



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di Agronomia Animali Alimenti Risorse Naturali e
Ambiente

Corso di laurea in Scienze e Tecnologie Viticole ed Enologiche

Tesi di laurea Triennale

EFFETTO DEL RAME SULLA PRODUZIONE DI ACETALDEIDE DURANTE LA FERMENTAZIONE ALCOLICA

Relatore:

Prof. Simone Vincenzi

Correlatori:

Dr.ssa Tiziana Nardi

Laureando:

Nicholas Da Ros

Matricola n. 1221440

Anno Accademico 2022-2023

Indice

RIASSUNTO	2
ABSTRACT	2
INTRODUZIONE	3
1 FERMENTAZIONE ALCOLICA	3
2 L'ACETALDEIDE	4
2.1 ACETALDEIDE: EFFETTI SUL VINO E SUGLI AROMI	4
2.2 VIE DI PRODUZIONE	5
2.3 EFFETTI DELLA SO ₂	5
2.4 SO ₂ , LEGAME CON L'ACETALDEIDE	5
2.5 ALTRI STRESS CHE POSSONO PORTARE A PRODURRE ACETALDEIDE	6
2.6 EFFETTO SUL COLORE	6
3 RAME IN VITICOLTURA	6
3.1 COME FUNZIONA, PRODOTTI DISPONIBILI IN COMMERCIO	8
3.2 RAME IN VITICOLTURA BIOLOGICA (limiti fonte OIV)	8
4 IL RAME IN ENOLOGIA	8
SCOPO	10
MATERIALI E METODI	11
ANALISI PRELIMINARI	11
CEPPI DI LIEVITO	12
ALLESTIMENTO DELLE FERMENTAZIONI	12
CONTA MICROBICA DEL MOSTO	14
ANALISI CHIMICHE	14
Analisi SO ₂ libera e SO ₂ totale	14
Analisi acetaldeide	14
RISULTATI E DISCUSSIONE	15
CONTA MICROBICA DEL MOSTO	15
RISULTATI MOSTO 1	16
RISULTATI MOSTO 2	21
BIBLIOGRAFIA	26
RINGRAZIAMENTI	32

RIASSUNTO

La tendenza recente nella vinificazione è quella di ridurre l'uso di composti chimici sia in vigneto che in cantina. Nelle produzioni biologiche vanno evitati fertilizzanti chimici e pesticidi di sintesi. Ma anche l'utilizzo di molecole a base di rame e zolfo in alternativa ai pesticidi chimici, pratica principale di difesa nei vigneti biologici, sta a sua volta progressivamente diminuendo, per diversi motivi. Al di là delle modifiche normative che impongono nuovi limiti, infatti, l'uso di dosi elevate comporta la presenza di residui di rame che possono, a loro volta, impattare sul processo di vinificazione. Precedenti studi hanno stabilito che alte concentrazioni di Cu^{2+} possono essere tossiche per i lieviti, inibendone la crescita e l'attività fermentativa, tuttavia, la maggior parte di questi lavori ha utilizzato concentrazioni elevate di Cu^{2+} , molto superiori a quelle normalmente presenti nei mosti d'uva (>20 mg/L). Lo scopo del lavoro è stato quello di verificare l'effetto di concentrazioni intermedie di rame, per indagare il potenziale effetto di contaminazioni reali provenienti dal vigneto sulla fermentazione alcolica. L'obiettivo è riuscire a identificare i ceppi di lievito il cui comportamento nel vino sia meno influenzato dalla presenza del rame. Per questo motivo la prova è stata condotta su mosti naturali da uve bianche, contaminati e non con 10 mg/l di Cu^{2+} , cercando di simulare il più possibile ciò che avviene in cantina. Sono stati confrontati 15 lieviti secchi attivi. Dai risultati ottenuti è emerso che la presenza della molecola di rame durante la fermentazione alcolica causa una produzione di acetaldeide maggiore nel vino finale e ciò è riscontrabile in tutti i ceppi di lievito utilizzati. I ceppi di lievito "S" e "Alba" sono i ceppi che in entrambi i mosti hanno avuto il minor aumento di acetaldeide in presenza di rame.

ABSTRACT

The recent trend in winemaking is to reduce the use of chemical compounds both in the vineyard and in the cellar. In organic productions, chemical fertilizers and synthetic pesticides should be avoided. But also, the use of copper and sulfur-based molecules, the main defense practice in organic vineyards, is in turn progressively decreasing, for various reasons. Beyond the regulatory changes that impose new limits, in fact, the use of high doses involves the presence of copper residues which can, in turn, impact the winemaking process. Previous studies have established that high concentrations of Cu^{2+} can be toxic to yeasts, inhibiting their growth and fermentative activity, however, most of these studies have used high concentrations of Cu^{2+} , much higher than those normally present in grape musts grapes (>20 mg/L). The aim of the present work was to verify the effect of intermediate concentrations of copper, to investigate the potential effect of real contaminations coming from the vineyard on alcoholic fermentation. The purpose is to be able to identify the yeast strains whose behavior in wine is less influenced by the presence of copper. For this reason, the test was conducted on natural musts from white grapes, contaminated and not with 10 mg/l of Cu^{2+} , trying to simulate as much as possible what happens in the cellar. Fifteen active dry yeasts were compared. The results obtained showed that the presence of the copper molecule during alcoholic fermentation causes a greater production of acetaldehyde in the final wine and this can be seen in all the yeast strains used. The yeast strains "S" and "Alba" are the strains that in both musts had the least increase in acetaldehyde in the presence of copper.

INTRODUZIONE

Il rame è l'elemento per eccellenza nella lotta alla peronospora nella vite. I prodotti rameici sono utilizzati in agricoltura da più di un secolo. Al giorno d'oggi l'effetto dell'impiego dei prodotti fitosanitari di sintesi è particolarmente sentito dalla popolazione e il passaggio delle aziende da un sistema di agricoltura convenzionale all'agricoltura biologica è sempre più frequente. Con l'agricoltura biologica l'utilizzo di prodotti fitosanitari di sintesi viene fortemente limitato. Nella realtà del Nord-est Italia dove una tra le colture principali è sicuramente la vite, la principale malattia fungina da combattere è *Plasmopara viticola*. In viticoltura biologica la principale molecola che è possibile impiegare per contrastare tale malattia è il rame. Risulta quindi indispensabile conoscerne le caratteristiche al fine di limitare gli sprechi e aumentarne l'efficienza. Un impiego considerevole di rame può comportare un alto residuo di quest'ultimo nel terreno ma anche nell'uva. La forte presenza di rame nel mosto può influenzare negativamente l'andamento della fermentazione alcolica ostacolando l'attività dei lieviti, con delle ovvie conseguenze sul prodotto finale, il vino.

1 FERMENTAZIONE ALCOLICA

Tramite la fermentazione alcolica i lieviti convertono gli zuccheri in etanolo, anidride carbonica e altri sottoprodotti, quest'ultimi derivanti dal metabolismo secondario della cellula. Gli zuccheri contenuti nel mosto attraverso la membrana cellulare penetrano all'interno della cellula di lievito, qui avviene la fermentazione alcolica (Butnariu & Butu, 2019).

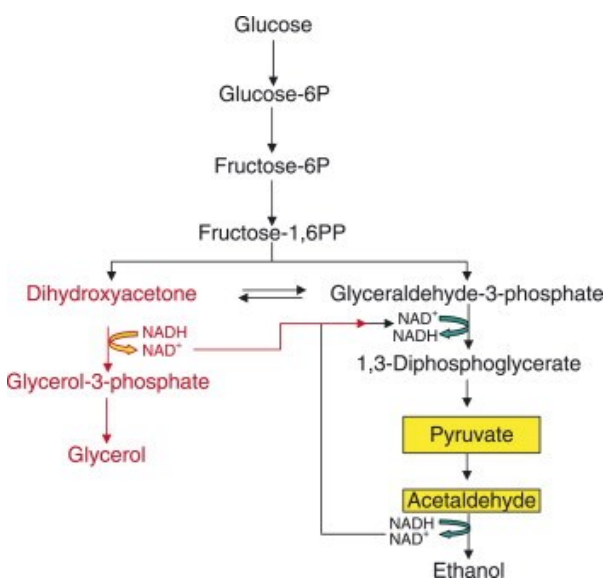


Fig. 1 - Schema della fermentazione alcolica. Linea nera: fermentazione alcolica. Linea rossa: fermentazione gliceropiruvica (Ciani et al., 2008).

Il processo di fermentazione alcolica è regolato dal complesso enzimatico del lievito. Gli enzimi agiscono come catalizzatori nelle reazioni di decomposizione degli zuccheri in molecole più semplici. La via metabolica della glicolisi del lievito converte gli esosi in acido piruvico e successivamente in alcol etilico e CO₂ (Butnariu & Butu, 2019).

Attraverso l'enzima piruvato decarbossilasi la molecola di piruvato viene decarbossilata ad acetaldeide. Successivamente tramite l'enzima alcol deidrogenasi l'equilibrio redox all'interno della cellula viene ripristinato: il NAD⁺ viene rigenerato con conseguente riduzione dell'acetaldeide in etanolo (Ciani et al., 2008).

La fermentazione alcolica è un processo esotermico. Da un grammo di zucchero si produce lo 0,05% di alcol etilico in volume, ciò equivale a dire che servono 17,5 g/l di zuccheri per produrre un grado alcolico. Da una molecola di zucchero vengono prodotte 2 molecole di ATP (Butnariu & Butu, 2019).

L'impiego di *Saccharomyces cerevisiae* nell'industria vinicola va attribuito alla capacità di questo ceppo di avere un elevato potere fermentativo e una resistenza maggiore alle difficili condizioni ambientali presenti nel mosto: alti livelli di etanolo e acidi organici, scarsa presenza di ossigeno e di alcuni nutrienti (Bauer e Pretorio, 2000; Bisson, 1999; Hansen et al., 2001). Tra le altre molecole che possono influenzare negativamente la fermentazione alcolica da parte dei lieviti ci sono i pesticidi applicati in vigneto contro le malattie della vite. Alcune di queste molecole possono essere rimosse o degradate da parte della cellula di lievito (Boudreau et al., 2017).

2 L'ACETALDEIDE

2.1 ACETALDEIDE: EFFETTI SUL VINO E SUGLI AROMI

L'acetaldeide (CH₃COH) è una molecola organica appartenente alla classe delle aldeidi. Viene chiamata anche etanale ed è una molecola aromatica presente in tantissimi alimenti, tra cui il vino. A bassi livelli dà un piacevole aroma fruttato, ad alte concentrazioni diventa irritante (Miyake & Shibamoto, 1993). Nel vino ad alte concentrazioni produce un retrogusto verde, erbaceo (Henschke & Jiranek, 1993). Nel vino la soglia di percezione è 100-125 mg/l (Berg et al., 1955; Zoecklein et al., 1995). L'acetaldeide è la molecola principale tra le aldeidi nel vino, rappresenta oltre il 90% delle aldeidi totali (Nykanen, 1986). È un prodotto della fermentazione alcolica e la sua concentrazione nel vino può variare da 10 mg/l a 300 mg/l (Schreier, 1979). L'acetaldeide è quindi presente sia nei vini bianchi che nei vini rossi. Nei vini bianchi la quantità di acetaldeide rappresenta un indicatore dello stato di ossidazione del vino, nei vini rossi dovrebbe essere presente fino a 100 mg/l, oltre i 500 mg/l il prodotto non può più essere considerato commercializzabile (Romano et al., 1994). Durante il periodo di invecchiamento, un vino va incontro a un incremento di acetaldeide a causa dell'ossidazione dell'etanolo (Wucherpfenning et al., 1972).

Vini prodotti in condizioni ossidative come gli Sherry e i Tocai hanno un maggior contenuto in acetaldeide (Schreier, 1979). A causa dell'alto contenuto in alcol deidrogenasi, alcune specie di lievito appartenenti al genere *Saccharomyces* provocano l'ossidazione dell'alcol in acetaldeide. Questi lieviti vengono impiegati nella preparazione dei vini di tipo ossidativo come quelli di Jerez in Spagna e quelli di Jura in Francia (Li e de Orduña, 2017).

2. 2 VIE DI PRODUZIONE

In vinificazione, la produzione di acetaldeide è determinata da vari fattori, tra questi l'eccessiva presenza di O₂ nelle condizioni di crescita (Bennetzen, and Hall, 1982) o l'impiego di coadiuvanti insolubili nella chiarifica di mosti e vini (Delfini and Costa, 1993). La via principale di produzione dell'acetaldeide è la fermentazione alcolica; tuttavia, questa non è l'unica via di formazione, l'acetaldeide viene prodotta anche dal metabolismo di alcuni amminoacidi come l'alanina (Henschke & Jiranek, 1993; Boulton et al. 1996).

2. 3 EFFETTI DELLA SO₂

L'impiego dell'anidride solforosa, tossica per il lievito, comporta una maggior produzione di acetaldeide (Lafon-Lafourcade, 1985; Longo et al., 1992; Schopfer et al., 1985; Weeks 1969). L'anidride solforosa è uno dei fattori principali che determina la produzione di acetaldeide in un vino: fermentazioni condotte in presenza di SO₂ hanno quantitativi di acetaldeide notevolmente più alti rispetto a vini fermentati senza SO₂ (Herraiz et al., 1989). Ciò sembra essere legato ai meccanismi di resistenza indotti dai lieviti nei confronti della SO₂ (Stratford et al., 1987; Pilkington & Rose, 1988).

2. 4 SO₂, LEGAME CON L'ACETALDEIDE

L'anidride solforosa è un conservante impiegato comunemente nel vino per la sua proprietà antiossidante, antiossidasica e antisettica. Nel vino la SO₂ è presente sotto varie forme. La SO₂ libera è rappresentata dallo ione bisolfito HSO₃⁻ e in piccola percentuale dalla SO₂ molecolare e dallo ione solfito SO₃⁻. La SO₂ totale è costituita da forme libere e legate: lo ione bisolfito (HSO₃⁻) può legarsi a composti carbonilici come l'acido piruvico, l'acido α-cheto-glutarico e l'acetaldeide, quest'ultima la più importante in quanto dotata di forte affinità verso la SO₂ (Fornachon, 1963; Lafon-Lafourcade, 1975; Somers & Wescombe, 1982; Hood, 1983; Delfini & Morsiani, 1992, 1993). Vari studi riportano dell'aumento di produzione di acetaldeide da parte del lievito in presenza di SO₂ (Casalone et al., 1992; and Pilone, 2000; Divol et al., 2006).

2. 5 ALTRI STRESS CHE POSSONO PORTARE A PRODURRE ACETALDEIDE

L'anidride solforosa non è l'unico fattore di stress che può indurre il lievito a produrre maggior acetaldeide, un'eccessiva concentrazione di zuccheri, pH molto acidi e l'anaerobiosi stessa possono agevolare questo processo (Ribéreau-Gayon et al., 1956). Non ci sono molti dati sull'effetto del rame, ma è ipotizzabile che questo metallo possa causare uno stress al lievito causando un aumento di produzione di acetaldeide (Cavazza et al., 2013).

2. 6 EFFETTO SUL COLORE

In un vino giovane il colore è determinato principalmente dal contenuto in antociani, mentre in un vino sottoposto ad invecchiamento il colore è sottoposto ad un processo evolutivo, nel quale i fenoli presenti nel vino condensano tra loro o con altre molecole (Jurd, 1969). La principale via di polimerizzazione è quella tra antociani e catechine. Il processo che porta alla formazione di questi polimeri è molto lento. La presenza della molecola di acetaldeide, facente da ponte tra antociani e catechine agevola e velocizza tale processo migliorando la stabilità e l'intensità del colore (Somers, 1972; Timberlake & Bridle, 1976; Bakker, 1986). La malvidina-3-glucoside (la principale antocianina presente nel vino) si lega alla catechina mediante acetaldeide formando un dimero (Timberlake & Bridle, 1976, 1977; Baranowski & Nagel, 1983; Bakker et al. 1993). Pratiche enologiche come l'aerazione agevolano la produzione di acetaldeide migliorando indirettamente la stabilità e l'intensità del colore nei vini: l'ossidazione dell'etanolo e dei composti fenolici promuove la copolimerizzazione tra antociani e catechine o tannini, importante per ridurre l'astringenza e l'amaro (Ribéreau-Gayon et al., 1983).

3 RAME IN VITICOLTURA

Il rame è un metallo pesante utilizzato in viticoltura come anticrittogamico e batteriostatico. In viticoltura è uno dei principali fungicidi utilizzati nella lotta alla peronospora (*Plasmopara viticola*). La *Plasmopara viticola* è un fungo oomicete trofico, il cui bersaglio è *Vitis vinifera*, la vite europea. L'introduzione di *P. viticola* proveniente dal Nord America in Europa risale alla seconda metà del 1800 (Singh, 2000).

La scoperta della capacità della molecola di rame di contrastare la peronospora della vite è attribuita ad A. Millardet, professore presso l'università di Bordeaux. La sua è stata una scoperta accidentale: nel 1880 in Francia a Bordeaux i viticoltori impiegavano una miscela di solfato di rame e calce per dissuadere i passanti dal mangiare l'uva. Millardet notò che le viti trattate con questa miscela, ossia la poltiglia bordolese erano immuni alla malattia.

Il rame è un elemento naturalmente presente nei suoli. Nella soluzione circolante nel suolo il rame si trova quasi esclusivamente sottoforma di catione Cu^{2+} , mentre le forme Cu^{1+} e Cu^0 sono possibili in condizioni riducenti. Il rame è un elemento calcofilo, cioè tende naturalmente ad associarsi allo zolfo, in particolare tende

a concentrarsi sottoforma di solfuro (Romić et al., 2013). Il suo adsorbimento è legato alle caratteristiche chimico fisiche del terreno. È la componente colloidale del terreno a legare questo elemento. Oltre alle argille, un ruolo importante lo hanno gli ossidi amorfi e cristallini di Fe e Al che assorbono facilmente Cu^{2+} , indipendentemente dall'eccesso di metalli alcalini nella soluzione. Ciò nonostante, la fonte principale di complessazione del rame nel suolo è la materia organica. La complessazione del rame da un lato ne riduce la biodisponibilità, dall'altro ne impedisce la mobilità e, quindi, il trasporto verticale attraverso il suolo fino al sottosuolo, riducendo sostanzialmente il rischio di contaminazione delle acque sotterranee (Romić et al. 2013).

Il rame è un comune inquinante metallico rilasciato nell'ambiente a seguito delle attività dell'uomo. L'utilizzo del rame in agricoltura ha portato a un maggior accumulo di questo elemento nei terreni agricoli rispetto ai suoli naturali. L'impiego di fungicidi rameici a lungo termine porta a un aumento dei livelli di rame anche negli strati inferiori del suolo (Casali et al., 2008). Degli studi hanno confrontato i quantitativi di rame nei suoli agricoli, trovando dei valori di 110-1500 mg/kg di terreno, che sono decisamente superiori ai 20-30 mg/kg riscontrati nei suoli naturali (Baker,1990). Nei vigneti francesi la concentrazione di rame supera i 100 mg/kg, nei casi più estremi arriva a oltre 1000 mg/kg di terreno (Fernandez-Calvino et al., 2008). Nei terreni agricoli del centro Italia le concentrazioni di rame nel suolo variano da 50 a 220 mg/kg di terreno (Mantovi et al., 2003).

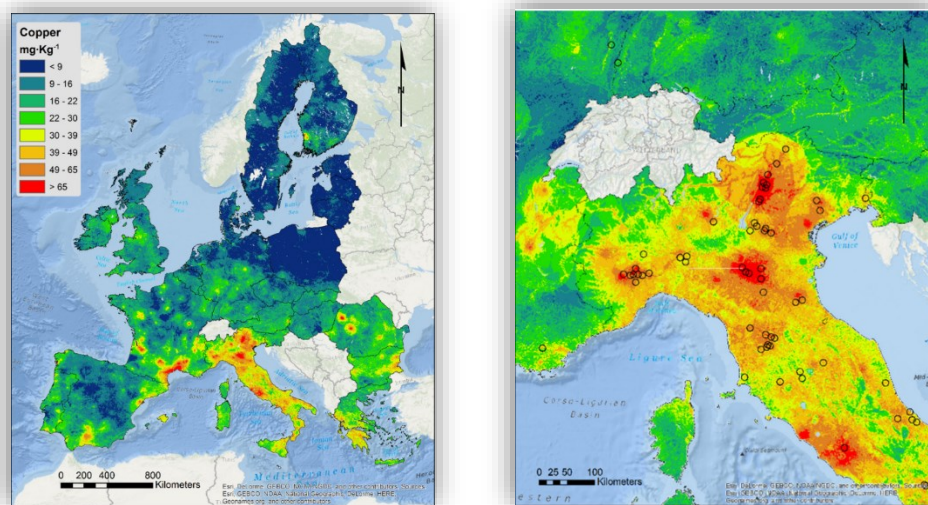


Fig. 2 - Dettagli della concentrazione di rame nel terreno in Europa (indagine LUCAS); concentrazioni di rame nel nord e centro Italia (immagine a dx) (Ballabio et al., 2018).

A basse concentrazioni il rame è un microelemento essenziale, a concentrazioni elevate diventa tossico sia per le piante che per gli animali, compreso l'uomo. Il suo accumulo nel terreno può portare ad una serie di squilibri all'interno di esso, infatti oltre ad essere fitotossico, danneggia i microrganismi del terreno, interrompe il ciclo dei nutrienti e inibisce la mineralizzazione dei nutrienti essenziali come azoto e fosforo (Romić et al., 2013). Alcuni studi sostengono che l'eccessiva concentrazione di rame nel terreno ha un impatto negativo sui lombrichi (Van Rhee, 1967).

3. 1 COME FUNZIONA, PRODOTTI DISPONIBILI IN COMMERCIO

Il rame esercita un'attività multisito nei confronti dei patogeni, sfruttando quindi diversi meccanismi: blocco degli enzimi coinvolti nel processo di respirazione cellulare, inibizione della sintesi proteica, alterazione dell'attività della membrana cellulare e degli organelli (El Bilali, 2005).

I prodotti cuprici in commercio sono diversi, a seconda del formulato abbiamo una differente finezza delle particelle e ciò permette l'utilizzo del prodotto ad una dose diversa. Quest'ultimo aspetto permette di ricoprire meglio la superficie fogliare della pianta con conseguente diminuzione del dilavamento e un miglioramento dell'attività crittogamica.

- Poltiglia bordolese: è una miscela di solfato di rame CuSO_4 e calce Ca(OH)_2 . Ha origine dalla città francese di Bordeaux. Le concentrazioni di CuSO_4 e Ca(OH)_2 da utilizzare nella preparazione della miscela sono differenti: la formula classica (formula Cuboni: 1Kg $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ e 1Kg di Ca(OH)_2 in 100 l di H_2O) porta ad un formulato basico. Con un pH più basico aumenta la persistenza, viceversa un pH più acido aumenterà l'attività anticrittogamica e la prontezza d'azione.
- Solfato tribasico di rame $3\text{Cu(OH)}_2 \cdot \text{CuSO}_4 \cdot 1/2\text{H}_2\text{O}$: parte del rame viene rilasciato velocemente, il rimanente si solubilizza più lentamente rendendo questo formulato persistente.
- Ossicloruro tetrarameico $3\text{Cu(OH)}_2 \cdot \text{CuCl}_2 \cdot (3\text{CuO} \cdot \text{CuCl}_2)$ e ossicloruro di rame e calcio ($3\text{CuO} \cdot \text{CaCl}_2$): meno fitotossici della poltiglia bordolese;
- Idrossido di rame Cu(OH)_2 : alta velocità d'azione ma scarsa persistenza sulla vegetazione (Matta et al. 2017)

3. 2 RAME IN VITICOLTURA BIOLOGICA (limiti fonte OIV)

Come già detto, il rame è tra i principali prodotti fitosanitari impiegabili in agricoltura biologica. Le formule di rame impiegabili sono quelle sopra descritte, cioè poltiglia bordolese, solfato di rame tribasico, idrossido di rame, ossido di rame e ossicloruro di rame (Allegato II al regolamento CE n. 889/2008, pagg. 84 e 95). Dal 1° gennaio 2019 è entrato in vigore il Regolamento UE 1981/2018, il quale stabilisce che la quantità massima di rame utilizzabile sulle colture biologiche è di 28 Kg/ha (corrispondenti mediamente a 4 kg/ha/anno), ripartibile in 7 anni.

4 IL RAME IN ENOLOGIA

Il solfato di rame utilizzato in vigneto è una delle principali fonti di rame nel mosto e nel vino. A questa fonte se ne aggiungono altre: ad esempio, nell'industria enologica, l'impiego di apparecchiature in rame (Volpe et al., 2009) o l'aggiunta di additivi come CuSO_4 per la rimozione dei composti solforati, aumenta i quantitativi di rame nel vino. Il solfato di rame in enologia viene impiegato per la rimozione dei solfuri dal vino che provocano un'eccessiva riduzione con odori sgradevoli (Garcia-Esparza et al., 2006; Tamasi et al., 2010). Gli

ioni solfuro interagendo con gli ioni di rame formano solfuro di rame, molecola insolubile che verrà poi eliminata dalla soluzione mediante filtrazione. Un vino con concentrazioni di rame superiori a 1 mg/l può creare torbidità, dovuta alla casse rameica (Ferreira et al., 2006; Robinson e Winge, 2010). Il rame è inoltre in grado di interagire con alcuni composti aromatici presenti nell'uva, in particolare con quelli solforati come i tioli volatili, portando a una riduzione del loro contenuto nell'uva e nel vino (Hatzidimitriou et al., 1996). Questa correlazione tra rame e composti tiolici è stata riscontrata anche sulle varietà Merlot e Cabernet Sauvignon (Tominaga et al., 1998).

Oltre agli aspetti tecnologici, bisogna anche considerare gli eventuali effetti del rame sulla fermentazione. Il rame a basse concentrazioni agisce come microelemento, essendo un cofattore per gli enzimi e partecipando alle reazioni redox, ma a concentrazioni superiori può risultare tossico (Komarek et al., 2010; Northcote, 1988). In concentrazioni elevate il rame interagisce con gli acidi nucleici, i siti attivi degli enzimi e con la membrana plasmatica (Komarek et al., 2010; Jiang et al., 2001; Northcote, 1988). L'interazione con la membrana plasmatica porta a un danneggiamento di quest'ultima comportando una serie di squilibri per la cellula, tra cui riduzione dell'attività delle proteine di trasporto (Hazel et al., 1990; Keena et al., 1982), aumento della impermeabilità ionica (Hazel et al., 1990) e fagocitosi (Avery et al., 1995). Degli studi affermano che la crescita di *Saccharomyces cerevisiae* durante la fermentazione alcolica viene inibita con una concentrazione di rame superiore ai 20 mg/l, comportando un ritardo nella fermentazione e una minor produzione di alcol (Sun, Zhao e Liu et al., 2015; Sun et al., 2016); secondo altri autori una concentrazione di rame di 20-25 mg/l nel mosto provoca una riduzione della vitalità cellulare di due unità logaritmiche (Cavazza et al. 2013). Altri autori sostengono che la presenza di residui di rame ha degli effetti in fermentazione e sull'acidità volatile, definendo la resistenza al rame una caratteristica ceppo dipendente (Ferreira et al. 2006). Questo effetto di tossicità nei confronti dei lieviti ha delle ripercussioni sul vino finito: un vino ottenuto da mosto ad alte concentrazioni di rame ha un contenuto di anidride solforosa e di acido acetico maggiore (Cavazza et al. 2013).

Il rame oltre a essere tossico per le cellule di lievito lo diventa anche per l'uomo se presente in quantità elevate, soprattutto in combinazione con altri metalli pesanti come ferro, manganese, nichel, scandio, piombo e zinco (Araya et al., 2003; Turnlund et al., 2004; Naughton & Petroczi, 2008). Per questo motivo i residui massimi di rame permessi e riportati nel Regolamento Delegato (UE) 2019/934 del 12 luglio 2019 della Commissione europea sono di 1 mg/l per i vini e 2 mg/l per i vini liquorosi ottenuti da mosto di uve non fermentato o leggermente fermentato. L'impiego massimo di solfato di rame (CuSO_4) nel vino come pratica enologica riportato nell'International Code of Oenological Practices dell'OIV è 1 g/hl.

Per fortuna, la fermentazione stessa, producendo composti solforati, è in grado di abbattere la concentrazione di rame nel vino portandola normalmente entro i limiti di legge. In ogni caso, l'OIV ha ammesso attraverso il Regolamento (CE) N. 606/2009 della Commissione del 10 luglio 2009 l'utilizzo del copolimero PVI-PVP fino alla dose massima di 500 mg/l come soluzione per ridurre nel mosto e nel vino la concentrazione dei metalli.

SCOPO

Lo scopo di questa esperienza era di verificare gli effetti della presenza di rame durante la fermentazione alcolica, rispetto ad una fermentazione condotta senza rame. L'obiettivo dell'esperimento non era verificare a quale concentrazione di rame il lievito interrompe la fermentazione, ma bensì mettere a confronto diversi ceppi commerciali di *Saccharomyces cerevisiae* in presenza di contenuti di rame normalmente riscontrabili nei mosti, al fine di individuare se questo metallo ha degli effetti sulla fermentazione. In particolare, sono state fatte delle analisi di SO₂ e acetaldeide nel vino. Sono stati testati diversi ceppi commerciali, con l'obiettivo finale di individuare quelli su cui gli effetti del rame sono minori.

MATERIALI E METODI

L'esperimento è stato condotto con micro-fermentazioni su due mosti differenti, eseguendo tre repliche per ognuno dei ceppi di lievito utilizzati. Per l'esperimento sono stati utilizzati mosti d'uva provenienti da due aziende vitivinicole diverse: il primo mosto proviene dalla Tenuta Bonotto delle Tezze nel comune di Vazzola, il secondo dall'azienda Perlage nel comune di Farra di Soligo.

ANALISI PRELIMINARI

Dei mosti d'uva impiegati sono stati quantificati il contenuto in zuccheri, azoto amminico e azoto ammoniacale per via enzimatica tramite analizzatore automatico I-Cubio della R-Biopharm utilizzando i kit specifici e i protocolli stabiliti dalla casa produttrice.

L'analisi del rame è stata eseguita con un assorbimento atomico Perkin Elmer 3100, con una lampada specifica per il rame e una lunghezza d'onda di misurazione di 234.8 nm. La quantificazione è avvenuta con una retta di calibrazione a 0.5, 1.0 e 1.5 mg/l di Cu.

In un caso il mosto di partenza aveva già un basso contenuto di rame, per cui è stato utilizzato tal quale, mentre nell'altro il mosto aveva un contenuto superiore a 5 mg/L, per cui per ottenere il campione di controllo (senza rame) il mosto è stato trattato con PVI-PVP (Diwine 2+/3+, Oenofrance) alla dose massima consentita (50 g/hl) e poi filtrato immediatamente con filtro GF/A (Whatman).

MOSTO1

ZUCCHERI	AZOTO AMMINICO	AZOTO AMMONIACALE	Cu
170 g/l	71 mg/l	13 mg/l	0.6 mg/L

MOSTO2

ZUCCHERI	AZOTO AMMINICO	AZOTO AMMONIACALE	Cu
199 g/l	21 mg/l	25 mg/l	1.5 mg/L

CEPPI DI LIEVITO

Nelle fermentazioni sono stati impiegati i seguenti ceppi commerciali:

	Casa produttrice	Nome ceppo	Specie dichiarata
1	FERMENTIS BY LESAFFRE	BC S103	<i>S. cerevisiae</i>
2	FERMENTIS BY LESAFFRE	HD T18	<i>S. cerevisiae</i>
3	FERMENTIS BY LESAFFRE	GV S107	<i>S. cerevisiae</i>
4	FERMENTIS BY LESAFFRE	HD A54	<i>S. cerevisiae</i>
5	FERMENTIS BY LESAFFRE	PR 106	<i>S. cerevisiae</i>
6	ERBSLOH	X-TREME	<i>S. cerevisiae</i>
7	ERBSLOH	FREDDO	<i>S. cerevisiae</i>
8	ANCHOR (EVER) MAURVIN	NT 116	<i>S. cerevisiae</i>
9	ANCHOR (EVER) MAURVIN	VIN 13	<i>S. cerevisiae</i>
10	LALLEMAND	ICV OPALE 2.0	<i>S. cerevisiae</i>
11	LALLEMAND	ICV OKAY	<i>S. cerevisiae</i>
12	LALLEMAND	EC 1118	<i>S. cerevisiae</i>
13	LALLEMAND	QA 23	<i>S. cerevisiae</i>
14	LALLEMAND	S (R&D)	<i>S. cerevisiae</i>
15	2B FERM	SAUVAGE	<i>S. cerevisiae</i>
16	2B FERM	ALBAFRIA	<i>S. cerevisiae</i>

ALLESTIMENTO DELLE FERMENTAZIONI

Ogni beuta da 200 ml è stata riempita con 150 ml di mosto. La reidratazione e l'inoculo dei vari ceppi di lievito nel mosto di ogni singola beuta è stato fatto rispettando le indicazioni e le dosi della casa produttrice riportate sulla scheda tecnica.

Preparazione degli inoculi:

Cepi	Mezzo di reidratazione	Tempo	Temperatura
T18, S107	H ₂ O	30 minuti	30°-35°C
S103, A54, 106	H ₂ O	20 minuti	T° ambiente
OPALE, OKAY, EC 1118, S	H ₂ O	20 minuti	35°-40°C
QA23	H ₂ O	30 minuti	37°C
X-TREME, FREDDO	50:50 H ₂ O mosto	20 minuti	37°-42°C
SAUVAGE, ALBA FRIA	50:50 H ₂ O mosto	15 minuti	30°-32°C
NT 116, VIN 13	H ₂ O	20 minuti	30°-35°C

Il dosaggio dell'inoculo è stato il medesimo per tutti i ceppi, corrispondente a 20 g/hl. Ogni ceppo di lievito è stato inoculato in 3 beute, così da ottenere 3 repliche per ceppo. Il numero totale di campioni prodotti è 196, divise equamente tra mosto 1 e mosto 2.

L'attivante utilizzato è il Fermaid E (Lallemand). Fermaid E è un nutriente contenente azoto ammoniacale, azoto organico e tiamina. È stato aggiunto a inizio della fermentazione alcolica, nel dosaggio di 0,3 g/l nel mosto 1 (per arrivare a 126 mg/l di APA totale) e 0,4 g/l (massimo limite consentito) nel mosto 2, che ci ha permesso di arrivare a 100 mg/l di APA totale.

Per le fermentazioni condotte in presenza di rame è stata aggiunta una soluzione di $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ in ogni beuta, per arrivare ad una concentrazione finale di 10 mg/l di rame totale.

Ogni beuta è stata chiusa mediante un apposito tappo in gommapiuma per poi essere conservata nell'incubatore alla temperatura costante di 18°C per tutto il periodo di fermentazione. Il tappo in gommapiuma evita la contaminazione da parte di altri microrganismi e permette la fuoriuscita della CO_2 prodotta ma non del vapore acqueo.



Fig. 3 - Beute del mosto 1 nell'incubatore

L'andamento della fermentazione è stato monitorato attraverso il calo in peso di ogni beuta dovuto alla fuoriuscita delle CO_2 . Le beute sono state pesate giornalmente. Quando per due giorni consecutivi il calo in peso era nullo, la fermentazione veniva considerata conclusa.

Per ogni ciclo di fermentazione, una replica è stata utilizzata come controllo: in essa non è stato inoculato nessun ceppo. Per una disponibilità strumentale di beute e incubatori le fermentazioni sono state suddivise in quattro momenti distinti con 49 fermentazioni in beuta ciascuno (controllo compreso).

CONTA MICROBICA DEL MOSTO

-WL: alle fine di verificare eventuali contaminazioni del mosto utilizzato ad ogni tornata di fermentazioni un campione di mosto di 15 ml è stato prelevato e diluito in 6 diluizioni seriali (1:10) in soluzione fisiologica (NaCl 0,9%) sterile. Le ultime tre diluizioni sono state seminate su mezzo di crescita WL all'interno di piastre di Petri.

ANALISI CHIMICHE

Analisi SO₂ libera e SO₂ totale

La solforosa libera e la solforosa totale sono state calcolate mediante analisi chimica in laboratorio con la metodica di Ripper-Schmidt. Per la solforosa libera, in un becher si mettono 20 ml di vino più 1 ml di acido solforico (H₂SO₄) 1:4 e alcune gocce di salda d'amido. Si titola con iodio N/40 fino al viraggio di colore a viola-blu.

Per la solforosa totale si mettono 20 ml di vino in un becher, si aggiungono 2 ml di idrossido di sodio 4N (NaOH) e si lascia agire per cinque minuti. Una volta passati cinque minuti si ripristina il pH acido con l'acido solforico, si apporta qualche goccia di salda d'amido e poi si titola con iodio fino al viraggio del colore viola-blu.

Analisi acetaldeide

Le analisi successive alle fermentazioni sono state eseguite per via enzimatica con analizzatore automatico I-Cubio della R-Biopharm, utilizzando il kit specifico per l'acetaldeide, e seguendo il protocollo forniti dalla casa produttrice. I campioni di vino da sottoporre ad analisi sono stati precedentemente prelevati dalle beute e centrifugati.

RISULTATI E DISCUSSIONE

CONTA MICROBICA DEL MOSTO

MOSTO 1

	(A) UFC/ml	(B) UFC/ml
Prelievo 1	$<10^2$	$<10^2$
Prelievo 2	$3,6 \times 10^3$	$3,8 \times 10^3$
Prelievo 3	10^3	$1,2 \times 10^3$

MOSTO 2

	(A) UFC/ml	(B) UFC/ml
Prelievo 1	2×10^4	$1,8 \times 10^4$
Prelievo 2	$4,5 \times 10^4$	3×10^4
Prelievo 3	$1,6 \times 10^4$	$1,7 \times 10^4$

I dati ottenuti accertano che la popolazione indigena presente in entrambi i mosti non era molto alta ($>10^4$ UFC/ml). In queste condizioni è possibile assumere con certezza che i lieviti secchi attivi della specie *Saccharomyces cerevisiae* inoculati nelle fermentazioni alla dose di 20 g/hl (corrispondenti a 2×10^6 UFC/ml) prendano il sopravvento nei confronti della popolazione indigena.

La popolazione microbica presente è tale da non creare problemi e ciò permette un pronto avvio della fermentazione dopo l'inoculo.

RISULTATI MOSTO 1

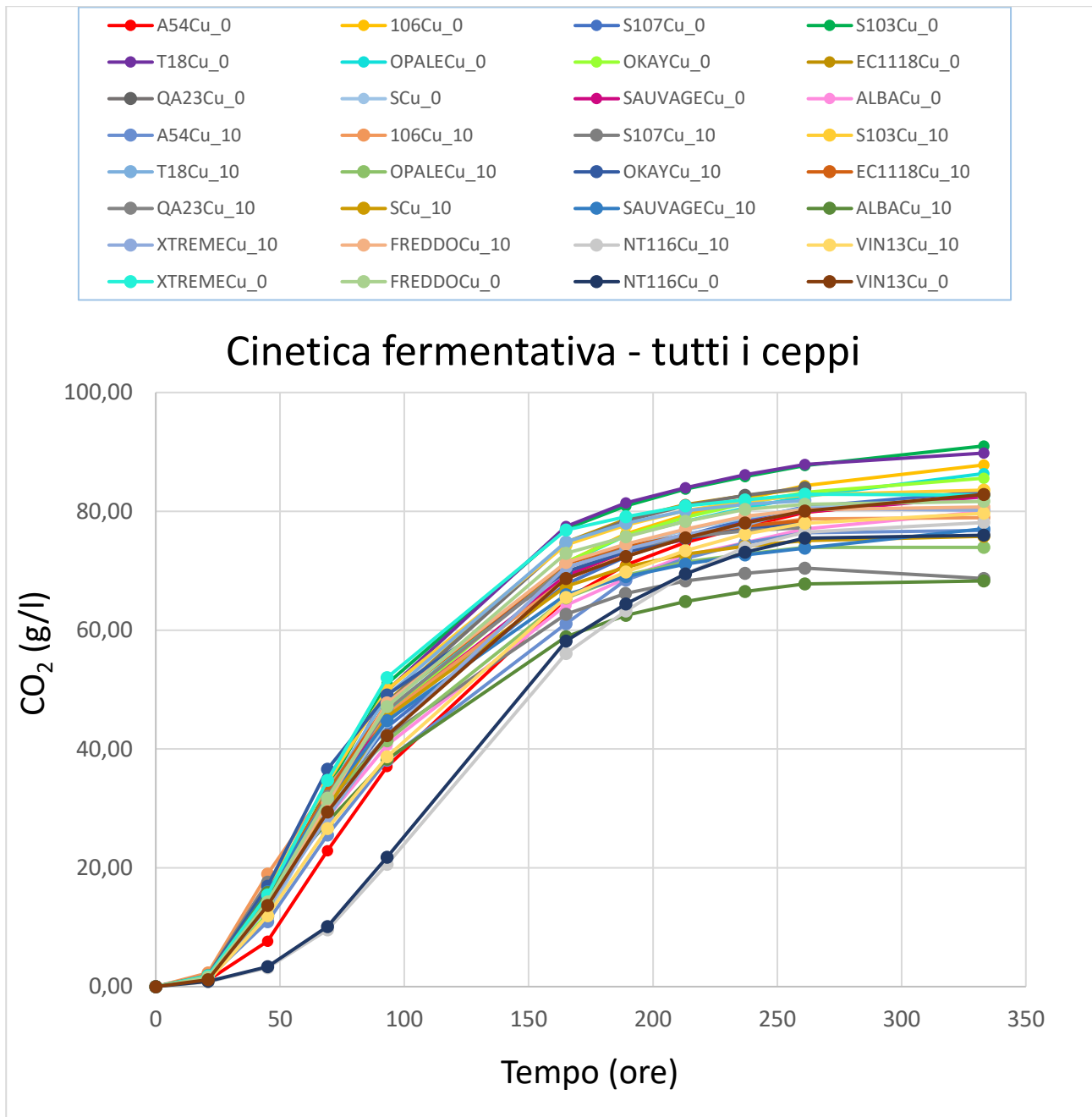


Fig. 4 – Cinetica fermentativa di tutti i ceppi con e senza l'aggiunta di rame

La produzione di CO₂ media per le fermentazioni condotte senza l'aggiunta di rame è stata di 83,9 g/l. Il ceppo con la maggior produzione di CO₂ è il 106 che ha prodotto 87,8 g/l. Quello che ne ha prodotta di meno è stato NT116, 75,98 g/l, l'unico ceppo che ha prodotto più CO₂ in presenza di rame (78,11 g/l). Nel caso delle fermentazioni avvenute in presenza di rame la produzione media di CO₂ è stata di 77,3 g/l, ciò comporta che molte di queste fermentazioni si sono interrotte prima di aver consumato tutti gli zuccheri presenti. Il ceppo che ha prodotto la maggior quantità di CO₂ con 83,57 g/l è stato S103. Il valore minimo di CO₂ è stato prodotto da Alba, 68,29 g/l.

Ceppi	CO ₂ prodotta senza rame (mg/l)	CO ₂ prodotta con rame (mg/l)
A54	82,73	76,78
106	87,80	78,93
S107	83,33	68,67
S103	91,00	83,57
T18	89,80	81,80
OPALE	86,36	73,93
OKAY	85,58	78,09
EC1118	83,80	78,47
QA23	83,98	77,27
S	82,38	75,80
SAUVAGE	82,47	77,07
ALBA	79,96	68,29
XTREME	82,73	80,18
FREDDO	81,67	80,73
NT116	75,98	78,11
VIN13	82,84	79,67

Tramite test t di Student è stato verificato che le medie di CO₂ prodotta con e senza rame sono significativamente diverse ad un livello di confidenza del 99,9%.

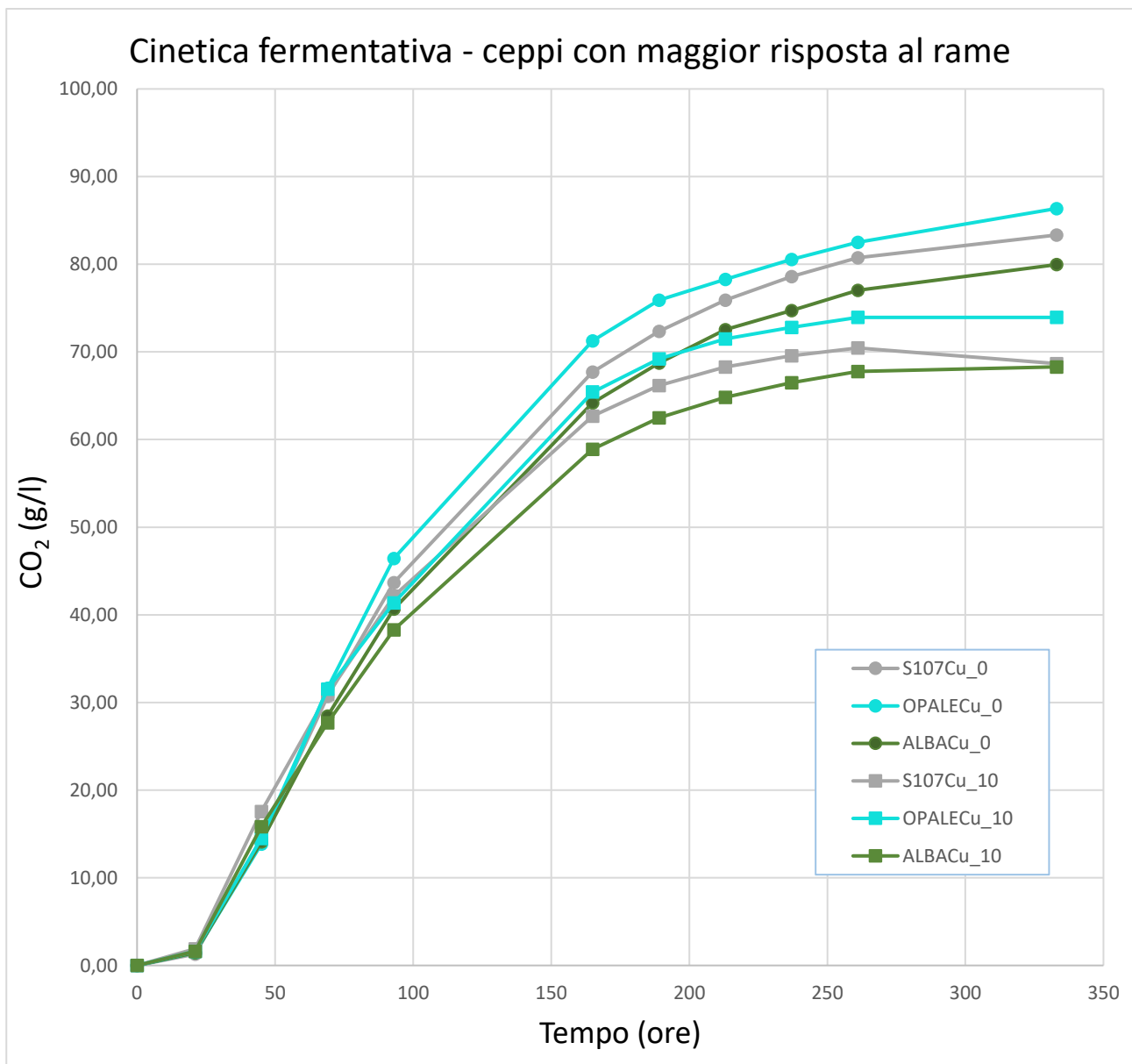


Fig. 5 – Cinetica fermentativa delle fermentazioni dei tre ceppi che hanno mostrato la maggior sensibilità al rame rispetto alla fermentazione senza aggiunta.

Analizzando i ceppi che hanno mostrato la maggiore sensibilità al rame (Fig. 5) la differenza media di produzione di CO₂ tra le fermentazioni con e senza rame è stata di 6,57 g/l. I ceppi di lievito S107, OPALE e ALBA nelle fermentazioni condotte con l'aggiunta di rame hanno prodotto rispettivamente 14,67, 12,42 e 11,67 g/l di CO₂ in meno rispetto alle fermentazioni senza rame. Questa differenza di produzione di CO₂ ha comportato che ha fine fermentazione il residuo zuccherino nel vino fosse rispettivamente di 30, 25,4 e 23,87 g/l.

L'acetaldeide è uno dei parametri che sono stati valutati nella tesi. I valori relativi ai risultati riscontrati nel mosto 1 sono riportati nel grafico 6.

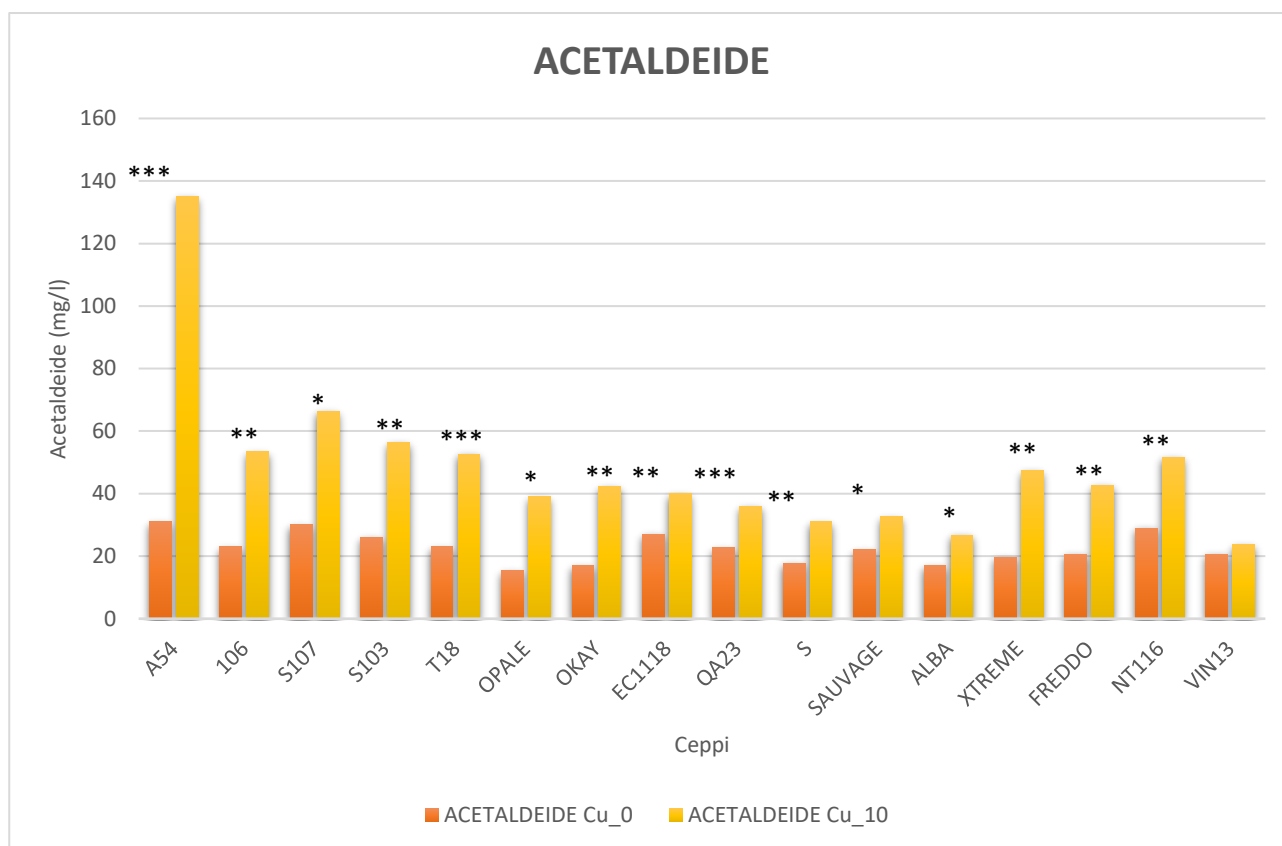


Fig. 6 – Produzione finale di acetaldeide di tutti i ceppi nelle fermentazioni condotte con e senza rame. (*) valori di acetaldeide significativamente diversi a un livello di confidenza del 95%. (**) valori di acetaldeide significativamente diversi a un livello di confidenza sia del 95% che del 99%. (***) valori di acetaldeide significativamente diversi a un livello di confidenza del 99,9%.

In questo caso tutti i ceppi hanno avuto una produzione di acetaldeide maggiore nelle fermentazioni avvenute in presenza di rame. Le produzioni medie di acetaldeide con e senza rame sono statisticamente significative a un livello di confidenza del 99,9%. Dai risultati emerge che il ceppo A54 ha avuto una produzione di acetaldeide nettamente maggiore nella fermentazione con rame: 135 mg/l di acetaldeide prodotta rispetto ai 31 mg/l della fermentazione senza rame, con una differenza di 104 mg/l. Questa differenza è significativamente più alta se comparata alla differenza media di produzione di acetaldeide di tutti gli altri ceppi: 21 mg/l (escludendo il ceppo A54). Il ceppo S107 che ha prodotto 14,67 g/l di CO₂ in meno in presenza di rame ha presentato anche il secondo valore di acetaldeide più alto dopo il ceppo A54, pari a 66 mg/l (rispetto ai 30 mg/l in assenza di rame).

Sui campioni è stata eseguita anche l'analisi della SO₂ libera e totale (Fig. 7) con lo scopo di cercare una possibile relazione tra acetaldeide, SO₂ e rame, i primi due composti entrambi prodotti dai lieviti durante la fermentazione alcolica. La forte affinità tra SO₂ e acetaldeide è riconosciuta (Peynaud, 1984; Romano & Suzzi, 1993; Zoecklein et al., 1995; Boulton et al., 1996; Somers, 1998), così come l'affinità del rame per i composti

solforati (Clark et al., 2015; Bekker et al., 2016) ma le informazioni riguardanti la produzione di queste molecole da parte del lievito in relazione alla presenza di rame sono ancora poche.

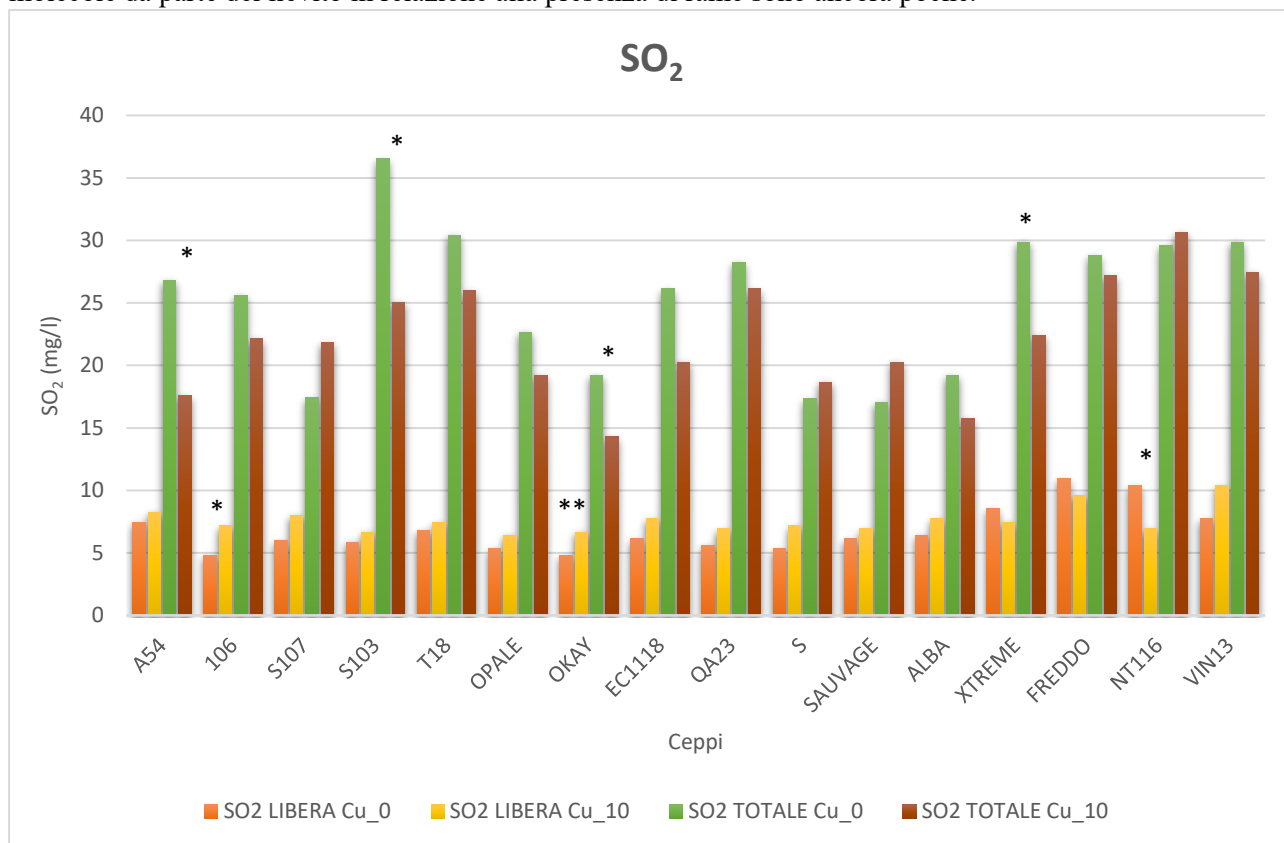


Fig. 7 – Produzione di SO₂ libera e totale di tutti i ceppi nelle fermentazioni del mosto 1 condotte con e senza rame. (*) valori di SO₂ (libera e/o totale) significativamente diversi a un livello di confidenza del 95%. (**) valori di SO₂ (libera e/o totale) significativamente diversi a un livello di confidenza sia del 95% che del 99%.

Dalle analisi è emersa una leggera maggior produzione di SO₂ libera nelle fermentazioni condotte con rame: in media sono stati prodotti 7,6 mg/l di SO₂ libera rispetto ai 6,8 mg/l delle fermentazioni senza rame; tuttavia, le medie non sono statisticamente significative. Viceversa, la quantità di SO₂ totale prodotta è stata maggiore nelle fermentazioni prive di rame: 25,30 mg/l rispetto ai 22,19 mg/l prodotti in presenza di rame. Anche per la SO₂ totale, però, le differenze nelle medie non sono statisticamente significative, inoltre nei ceppi S107, S, Sauvage e NT116 si è verificato il contrario: la produzione di SO₂ totale è maggiore nelle fermentazioni con rame. Il ceppo A54, che in presenza di rame ha prodotto 135 mg/l di acetaldeide, ha mostrato dei livelli di SO₂ libera e SO₂ totale rispettivamente di 8,3 e 17,6 mg/l, valori vicini alla produzione media di SO₂ di tutti i ceppi.

Con una maggiore produzione di acetaldeide ci saremmo aspettati anche una maggiore presenza di anidride solforosa combinata, proprio grazie all'elevata affinità tra i due composti. Ma in effetti, mentre è ben noto che la produzione di acetaldeide può essere una risposta del lievito per difendersi dalla tossicità della anidride solforosa (Li e Mira de Orduña, 2017), non è ancora stato provato il meccanismo contrario, anche se è stato dimostrato che l'esposizione del lievito ad alti livelli di acetaldeide attiva alcuni dei geni coinvolti nel

metabolismo dello zolfo (Aranda e del Olmo, 2004), suggerendo che la produzione di solfiti o di aminoacidi solforati possa essere un meccanismo di detossificazione da un eccesso di acetaldeide. Come già accennato, la capacità del rame di complessare i composti solforati è ben nota, e questa proprietà potrebbe costituire una sorta di competizione nel legame tra SO₂ e acetaldeide. Se la produzione di acetaldeide è maggiore nelle fermentazioni con rame, è altresì vero, come mostrato dai risultati, che la SO₂ totale non mostra differenze significative tra i due trattamenti. Il maggior contenuto di acetaldeide risultante dalle analisi potrebbe essere dovuto ai meccanismi di difesa utilizzati dal lievito per contrastare il rame e all'alterazione del normale rapporto tra acetaldeide e SO₂.

RISULTATI MOSTO 2

Lo stesso esperimento è stato ripetuto su un secondo mosto, per verificare la ripetibilità dei risultati e valutare l'incidenza della composizione del mezzo sulla risposta dei lieviti. Il secondo mosto è stato ottenuto dalla stessa varietà del primo (Glera) e come si può osservare dalle analisi riportate in Materiali e Metodi, è leggermente più ricco di zuccheri ma allo stesso tempo più povero di nutrimento azotato. Per questo motivo è stata fatta una correzione con attivante complesso più marcata rispetto al primo mosto, ma considerando il limite di legge di 40 g/hl per l'attivante utilizzato, il secondo mosto è comunque risultato meno bilanciato per quanto riguarda il rapporto zuccheri/azoto. Un'altra differenza è legata al fatto che il secondo mosto risultava già in partenza con un contenuto di rame superiore a 5 mg/L, situazione che non avrebbe permesso di eseguire le fermentazioni di controllo (= senza rame). Per questo motivo il mosto è stato preventivamente trattato con PVI/PVP, un polimero con capacità di rimuovere i metalli dal vino, portando i livelli di rame a 1.5 mg/L, che si può considerare un livello sufficientemente basso per poter considerare il mosto "povero" di rame.

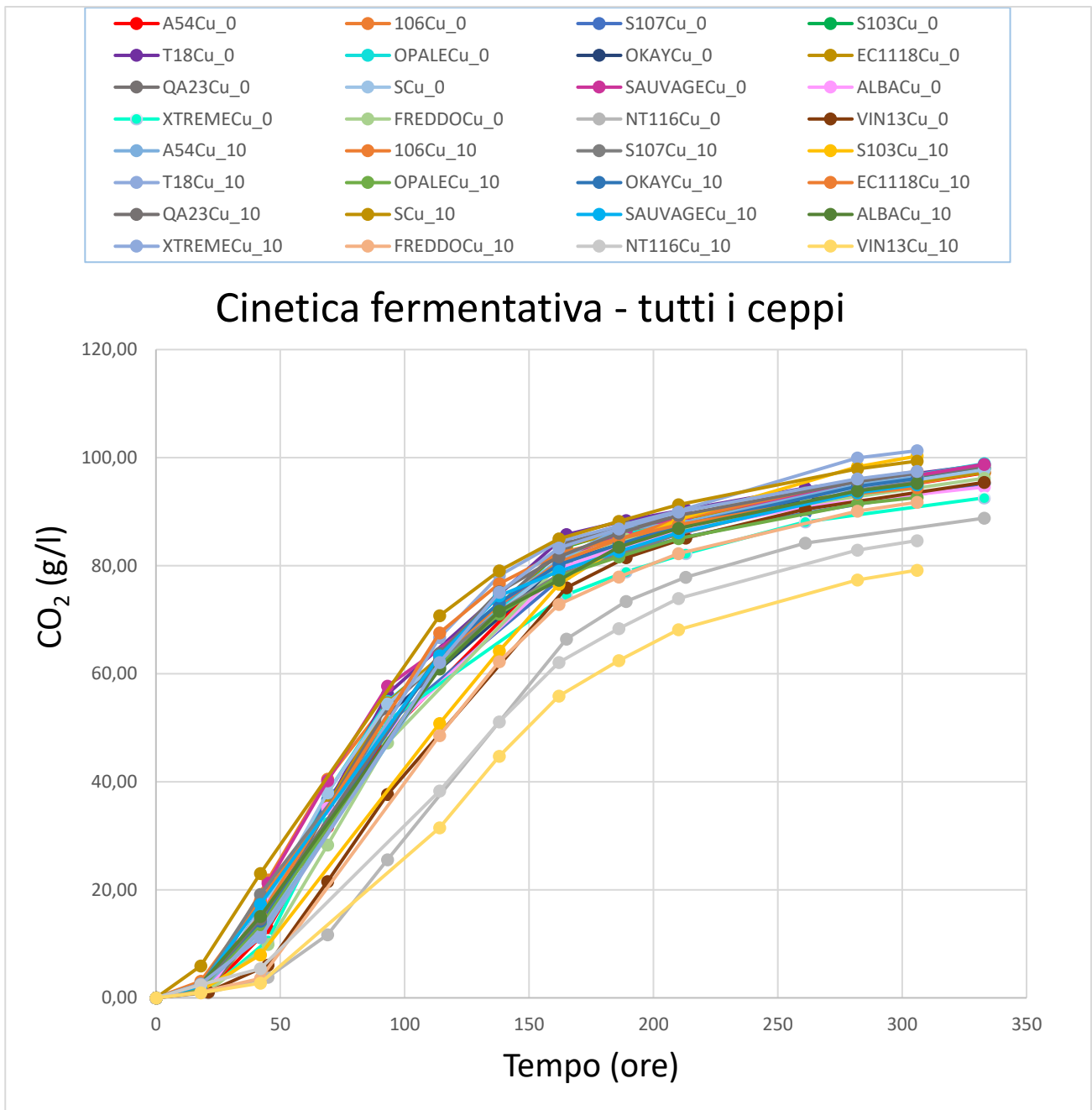


Fig. 8 – Cinetica fermentativa di tutti i ceppi con e senza l'aggiunta di rame.

La produzione di CO₂ media per le fermentazioni senza rame è stata di 96,44 g/l. La maggior quantità di CO₂ è stata prodotta dal ceppo OPALÉ, 98,89 g/l. Quello che ne ha prodotta di meno è stato invece NT116, 88,8 g/l. La produzione di CO₂ media per le fermentazioni Cu₁₀ è stata 94,63 g/l. Il ceppo T18 ha prodotto la maggior quantità di CO₂, 101,29 g/l. I valori minimi di CO₂ sono stati prodotti da VIN13 e NT116: rispettivamente 79,17 g/l e 84,64 g/l. Le differenze delle medie di CO₂ prodotte con e senza rame in questo secondo esperimento non sono risultate statisticamente significative. Questo dimostra come il mezzo possa influenzare la risposta dei lieviti: il maggior contenuto di zuccheri associato ad un minor contenuto di azoto

potrebbe avere creato una situazione aggiuntiva di stress per i lieviti rispetto al primo mosto, rendendo la presenza di rame meno impattante sul metabolismo dei lieviti stessi.

Anche in questo secondo caso è stata fatta un'analisi dei vini ottenuti a fine fermentazione. L'analisi dell'acetaldeide, nonostante non fossero presenti differenze significative sulla produzione di CO₂, ha confermato una maggiore produzione di questo metabolita in presenza di rame.

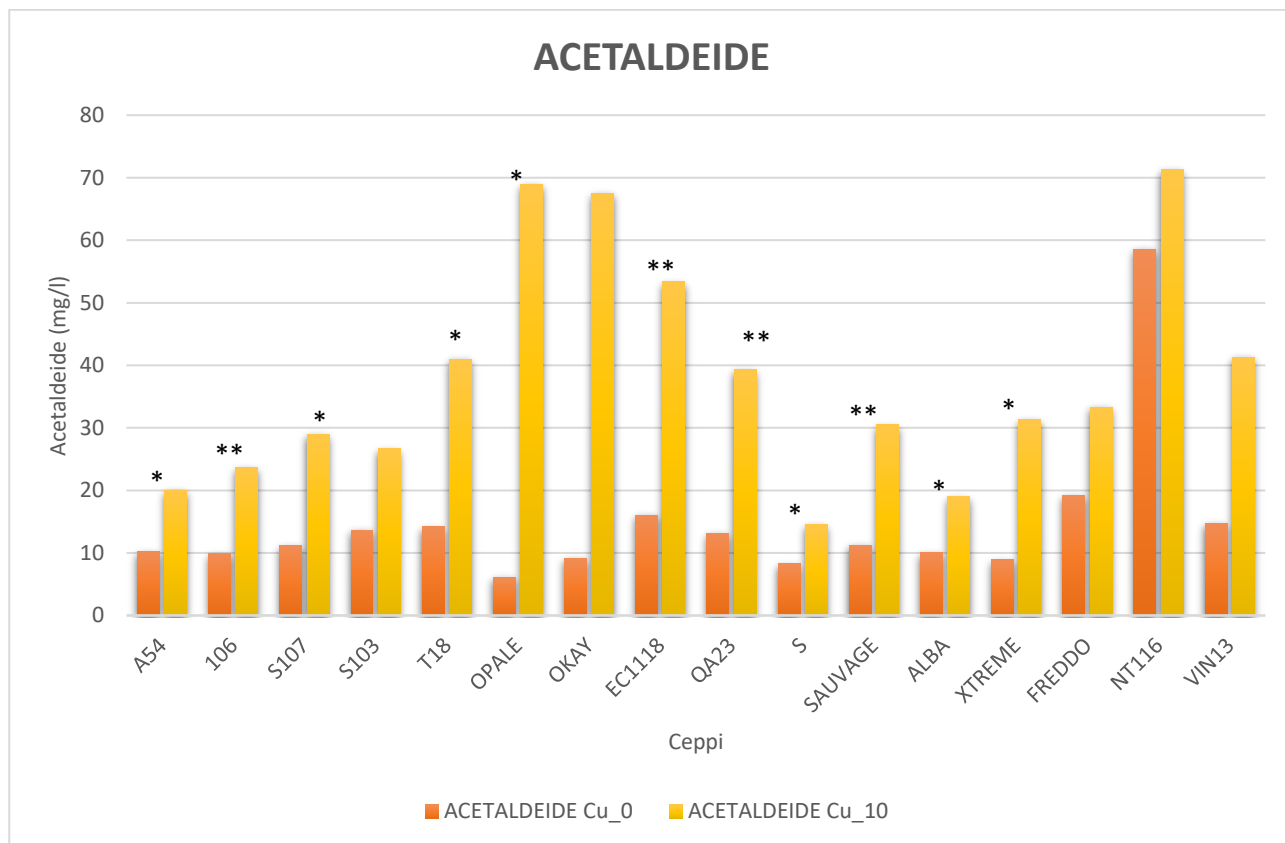


Fig. 9 – Produzione finale di acetaldeide di tutti i ceppi nelle fermentazioni del mosto 2 condotte con e senza rame. (*) valori di acetaldeide significativamente diversi a un livello di confidenza del 95%. (**) valori di acetaldeide significativamente diversi a un livello di confidenza sia del 95% che del 99%.

La produzione media di acetaldeide è risultata infatti pari a 14,66 mg/l nelle fermentazioni senza rame, mentre nelle fermentazioni Cu_10 è stata di 38,18 mg/l, con una differenza statisticamente significativa ($p < 0.01$). NT116 è stato il ceppo che in entrambe le fermentazioni ha prodotto il quantitativo di acetaldeide maggiore: 58,67 mg/l senza rame e 71,3 mg/l con rame. Osservando il grafico relativo alla cinetica fermentativa, NT116 è il ceppo che ha consumato meno zuccheri in assoluto nella fermentazione Cu_0, e nelle fermentazioni Cu_10 l'andamento è analogo assieme a VIN13. Il valore di acetaldeide del ceppo VIN13 che in presenza di rame ha prodotto la minor quantità di CO₂ è anch'esso sopra la media. Il ceppo S, invece, che in presenza di rame ha prodotto 99,36 g/l di CO₂, uno dei valori più alti, è quello con la minor produzione di acetaldeide nelle fermentazioni Cu_10.

Questi dati sembrerebbero quindi evidenziare, come prevedibile, una relazione negativa tra vigore fermentativo e produzione di acetaldeide: in altre parole, i lieviti che risentono meno dello stress e che riescono quindi a completare meglio la fermentazione sarebbero anche quelli con la minore produzione di acetaldeide.

Anche in questo secondo esperimento è stata misurata la anidride solforosa libera e totale.

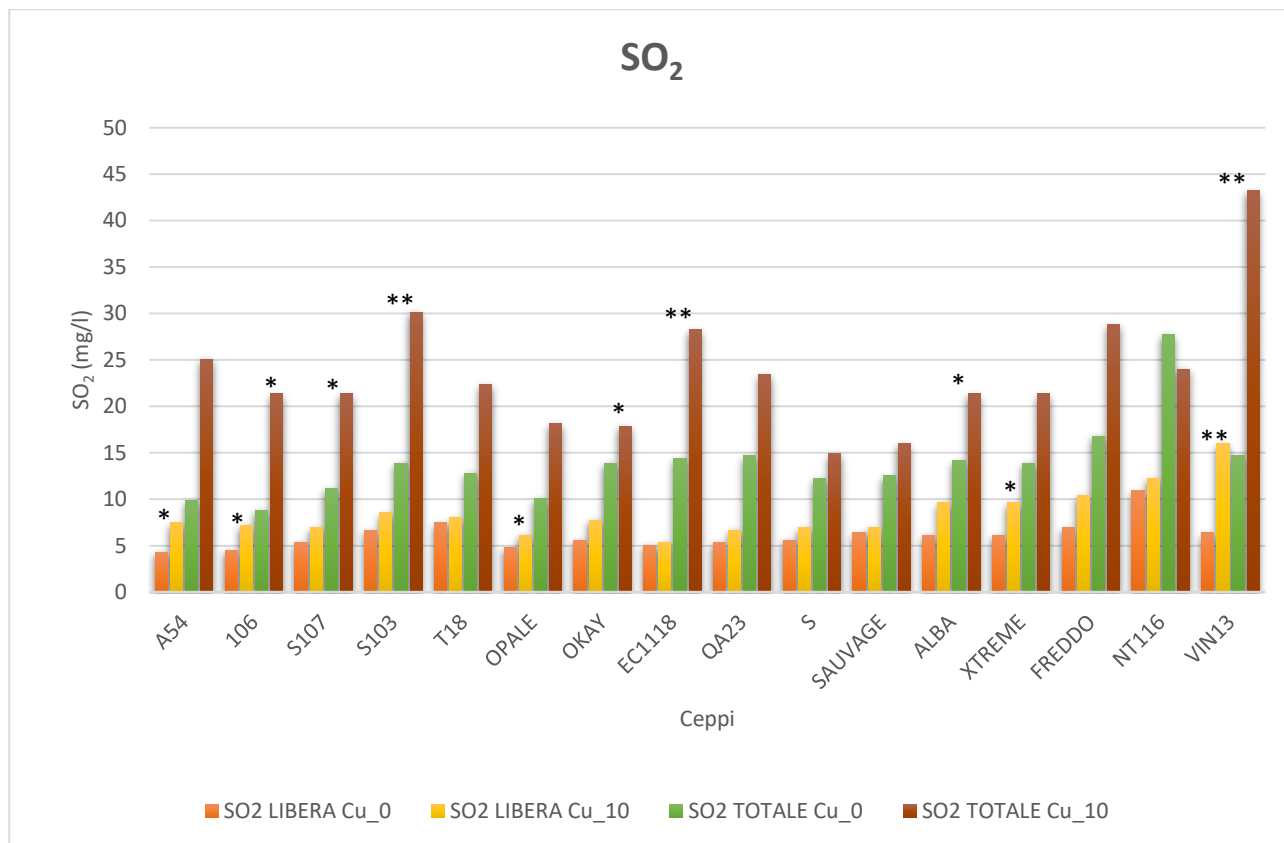


Fig. 10 – Produzione di SO₂ libera e totale di tutti i ceppi nelle fermentazioni del mosto 2 condotte con e senza rame. (*) valori di SO₂ (libera e/o totale) significativamente diversi a un livello di confidenza del 95%. (**) valori di SO₂ (libera e/o totale) significativamente diversi a un livello di confidenza sia del 95% che del 99%.

In questo caso sia la produzione di SO₂ libera che quella della totale sono risultate superiori nelle fermentazioni Cu_10 (p<0.1 e p<0.01, rispettivamente). La produzione media di SO₂ libera è stata di 6,1 mg/l in assenza di rame e 13,5 mg/l in presenza di rame. Allo stesso tempo, la SO₂ totale prodotta nelle fermentazioni con rame è circa il triplo (23,6 mg/l) di quella prodotta senza rame (8,4 mg/l). Il ceppo VIN13 ha prodotto 43,2 mg/l di SO₂ totale, ben oltre la media prodotta da tutti i ceppi. VIN13 è anche il ceppo che ha prodotto la quantità minore di CO₂ in presenza di rame e presenta valori di acetaldeide sopra la media. I ceppi OPALE e OKAY con alti valori di acetaldeide nelle fermentazioni Cu_10, hanno mostrato valori di SO₂ libera e totale nella media, confermando anche in questo secondo caso che non sembra esistere una relazione tra presenza di rame, acetaldeide e solforosa.

CONCLUSIONI

Come osservato nei grafici mostrati precedentemente, la cinetica fermentativa relativa ai due mosti ha presentato delle differenze. Se nel mosto 1 le fermentazioni Cu_0 hanno prodotto in media 6,57 g/l in più delle Cu_10, ciò non si è verificato nel mosto 2 dove questa differenza è risultata molto inferiore e non significativa. Nel mosto 2, infatti, alcuni ceppi hanno prodotto di fatto la stessa quantità di CO₂ in entrambe le condizioni, come il ceppo 106, e addirittura in altri ceppi come XTREME, T18 e S103 la produzione di CO₂ nella fermentazione Cu_10 è stata maggiore. Confrontando i due mosti, si può osservare che i ceppi S107, OPALE e ALBA che nel mosto 1 sono stati considerati più sensibili al rame per la marcata differenza di produzione di CO₂ tra le fermentazioni Cu_0 e Cu_10 (Figura 5) non hanno avuto lo stesso risultato nel mosto 2. Al contrario VIN 13 è l'unico ceppo che fermentando in presenza di rame nel mosto 2 ha avuto una diminuzione nella produzione di CO₂ di 16,26 g/l, mentre nel mosto 1 aveva mostrato una cinetica di fermentazione meno influenzata dal rame rispetto ad altri ceppi. Questo chiaramente conferma come ceppi diversi possano essere influenzati in maniera differente dalla composizione del mezzo di crescita, basti solo pensare al fatto che esistono ceppi con minori o maggiori esigenze di azoto, che potrebbero evidentemente avere delle performances diverse nei due mosti utilizzati in questo studio.

Nonostante questo aspetto, i valori di acetaldeide ottenuti dalle analisi hanno mostrato un andamento chiaro: la presenza del rame in fermentazione ha aumentato la produzione di acetaldeide da parte dei lieviti in tutti e due i mosti. Nel dettaglio, però, come prevedibile, non tutti i ceppi hanno reagito allo stesso modo: dai grafici emerge che la differenza di acetaldeide prodotta con e senza rame è maggiore nel ceppo A54 nel mosto 1 e nei ceppi OPALE, OKAY, EC1118 e NT116 nel mosto 2. È stato però possibile anche individuare dei ceppi che tendenzialmente sono risultati dei bassi produttori di acetaldeide sia in assenza che in presenza di rame in entrambi i mosti, si tratta in particolare dei ceppi S e ALBA.

Saranno ovviamente necessari degli ulteriori studi per confermare questi risultati, ma questi due ceppi mostrano delle buone potenzialità per poter essere utilizzati in mosti "difficili" caratterizzati da contaminazioni di rame sopra la media.

Per quanto riguarda la produzione di anidride solforosa da parte dei lieviti in relazione al contenuto di rame, è un altro aspetto che merita ulteriori indagini e che potrebbe aiutare a capire meglio il meccanismo di resistenza di alcuni ceppi di lievito nei confronti del rame.

BIBLIOGRAFIA

- A. Cavazza, R. Guzzon, M. Malacarne & R. Larcher (2013). The influence of the copper content in grape must on alcoholic fermentation kinetics and wine quality. A survey on the performance of 50 commercial Active Dry Yeasts.
- Aranda, A. & del Olmo, M. (2004). Exposure of *Saccharomyces cerevisiae* to Acetaldehyde Induces Sulfur Amino Acid Metabolism and Polyamine Transporter Genes, Which Depend on Met4p and Haa1p Transcription Factors, Respectively. *Appl Environ Microbiol.* 2004 Apr; 70(4): 1913–1922.
- Araya, M., Olivares, M., Pizarro, F., Gonzalez, M., Speisky, H., & Uauy, R. (2003). Copper exposure and potential biomarkers of copper metabolism. *BioMetals*, 16, 199–204.
- Avery, S. V., D. Lloyd, & Harwood, J.L., (1995). Temperature-dependent changes in plasma-membrane lipid order and the phagocytotic activity of the amoeba *Acanthamoeba castellanii* are closely correlated. *Biochem. J.* 312, 811–816.
- Baker DE. Copper. In: Alloway BJ. (ed.) *Heavy Metals in Soils*. Glasgow: Blackie and Son Ltd, (1990). p151-175.
- Bakker, J. (1986). HPLC of anthocyanins in port wines; determination of aging rates. *Vitis*, 25, 203–214.
- Bakker, J., Picinelli, A. & Bridle, P. (1993). Model wine solutions: colour and composition changes during ageing. *Vitis*, 32, 111–118.
- Ballabio C., Panagos P., Lugato E., Huang J., Orgiazzi A., Jones A., Fernández-Ugalde O., Borrelli P., Montanarella L. (2018) Copper distribution in European topsoils: An assessment based on LUCAS soil survey.
- Baranowski, E.S. & Nagel, C.W. (1983). Kinetics of malvidin-3-glucoside condensation in wine model systems. *Journal of Food Science*, 48 (419–421), 429.
- Bauer FF & Pretorius IS, (2000). Yeast stress response and fermentation efficiency: how to survive the making of wine-a review. *S Afr J Enol Vitic* 21:27–51.
- Bekker, M.Z; Mierczynska-Vasilev, A.; Smith, P.A. & Wilkes, E.N. (2016). The effects of pH and copper on the formation of volatile sulfur compounds in Chardonnay and Shiraz wines post-bottling. *Food Chemistry* Volume 207, 15 September 2016, Pages 148-156.
- Bennetzen, J. and Hall, B.D. (1982). The primary structure of *S. cerevisiae* gene for alcohol dehydrogenase I. *J. Biol. Chem.* 257, 3018-3025.
- Berg, H.W., Filipello, F., Hinreiner, E. & Webb, A.D. (1955). Evaluation of thresholds and minimum difference concentrations for various constituents of wines. I. Water solutions of pure substances. *Food Technology*, 9, 23–26.
- Bisson, LF, (1999). Stuck and sluggish fermentations. *Am J Enol Vitic* 50: 107–119.

- Boudreau, TF, Peck, GM, O'Keefe, SF & Stewart, AC, (2017). L'effetto interattivo di residui fungicidi e azoto assimilabile dai lieviti sulla cinetica di fermentazione e sulla produzione di acido solfidrico durante la fermentazione del sidro. *J. Sci. Agroalimentare* 97 (2), 693–704.
- Boulton, R.B., Singleton, V.L., Bisson, L.F. & Kunkee, R.E. (1996). *Principles and Practices of Winemaking*. Pp. 136–137, 448–473. New York: Chapman & Hall.
- Butnario, M. & Butu, A. (2019). The Evolution and the Development Phases of Wine. *Alcoholic Beverages Volume 7: The Science of Beverages 2019* (pp.303-345) Edition: 1st Edition.
- Casali, C. A., D. F. Moterle, D. D. Rheinheimer, G. Brunetto, A. L. M. Corcini, J. Kaminski, G. W. B. de Melo, (2008). Copper forms and desorption in soils under grapevine in the serra gaucha of Rio Grande do Sul. *Revista Brasileira de Ciencia do Solo*, 32: 1479-1487.
- Casalone E, Colella CM, Daly S, Gallori E, Moriani L, Polsinelli M (1992). Mechanism of resistance to sulfite in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* 22, 435-440
- Ciani, M., Domizio, P. & Mannazzu, I. (2008). Impact of mother sediment on yeast growth, biodiversity, and ethanol production during fermentation of Vinsanto wine. *International Journal of Food Microbiology* 129(1):83-7.
- Clark, A.C.; Grant-Preece, P.; Cleghorn, N. & Scollary, G.R. (2015). Copper(II) addition to white wines containing hydrogen sulfide: Residual copper concentration and activity. *Aust. J. Grape Wine Res.* 2015, 21, 30–39.
- Delfini, C. & Costa A. (1993). Effects of the grape must lees and insoluble materials on the alcoholic fermentation rate and the production of acetic acid, pyruvic acid, and acetaldehyde. *Am. J. Enol. Vitic.* 44, 86-92.
- Delfini, C. & Morsiani, M.G. (1992). Resistance to sulfur dioxide of malolactic strains of *Leuconostoc oenos* and *Lactobacillus* sp. isolated from wines. *Sciences Des Aliments*, 12, 493–511.
- Delfini, C. & Morsiani, M.G. (1993). Study on the resistance to sulfur dioxide of malolactic strains of *Leuconostoc oenos* and *Lactobacillus* sp. *FEMS Microbiological Reviews*, 12 (1–3), 163.
- Divol B, Miot-Sertier C, Lonvaud-Funel A (2006) Genetic characterization of strains of *Saccharomyces cerevisiae* responsible for 'refermentation' in Botrytis-affected wines. *J Appl Microbiol* 100, 516–526.
- El Bilali, H., I. Pertot & V. Simeone, (2005). Copper use reduction in the Mediterranean environment for the Management of *Plasmopara viticola* in organic vineyards. Msc Thesis.
- Fernandez-Calviño, D., J. A. Rodriguez-Suarez, E. Lopez-Periago, M. Arias-Estevez & J. Simal-Gandara, (2008). Copper content of soils and river sediments in a winegrowing area, and its distribution among soil or sediment components. *Geoderma*, 145: 91-97.

- Ferreira, J., Toit, M., Toit, J., Toit, M., & Toit, W. (2006). The effects of copper and high sugar concentrations on growth, fermentation efficiency and volatile acidity production of different commercial wine yeast strains. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 12, 50–56.
- Fornachon, J.C.M. (1963). Inhibition of certain lactic acid bacteria by free and bound sulphur dioxide. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 14, 857–862.
- García-Esparza, M., Capri, E., Pirzadeh, P., & Trevisan, M. (2006). Copper content of grape and wine from Italian farms. *Food Additives and Contaminants*, 233, 274–280.
- Hansen EH, Nissen P, Sommer P, Nielsen JC & Arneborg N, (2001). The effect of oxygen on the survival of non-Saccharomyces yeasts during mixed culture fermentations of grape juice with *Saccharomyces cerevisiae*. *J Appl Microbiol* 91:541–547.
- Hatzidimitriou, E., P. Bouchilloux, P. Darriet, Y. Bugaret, M. Clerjeau, C. Poupot, B. Medina & D. Dubourdiou, (1996). Incidence d'une protection viticole anticryptogamique utilisant une formulation cuprique sur le niveau de maturite et l'arome varietal des vins de Sauvignon. Bilan de trois annees d experimantation. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*, 30: 133-150.
- Hazel, J. R., & E. E. Williams. (1990). The role of alterations in membrane lipid composition in enabling physiological adaptation of organisms to their physical environment. *Prog. Lipid Res.* 29, –227.
- Henschke, P.A. & Jiranek, V. (1993). Yeasts – metabolism of nitrogen compounds. In: *Wine Microbiology and Biotechnology* (edited by G.H. Fleet). Pp. 77–164. Amsterdam: Harwood Academic Publishers.
- Herraiz, T., Martin-Alvarez, P.J., Reglero, G., Herraiz, M. & Cabezudo, M.D. (1989). Differences between wines fermented with and without SO₂ using various selected yeasts. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 49, 249–258.
- Hood, A. (1983). Inhibition of growth of wine lactic-acid bacteria by acetaldehyde-bound sulphur dioxide. *The Australian Grapegrower & Winemaker*, April, Pp., 34, 37–38, 40, 42–43.
- Jiang W, Liu D, Liu X. Effects of copper on root growth, cell division, and nucleolus of *Zea mays*. *Biologia Plantarum* 2001; 44(1): 105-109.
- Jurd, L. (1969). Review of polyphenol condensation reactions and their possible occurrence in the aging of wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 20, 191–195.
- Keenan, M. H. J., A. H. Rose, & B. W. Silverman, (1982). Effect of plasmamembrane phospholipid unsaturation on solute transport into *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 366. *J. Gen. Microbiol.* 128, 254–255.
- Komarek, M., Cadkova, E., Chrastny, V., Bordas, F. & Bollinger, J-C. Contamination of vine- yard soils with fungicides: A review of environmental and toxicological aspects. *En- vironment International* 2010; 36: 138–151.

- Lafon-Lafourcade, S. (1975). Factors of the malo-lactic fermentation of wines. In: *Lactic Acid Bacteria in Beverages and Food* (edited by J.G. Carr, C.V. Cutting & G.C. Whiting). Pp. 43–53. London: Academic Press.
- Lafon-Lafourcade, S. (1985). Role des microorganismes dans la formation de substances combinant le SO₂. *Bull. Off. Int. Vigne Vin* 58, 590-604.
- Liu S-Q, Pilone GJ (2000). An overview of formation and roles of acetaldehyde in winemaking with emphasis on microbiological implications. *Int J Food Sci Technol* 35, 49–61
- Longo, E., Velazquez, J.B., Sieiro, C., Cansado, J., Calo P. & Villa, T.G. (1992). Production of higher alcohols, ethyl acetate, acetaldehyde and other compounds by 14 *Saccharomyces cerevisiae* wine strains isolated from the same region (Salnés, N.W. Spain). *World J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 8, 539-541.
- Mantovi, P, G. Bonazzi, E. Maestriand N. Marmiroli, (2003). Accumulation of copper and zinc from liquid manure in agricultural soils and crop plants. *Plant and Soil*, 250: 249–257.
- Matta, A., Buonario, R., Favaron, F., Scala, A., Scala, F., (2017). *Fondamenti di patologia vegetale*, 9, 161-162.
- Mira de Orduña, R., (2017). Acetaldehyde kinetics of enological yeast during alcoholic fermentation in grape must. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 44 (2), 229–236.
- Miyake, T. & Shibamoto, T. (1993). Quantitative analysis of acetaldehyde in foods and beverages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41, 1968–1970.
- Naughton, D., & Petróczi, A. (2008). Heavy metal ions in wines: Meta-analysis of target hazard quotients reveal health risks. *Chemistry Central Journal*, 3, 1–7.
- Northcote KH., (1988). Soils and Australian viticulture. In: Coombe BG, Dry PR. (eds.) *Viti- culture Volume 1: Resources*. Adelaide South Australia: Winetitles.
- Nykanen, L. (1986). Formation and occurrence of flavor compounds in wine and distilled alcoholic beverages. *American Journal of Enology and Viticulture*, 37, 84–96.
- Peynaud, E. (1984). *Knowing and Making Wine*. Pp. 266–274. New York: John Wiley & Sons [English translation].
- Pilkington, B. & Rose, A.H. (1988). Reactions of *Saccharomyces cerevisiae* and *Zygosaccharomyces bailii* to sulphite. *Journal of General Microbiology*, 134, 2823–2830.
- Ribéreau-Gayon, J., Peynaud, E. & Lafon, M. (1956). Investigations on the origin of secondary products of alcoholic fermentation. *American Journal of Enology and Viticulture*, 7, 53–61.
- Ribéreau-Gayon, P., Pontallier, P. & Glories, Y. (1983). Some interpretations of colour changes in young red wines during their conservation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 34, 505–516.

- Robinson, N., & Winge, D. (2010). Copper metallochaperones. *Annual Review of Biochemistry*, 79, 537–562.
- Romano, P. & Suzzi, G. (1993). Sulfur dioxide and wine microorganisms. In: *Wine Microbiology and Biotechnology* (edited by G.H. Fleet). Pp. 373–393. Amsterdam: Harwood Academic Publishers.
- Romano, P., Suzzi, G., Turbanti, L. & Polsinelly, M. (1994). Acetaldehyde production in *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts. *FEMS Microbiology Letters*, 118, 213–218.
- Romić, M., Matijević, L., Bakić, H., & Romić, D., (2013 2014). Copper Accumulation in Vineyard Soils: Distribution, Fractionation and Bioavailability Assessment. *IntechOpen*, 28, 800-825.
- Schopfer, J.F. & Aerny, J. (1985). Role of sulphur dioxide in vinification. *Bull. Off. Int. Vigne Vin* 58, 515-542.
- Schreier, P. (1979) Flavor composition of wines: a review. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 12, 59-111.
- Singh, R.S., (2000). *Diseases of Fruit Crops*. Science Publishers, Enfield, New Hampshire.
- Somers, T.C. & Wescombe, L.G. (1982). Red wine quality: the critical role of SO₂ during vinification and conservation. *The Australian Grapegrower & Winemaker*, April, 68, 70, 72, 74.
- Somers, T.C. (1972). The nature of colour in wines. *Food Technology in Australia*, 24, 10–12.
- Somers, T.C. (1998). *The Wine Spectrum: an approach towards objective definition of wine quality*. Pp. 80–87. Adelaide, Australia: Winetitles.
- Stratford, M., Morgan, P. & Rose, A.H. (1987). Sulphur dioxide resistance in *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces ludwigii*. *Journal of General Microbiology*, 133, 2173–2179.
- Sun, X. Y., Liu, L. L., Zhao, Y., Ma, T. T., Zhao, F., Huang, W. D., & Zhan, J. C. (2016). Effect of copper stress on growth characteristics and fermentation properties of *Saccharomyces cerevisiae* and the pathway of copper adsorption during wine fermentation. *Food Chemistry*, 192, 43–52.
- Sun, X. Y., Zhao, Y., Liu, L. L., Jia, B., Zhao, F., Huang, W. D., & Zhan, J. C. (2015). Copper tolerance and biosorption of *Saccharomyces cerevisiae* during alcoholic fermentation. *PLOS ONE*.
- Tamasi, G., Pagni, D., Carapelli, C., Justice, N., & Cini, R. (2010). Investigation on possible relationships between the content of sulfate and selected metals in Chianti wines. *Journal of Food Composition and Analysis*, 23, 333–339.
- Timberlake, C.F. & Bridle, P. (1976). Interactions between anthocyanins, phenolic compounds, and acetaldehyde and their significance in red wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 27, 97–105.
- Timberlake, C.F. & Bridle, P. (1977). Anthocyanins: colour augmentation with catechin and acetaldehyde. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 28, 539–544.

- Tominaga, T., C. Pyrot des Gachons & D. Dubourdieu, (1998). A new type of flavor precursors in *Vitis Vinifera* L. cv. Sauvignon Blanc: S-cysteine conjugates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46: 5215-5219.
- Turnlund, J., Jacob, R., Keen, C., Strain, J., Kelley, D., Domek, J., Keyes, W., Ensunsa, J., Lykkesfeldt, J. & Coulter, J. (2004). Long-term high copper intake: Effects on indexes of copper status, antioxidant status, and immune function in young men. *American Journal of Clinical Nutrition*, 79, 1037–1044.
- Van Rhee, J. A., (1967). Development of earthworm populations in orchard soils. In: O. Graff, J. Satchell (Editors). *Progress in Soil Biology*, North Holland Publishing Company, Amsterdam, pp. 360-371.
- Volpe, M., Cara, F., Volpe, F., Mattia, A., Serino, V., Petitto, F., ... Di Stasio, M. (2009). Assorbimento di metalli pesanti nella catena alimentare enologica. *Chimica degli alimenti*, 117, 553–560.
- Vystavna, Y., Reelika, R., Nina, R., Olena, D., Valentina, P. e Mykola, K. (2015). Confronto dei coefficienti di trasferimento suolo-radice e di traslocazione degli oligoelementi in viti di Chardonnay e Moscato bianco coltivate nello stesso vigneto. *Scientia Horticulturae*, 192,89–96.
- Weeks, C. (1969). Production of sulfur dioxide-binding compounds and of sulfur dioxide by two *Saccharomyces* yeasts. *Am. J. Enol. Vitic.* 20, 32-39.
- Wucherpfenning, K. & Semmeler, G. (1972). Acetaldehydbildung im Verlauf der Garung in Abhängigkeit vom Wuchsstoffgehalt des Garsubstrates. I. Mitteilung. *Z. Lebensm.-Unters.-Forsch.* 148, 77-82.
- Zoecklein, B.W., Fugelsang, K.C., Gump, B.H. & Nury, F.S. (1995). *Wine Analysis and Production*. Pp. 115–151, 178–19, 221–222.

RINGRAZIAMENTI

Per il lavoro svolto ringrazio l'azienda vitivinicola Perlage Winery che ha proposto e finanziato questo lavoro. Ringrazio inoltre il CREA viticoltura ed enologia di Conegliano disponibile a mettere a disposizione gli spazi e la strumentazione necessaria per la realizzazione del lavoro. Un ringraziamento particolare va alla dottoressa Tiziana Nardi che mi ha seguito durante le ore di lavoro nella sede del CREA, soprattutto nell'allestimento delle beute e al professore Simone Vincenzi, il quale ha monitorato la parte relativa alle analisi chimiche post fermentazioni. Sono felice di aver preso parte a questo progetto e di aver lavorato in un ambiente sereno, con persone sempre disponibili a rispondere a chiarimenti e domande.

Per questi tre anni all'interno dell'università sono grato alla mia famiglia per il costante sostegno fornito in tutto quello che facevo. All'interno del campus universitario ho conosciuto persone con le quali ho trascorso molti momenti piacevoli e che mi hanno aiutato nell'affrontare questo percorso. In particolare, ringrazio gli amici Antonio, Riccardo, Alessandro, Matteo, David e Giovanni.

Esco dall'università come persona più matura, questa esperienza mi ha sicuramente segnato e la porterò sempre con me. Sono felice del traguardo raggiunto e consapevole che tutto ciò è solamente l'inizio di un lungo percorso.

Nicholas