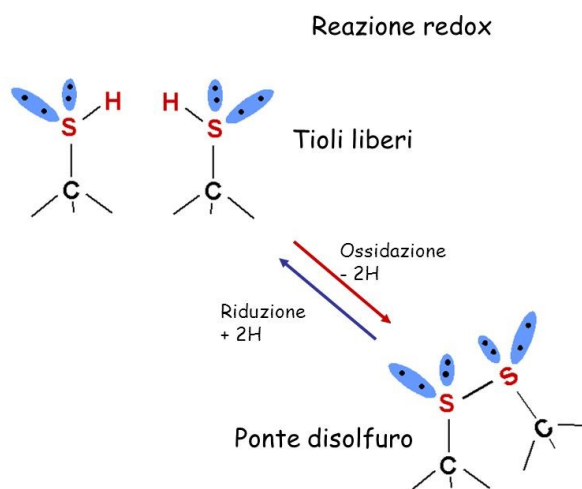


Figura 3.6: Trasformazione da tiolo inodoro a tiolo odoroso.

Tali ioni fanno precipitare gli aromi cosiddetti secondari varietali appena essi vengono separati dagli zuccheri per opera delle beta glucosidasi all'interno dei lieviti. Sono quindi varietali perché appartenenti alle uve, ma secondari perché liberati grazie alla fermentazione alcolica.

Si fa riferimento in seguito ai tioli tipici del sauvignon che all'inizio sono glucosidati e vengono liberati soltanto nelle prime fasi della fermentazione diventando odorosi. Se nel mosto, al momento in cui il tiolo si libera, si trova un'importante presenza di metalli pesanti, vengono immediatamente chelati dallo ione metallo e persi in maniera definitiva.

Con questo sistema molti degli aromi varietali vengono rimossi e depositati sul fondo prima che avvenga la detossificazione biologica della fermentazione alcolica.

A questo punto è facile valutare che la demetallizzazione biologica non permette di risolvere i problemi iniziali che gli ioni metalli creano.

La demetallizzazione biologica permette quindi di rientrare nei limiti di legge con le dosi massime di metalli, ma non di preservare gli aromi. È perciò opportuno eliminare il contenuto di metalli pesanti nei metodi e coadiuvanti che verranno illustrati in seguito.

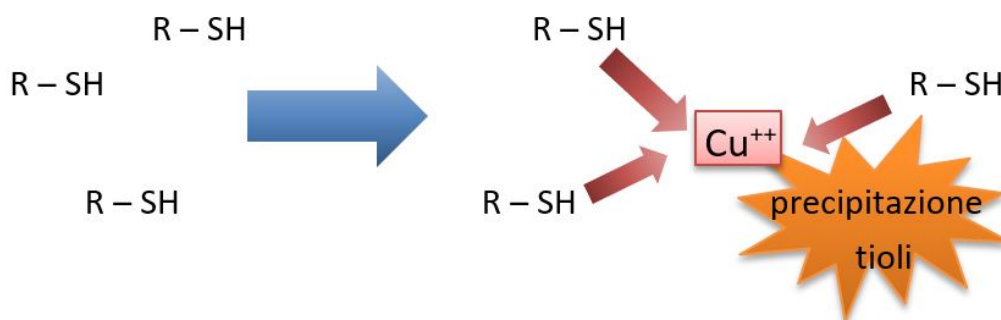


Figura 3.7: Chelazione dell'aroma con lo ione rame e perdita dell'aroma.

La chelazione avviene tramite un legame covalente dativo in cui un atomo cede entrambi gli elettroni. Questo rende il legame molto stabile e il sale formato insolubile in maniera irreversibile.

Valutando la molecola A3MH nell'istogramma di Fig. 3.8 si nota come la quantità di essa risulti quasi doppia in vino demetallizzato a mosto. In questo caso gli ioni metallo non hanno potuto far precipitare tali molecole odorose.

Oltre all'ossidazione dei tioli e quindi l'ossidazione aromatica, i metalli ossidano ed eliminano altri composti che fungono da antiossidanti come glutazione, cisteina e peptidi contenenti cisteina.

In questo modo perdiamo molti degli antiossidanti naturali dell'uva e l'aggiunta di solforosa può risultare non necessaria rispetto alle normali dosi utilizzate. In questo caso possono verificarsi ossidazioni e numerosi altri problemi dovuti alla bassa presenza di solforosa nel mezzo.

3.3.2 Casse e intorbidenti dovuti alla presenza dei metalli

Si definisce casse la rottura della limpidezza e del colore. Ci sono tre tipi di casse che possono essere provocati dalla presenza degli ioni metallo: rameica, ferrica e ossidasica.

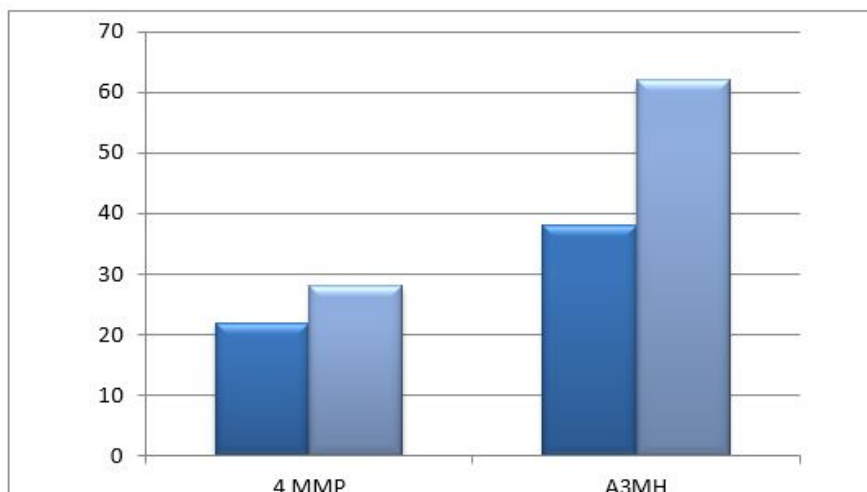


Figura 3.8: Nel grafico si considerano due molecole aromatiche tipiche del Sauvignon 4MMP e A3MH su vino finito non demetallizzato e su un vino finito invece depauperato in precedenza degli ioni metallici.

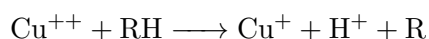
3.3.3 Casse rameica

Si tratta di un intorbidimento e la precipitazione è causata dall'eccesso di rame in bottiglia. In particolare tale precipitazione può verificarsi a partire da $0,5 \text{ mg/L}$ di rame.

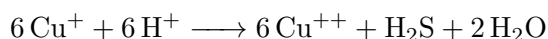
Si presenta, soprattutto nei vini bianchi, come un precipitato rosso-giallastro prodotto dalla reazione del rame con zolfo o suoi composti, in particolare l'anidride solforosa largamente utilizzata in enologia come disinfettante.

Il meccanismo chimico della casse rameica comporta delle tappe principali:

- riduzione degli ioni rameici;

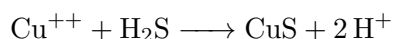


- riduzione del diossido di zolfo;



- formazione del solfuro rameico che poi floccula ad opera delle proteine;
- riduzione del Cu^{++} fino a Cu metallico.

Una parte precipita allo stato colloidale e l'altra riduce la SO_2 ad H_2S con formazione di CuS . Successivamente con le proteine si formano intorbidimento e deposito.



Tale intorbidimento è un grave inconveniente che si manifesta a seguito della conservazione del vino in bottiglia. Le bottiglie che presentano tale problema devono essere stappate e sottoposte a nuovi trattamenti, quindi anche il costo dell'operazione è molto oneroso.

Capitolo 4

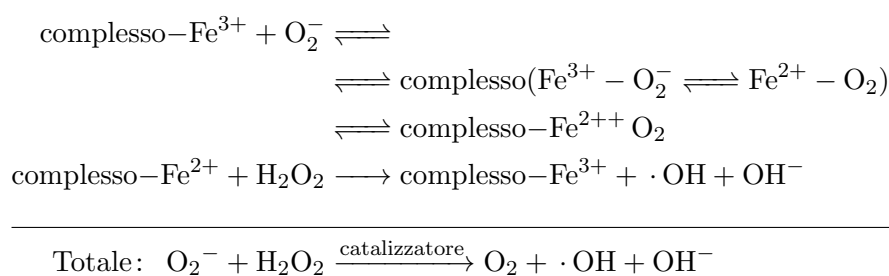
Importanza dei metalli nella vitalità del lievito

Come descritto nella sezione 3.1, una quantità di rame e di altri metalli elevata agisce in modo negativo sulla vitalità del lievito e sulla vinificazione in generale. In questo paragrafo dimostreremo qual è la dose che fa da veleno, poiché una piccolissima percentuale di questi elementi risulta fondamentale per la vitalità e lo svolgimento di molte attività all'interno del lievito. Infatti l'enzima superossido dismutasi (SOD), appartenente alla classe delle ossido riduttasi, catalizza molte reazioni all'interno del lievito utilizzando cofattori metallici come rame, zinco, manganese, ferro e nichel.

Si tratta di un importante antiossidante di tutte le cellule esposte all'ossigeno o a fenomeni ossidativi.

Le cellule del lievito come sappiamo lavorano sia in anaerobiosi che in aerobiosi, anzi in condizioni aerobiche riescono a produrre più ATP. Il problema sono le forme reattive dell'ossigeno come il radicale superossido (ossigeno con un elettrone in più) che può sfuggire agli enzimi della respirazione cellulare e provocare disastri nelle cellule.

Le SOD catalizzano le seguenti reazioni:



Avvengono contemporaneamente due reazioni opposte, un'ossidazione e una riduzione. L'enzima SOD prende due radicali superossido, strappa via l'elettrone in più dal primo e lo trasferisce al secondo. In questo modo una delle due molecole perde l'elettrone in più e diventa ossigeno molecolare O_2 , l'altra si ritrova con un elettrone in più e, dopo aver legato due ioni H^+ , diventa acqua ossigenata H_2O_2 .

Vengono utilizzati dal lievito principalmente rame, zinco, ferro e manganese.

- Rame e zinco sono cofattori delle SOD contenute nel citoplasma delle cellule del lievito. Inoltre per quanto riguarda il rame, l'optimum per la crescita è di 1,5 μM e a partire da 1 μM stimola il flusso glicolitico della cellula.
- Ferro e manganese, importanti nei mitocondri in quanto contengono una forma dell'enzima con ferro e manganese Fe-SOD e Mn-SOD.

In base a questa premessa si capisce che lo scopo del demetallizzante non è quello di eliminare tutti i metalli presenti nel mosto, ma di lasciarne una dose minima, indispensabile per i lieviti ed altri microrganismi, nonché per il potenziale redox del vino. Tale minima quantità di metalli può essere chiamata "benigna" in quanto verrà utilizzata dai lieviti e non verrà utilizzata nei processi ossidativi negativi.

Nel caso in cui venga a formarsi l'ortochinone (molecola ossidante), viene subito inibita dalla presenza del glutatione.

Il glutatione nel vino non è molto presente e quindi può essere aggiunta tramite autolisato di lievito contenente alte dosi di questo elemento.

Capitolo 5

Demetallizzazione biologica della fermentazione

In base a svariati studi su molti campioni si è notato che gran parte dei vini a fine fermentazione hanno un contenuto di metalli molto inferiore ai limiti di legge. Ciò sta a dimostrare che la fermentazione alcolica ha un effetto assorbente naturale nei confronti dei metalli.

Il lievito produce durante la fermentazione una vasta gamma di prodotti secondari tra i quali idrogeno solforato e altri composti contenenti zolfo che reagendo con il rame e altri metalli diventano insolubili e precipitano eliminando in questo modo anche molecole dannose. Infatti una percentuale variabile tra il 69% e il 98% dei metalli presenti nel mosto viene asportato con la prima sfecciatura di fine fermentazione mediante adsorbimento cellulare.

Il biochimismo è semplice: il rame quando si combina con atomi di elementi non metallici come lo zolfo, tende a cedere elettroni, cioè a ossidarsi producendo solfuro di rame a differenza dello zolfo che si riduce.

Lo zolfo è molto presente nei mosti derivanti dall'agricoltura biologica ed è il primo fattore che provoca il difetto di ridotto.

Le due semi-reazioni che provocano la reazione tra rame e zolfo sono:



Se però il vino nuovo viene tenuto in contatto con le fecce per un lungo periodo può verificarsi il caso contrario, ossia il desorbimento del rame che torna in soluzione, in quanto tra le fecce e i metalli c'è un legame debole che tende a sciogliersi nel breve periodo.

A differenza della chelazione infatti, l'assorbimento biologico non è permanente.

Se si hanno problemi di rame e di altri metalli è necessario travasare il vino separandolo dalle fecce in decantazione, purtroppo perdendo i benefici legati ad esse in fase di batonnage.

Mosto chiarificato	Feccia di decantazione	Feccia di lievito	Vino
5,60	3,20	237,9	0,2
9,35	9,10	511,5	0,2
7,50	6,95	370,8	0,1

Tabella 5.1: Contenuto in rame [mg/L] durante il corso della vinificazione.

In Tab. 5.1 si osserva come i vini dopo la fermentazione alcolica contengono solo 0,1/0,2 mg/L di rame mentre la feccia del lievito contiene un elevatissimo contenuto di rame.

Questo dimostra l'effetto demetallizzante biologico della fermentazione e l'effetto spugna delle fecce di lievito nei confronti dei metalli.

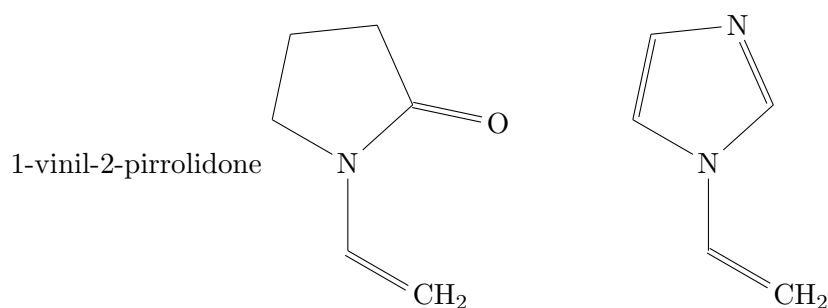
In tabella viene valutato solo il contenuto in rame, ma tale principio risulta valido anche per tutti gli altri metalli. Osservando la tabella sembrerebbe che ogni tipo di demetallizzazione sia quasi o del tutto inutile in quanto la fermentazione fa da sé nei confronti di questi cationi dannosi, ma con questa tesi e soprattutto nei paragrafi successivi si vuole dimostrare che l'effetto negativo dei metalli non si ha sul vino, o meglio non sia tanto preoccupante su vino quanto su mosto.

La demetallizzazione infatti non deve avere uno scopo curativo o legislativo ma preventivo per evitare che rechi danni sugli aromi e sulla qualità tanto ricercate dai produttori. In questo contesto anche i più piccoli aspetti che potrebbero apparire insignificanti non vanno trascurati.

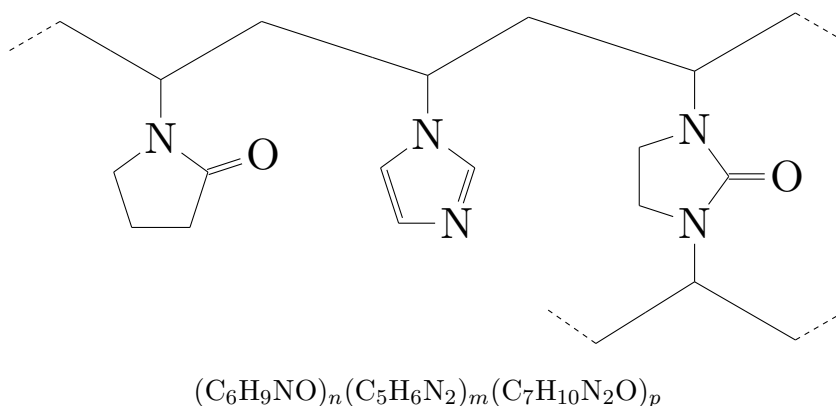
Capitolo 6

Molecola PVI – PVP: aspetti chimici

La molecola PVI-PVP è una molecola unica che comprende il PVI (Polivinilimidazolo) e PVP (polivinilpirolidone) sintetizzata e poi utilizzata come copolimero adsorbente. Le due molecole principali utilizzate per la formazione del copolimero sono l’N-vinilimidazolo (N. CAS 1072 – 63 – 5) e del N-vinil-2-pirolidone (N. CAS 88 – 12 – 0).



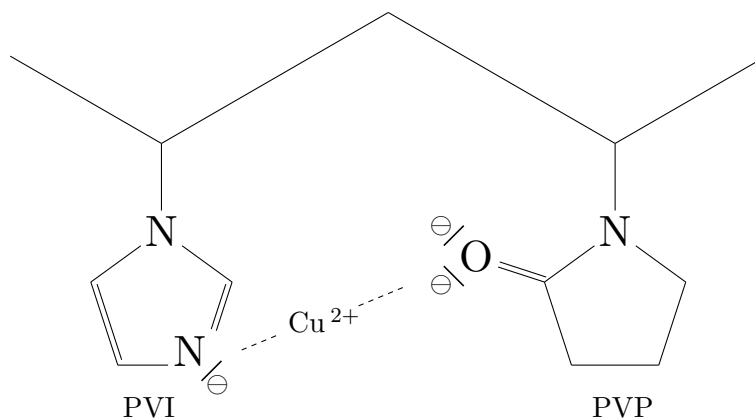
Tale molecola è stata inserita nel Codex enologico internazionale il 14 novembre 2014.



Questa molecola è insolubile in acqua e in quasi tutti i solventi in commercio ed è leggermente igroscopica. E’quindi impossibile misurarne il peso molecolare. Si trova sotto forma di polvere, di colore dal bianco al giallastro. Si produce attraverso polimerizzazione di tipo “popcorn” del N-vinilimidazolo e del N-vinil-2-pirolidone con un rapporto di 9:1.

Questo tipo di polimerizzazione ci permette di ottenere una forma sferica e dall’aspetto vetrificato con una superficie di contatto elevata, simile appunto ad un popcorn.

Nella molecola PVI-PVP precisamente ci sono 3 monomeri con rapporti differenti. La presenza di una grande quantità di gruppi funzionali dell'Imidazolo permette alla molecola di chelare in modo selettivo i metalli.



Molecola PVI-PVP

La chelazione è una reazione chimica in cui solitamente un atomo metallico, comportandosi da acido di Lewis, viene legato da un reagente detto chelante tramite più di un legame coordinativo. La struttura del composto risultante costituisce un particolare complesso molto stabile che vede l'atomo centrale essere circondato a tenaglia dal chelante, come se fosse stretto tra le chele di un granchio (da cui il termine chelazione). In questo modo tra le molecole di PVP e quella di PVI viene chelato il metallo, la struttura poi precipita in maniera definitiva senza rilasciare di nuovo i metalli nel mosto col passare del tempo.

La molecola non risulta ad oggi dannosa per l'essere umano, nè rilascia elementi nel mosto dopo essersi sedimentata. Nonostante ciò il disciplinare prevede la filtrazione del prodotto alla fine del processo.

Capitolo 7

Effetti positivi derivanti dall'aggiunta di PVI – PVP

La molecola PVI-PVP viene utilizzata ed è efficace sulla rimozione dei metalli ed in particolare Cu, Fe, Pb, Cd, Al che sono spesso presenti in grandi quantità nei mosti/vini.

Per quanto riguarda il ferro il PVP-PVI è un giusto sostituto al ferrocianuro di potassio, molto utilizzato ancora in molte zone d'Italia anche con una difficile burocrazia nell'utilizzo di esso.

La molecola in questione ha effetti positivi sia che si utilizzi su vino finito che su mosto. Molti studi sono stati fatti però per preservare gli aromi tiolici del Sauvignon e quindi l'utilizzo del prodotto su mosto a inizio fermentazione alcolica.

- Produzione di vini aromaticamente più intensi e stabili e prevenzione dell'imbrunimento del colore grazie alla chelazione degli ioni responsabili dell'ossidazione nei vini bianchi e rosati.
- Prevenzione del pinking.

Per quanto riguarda la quantità di ioni metallo chelati, la molecola ha effetti maggiori su vino finito.

In un vino finito la molecola non aumenta il potenziale aromatico come quantità di molecole aromatiche all'interno ma è essenziale per aumentare la stabilità dei vini bianchi da invecchiamento.

Può capitare inoltre che la qualità aromatica e organolettica aumenti in quanto la rimozione della nota aromatica spesso copre e distrae facendo risultare il vino non armonico. Quello che più però ci interessa è l'aumento nella qualità organolettica del prodotto finito dopo un'aggiunta di PVP-PVI su mosto.

La molecola inoltre, come vedremo, non viene utilizzata solo per la rimozione dei metalli ma anche per aumentare la cosiddetta "shelf life" del vino e la stabilità del colore. Un altro effetto positivo non richiesto nell'utilizzo del prodotto, ma comunque apprezzabile, è la stabilità tartarica del prodotto.

Nell'istogramma di Fig. 7.1 si valuta i parametri di rame, ferro e alluminio dopo l'aggiunta di 25 g/hL o 50 g/hL di PVI-PVP su due campioni con aggiunte diverse di metalli.

Si nota che a parità di quantità di metalli presenti, maggiore è la quantità di PVI-PVP che viene utilizzato e maggiore è la quantità di metalli che si riducono.

Secondo degli studi effettuati da alcuni laboratori si nota che la percentuale di rimozione dei metalli è maggiore in vini bianchi rispetto a mosti e vini rossi.

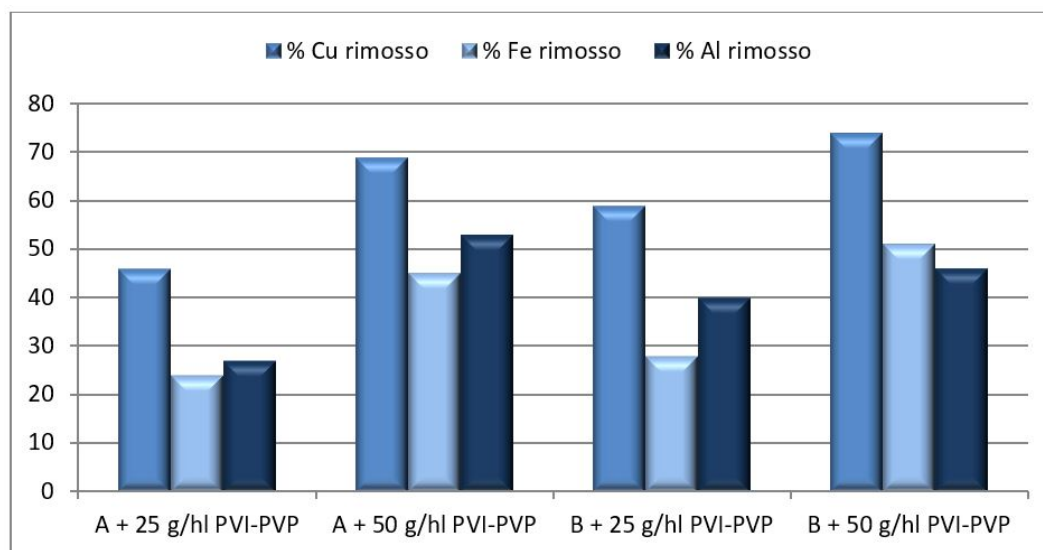


Figura 7.1: Rimozione in % dei vari elementi dopo il trattamento con PVI-PVP su due vini. A (campione con $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ di ferro e $0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ di rame), B (campione con $15 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ di ferro e $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ di rame).

Con questa tesi si vuole dimostrare però che gli effetti positivi maggiori si hanno con la demetallizzazione a livello di mosto per quanto riguarda l'aumento del potenziale aromatico.

7.1 Aumento del potenziale aromatico dopo l'utilizzo di PVI-PVP e glutazione in sinergia

L'efficacia della molecola PVI-PVP sta proprio nell'aumento del potenziale aromatico derivante dalla demetallizzazione preventiva su mosto.

L'analisi effettuata dall'università di Padova in un'esposizione di *Oenofrance* mette in luce la capacità che il lievito ha in assenza di metalli pesanti di molecole aromatiche definite "caratterizzanti".

I vini trattati infatti risultano più caratteristici e richiamano la tipicità varietale derivante dagli aromi varietali primari e secondari illustrati nella tabella seguente.

	Molecola aromatica	Sensazione aromatica	% plus/minus
1	1-esanolo	Fruttato/erbaceo	3,44%
2	4MMP	Frutta tropicale	100%
3	α -ianone	Floreale/rosa	100%
4	Benzil alcol	Frutta fresca/ciliegia	112,86%
5	Linalolo	Floreale	23,71%
6	α -terpineolo	Mughetto/gelsomino	251,39%
7	Citronellolo	Agrumato/limone	64,4%
8	Geraniolo	Rosa	-19,58%
9	Ottanoato di etile	Fruttato/vinoso	23,86%
10	Decanoato di etile	Uva	-8,73%

Tabella 7.1: Variazione in % positiva e negativa dei principali aromi contenuti nel campione analizzato prima e dopo il trattamento con PVI-PVP.

In Tab. 7.1 si nota come quasi tutte le molecole considerate sono anche molto maggiori sul campione trattato a differenza del campione standard. Le molecole tioliche tipiche del Sauvignon, come ad esempio 4MMP sul campione non trattato risulta ridotta a 0 in quanto precipitata in maniera completa ad opera degli ioni metallo.

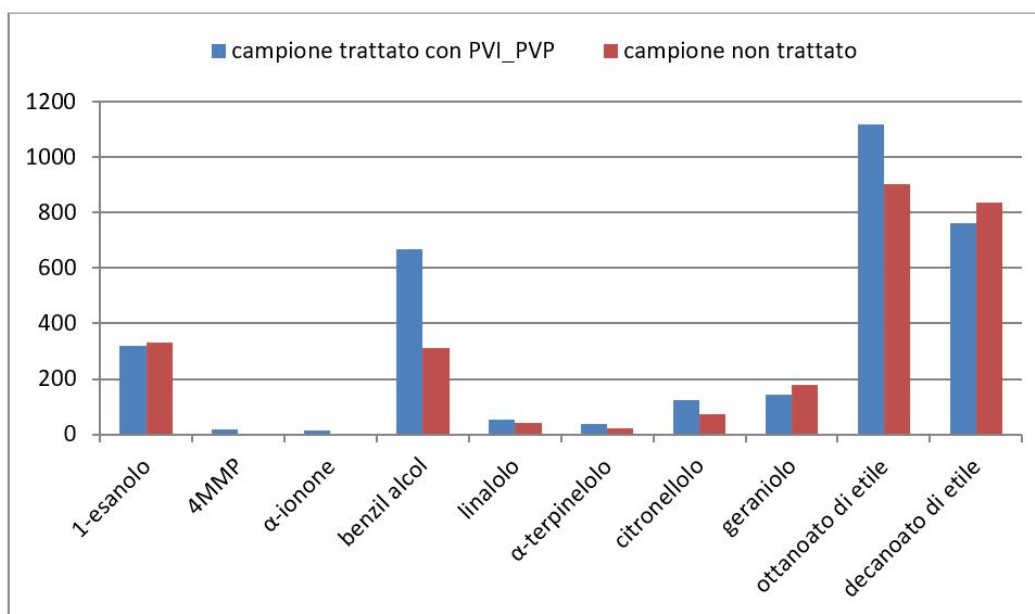


Figura 7.2: Variazione aromatica prima e dopo il trattamento.

Da una degustazione effettuata in un'azienda del Collio, si sono degustati due Sauvignon blanc per rendere in qualche modo pratico in ogni dettaglio il risultato della tesi.

I due campioni sono stati vinificati in maniera uguale e il lievito utilizzato è lo stesso. Su uno dei due campioni è stato effettuato un trattamento demetallizzante a livello di mosto prima della fase di vinificazione.

Inoltre risulta opportuno precisare che su entrambi i campioni è stata effettuata una breve macerazione e quindi la quantità di metalli presenti nei campioni poteva risultare

leggermente superiore rispetto alla media.

I risultati ottenuti purtroppo non sono stati quantificati e valutati in apposite tabelle di degustazione, ma risulta nel parere di tutti la spiccata e nitida aromaticità del Sauvignon trattato rispetto a quello non trattato.

I palati più fini percepivano una nota metallica che rendevano il vino in qualche modo non omogeneo e rotondo dal punto di vista aromatico. Il colore del vino risultava pressoché identico nei due campioni.

7.2 Altri aspetti positivi dopo l'aggiunta di PVI-PVP in sinergia

- Prevenzione intorbidimenti e precipitazioni.

Con la demetallizzazione sia a livello di vino che a livello di mosto, una riduzione dei metalli ci permette di prevenire casse rameica e ferrica che si possono verificare in bottiglia rovinando la presentazione del prodotto. Infatti sotto i $0,5 \text{ mg/L}$, sia per quanto riguarda il ferro che il rame, non si verificano intorbidimenti.

- Produzione di vini aromaticamente più intensi.
- Prevenzione dell'imbrunimento del colore.
- Prevenzione del pinking.

Questo fenomeno è caratterizzato da un cambiamento del colore dei vini bianchi verso le sfumature grigio-rosa. Può verificarsi durante una leggera ossidazione dopo qualche operazione di cantina come travaso o filtrazione.

Questo fenomeno può verificarsi anche a causa di un alto livello di metalli nel vino e una conseguente ossidazione a catena provocata da esso.

Spesso il pinking non è permanente ma dopo qualche mese in bottiglia tende a sparire. Con una demetallizzazione preventiva si può evitare facilmente tale fenomeno.

Bibliografia

- [1] *L'Enologo*, rivista dell'Associazione Enologi ed Enotecnici Italiani
- [2] *Trattato di enologia, volume I*, P. Ribereau-Gayon e altri, Edagricole
- [3] *Trattato di enologia, volume II*, P. Ribereau-Gayon e altri, Edagricole
- [4] *Enologia, con elementi di chimica viticolo enologica*, Giuseppe Sicheri, libreria universitaria edizioni
- [5] Appunti dei professori Fabro Roberto e Disnan Franco
- [6] *Garoglio*, Libro di enologia
- [7] Appunti del dott. Michele Bonelli
- [8] *Oenofrance: presentazione del prodotto Diwine*
- [9] Pubblicazione: *Metal reduction in wine using PVI-PVP copolymer and its effect on chemical and sensory characters.*, H. Mira, P. Leite, S.Catarino, J.M. Ricardo-Silva, A.S.Curvelo-Garcia
- [10] *La calamita naturale contro i metalli pesanti: nuovi mezzi biologici per l'elaborazione dei vini in modo naturale*, Qi trapping di redazione, Perdomini-IOC
- [11] *Rame e vino*, Erwin ECCLI, Armin KOBLEK, Centro di Sperimentazione agraria di Laimburg
- [12] *Impatto sconosciuto del rame sulla fermentazione alcolica e sulla qualità del vino*, Christopher Morge
- [13] Pubblicazione: *Enartis Pro FT e Pro XP*
- [14] Articolo: *Il criterio della sensibilità al rame di Celine Sparrow*, Sofralab
- [15] Cataloghi Martin Vialette
- [16] Cataloghi Oenofrance
- [17] Pubblicazione di David Lefebvre: *Gli effetti del rame e dei metalli pesanti*
- [18] *I microrganismi del vino*, Adriano Sofo, Università degli studi della Basilicata, Potenza
- [19] *Nuovi approcci per la produzione di Vinsanto e Vinsanto occhio di pernice del Chianti Classico*, Nicola Menditto

- [20] *Processi e fasi della vinificazione biologica*, Simoni e Corzani, AA.VV. Viticoltura ed enologia biologica, Edagricole, Bologna 2004
- [21] Catalogo Enartis: *Stabil PVI-PVP*
- [22] *Un nuovo prodotto ad azione demetallizzante: risultati di alcune prove applicative sperimentali*, F. Mattivi, G. Nicolini, G. Versini