



ASSOENOLOGI
IL VINO PER CULTURA E PROFESSIONE

Assoenologi Giovani – Ottobre 2019

Tema del mese

CHITINA, CHITOSANO E CHITIN-GLUCANO

*La chitina è il biopolimero più abbondante sulla Terra dopo la cellulosa: si trova nei funghi e nelle alghe, negli insetti e nei crostacei, nei molluschi ed anche in alcuni fossili. I derivati della chitina, che sono i chitosani e i chitina-gluconi, sono già utilizzati da parecchi anni in vari settori quali l'agricoltura, il trattamento delle acque, la cosmetica, l'alimentazione ed anche il medicale. In enologia, sono state autorizzate unicamente le forme derivate da funghi (*A. niger*) e sono proibite tutte le fonti d'origine animale.*

CHITINA: Composizione

Dal punto di vista chimico si tratta di un polisaccaride, costituito da più unità di N-acetilglucosamina (N-acetil-D-glucos-2-ammina) legate tra di loro con un legame di tipo β -1,4, lo stesso delle unità di glucosio che formano la cellulosa. Pertanto, la chitina può essere considerata come una cellulosa nella quale al gruppo di idrossile su ogni monomero sia stato sostituito un gruppo di **acetilammina**. La chitina è inoltre il componente principale della parete cellulare dei **funghi**.



ASOENOLOGI
IL VINO PER CULTURA E PROFESSIONE

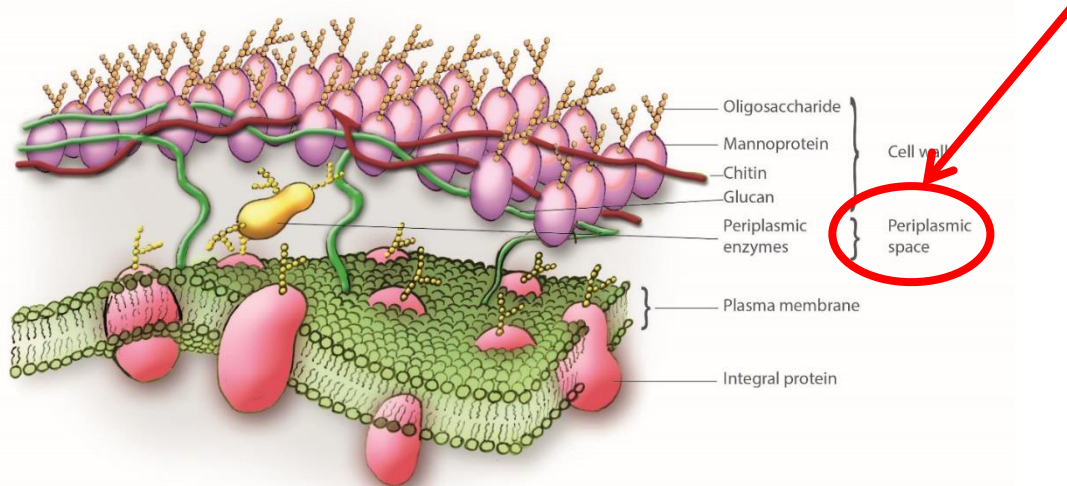
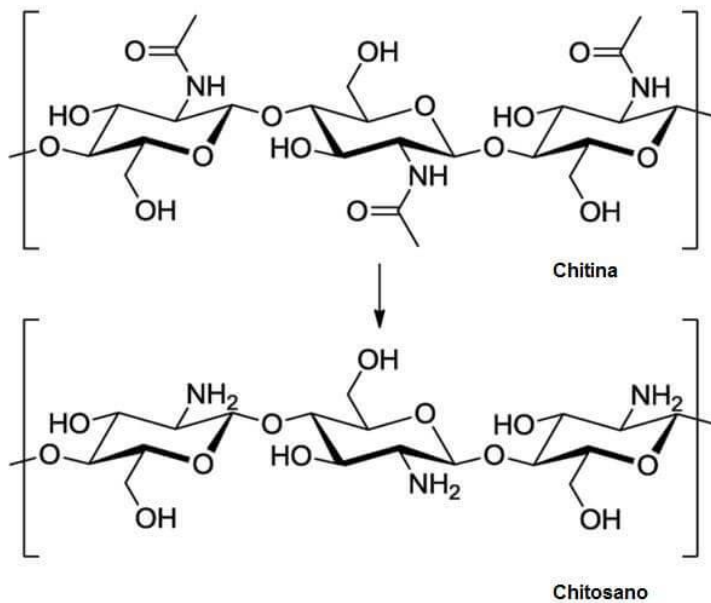


Fig.1: Parete cellulare del lievito

Nelle pareti dei funghi, oltre alla chitina, si trova il **chitosano**, completamente deacilato (viene tolto l'unità di acido acetico) sul gruppo amminico dell'N-acetilglucosammina, che, invece, nei funghi può essere più o meno acilata sul gruppo. Spesso nei funghi essa è associata a polisaccaridi beta-glucani legati a proteine a formare una matrice polisaccaridica a volte stratificata. Nelle **pareti di lieviti**, facenti sempre parte del regno dei funghi, la **chitina pura si riscontra raramente**. I legami a idrogeno tra polimeri adiacenti garantiscono alla sostanza una notevole durezza. Tale caratteristica, unita alla sua flessibilità e al fatto che è degradabile dagli enzimi endogeni, fa della chitina un ottimo materiale resistente. La chitina ha anche l'insolita proprietà di accelerare la guarigione delle ferite negli esseri umani, strettamente correlata al **chitosano (un derivato della chitina più idrosolubile)** ed al sistema immunitario di piante ed animali.



ASOENOLOGI
IL VINO PER CULTURA E PROFESSIONE



Esempio di reazione:

Prima si estrae la chitina dal fungo tramite idrolisi in mezzo acquoso, poi si purifica tramite dei lavaggi e si eliminano i lipidi e dopo si esegue l'essiccamento. A questo punto in ambiente alcalino e ad elevate temperature si ottiene il chitosano dalla chitina. Da questo processo si ottiene un estratto, purificato (deacetilazione della chitina per idrolisi dei gruppi N-acetile) e preparato in polvere dalla ditta KitoZyme SA.

CHITINA - GLUCANO

La chitina-glucano (Figura 2) è un copolimero costituito da polisaccaridi di chitina e beta (1-3)-glucano. Essa si estrae dal micelio fungineo di *Aspergillus Niger* mediante digestione in mezzo acquoso e l'essiccamento. Il processo è stato brevettato da KitoZyme nel 2003. La chitina-glucano è quindi il precursore del chitosano.



ASOENOLOGI
IL VINO PER CULTURA E PROFESSIONE

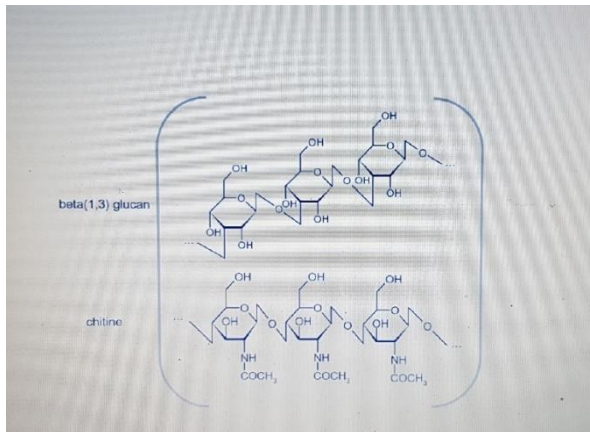
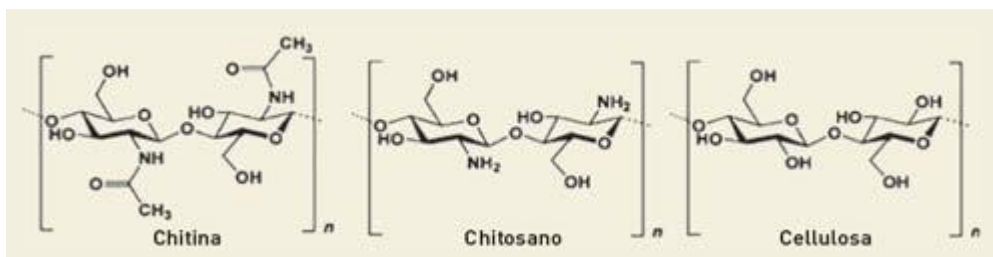


Fig.2: chitina-glucano

CHITOSANO: Composizione

Il chitosano è un polisaccaride lineare composto da D-glucosamina (che può essere >90%, tra il 90-80% e sotto l'80%) e N-acetil-D-glucosamina, legate tramite legami $\beta(1-4)$. Esso è stato scoperto per la prima volta nel 1859 da Rouget trattando la chitina con KOH. Il chitosano si forma trattando la chitina, generalmente ottenuta dall'esoscheletro di crostacei (granchi, gamberi, ecc.) con soluzione acquosa basica.

È questa modifica funzionale (sostituzione di -OH con -NH₂) che conferisce ai derivati di chitina le loro proprietà uniche e ne permette l'utilizzo in diversi ambiti dell'enologia. Troviamo quindi il chitosano in applicazioni quali la flottazione, come alternativa ai mezzi di solito usati contro i fenomeni di ossidazione (caseina, PVPP, ...) o come strumento biologico per bloccare la proliferazione di *Brettanomyces*.





ASOENOLOGI
IL VINO PER CULTURA E PROFESSIONE

Fig. 3 – Analogia di struttura tra chitina, chitosano e cellulosa. Lo scheletro poli (1->4) glucopiranosico è comune per le 3 molecole. D'altra parte, la bibliografia fornisce utili ragguagli sulle proprietà chelanti dei derivati di chitina nei confronti dei metalli; tuttavia, molti esperimenti sono stati eseguiti in mezzo acquoso e pochi nel vino (soli, i lavori di Borneo riferiscono di prove su alcuni metalli).

PRINCIPALI APPLICAZIONI DEL CHITOSANO:

La **Chitina** e il **Chitosano** hanno caratteristiche proprie molto attraenti come: biocompatibilità, biodegradabilità, non tossicità, prevenzione delle infezioni, acceleranti nella guarigione di ferite. Questo ha fatto sì che si siano moltiplicate le ricerche e gli studi sulle possibili applicazioni di questi materiali.

Attualmente vengono utilizzati nei più disparati campi:

- 1) Chiarificazione delle acque contenenti proteine derivanti dalla lavorazione di frutta, carne, pesce e latte. Vengono utilizzati anche nell'industria delle bevande: questo è stato il maggiore e per lungo tempo l'unico utilizzo di questo polisaccaride. Il chitosano causa la flocculazione delle proteine. Essendo biodegradabile e non tossico è stato preferito ai polimeri sintetici.
- 2) Il chitosano è un agente chelante per i metalli. Poiché con un acido inorganico diluito è possibile rigenerarlo, il chitosano può essere utilizzato per purificare l'acqua da metalli pesanti. Le membrane fatte con chitosano possono essere utilizzate per addolcire l'acqua. Esso funziona perché si comporta da poliammina dove si formano legami di coordinazione tra il doppietto dell'N con i cationi metallici (Fe^{3+} , Cu^{2+} , Cadmio, Piombo, etc.). Esempio enologico è la Chelazione su mosto. Commercialmente si utilizza un prodotto contenente del chitosano e un derivato di lievito. Il mosto è stato volontariamente integrato con 5 mg/L di Fe (sotto forma di cloruro ferrico) e il collaggio è stato effettuato dopo l'aggiunta del preparato per la durata di una notte a 13° C. La riduzione di ferro in questo mosto depone a favore di una resistenza potenziale di quest'ultimo nei confronti dei fenomeni ossidativi.



ASOENOLOGI
IL VINO PER CULTURA E PROFESSIONE



Fig.4: Esempio di asportazione del ferro da parte dei derivati della chitina

Effetto decolorante dei derivati di chitina su mosto. 1 e 1bis sono i testimoni che non contengono il preparato, 2 contiene 50 g/hL e 3 e 3bis contengono 100 g/hL di questo prodotto. Così come viene riportato è la combinazione dei gruppi amminici (-NH₂) e idrossile (-OH) che rende conto di questa attività di chelazione. In altre parole, si può pensare che questa attività possa essere variabile in funzione del pH e della forza ionica dei vini.



ASOENOLOGI

IL VINO PER CULTURA E PROFESSIONE

Rif. Test	Qi-Trapping (g/hL)	Torbidità (NTU) dopo 15h	Abs 420nm	Abs 520nm	Fe (mg/L)
1	0	31,0	0,265	0,132	5,5
1 bis	0	29,3	0,267	0,133	5,6
2	50	7,5	0,159	0,087	2,2
3	100	13,8	0,143	0,084	1,6
3 bis	100	12,7	0,144	0,081	1,5

Tab. 1 - Effetto chiarificante e di chelazione del ferro di Qi-Trapping su un mosto di Pinot Nero.

Rif. Test	Qi-Trapping (g/hL)	Pb (µg/L)	Cd (µg/L)	Al (µg/L)
1	0	512	163	1576
2	50	93	150	1217
3	100	82	138	1041

Tab 2 - Effetto di un preparato a base di chitosano su alcuni metalli pesanti aggiunti in un vino bianco.

Rif. Test	Qi-Trapping (g/hL)	Fe iniziale (mg/L)	Fe finale (mg/L)
1	2x 50	21,6	4,3
2	2x 50	19,0	2,1
3	2x 30	10,0	2,7

Tab 3 - Effetto di 2 trattamenti successivi di Qi-Trapping sulla chelazione del ferro in 3 vini bianchi (pH vicino a 3,3).

- 1) Uno dei principali utilizzi del chitosano è basato sulla sua abilità di flocculare lipidi e proteine. Questa proprietà è dovuta al fatto che il pK dell'amminogruppo del residuo di glucosammina è circa 6.3 e, per questa ragione, il chitosano si comporta come un policatione in soluzioni acide (Muzzarelli R.A.A. 1985). In questo modo il chitosano forma complessi con molecole cariche negativamente presenti in soluzione od allo stato colloidale e ne induce la flocculazione (Shahidi F. et al. 1999).



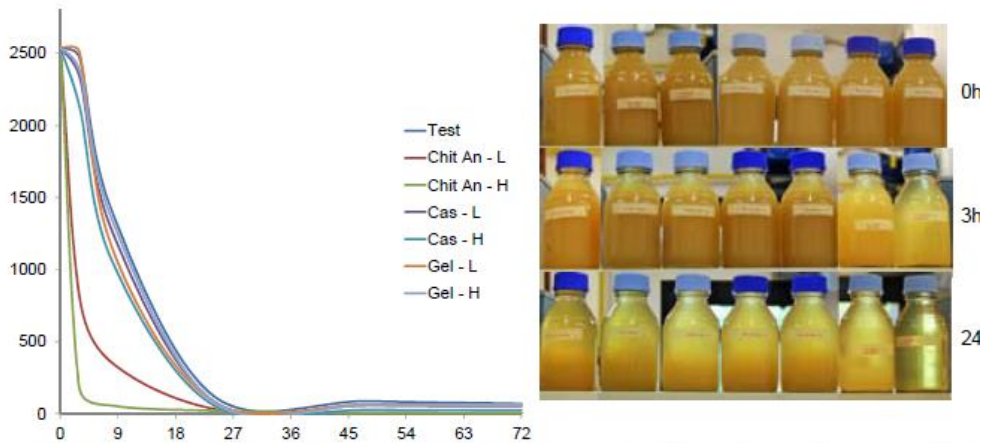
ASOENOLOGI

IL VINO PER CULTURA E PROFESSIONE

- 2) Nel settore alimentare, inoltre, questi biopolimeri ed i loro derivati sono stati studiati anche per tutta una serie di ulteriori attività che includono, tra le altre, anche quelle antimicrobiche e di agglutinazione dei microrganismi (Helander I.M. et al. 2001), quelle antiossidanti e quelle nutrizionali (Muzzarelli C. et al. 2003). Infine sono stati proposti anche altri impieghi di questi polisaccaridi per esempio per l'immobilizzazione di enzimi e di microrganismi (Juang R.S. et al. 2002).
- 3) Le possibili applicazioni della chitina e dei suoi derivati sono quindi molteplici includendo la bioconversione per la produzione di prodotti alimentari a valore aggiunto, la conservazione degli alimenti dal deterioramento microbico, la formazione di pellicole biodegradabili, il recupero di materiale di scarto da reflui, la purificazione dell'acqua e la chiarifica e deacidificazione dei succhi di frutta (Muzzarelli C. et al. 2003, Shahidi F. et al. 1999).
- 4) Reattività con i composti fenolici. Una applicazione di questi polisaccaridi è stata suggerita in tempi recenti in campo enologico (Spagna G. et al. 2001). In questo studio è stato dimostrato che il chitosano ha una grande affinità per i composti fenolici implicati nei fenomeni di imbrunimento dei vini bianchi e che il suo utilizzo, in termini di profilo di sedimentazione, sarebbe compatibile con le tecniche e gli impianti correntemente utilizzati nelle pratiche di vinificazione.



Torbidità iniziale di 2500 NTU



Il chitosano animale è stato messo a confronto con caseinato e gelatina, risultando più efficace e rapido. Dopo 48 h alla concentrazione di 10 g/hL il vino trattato ha terminato la chiarifica.

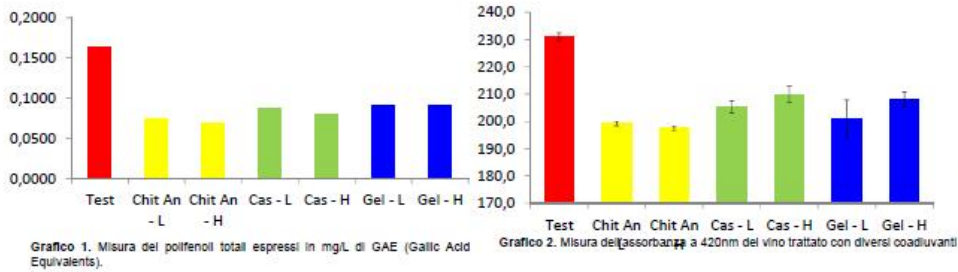
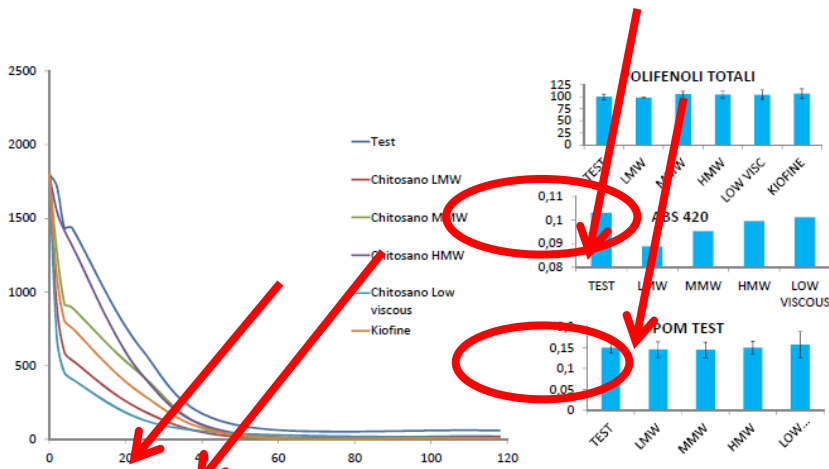


Grafico 1. Misura dei polifenoli totali espressi in mg/L di GAE (Gallic Acid Equivalents).

Grafico 2. Misura dell'assorbanza a 420nm del vino trattato con diversi coadiuvanti



La lunghezza della catena e il grado di deacetilazione possono influenzare le proprietà del chitosano. Qui sopra sono messi a confronto differenti tipologie di chitosano animale (5gr/hL). Il grado di deacetilazione (DDA%) assume valori variabili da campione a campione in media: il chitosano commerciale > 90%; MMW e LMW (> 80%), mentre HMW < 80%.



ASOENOLOGI

IL VINO PER CULTURA E PROFESSIONE

Dai dati emerge che il chitosano non sottrae in maniera significativa polifenoli e tannini ma interviene in maniera particolare sull'assorbanza 420 paragonabile al caseinato sui polimeri bruni. Quello più efficace è quello a basso peso molecolare (LMW) e a bassa viscosità (Low viscous) che sono quelli a maggior grado di deacetilazione.

- 5) Interessante è l'effetto del Chitosano su molti funghi come la Botrytis Cinerea e si è visto che è molto efficace a pH=6 e le forme di chitosano oligomere ad almeno 7 unità. Funziona come effetto sull'uva sia curativo che preventivo.
- 6) Valutando la struttura del chitosano si potrebbe ipotizzare l'utilizzo del chitosano quale stabilizzatore delle caratteristiche del vino bianco ma i possibili effetti di questi polisaccaridi potrebbero essere anche altri. Le proteine del succo d'uva hanno una notevole importanza tecnologica, soprattutto per gli effetti sulla stabilità e limpidezza del vino (Waters E.J. et al. 1991).
- 7) Ci sono dei progetti in atto dove ci si propone di studiare la possibilità di rimuovere, **tramite l'uso di chitina, parte delle proteine del vino bianco che**, stando alle indicazioni di letteratura, sono per lo più della famiglia delle **chitinasi** (Robinson S.P. et al. 1997) e quindi potenzialmente in grado di legarsi in modo specifico alla **chitina**. Si intendono inoltre analizzare anche gli effetti sulla microflora batterica dei vini bianchi verificando la possibilità che **chitina e chitosano sequestrino i batteri o chelino microelementi rendendo più difficile la proliferazione dei batteri responsabili della fermentazione malolattica che è un altro fattore di instabilità dei vini bianchi (Radler F. 1990). In questo senso il trattamento dei vini con chitosano potrebbe permettere di ridurre le concentrazioni di anidride solforosa normalmente utilizzate nella vinificazione.**

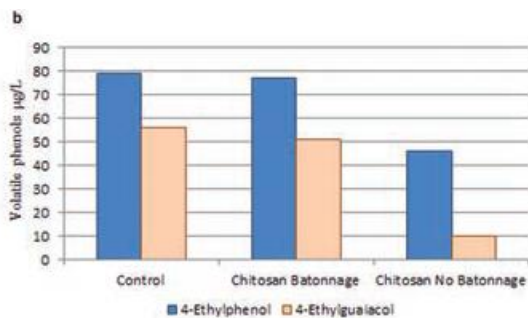
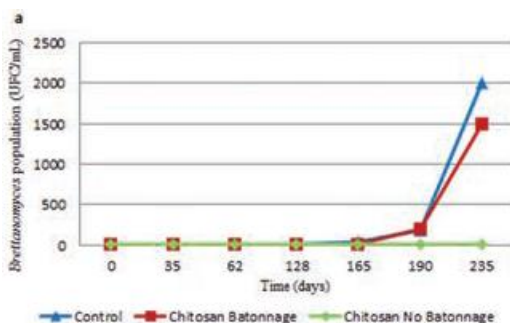
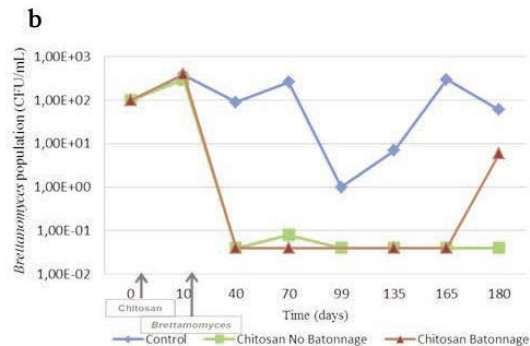
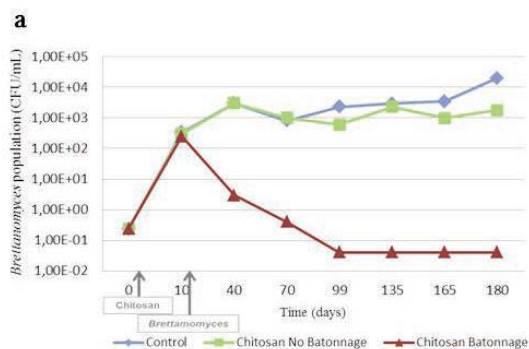
L'idea dei piani sperimentali futuri sarà quello di aggiungere diverse quote di **chitina e di chitosani diversamente deacetilati**. Si eseguiranno quindi prove rivolte all'indagine sulla stabilità dei campioni impiegando analisi quali l'heat test (Sarmento



M.R. et al. 1973.). Successivamente si valuteranno le modificazioni del contenuto polifenolico, verificando i dati di letteratura (Spagna et al. 1996), ma si approfondiranno anche le modificazioni indotte sul profilo degli acidi organici e delle proteine del vino sia sotto un profilo quantitativo tramite saggi colorimetrici che qualitativo con analisi cromatografiche ed elettroforetiche. Infine ci si propone di eseguire saggi sulle modificazioni delle attività microbiche relativamente ai batteri responsabili della fermentazione malolattica. In questo senso si provvederà sia a trattare con chitine e chitosano i vini verificando le modificazioni di carica batterica sia inoculando batteri lattici in vini trattati e non al fine di verificare l'effetto sulla proliferazione batterica della sottrazione di microelementi.

SPERIMENTAZIONE SUGLI EFFETTI MICROBICIDI DEL CHITOSANO

È stata provata una matrice di Chitosano prodotta dalla ditta Kitozyme (Herstal, Belgium) in polvere con delle particelle con diametro più piccolo di 50 µm estratte da *Aspergillus Niger*. Si è visto che la sua azione sul *Brettanomyces* è per contatto, infatti si è notato che, favorendo la risospensione del prodotto dove ci sono alte cariche di cellule, ne aumenta l'efficacia, se invece fosse bassa sembrerebbe che il prodotto, senza il ricorso del battonage, risulti essere più efficace.





Qual è il meccanismo di azione del chitosano? Ci sono varie ipotesi.

- A) Prima ipotesi: adsorbimento sulla parete cellulare e formazione di un composto che sedimenta. Esempio: $3,8 \cdot 10^6$ cellule/ml + chitosano (40g/hl) dopo $t = 8h$

- B) Effetto sul potenziale di membrana (differenza di pH tra interno ed esterno della cellula).

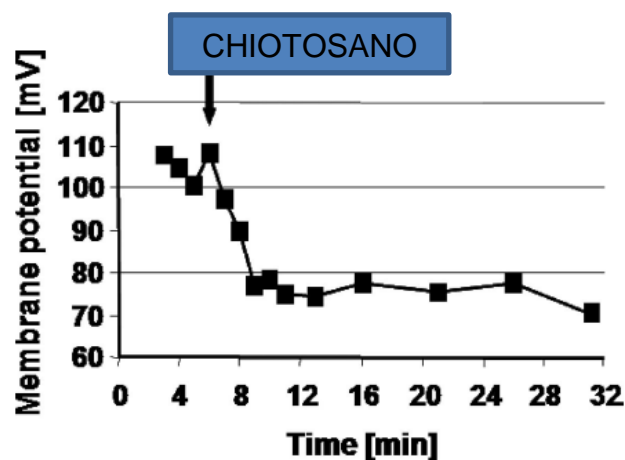
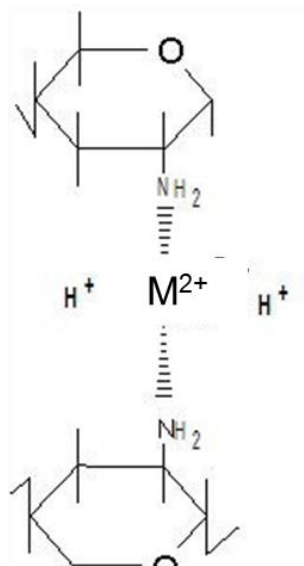


FIG. 3. Measurement of chitosan's ability to perturb the membrane potential ($\Delta\Psi$) using $[^3H]TPP^+$. Cells of *S. simulans* 22 in the late log



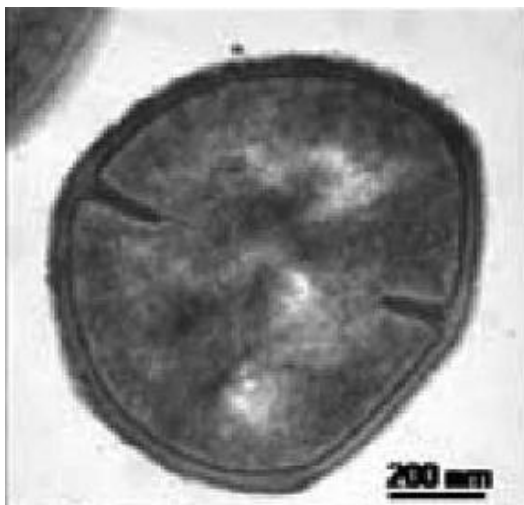
ASSENNOLOGI
IL VINO PER CULTURA E PROFESSIONE

C) Azione chelante sui metalli formando un complesso chimico che precipita

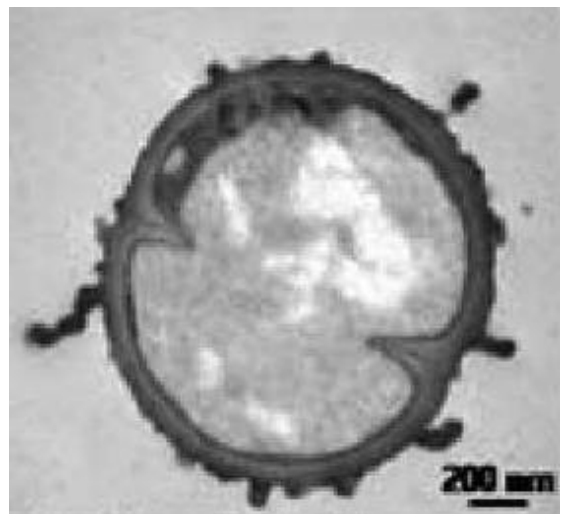


D) Perturbazione dello spazio periplasmatico

Chelation Reaction



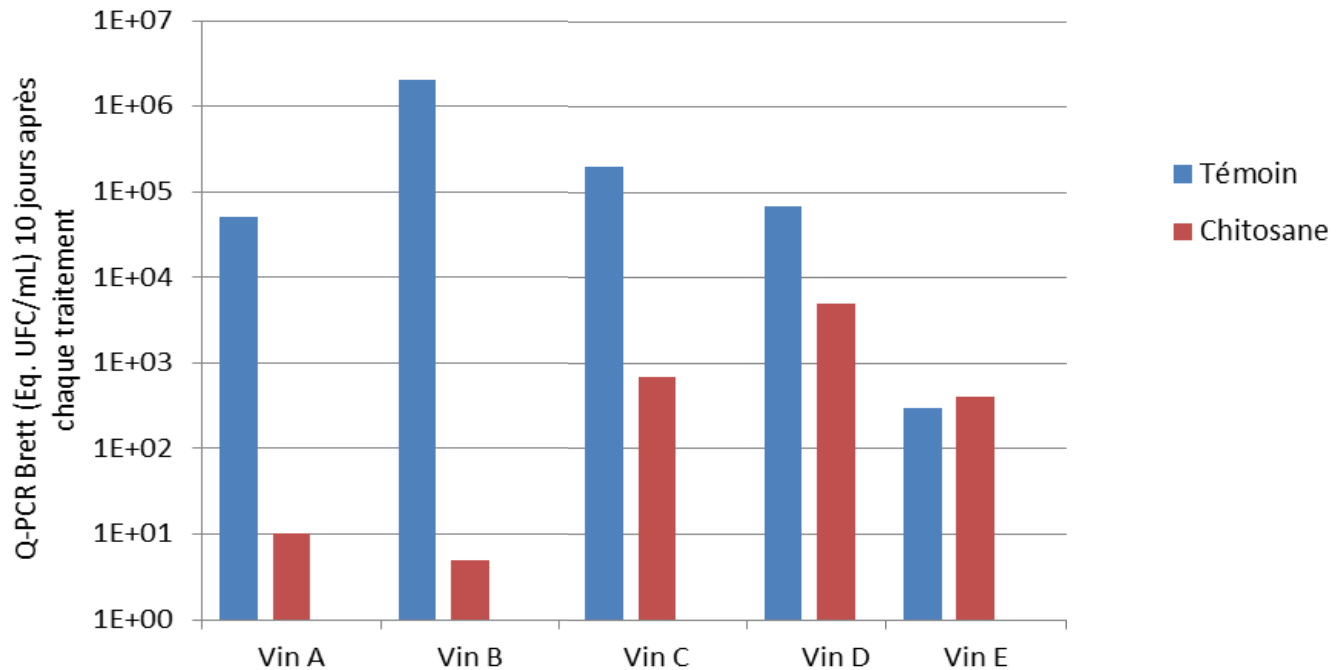
Prima



Dopo



Efficacia del Chitosano sul Brettanomyces



IN CONCLUSIONE

Ad oggi, il chitosano fungineo puro ed attivato sottostà a processi di idrolisi, purificazione ed attivazione e le rese medio basse implicano costi di processo importanti, di conseguenza il prezzo elevato del prodotto. Il suo meccanismo di azione è per contatto e quindi è più efficace su vini limpidi. Il chitosano puro è estremamente reattivo verso il Brettanomyces.

Sul mercato sono stati poi proposti dei preparati a base di chitosano attivato e una piccola parte di scorze di lievito ricche in chitina-glucano creati appositamente per trattare mosti e vini torbidi, dove la presenza di solidi limita l'effetto microcida del chitosano puro. In questo caso la minor purificazione e la presenza di chitina-glucano comportano costi di processo produttivo più contenuti che si trasformano successivamente in un prezzo più contenuto del prodotto. Queste tipo di formulazioni con l'azione congiunta di chitina-glucano e chitosano vengono proposte per l'abbattimento della carica dei batteri lattici ed ostacolare così lo sviluppo della fermentazione malolattica. Si dovranno attendere studi più approfonditi per valutare forme di chitosano (grado di idrolisi, peso molecolare, grado di acetilazione e grado di viscosità) che risultano essere più o meno specifiche verso ciascuna delle specie microbiche del vino.



ASOENOLOGI
IL VINO PER CULTURA E PROFESSIONE

Chitosano

Riflessione dal gruppo di legislazione:

La chitina è il biopolimero più abbondante sulla Terra dopo la cellulosa: si trova nei funghi e nelle alghe, negli insetti e nei crostacei, nei molluschi ed anche in alcuni fossili.

I derivati della chitina, che sono i chitosani e i chitina-glucani, sono già utilizzati da parecchi anni in vari settori quali l'agricoltura, il trattamento delle acque, la cosmetica, l'alimentazione ed anche il medicale. In enologia, sono state autorizzate unicamente le forme derivate da funghi (*A. niger*) e sono proibite tutte le fonti d'origine animale.

Il chitosano è un polisaccaride naturale, non tossico e biodegradabile, definito chimicamente come polimero lineare della D-glucosamina. Per essere utilizzato viene ottenuto industrialmente tramite trattamento alcalino ad elevate temperature, operazione che porta alla parziale deacetilazione della chitina. In commercio si trovano diversi tipi di chitosano che presentano grado di deacetilazione compreso tra 70% e 80%.

In enologia il chitosano è un chiarificante ad azione microcida ottenuto per deacetilazione della chitina-glucano, un polisaccaride estratto da *Aspergillus niger*. Il suo utilizzo è stato approvato dalla commissione OIV nel 2009 con la prassi enologiche il trattamento dei vini mediante chitosano di origine fungina. Le caratteristiche della molecola sono specificate nella monografia della stessa con la risoluzione OIV-OENO 368 del 3 luglio 2009. E' consentito solo l'impiego di chitosano di origine fungina perché il chitosano di origine animale potrebbe indurre fenomeni allergici a causa delle eventuali proteine residue potenzialmente rilasciabili nel vino (come la tropomiosina).

Con il regolamento (CE) 606/2009 sono stati specificati i settori di applicazione e le dosi di utilizzo in enologia del chitosano. Il regolamento di applicazione (UE) 315/2012 ha determinato principalmente l'origine del prodotto: il fungo *Aspergillus niger*.

Le indicazioni di utilizzo nel vino di chitosano alle quali attenersi sono le seguenti:

fino ad un massimo di 100 g/l per ridurre il tenore di metalli pesanti, in particolare ferro, piombo, cadmio e rame e prevenire la casse ferrica e rameica

fino ad un massimo di 500 g/hl per ridurre i contaminanti eventualmente presenti, in particolare l'ocratossina A.

fino ad un massimo di 10 g/hl per ridurre le popolazioni di microrganismi indesiderati, in particolare i *Brettanomyces*



ASOENOLOGI

IL VINO PER CULTURA E PROFESSIONE

I sedimenti del trattamento devono essere eliminati mediante processi fisici.

Nel mosto l'utilizzo di chitosano è stato approvato per facilitare la sfeccatura e la chiarifica ed effettuare eventualmente un trattamento preventivo delle casse proteiche.

Il regolamento delegato UE 2019/934 del 12 marzo 2019, che integra il regolamento UE 1308/2013 sui trattamenti enologici autorizzati nonché le condizioni e i limiti per il loro utilizzo, inserisce il chitosano tra i coadiuvanti tecnologici autorizzati come chiarificanti.

Il regolamento CE 1584/2018 a seguito della valutazione positiva del comitato tecnico europeo EGTOP (expertgroup for technical advice on organic production) tra le sostanze aggiunte nella lista allegato VIII bis degli additivi e coadiuvanti tecnologici ammesse per la vinificazione con metodo biologico inserisce:

chitosano derivato da *Aspergillus niger* per la chiarificazione (punto 10 dell'allegato I A del regolamento CE 606/2009)

Interessante anche l'utilizzo dei derivati della chitina in difesa della vite. In particolare il chitosano cloridrato è in grado di indurre una resistenza sistemica acquisita (SAR) nei confronti di alcune specie di insetti. Attualmente è stato inserito nell'elenco delle sostanze di base da utilizzare come stimolatore delle difese della piante (ai sensi del Reg. 1107/2009).



ASOENOLOGI
IL VINO PER CULTURA E PROFESSIONE

BIBLIOGRAFIA

1 G. Crini et al., 2009., Chitine et chitosane. Du biopolymère à l'application. Ed Presses Univ. Franche-Comté, pp 239.

2 N. Delavigne et al., 2014. Les dérivés de chitine comme nouvelle génération d'adjuvant de flottation. Revue des Œnologues, avril.

3 M. Cassien et al. Electron spin resonance and HPLC evidence for the metal ions inactivating properties of chitosan as a natural antioxidant in a model wine system. Accepted for IVAS 2015 (Trento, It.)

4 D. Ferreira et al., 2013. The antimicrobial action of chitosan against the wine spoilage yeast *Brettanomyces/Dekkera*. J. of Chitin and Chitosan Sci., 1, 1-16.

5 A. Bornet, 2006. Utilisation de nouveaux auxiliaires technologiques en œnologie, Ph.D. thesis., pp225.