

DOCUMENTO
TECNICO

Raffaele Guzzon
Giacomo Widmann
Daniela Bertoldi
Tiziana Nardin,
Roberto Larcher
Giorgio Nicolini

*Chimica Vitenologica
 & Agroalimentare,
 Centro Trasferimento Tecnologico,
 FEM - San Michele all'Adige (TN)*



*Da sinistra:
 R. Guzzon,
 G. Nicolini,
 T. Nardin,
 R. Larcher,
 D. Bertoldi*

MATERIALI INNOVATIVI PER LA PROTEZIONE DELLE BOTTI DALLE CONTAMINAZIONI MICROBICHE

La sanificazione chimico-fisica delle barriques appare sempre meno sostenibile. Il trattamento sperimentato sembra poter conferire al legno maggiore resistenza agli attacchi microbici senza pregiudizio delle caratteristiche utili alla maturazione del vino. I risultati di laboratorio sono incoraggianti e possono aprire la strada alla verifica della compatibilità con le bevande alcoliche e della applicabilità in scala di cantina.

Premessa

Le botti sono uno strumento enologico prezioso ma è noto che la porosità del legno può favorire la crescita di una complessa microflora, in grado di causare alterazioni dei vini. Le botti nuove sono normalmente prive di microrganismi alterativi ma, già dopo pochi mesi di utilizzo, la concentrazione di lieviti e batteri presenti sulla superficie interna di questi vasi vinari può superare le mille cellule per cm². I trattamenti

oggi disponibili per la pulizia e la sanificazione delle botti possono contenere questa crescita senza, tuttavia, fornire soluzioni “definitive” per le quali occorrerebbe “ripensare” in il materiale stesso con cui le botti sono fatte, cioè il legno.

Un utile contributo in questa direzione potrebbe venire dal trattamento del legno con composti a base di silice denominati alcossidi. Come hanno dimostrato applicazioni in campo elettronico, ottico ed edilizio, derivati or-

ganici della silice - sintetizzati mediante un processo chimico denominato *sol-gel* - sono utili per ottimizzare le proprietà superficiali di vari materiali. Nel caso del legno, i più comuni metodi di trattamento con derivati della silice tuttavia implicano condizioni chimico/fisiche drastiche - necessarie per favorire le reazioni alla base della formazione dei polimeri silicei - che non si adattano ad applicazioni che richiedono il mantenimento delle proprietà superficiali native del

legno stesso. In questo caso, una valida alternativa - proposta in settori più affini alla scienza enologica come quello biologico e medicale - consiste nell'utilizzo diretto di alcossidi, come il metiltrietossisilano (MTES) in fase gassosa.

In questo lavoro viene descritta l'applicazione del metodo generale di rivestimento di materiali organici con un polimero organo-siliceo, derivato da MTES in fase gassosa, per il trattamento della superficie interna delle barriques in modo da migliorarne le caratteristiche di resistenza ai microorganismi alterativi del vino. Allo stato attuale le prove sono state realizzate esclusivamente su scala di laboratorio, tuttavia gli incoraggianti risultati ottenuti fanno ritenere utile e opportuna in futuro la verifica sia della corrispondenza del trattamento ai requisiti di compatibilità con le bevande alcoliche che della reale applicabilità in scala di cantina. Il lavoro testimonia la capacità della ricerca italiana di operare nel campo dell'innovazione tecnologica finalizzata a cercare e validare soluzioni a problemi concreti della trasformazione enologica.

Sintesi e proprietà del polimero organo-siliceo.

Per tutti gli esperimenti sono stati impiegati blocchetti di legno di rovere di 50×40×30 mm, ricavati da doghe di barriques a media tostatura nuove, che sono stati rivestiti con paraffina su cinque lati per simulare la condizione delle botti dove solo una faccia delle doghe è a contatto con il vino. I campioni di legno sono stati quindi esposti in una camera di reazione (Fig. 1) a un trattamento superficiale con i vapori del precursore siliceo (MTES), che, caratterizzato da un punto di ebollizione relativamente basso, intorno ai 140°C, era trasferito da un flusso di azoto da una seconda camera riscaldata e pressurizzata. Al momento del contatto tra legno e MTES, l'umidità naturalmente presente sui blocchetti favoriva la polimeriz-

Tab. 1 - Principali caratteristiche dei campioni di legno dopo trattamento con metiltrietossisilano (MTES) in fase gassosa (Media ± SD, n = 5)

Campione	Tempo di esposizione al MTES (min)	Variazione in volume (%)	Variazione in peso (%)	Si (mg/cm ²)
Legno non trattato	0	-	-	0.06±0.01
Legno trattato	5	1.8±0.8	2.7±1.1	0.79±0.26
	10	1.3±1.6	1.7±0.6	1.78±0.47
	15	2.5±1.1	2.1±0.9	2.25±0.41

zazione dei monomeri silicei sulla superficie del legno. Sono stati testati diversi tempi di trattamento, tra i 5 e i 20 minuti, al termine dei quali i campioni di legno sono stati posti per 60 minuti a 25° C per dar il tempo al polimero di stabilizzarsi.

La caratterizzazione chimico/fisica del materiale così ottenuto ha visto l'impiego di diversi approcci analitici. Le osservazioni al microscopio sono state eseguite sia con microscopio ottico (Nikon SMZ80) che con un microscopio elettronico a scansione (SEM). Inoltre, per definire con precisione la struttura molecolare del polimero siliceo è stato acquisto lo spettro NMR del ²⁹Si utilizzando un NMR allo stato solido (Bruker 400 WB). La determinazione quantitativa del silicio è stata invece svolta in spettrometria di massa al plasma accoppiato induttivamente (ICP-MS) utilizzando un apparato Agilent 7500 su campioni precedentemente mineralizzati.

Test biologici. Sono stati condotti anche test biologici per valutare la reale efficacia del polimero organo-siliceo nel prevenire le contaminazioni microbiche senza alterare i processi fermentativi. Prove di fermentazione sono state eseguite in terreno sintetico in cui erano stati precedentemente immersi campioni di legno trattati con MTES.

Per quanto riguarda la protezione da microorganismi alterativi, le prove di contaminazione dei blocchetti di legno sono state eseguite mediante immersione dei campioni in colture di diverse

specie di microrganismi ritenuti alterativi nel settore enologico. I blocchetti di legno sono stati mantenuti in contatto con la coltura per 14 giorni a 20°C dopo di che sono stati eseguiti dei lavaggi volti a simulare i comuni trattamenti di cantina e le cariche microbiche superficiali residue sono state determinate secondo la norma ISO 18593:200419.

Cessione di fenoli. Con questo esperimento si è voluto valutare se la membrana organo-silicea superficiale salvaguardasse ancora, grazie alla sua micro porosità, la cessione di fenoli semplici nel vino da parte del legno. Per far questo i campioni di legno trattati con MTES sono stati posti a macerare in vino bianco per 16 giorni. Al termine, i fenoli ceduti al vino sono stati analizzati con un HPLC (Alliance 2695) dotato di detector coulometrico e colonna Supelco Ascentis Express.

Risultati e discussione

Il materiale e la sua struttura. Al termine del rivestimento dei campioni è stato dapprima valutato se il rivestimento siliceo inducesse modificazioni fisiche nella struttura del legno. Non sono state osservate variazioni significative nel peso e nelle dimensioni dei campioni (Tab. 1) soprattutto se confrontiamo i risultati ottenuti con i dati relativi ai trattamenti tradizionali di legno con alcossisilani. Per le applicazioni di interesse enologico, ed in particolare per le

barriques, questo risultato è di particolare importanza perché una delle caratteristiche peculiari di queste botti è che sono ottenute per incastro delle doghe di quercia, senza uso di giunture. In queste condizioni forti variazioni dimensionali porterebbero a fratture nelle botti e perdita di tenuta.

L'analisi elementare condotta mediante ICP-MS conferma la presenza di silicio sulla superficie del legno al termine dei trattamenti con MTES in fase gassosa (Tab. 1) in quantità proporzionale al tempo di trattamento. Le osservazioni condotte con il SEM dimostrano l'effettiva formazione di una membrana silicea uniforme sui campioni di legno. Il profilo non omogeneo tipico della superficie nativa del legno (Fig. 2A) è evidentemente modificato dallo strato siliceo (Fig. 2B) ottenendo una superficie liscia e omogenea. Questi risultati trovano conferma in precedenti lavori che si sono occupati di trattamenti superficiali del legno con derivati di silice per aumentarne la resistenza agli attacchi biologici. Tuttavia nel presente caso le modificazioni superficiali e la riduzione di porosità sono ottenute in condizioni di reazione più blande e in tempi rapidi. Inoltre l'utilizzo di un fluido gassoso consentirà in futuro di trattare anche superfici complesse o di difficile accesso, come appunto la superficie interna delle barriques che, infatti, già oggi sono sovente sanificate con vapore.

La conformazione molecolare della membrana silicea è stata definita mediante analisi NMR allo stato solido. Lo

Tab. 2 - Costanti cinetiche delle fermentazioni condotte con *Saccharomyces cerevisiae* in presenza di campioni di legno.

Campione	V _{max} (×10 ⁻⁵ m CO ₂ s ⁻¹)	K _m	Resa di fermentazione (%)	Cellule di lievito nel mezzo al 50% della fermentazione (×10 ⁷ cell/ml)
Legno non trattato	1.15 ± 0.01	0.30 ± 0.01	64.1 ± 0.9	1.9 ± 0.1
Legno trattato (5 min)	1.16 ± 0.02	0.20 ± 0.02	63.1 ± 0.5	1.8 ± 0.2
Legno trattato (10 min)	1.09 ± 0.01	0.19 ± 0.01	62.9 ± 0.9	1.8 ± 0.1
Legno trattato (15 min)	1.20 ± 0.01	0.23 ± 0.01	63.2 ± 0.6	1.8 ± 0.1

spettro del ²⁹Si (Fig. 3) evidenzia la presenza delle unità strutturali T3 [H₃CSi(OSi)₃] e T2 [H₃CSi(OSi)₂OR] e la completa assenza di monomeri residui non polimerizzati (T1). Questi risultati indicano che il polimero formato sulla superficie del legno è stabile e non sono presenti residui liberi che potrebbero essere rilasciati nel vino durante il contatto con il legno trattato.

Protezione dai contaminati. Visti gli scopi del lavoro, l'effetto protettivo della membrana organo-silicea è stato studiato focalizzando l'attenzione sui principali microrganismi alterativi in campo enologico (Fig. 3). I campionamenti microbiologici superficiali dimostrano che nei legni trattati con silice un lavaggio blando, svolto con acqua calda, garantisce un abbattimento della concentrazione microbica superficiale di almeno due unità logaritmiche. In condizioni reali, considerando la comune contaminazione microbica delle botti, questo risultato sarebbe sufficiente a considerare le botti prive di carica microbica contaminate. Nel caso del legno non trattato, un analogo lavaggio lascia una carica microbica decisamente più elevata.

Per spiegare l'effetto protettivo della membrana organo-silicea occorre considerare diversi aspetti. È noto che il polimero ottenuto da MTES abbia un carattere idrofobo, in grado di sfavorire l'adesione delle cellule alla superficie riducendo le interazioni chimiche tra le cellule e substrato tipiche dei meccanismi di for-

mazione di biofilm. Inoltre, la deposizione della membrana organo-silicea riduce la macro porosità del legno, impedendo una profonda penetrazione di microrganismi nel materiale al riparo dai trattamenti di pulizia.

Compatibilità biologica. L'assenza di interferenze negative con l'attività di *Saccharomyces cerevisiae* è stata valutata mediante fermentazioni in substrati sintetici a diretto contatto con campioni di legno trattato e non. I dati sono stati trattati seguendo l'approccio Lineweaver & Burk per determinare le costanti cinetiche di processo. In Tab. 2 sono riportati i parametri utili per confrontare i processi fermentativi. Nessuna differenza è stata trovata tra le V_{max} delle fermentazioni svolte in presenza di blocchetti di legno rivestiti o meno. Anche la K_m e la resa della fermentazione non variavano nelle diverse prove e sono nel range tipico di *Saccharomyces cerevisiae*. La misura della densità cellulare nel mezzo, dopo il consumo del 50% di zuccheri, dissipa definitivamente i dubbi circa la tossicità della membrana organo-silicea per le cellule presenti nel mezzo. I dati infatti mostrano una elevata concentrazione di lieviti, superiore alle 10⁷ cell/ml, tipica di *Saccharomyces cerevisiae*, durante la fermentazione alcolica.

Interazioni tra vino e legno. La Fig. 4 mostra il confronto tra i contenuti medi di fenoli semplici misurati in vino dopo un periodo di 16 giorni di contatto tra il vino e i campioni di legno trattati o

meno con silice. Nessuna differenza statisticamente significativa dovuta al trattamento è stata riscontrata per i composti analizzati. L'unica eccezione è rappresentata dall'acido omovanillico, una molecola di scarsa rilevanza enologica e forte ossidabilità. Il comportamento ambivalente della membrana silicea, in grado di permettere la migrazione di piccole molecole ma, allo stesso tempo, capace di contrastare la migrazione di strutture che hanno un alto significato biologico quali cellule, anticorpi o proteine, è già stato descritto in precedenza.

Nel presente lavoro si è messo in evidenza come, nonostante il film organo-siliceo copra uniformemente il legno, la trama che risulta dalla condensazione delle unità di MTES, [(CH₃)Si](OEt)_n (n = 1,2,3), crei una micro porosità che permette la piena conservazione degli scambi chimici, senza interferenze con il processo di invecchiamento del vino in cui le frazioni fenoliche rilasciate dalle botti giocano un ruolo fondamentale.

Considerazioni conclusive

Anche per rispondere ai desideri dei consumatori più attenti, nell'industria enologica l'attenzione dei tecnici è sempre più diretta all'ottenimento di prodotti a basso impatto ambientale, senza pregiudicare la qualità e la salubrità dei vini. In questo senso, i tradizionali trattamenti di sanificazione, basati su un ampio impiego di prodotti chimici e/o di energia, appa-

Fig. 1 - Schema dell'apparato per il trattamento del legno con metiltrietossisilano (MTES) in fase gassosa

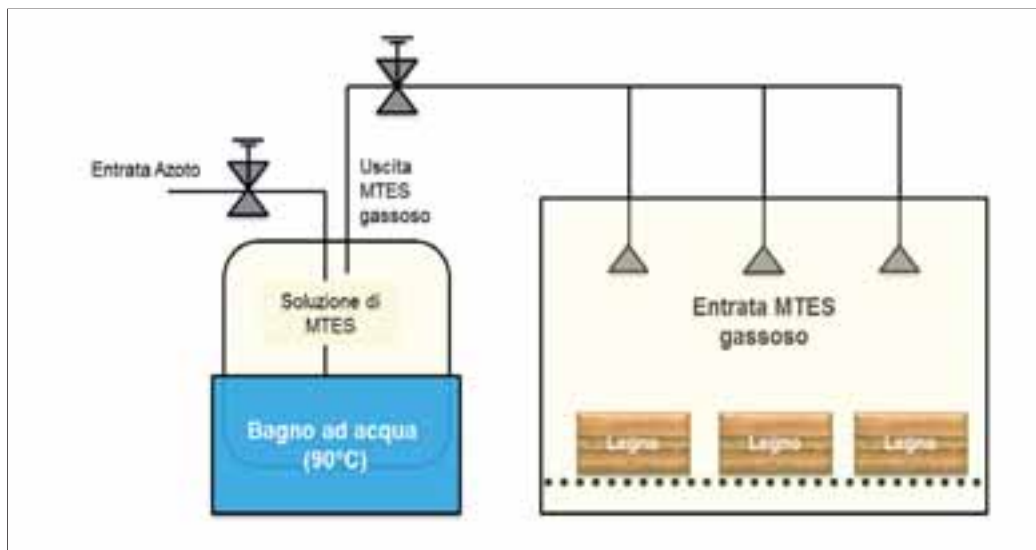
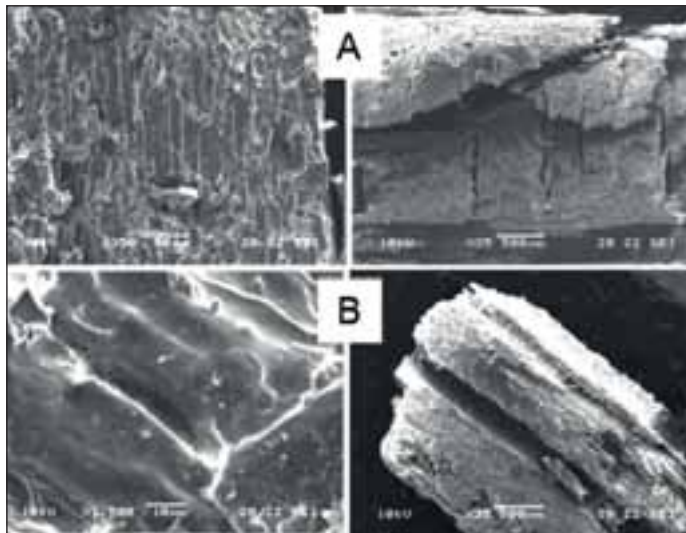


Fig. 2 - Morfologia del legno prima (A) e dopo (B) il trattamento di ricopertura copertura con il polimero organo-siliceo



ione sempre meno sostenibili e nuovi approcci alla prevenzione della contaminazione microbica sono auspicabili.

In questo lavoro è stata descritta una soluzione alternativa, basata sulla sintesi di un nuovo materiale composito ottenuto per deposizione gassosa di una membrana di silice sul legno delle barriques. La membrana silicea si è dimostrata in grado di garantire al legno il mantenimento dei fenomeni essenziali al processo di maturazione del vino, legati alle cessioni di composti fenolici semplici, riducendo nel contempo la

sensibilità del legno stesso agli attacchi da parte dei microrganismi contaminati. I risultati ottenuti in laboratorio dovranno essere validati circa la corrispondenza del trattamento ai requisiti di compatibilità con le bevande alcoliche ed eventualmente "esportati" in condizioni reali di cantina, su botti intere, al fine di verificare l'effettiva applicabilità delle soluzioni proposte all'industria enologica.

Ringraziamenti. Si ringrazia per la collaborazione e il supporto analitico la dott.ssa Emanuela Callone del Dip. Ingegneria dei Materiali e Tecnologie Industriali dell'Università di Trento,

Bibliografia essenziale

Avnir, D., Coradin, T., Lev O., & Livage, J. (2006). Recent bio-applications of sol-gel materials. *Journal of Material Chemistry*, 16(11), 1013-1030.

Callone, E., Campostrini, R., Carturan, G., Cavazza, A., & Guzzon, R. (2008). Immobilization of yeast and bacteria cells in alginate microbeads coated with silica membranes: procedures, physico-chemical features and bioactivity. *Journal of*

Material Chemistry, 18(40), 4839-4848.

Carturan, G., Campostrini, R., Tognana, L., Boninsegna, S., Dal Toso, R., & Dal Monte, R. (2006). Gas-Phase Silicon Alkoxide Reactivity vs. Na-Alginate Droplets for Conjugation of Alginate and Sol-Gel Technologies. *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, 37(1), 69-77.

De Vetter, L., Cnudde, V., Masschaele, B., Jacobs, P.J.S., & Van Acker J. (2006). Detection and distribution analysis of organosilicon compounds in wood by means of SEM-EDX and Micro-Ct. *Material Characterization*, 56, 39-48.

Donath, S., Militz, H., & Mai, C. (2010). Wood modification with alkoxysilanes. *Wood Science and Technology*, 38(7), 555-566.

Guzzon, R., Carturan, G., Krieger-Weber, S., & Cavazza A. (2012). Use of organosilica immobilized bacteria produced in a pilot scale plant to induce malolactic fermentation in wines that contain lysozyme. *Annals of Microbiology*, 62(1), 381-390.

Guzzon, R., Widmann, G., Malacarne, M., Nardin, T., Nicolini G., & Larcher R. (2011). Survey of the yeast population inside wine barrels and the effects of certain techniques in preventing microbiological spoilage. *European Food Research Technology*, 233(2), 285-291.

Guzzon, R., Nardin, T., Micheletti, O., Nicolini, G. & Larcher R. (2013). The antimicrobial activity of ozone. Effectiveness against the main wine spoilage microorganisms and evaluation of impact on simple phenols in wine. *Aus. J. Grape Wine Res.* (doi: 10.1111/ajgw.12018)

Larcher, R., Nicolini, G., Bertoldi, D., & Nardin, T. (2007). Determination of 4-ethylcatechol in wine by high-performance liquid chromatography-coulometric electrochemical array detection. *Analitica Chimica Acta*, 609(2), 235-240.

Larcher, R., Puecher, C., Rohregger, S., Malacarne, M. & Nicolini, G. (2012). 4-Ethylphenol and 4-ethylguaiacol depletion in wine using

Fig. 3 - Riduzione della carica microbica superficiale dopo lavaggio con acqua calda in legni trattati (verde) o non trattati (rosso) con metiltrietossilano in fase gassosa.

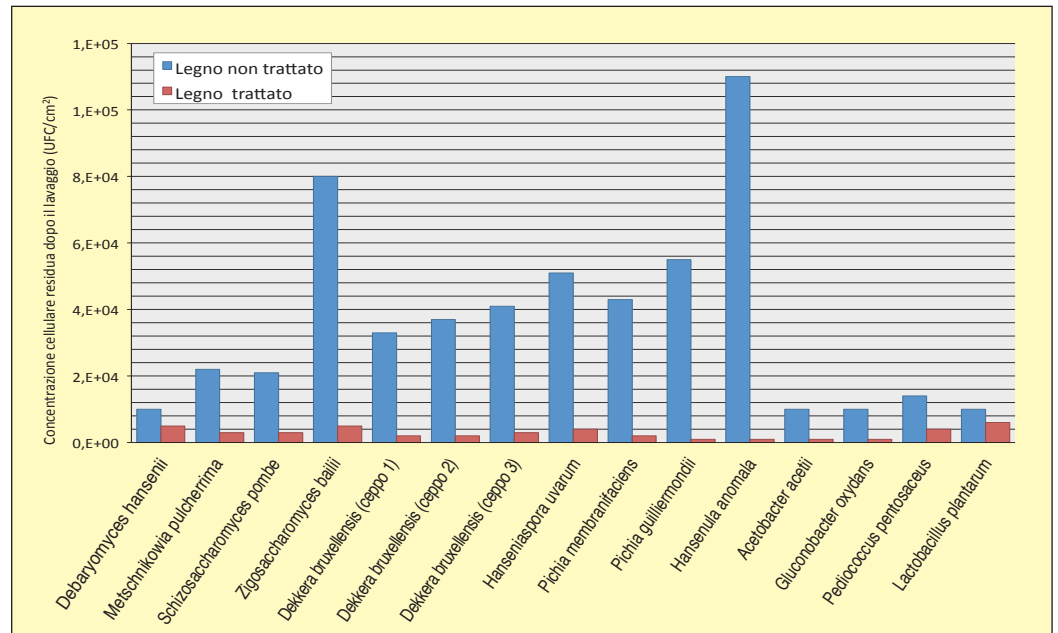
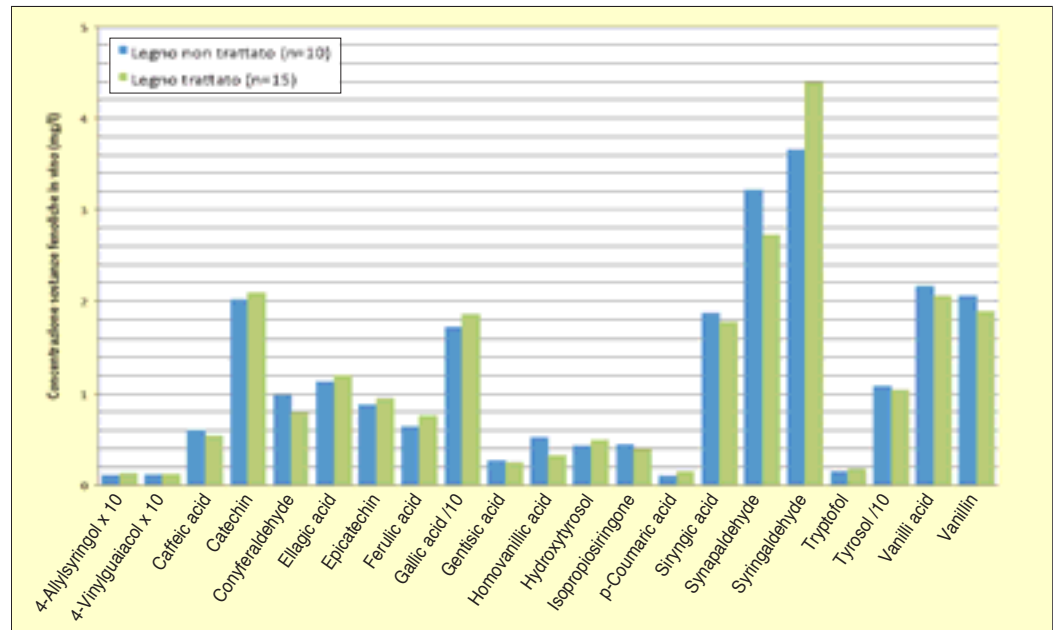


Fig. 4 - Confronto tra il contenuto medio di fenoli nel vino bianco dopo 16 giorni di contatto con i campioni di legno



(Per esigenze grafiche l'altezza delle barre di 4-allilsiringolo e 4-vinylguaiacolo è stata ingrandita 10 volte, mentre per acido gallico e tirosolo è stata ridotta 10 volte)

esterified cellulose, Food Chemistry, 132, 2126-2130.

Oelofse, A., Pretorius, I. S., & Du Toit, M. (2008). Significance of Brettanomyces and Dekkera during winemaking: a synoptic review. South African Journal of Enology and Viticulture, 29(2), 128-144.

Singleton, V. L. (1995).

Maturation of Wines and Spirits: Comparisons, facts, and hypotheses. American Journal of Enology and Viticulture, 46(1), 98-115.

Mai, C., & Militz, H. (2004). Modification of wood with silicon compounds. inorganic silicon compounds and sol-gel systems: a review. Wood Science and Technology, 37(5), 339-348.

chnology, 37(5), 339-348.

Vignali, F., Predieri, G., Feci, E., Palanti, S., Baratto, M. C., Basosi, R., Callone, E., & Müller K. (2011). Interpenetration of wood with NH₂R-functionalized silica xerogels anchoring copper(II) for preservation purposes. Journal of Sol-Gel Science and Technology, 60(3), 445-456.