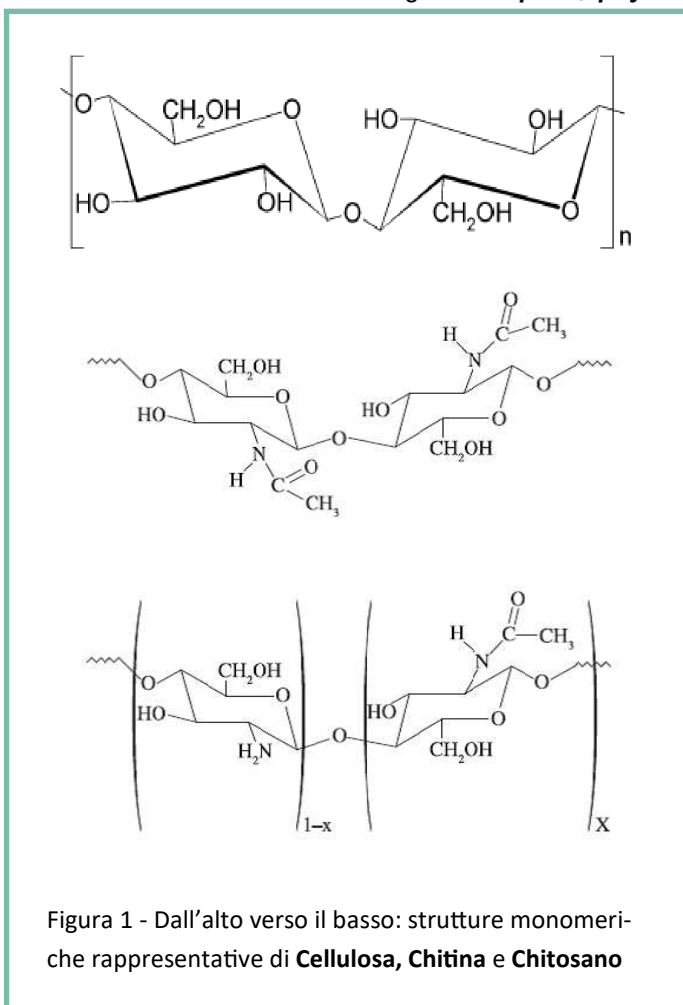


# IL CHITOSANO

## e le sue applicazioni nella stabilizzazione microbiologica dei mosti e dei vini

### Chitina e Chitosano: il punto sulle molecole, innanzitutto

La **Chitina** (Fig.1, al centro) è un polisaccaride che si caratterizza per la struttura fibrosa, è tipico dei **Funghi**, regno tassonomicamente considerato dai biologi a sé stante, un po' a cavallo tra mondo animale e mondo vegetale, al quale appartengono, fra gli altri, i **lieviti da vinificazione** ed è pure costituente dell'esoscheletro degli **Arthropoda**, phylum



al quale appartengono, fra gli altri, insetti e crostacei.

La sua costituzione strutturale è poco dissimile da quella della cellulosa (Fig.1, in alto), altro polisaccaride diffusissimo in natura, principale costituente delle pareti cellulari vegetali, presentando la medesima tipologia di legame (1-4- $\beta$ -glucosidico), ma un gruppo ossidrilico di ciascun monomero sostituito da un **radicale acetilamminico**.

Il Chitosano, dal punto di vista chimico, può essere considerato un polisaccaride derivato dalla Chitina per deacetilazione più o meno spinta della posizione C2 dell'anello di glucosio costituente monomero della catena. Allorquando, a seguito ad esempio ad una reazione di idrolisi alcalina in soluzione concentrata ad alta temperatura si riducono al 30 - 40 % i gruppi acetilati, il co-polimero risultante, chimicamente (1-4)-2-ammino-2-desossi- $\beta$ -D-glucano e (1-4)-2-acetilamide-2-desossi- $\beta$ -D-glucano - Figura 1 in basso, viene appunto definito Chitosano.

Data la sua origine e natura il Chitosano è caratterizzabile fondamentalmente in base alla massa molecolare caratteristica, ed al grado di acetilazione.

La monografia OIV COEI-1-CHITOS:2009 relativa al prodotto, inserito nel Codex enologico dalla risoluzione OIV/OENO 368/2009, lo identifica precisamente mediante il numero **CAS 9012-76-4**: quindi come un polisaccaride costituito da una associazione di unità di tipo glucosamminico (deacetilate) ed altre di tipo N-acetil-D-

### Il numero CAS

Il **CAS** (acronimo per **Chemical Abstract Service**) è una divisione della **American Chemical Society** che si occupa di assegnare un numero identificativo ad ogni sostanza chimica descritta in letteratura; più di 60 milioni di composti chimici sono stati fino ad oggi classificati, e parecchie migliaia di nuovi vengono aggiunti al database **CAS** ogni giorno. Questo servizio consente di poter identificare, su elenchi cartacei o tramite Internet, in maniera rapida ed univoca, qualsiasi composto chimico classificato **CAS**. Volete, per curiosità, scoprire a quale sostanza corrisponde il **CAS 7732-18-5**? Provate a avviare una ricerca su Internet utilizzando un qualsiasi motore di ricerca.

glucosaminico (le acetilate), collegate tra loro da legami di tipo  $\beta$ -1-4.

Sempre il dispositivo OIV prescrive che il Chitosano ad uso enologico sia **di origine esclusivamente fungina** di tipo alimentare o da sorgenti quali *Agaricus bisporus* od *Aspergillus niger*, derivi dall'idrolisi di un estratto ricco in chitina, sia caratterizzato da una purezza uguale o superiore al 95%, e possieda una **viscosità** - in soluzione all'1% in acido acetico 1% - che sia **< 15 cPs**. Tale dato discrimina con adeguata precisione la massa molecolare che deve essere propria del Chitosano ad uso enologico.

Normalmente infatti il Chitosano è disponibile sul mercato con un grado di acetilazione < 15% ed in svariate taglie molecolari: se ne distinguono solitamente tra i 100 ed i 1000 kDa e, nonostante non ci sia uno standard specifico, è normalmente accettato considerarlo a "bassa massa molecolare" se essa è < 50 kDa, a "massa molecolare media" se questa è compresa tra 50 e 150 kDa, e ad "elevata" nel caso sia > 150 kDa. Nella selezione del prodotto per uso enologico vanno pertanto accuratamente scelte sia l'origine che la taglia molecolare, in modo da rientrare nelle specifiche fissate dall'OIV.

Sempre in ambito OIV risulta anche descritto (scheda monografica COEI-1-CHITGL:2009) l'affine **copolimero naturale Chitina-glucano**. Risulta essere il costituente principale delle pareti cellulari di *Aspergillus niger* dal micelio del quale viene estratto ed ottenuto dopo purificazione. E' costituito da **Chitina** e da **1,3- $\beta$ -glucano** (l'unità monomerica del quale è costituita dal D-glucosio). I due polimeri sono legati da interazioni di tipo covalente, a formare un complesso tridimensionalmente strutturato. La proporzione Chitina/Glucano può variare nell'intervallo 25:75 - 60:40 (m/m). Ne è previsto principalmente l'utilizzo come agente di collaggio per mosti e vini (dal *débourbage* alle chiarifiche in fase post-fermentativa); presenta poi analogamente al Chitosano, interessanti potenzialità chelanti nei confronti degli ioni metallici.

## Le caratteristiche del polimero ed i modelli d'azione antimicrobica proposti

Il Chitosano chimicamente si comporta come una base debole, insolubile in acqua; la sua solubilità aumenta in soluzioni acquose acide diluite. La paternità della sua scoperta è generalmente attribuita al fisiologo francese Charles Rouget che nel 1859 per primo lo ottenne dalla Chitina per deacetilazione parziale a caldo in presenza di una base forte, e lo riconobbe diverso dalla Chitina proprio per la sua caratteristica solubilità.

Dall'inizio del '900 furono evidenziate le proprietà antimicrobiche del Chitosano, che forniscono una efficiente forma di difesa ai funghi ed agli animali che se ne rivestono. Qualche dato più preciso riguardo alla sua struttura cominciò ad emergere attorno al 1950, grazie a studi condotti con metodologie a raggi X, spettroscopia nell'infrarosso ed analisi di tipo enzimatico. Attorno al 1960 furono notate le sue proprietà emostatiche legate alla sua capacità di legarsi con i globuli rossi del sangue; in ogni caso, per lungo tempo il suo utiliz-

zo più comune era legato all'attività di depurazione delle acque reflue, dalla superficie delle quali è in grado di adsorbire grassi, olii ed inquinanti metallici grazie anche alle sue proprietà chelanti. Questo polimero ha pertanto attratto l'attenzione della scienza, data anche la sua abbondanza in natura, e le sue peculiari caratteristiche tra le quali la sua non-tossicità nei confronti dei vertebrati e la sua biodegradabilità. Verso la fine degli anni '70 del secolo scorso un'approfondita e sistematica valutazione delle potenziali fonti naturali di Chitina e Chitosano ha individuato come sorgenti primarie i sottoprodotti della lavorazione dei crostacei, assieme - ma in misura minore - a ceppi fungini da coltivazioni intensive; queste osservazioni mantengono la loro validità ancora ai giorni nostri.

In anni più recenti si è iniziato ad approfondire la ricerca sulle interessantissime e già in parte intuite proprietà **antimicrobiche**, **battericide** (in grado cioè di uccidere forme batteriche viventi) e **batteriostatiche** (capacità di inibirne lo sviluppo al di là della soppressione o meno della loro vitalità) e si è cercato di fornire alle stesse una spiegazione scientifica. Al momento è stato possibile formulare alcune ipotesi, e la ricerca si è mossa a questo riguardo attorno a tre linee fondamentali.

1 - Una prima ipotesi - ed è probabilmente quella maggiormente supportata da evidenze - chiama in causa l'interazione fra la carica positiva delle molecole di

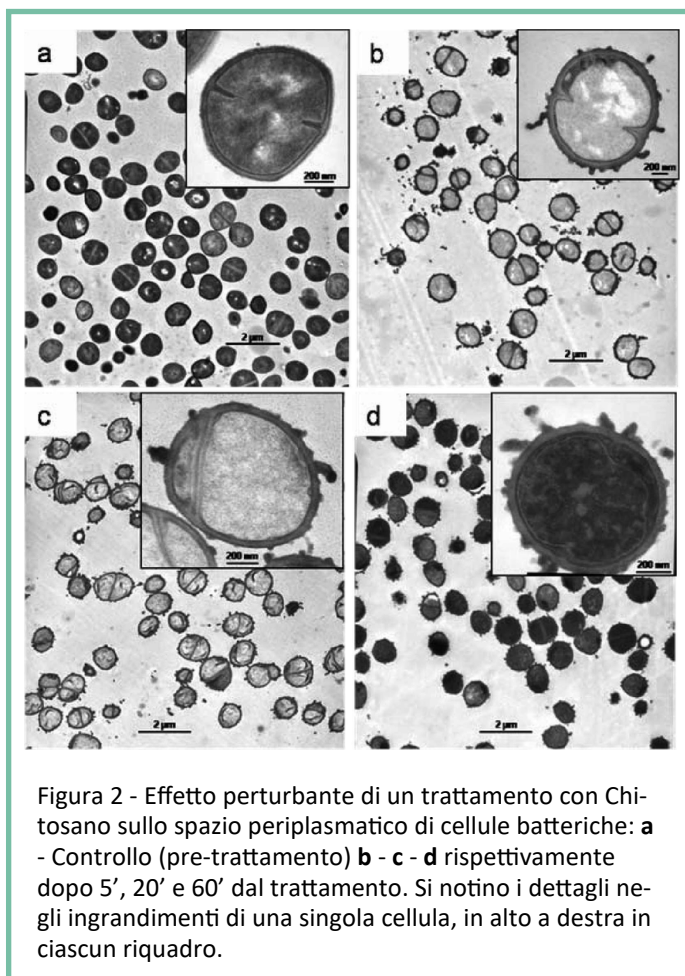


Figura 2 - Effetto perturbante di un trattamento con Chitosano sullo spazio periplasmatico di cellule batteriche: a - Controllo (pre-trattamento) b - c - d rispettivamente dopo 5', 20' e 60' dal trattamento. Si notino i dettagli negli ingrandimenti di una singola cellula, in alto a destra in ciascun riquadro.

Chitina e Chitosano e le membrane cellulari delle specie batteriche, cariche invece negativamente (vedi Fig. 2). L'appena descritta interazione elettrostatica potrebbe causare da un lato squilibri a livello della membrana microbica, e conseguenti sbilanciamenti a livello dell'equilibrio osmotico interno delle cellule dei batteri.

Si potrebbero inoltre determinare idrolisi di alcuni peptidoglicani parietali con perdite di elettroliti come il  $K^+$  ed altri elementi di ridotto peso molecolare interni alla cellula, quali proteine di piccola taglia, acidi nucleici, glucosio e componenti enzimatiche. Inoltre si sono avute conferme visive dirette di fenomeni di lisi delle membrane batteriche, sia in specie GRAM + che GRAM - a seguito di trattamenti con Chitosano a differenti dosi ed in varie situazioni.

2 - Una seconda ipotesi, che presuppone la possibilità di penetrazione del Chitosano - od almeno di suoi oligomeri di minor taglia - all'interno del protoplasma cellulare, legherebbe la sua attività antimicrobica al danneggiamento del DNA batterico ed alla conseguente inibizione delle funzionalità del mRNA.

Ed effettivamente alcune osservazioni realizzate mediante CLSM (microscopia confocale a scansione laser) sono state in grado di evidenziare la presenza di oligomeri del Chitosano all'interno di cellule batteriche.

Si tenderebbe tuttavia a considerare questo tipo di azione come secondaria, considerando prevalente l'attività di danneggiamento delle membrane cellulari dall'esterno.

3 - Un terzo possibile meccanismo di soppressione dell'attività microbica sarebbe poi legato al già ben noto potere chelante ed adsorbente storicamente ascrivito al Chitosano, che rende da un lato possibile l'abbattimento degli ioni metallici presenti nel mezzo trattato (vedi Fig. 3), azione che potrebbe privare le popolazioni indesiderate di oli-

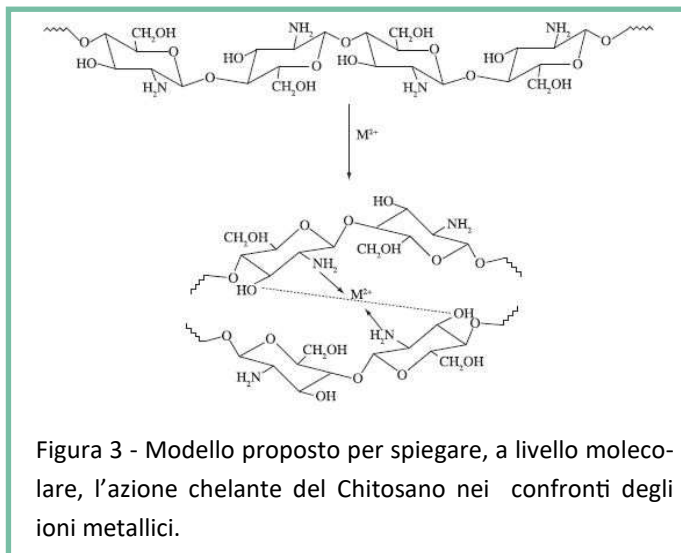


Figura 3 - Modello proposto per spiegare, a livello molecolare, l'azione chelante del Chitosano nei confronti degli ioni metallici.

goelementi essenziali al loro sviluppo, d'altro canto pare anche ipotizzabile una contestuale azione di cattura ed eliminazione dal substrato delle spore eventualmente presenti nella matrice da decontaminare.

### Ulteriori aspetti particolari relativi all'attività di biocontrollo del Chitosano

Svariate ricerche hanno poi mostrato che l'attività di biocontrollo espletata dal Chitosano è legata in maniera significativa alla massa molecolare ed al grado di acetilazione. Entrambi i parametri appena ricordati appaiono in grado di influenzarne, indipendentemente l'uno dall'altro, l'attività antimicrobica, anche se sembra provato che il ruolo della massa molecolare sia più rilevante, dal punto di vista dell'efficacia, rispetto a quello del grado di acetilazione.

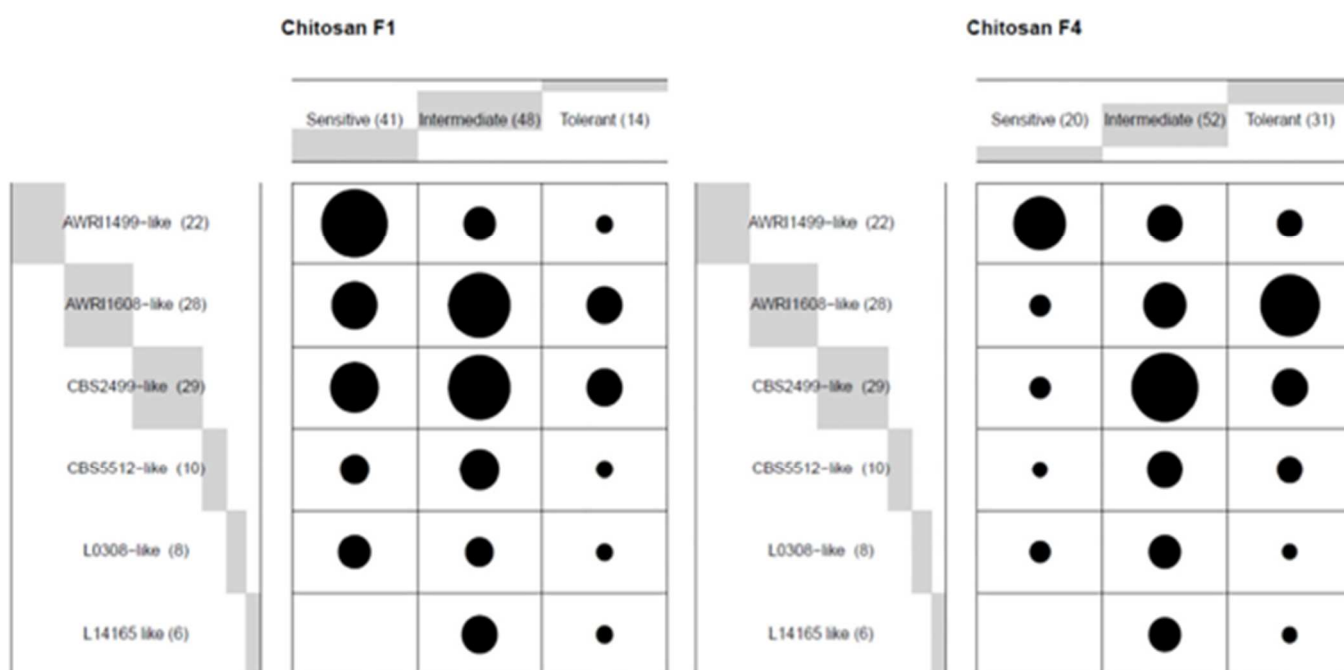


Figura 4 - Distribuzione della sensibilità a due differenti forme di Chitosano utilizzate in un test che ha preso in considerazione 53 differenti ceppi di *B. Bruxellensis*.

Ed in effetti, come razionalmente deducibile dai modelli proposti per spiegare l'azione inibente la crescita e la moltiplicazione dei microrganismi del Chitosano, la stessa risulta maggiore al diminuire della massa molecolare, ed in effetti si può ragionevolmente assumere che gli oligomeri presentino mobilità e capacità di stretta adesione alle strutture cellulari esterne più spiccate rispetto a polimeri di maggiori dimensioni ed ingombro.

In maniera analoga, ma con differente intensità, l'efficacia del Chitosano tende a crescere con il decrescere del grado di acetilazione: ed effettivamente i gruppi amminici deacetilati sono considerati, per eccellenza, i loci responsabili dello sviluppo delle cariche alle quali è collegabile la solubilità e l'attività del polimero; ad un ridotto grado di acetilazione corrisponderebbe quindi una più spiccata azione antimicrobica, legata alla maggior frequenza dei gruppi amminici liberi presenti sulle catene.

Un recentissimo studio coordinato da BioLaffort è stato condotto mettendo a confronto due lotti di Chitosano (denominati rispettivamente F1 ed F4), entrambi di origine fungina, ed aventi caratteristiche differenti principalmente

sotto il profilo della viscosità in soluzione, parametro - come si è visto - definito determinante per la conformità del prodotto alle specifiche OIV. Da quanto sintetizzato in Fig. 4 (pagina precedente, in basso), si è potuto dimostrare come l'efficacia del Chitosano F1 - peraltro pienamente conforme al Codex OIV - si sia dimostrata superiore a quella del prodotto F4 che presentava in particolare una viscosità superiore ai parametri fissati. (Tab. 1 qui sotto).

Ciò ad ulteriore riprova dell'importanza della selezione, fra le differenti fonti di materia prima disponibili sul mercato, di quelle dotate delle caratteristiche più idonee in vista delle applicazioni cui saranno destinate.

Fungal chitosan	Viscosity (cPo)	M <sub>w</sub> (kDa)	DA (%)
F1	4	32	9.6
F4	113	400	15.8

Tabella 1 - Viscosità, massa molecolare e grado di acetilazione dei chitosani di origine fungina testati nella sperimentazione citata.

# FLORACONTROL

## PER LA STABILIZZAZIONE MICROBIOLOGICA DEI MOSTI E DEI VINI

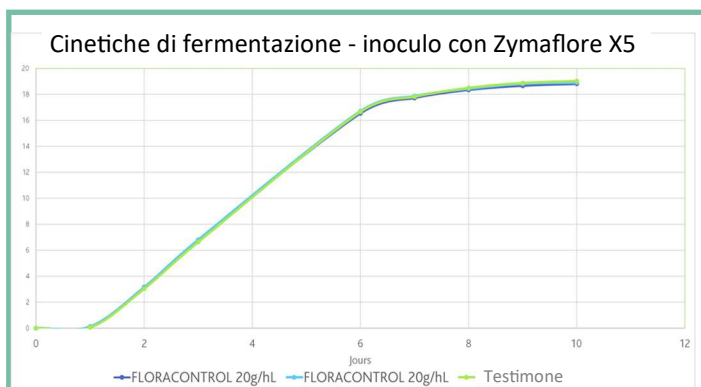
Prodotto a base di CHITOSANO di origine fungina da *Aspergillus niger*,  
e lieviti inattivati

Il formulato, messo a punto sulla scorta delle conoscenze scientifiche e del *savoir faire enologico* di Laffort, consente di pervenire, globalmente, nelle masse, ad un maggiore controllo dei microrganismi indesiderati e conseguentemente di lottare contro le alterazioni da questi indotte.

Esplica inoltre un trattamento di micro-chiarifica agevolando una positiva evoluzione ed affinamento dei vini.

Può essere applicato sia sui mosti che sui vini: sui mosti ad una dose di 10–20 g/hL permette di eliminare i microrganismi inquinanti e condurre fermentazioni contraddistinte da una maggiore pulizia, con risultati caratterizzati da una miglior franchezza.

Non interferisce negativamente con lo svolgimento della fermentazione alcolica in seguito ad un corretto inoculo di lievito selezionato.



Sui vini si consiglia di addizionarlo dopo il completamento di tutte le fasi fermentative. Deve essere aggiunto anche in questo caso ad una dose compresa tra 10 e 30 g/hL a seconda della tipologia di vino e della carica microbica globalmente presente. E' necessario prevedere un tempo di contatto con il vino di almeno 15 giorni, ma nulla vieta che resti a contatto con la massa anche diversi mesi prima del travaso, senza dimenticare che quest'ultimo è uno strumento molto importante nella gestione e controllo microbiologico (vedi anche al riguardo i Laffort-Info n° 27 e 51).

Per ottenere la massima efficacia, al momento dell'aggiunta, sia a mosto che a vino, va garantita la migliore omogeneizzazione possibile del prodotto a tutta la massa.

Data la sua composizione può essere applicato senza problemi nei protocolli di vinificazione in regime biologico (fare comunque sempre preventivamente riferimento all'Organismo di controllo competente).

Si rivela particolarmente adatto all'integrazione in protocolli di vinificazione a ridotto o minimo impiego di anidride solforosa.

E' inoltre esente da composti ritenuti ad oggi di tipo allergenico.

