



# UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di Agronomia Animali Alimenti Risorse Naturali e Ambiente - DAFNAE

Corso di laurea in Scienze e Tecnologie Viticole ed Enologiche

Tesi di laurea Triennale

## EFFETTO DEL CONTENUTO DI RAME NEL MOSTO SULLA FERMENTAZIONE

**Relatore:**

Prof. Simone Vincenzi

**Laureando:**

Andrea Di Fazio

**Matricola n.** 1221669

Anno Accademico 2023-2024

## INDICE

<b>RIASSUNTO</b>	2
<b>ABSTRACT</b>	3
<b>INTRODUZIONE</b>	4
1 LA PERONOSPORA	4
2 IL RAME	6
3 AZIONE DEL RAME	7
4 DEPOSITO DEL RAME NEI SUOLI	8
5 ASSIMILAZIONE DEL RAME DALLE PIANTE	10
6 STRATEGIE PER LA RIDUZIONE DELL'USO DI RAME	11
7 RAME IN ENOLOGIA	11
8 ASSORBIMENTO DA PARTE DEI LIEVITI	12
9 IMPATTO SUI LIEVITI E LA VINIFICAZIONE	12
10 EFFETTI SULLA CELLULA DI LIEVITO	13
11 MECCANISMI DI RESISTENZA	14
12 CONSEGUENZE SUGLI AROMI DEL VINO	15
13 RIFLESSI IN POST VINIFICAZIONE	16
<b>OBIETTIVO</b>	17
<b>MATERIALI E METODI</b>	18
<b>RISULTATI E DISCUSSIONE</b>	19
<b>CONCLUSIONI</b>	23
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	24
<b>SITOGRAFIA</b>	30

## RIASSUNTO

L'ampio impiego di rame in viticoltura ha lo scopo di prevenire e contrastare le infezioni di *Plasmopara viticola*, una delle ampelopatie più temute. Questo patogeno richiede il maggior impegno nella difesa delle colture; soprattutto in aree dove le condizioni climatiche sono particolarmente favorevoli alla sua proliferazione. In viticoltura biologica, il rame rappresenta il mezzo di maggior efficacia contro la peronospora, poiché ricopre il ruolo di unico principio attivo realmente efficace ed utilizzabile.

L'abbondante deposito di questo metallo sulla vegetazione e nel terreno ne provoca concentrazioni residue nei mosti. La presenza di rame nei mosti potrebbe condizionare negativamente la fermentazione, influenzando sulla crescita e sull'attività fermentativa dei lieviti. Infatti, il rame esercita un'interazione diretta con i componenti del mosto, formando complessi stabili con aminoacidi e fenoli, che possono contribuire a ostacolare la fermentazione, agevolare l'ossidazione del mosto, e promuovere la modifica del gusto, del colore e dell'aroma del vino. L'obiettivo di questo progetto è studiare diversi campioni reali provenienti da un'unica cantina, evidenziando le correlazioni tra la concentrazione di rame nel mosto, i sottoprodotti di fermentazione e l'acetaldeide nel vino, oltre, al residuo finale di rame nel vino.

La prova è stata svolta analizzando campioni di mosto chiarificato con flottazione e vino a fermentazione terminata.

È stata quindi eseguita un'analisi di correlazione per trovare eventuali legami tra il contenuto di rame nel mosto e i parametri enologici del vino finito. Un parametro che effettivamente ha una correlazione significativa con il rame di partenza è l'acetaldeide.

È invece interessante notare che l'acidità volatile non è correlata con il contenuto iniziale di rame: considerando che il rame può essere un fattore di stress per il lievito, ci si aspetterebbe un aumento di tutti i parametri legati allo stress, tra cui anche la produzione di acido acetico.

Il fatto che invece ci sia un effetto solo sull'acetaldeide suggerisce che il meccanismo di azione del rame sia molto più specifico e non generalizzato.

Un fattore da considerare è sicuramente il ceppo di lievito utilizzato per la fermentazione, in quanto è noto che ceppi diversi possono avere diversa sensibilità al rame.

Questo indicherebbe che, anche se non c'è un effetto diretto del rame sulla velocità di fermentazione, la presenza della molecola nel mezzo causa, comunque, degli effetti sul metabolismo del lievito.

## ABSTRACT

The intensive use of copper in viticulture aims to prevent and combat infections by *Plasmopara viticola*, one of the most feared ampelopathies. This pathogen requires greater effort in crop protection; especially in areas where the climatic conditions are particularly favorable for its proliferation. In organic viticulture, copper represents the most effective means against downy mildew, since it plays the role of the only active ingredient that is actually effective and usable. The abundant deposition of this metal on vegetation and in the soil causes residual concentrations in musts. As a result, the presence of copper in must could adversely affect fermentation, affecting the growth and fermentative activity of yeasts.

In addition, copper directly interacts with the components of the must, forming stable complexes with amino acids and phenols, which can help to hinder fermentation, facilitate the oxidation of the must, and promote changes in the taste, colour and aroma of wine.

The aim of this project is to study different real samples from a single winery, highlighting the correlations between the copper concentration in the must, the fermentation by-products and the acetaldehyde in wine, as well as the final residual copper in wine.

The test was carried out by analyzing samples of must clarified by flotation and wine at the end of fermentation.

An analysis of correlation was then carried out to find any links between the copper content in the must and the oenological parameters of the finished wine. One parameter that actually has a significant correlation with the starting copper is acetaldehyde.

It is interesting to note that volatile acidity is not correlated with the initial copper content: considering that, copper can be a stress factor for yeast, an increase in all the parameters related to stress would be expected, including the production of acetic acid.

The fact that there is an effect only on acetaldehyde, suggests that the mechanism of action of copper is much more specific and not generalized.

One factor to consider is certainly the yeast strain used for fermentation, as it is known that different strains may have different copper sensitivity.

This would indicate that, even if there is no direct effect of copper on the rate of fermentation, the presence of the molecule in the medium causes effects on the metabolism of the yeast.

## INTRODUZIONE

In viticoltura e in generale in agricoltura moderna si investono capacità fisiche e intellettuali soprattutto nella prevenzione e contrasto delle avversità. La coltura agraria richiede costante protezione con interventi da parte dell'uomo, poiché gran parte degli organismi vegetali attualmente coltivati hanno subito un'addomesticazione; quindi, in molti casi sono stati soppressi i meccanismi di equilibrio che agiscono normalmente in situazioni naturali.

La lotta alle avversità è necessaria per il mantenimento dell'apparato epigeo sano ed efficiente sotto il profilo dell'attività fotosintetica; caratteristica necessaria alla vite per crescere, entrare in produzione ed accumulare sostanze di riserva.

Le alterazioni delle colture che oggi vengono identificate come specifiche patologie, sono già state descritte nella Bibbia. Inizialmente queste situazioni erano attribuite ad eventi fantasiosi, meteorologici o castighi divini. Con la concezione del metodo scientifico da parte di Galileo Galilei e l'invenzione del microscopio ottico, si cominciarono a studiare le cause di tali avversità, le cure e la prevenzione.

La grande svolta nello studio della patologia vegetale e della fitoiatria arrivò con la comparsa in Europa di fillossera, peronospora e oidio dall'America nella seconda metà del 1800.

Nel 1884 il botanico Millardet scopre, per puro caso, la funzione anticrittogamica del rame nei confronti della peronospora, effetto già emerso in precedenza dagli studi di Prevost nel 1807 che dimostrò l'origine fungina delle carie nelle sementi e sperimentò l'efficacia del rame nella concia per il controllo delle spore (D'Ambra & Rui, 1990).

### 1 LA PERONOSPORA

La *Plasmopara viticola* rappresenta ancora oggi, a 150 anni dal suo arrivo in Europa, una delle ampelopatie più temibili.

È un oomicete, ma per varie ragioni si continua a considerarla un fungo (Berk et al., n.d.). È un parassita obbligato su *Vitis vinifera* e in condizioni a lei favorevoli, può portare alla perdita del 100% della produzione.

L'infezione della *Plasmopara viticola* è conseguenza della presenza delle sue spore nel terreno, provenienti dal ciclo infettivo dell'anno precedente. Essa sverna come oospore ibernante, risultante dalla riproduzione sessuata. Le oospore non possono germinare immediatamente ma necessitano di un periodo di maturazione che termina entro la prima metà di dicembre (Berk et al., n.d.).

La gravità dell'infezione è legata non solo al numero delle oospore presenti, ma anche al loro grado di maturazione che risulta influenzato dall'andamento meteorologico autunno-invernale (Ricciolini & Rizzo, 2007).

In primavera le oospore producono il macrosporangio, che dà poi origine a dei piccoli corpuscoli muniti di flagelli in grado di spostarsi nell'acqua, ovvero le zoospore. Esse vengono trasportate dal vento o dalla pioggia ed entrando in contatto con la vegetazione penetrano all'interno dei tessuti, passando attraverso le aperture stomatiche come micelio. Questo si sviluppa assorbendo il succo cellulare tramite gli austori provocando la morte dei tessuti.

Da questo momento il patogeno non è più sensibile ai trattamenti di copertura ed entrerà nella fase di incubazione. Terminata l'incubazione si cominciano a notare le macchie d'olio sulla pagina superiore della foglia, ovvero le aree colonizzate dalle ife.

Ad accrescimento terminato, le ife fuoriescono dagli stomi formando una efflorescenza muffosa biancastra che porterà i conidi. Qui termina il ciclo di infezione primaria.

Ad evasione terminata, dai conidi della muffa bianca si propagheranno le nuove zoospore che, con almeno 4 ore di bagnatura ed una temperatura media superiore a 14 °C, possono diffondere le infezioni secondarie ad ogni ripetizione delle condizioni climatiche adatte.

La *Plasmopara viticola* colpisce tutti gli organi verdi provvisti di stomi. Quindi, durante infezioni tardive può colpire foglie più vecchie e grappoli, producendo rispettivamente peronospora a mosaico e larvata (Corazzina, 2018).

Distribuzione geografica dei vigneti, andamento climatico (temperatura, quantità di pioggia e ore di bagnatura), fenologia della vite, sensibilità del vitigno, sesto d'impianto, forma di allevamento, prodotti fitosanitari e loro modalità di impiego; sono i fattori che influiscono sull'intensità di attacco del patogeno.

Detto questo, nelle aree più favorevoli alla peronospora e soprattutto in annate umide e piovose, conviene garantire una protezione costante della vegetazione, fino alla allegagione, anche in assenza di sintomi evidenti. Questa difesa è realizzabile più facilmente, grazie ai moderni antiperonosporici che sono in grado, se correttamente utilizzati, di fornire un valido e prezioso contributo alla lotta, soprattutto in termini di allungamento degli intervalli tra un trattamento e l'altro. Nei casi in cui, nonostante gli interventi di difesa, si manifestassero focolai di peronospora, va prestata molta attenzione per impedire che la malattia raggiunga la fase epidemica, difficilmente arrestabile anche con i moderni prodotti endoterapici (Berk et al., n.d.). Una volta che il germoglio ha raggiunto la lunghezza di 5 – 10 cm, si potranno iniziare i trattamenti intervenendo subito prima del verificarsi delle condizioni favorevoli all'infezione:

pioggia prevista di intensità indicativamente maggiore ai 10 mm e temperatura superiore ai 10 gradi.

Va precisato che, in zone caratterizzate da alta pressione della malattia e umidità elevata, possono essere sufficienti anche meno di 10 mm di pioggia.

Successivamente al primo evento infettivo i trattamenti andranno sempre posizionati in via preventiva, tenendo conto delle previsioni meteo e delle indicazioni di etichetta dei prodotti.

È di fondamentale importanza evitare l'instaurarsi di infezioni primarie. Le infezioni dovute alle oospore si possono avere, in certe annate, fino a luglio inoltrato.

Le infezioni secondarie, che necessitano solamente di alcune ore di bagnatura della vegetazione, si possono verificare anche in seguito alla semplice deposizione di rugiada, contribuendo così alla successiva diffusione della malattia (Zecchin, 2020).

La viticoltura biologica registra il maggior sfruttamento del rame come principio attivo anticrittogamico ai sensi del Reg. CE 2092/91. Tale viticoltura costituisce un metodo particolare di produzione al livello delle aziende agricole che si basa sul rispetto dell'equilibrio biologico, non ammette l'utilizzo di sostanze chimiche di sintesi e concede l'uso di sostanze minerali o naturali come: estratti di piante, farine di roccia, derivati di rame e zolfo.

## **2 IL RAME**

Il rame è il prodotto principe per la difesa verso la peronospora. Usato da più di 130 anni, è uno dei biopesticidi più importanti utilizzati soprattutto nelle aziende agricole biologiche. È efficace contro un elevato numero di parassiti delle colture ed è utilizzato come fungicida e battericida. Le formulazioni di rame sono efficaci contro la peronospora della vite e hanno un effetto secondario sia su peronospora che su un'ampia gamma di insetti nocivi e altre malattie della vite (Provenzano et al., 2010).

Con la scoperta nel 1884 di ciò che oggi definiamo poltiglia bordolese, inizia la prima era dei trattamenti peronosporici; essa dà il via ad un uso sconsiderato di questo metallo fino alle recenti limitazioni che portano ad oggi l'impiego di rame a 4 Kg/ha all'anno o 28 Kg in 7 anni con un massimo assoluto di 6 kg/ha ad annata, sebbene tali limiti siano sottoposti a continue riduzioni secondo il Reg. 1981/2018. La seconda era è segnata dalla comparsa dei ditiocarbammati di sintesi nel 1950 e la terza dall'arrivo dei fungicidi endoterapici (Morando & Guercio, 1984).

L'effetto dei sali di rame sulla peronospora permette di identificare un procedimento razionale e ancora valido contro la malattia fungina più grave e segna l'inizio della fitoiatria,

nonché nascita di un mezzo sicuro di lotta contro numerosi patogeni in molte altre colture agrarie (D'Ambra & Rui, 1990). Il rame è un prodotto non nocivo per insetti e acari utili ma resta comunque un metallo pesante; quindi, si accumula in continuo nel terreno.

Un altro aspetto a favore, è che i prodotti rameici sono multi-sito e ad ampio spettro e questo risulta un vantaggio in quanto la peronospora può manifestare resistenza se si utilizzano principi attivi ad alta specificità di azione.

La funzione fungitossica della molecola è data dalle interferenze nella respirazione a livello della formazione di acetil co-A e nel ciclo di Krebs (Ricciolini & Rizzo, 2007).

È un prodotto di copertura, quindi non penetra all'interno delle superfici trattate. Tali prodotti si differenziano tra di loro per una maggiore o minore affinità per le cere, che ne permette una maggiore o minore resistenza al dilavamento. Andranno preferiti i prodotti meno dilavabili in condizioni difficili o quando diventa importante proteggere i grappoli. Avendo un'azione esclusivamente di contatto, per esplicitare al meglio la sua efficacia, il trattamento andrebbe posizionato idealmente poche ore prima o il giorno prima della pioggia, in quanto, per il semplice effetto della crescita vegetativa, si riduce la copertura, quindi l'efficacia.

Viene classificato quindi come trattamento esoterapico ad azione profilattica poiché non attraversa la cuticola. Il controllo del patogeno avviene solo prima della penetrazione dei tessuti poiché gli organismi endofiti non sono raggiungibili in post penetrazione. Gli esofarmaci hanno azione curativa solo nei confronti di infezioni già in atto di patogeni ectofiti; ovvero che si sviluppano all'esterno dell'ospite (D'Ambra & Rui, 1990).

### **3 AZIONE DEL RAME**

Il rame è letale per i funghi in forma ionica ( $\text{Cu}^{2+}$ ), quindi, necessita di acqua per espletare la sua funzione. L'acqua di irrorazione o piovana consente di disciogliere i sali cuprici e di conseguenza formare ioni assimilabili dall'organismo fungino, fino alla soglia di tossicità.

Ha azione preventiva e fisiologica sulla vegetazione trattata che può essere, secondo le condizioni ambientali e fasi fenologiche, positiva o negativa (fitotossico in fioritura).

L'azione fisiologica benefica consiste nell'ispessimento della cuticola e delle pareti cellulari epidermiche conferendo maggiore resistenza ad alcuni parassiti fitofagi, crittogame (muffe, oidio, botrite), minore lussureggiamento e allungamento del ciclo vegetativo.

I sali di rame usati in fitoiatria sono: solfato, ossicloruro, idrossido (D'Ambra & Rui, 1990).

La poltiglia bordolese, un efficace agente per la prevenzione della peronospora della vite, è stata utilizzata abitualmente in Europa dalla fine del XIX secolo con concentrazioni e numero



di trattamenti decisi a seconda delle condizioni meteorologiche, dell'intensità dell'infezione e della gestione del vigneto.

La pratica secolare di utilizzare solfato di rame e altri fungicidi contenenti rame per proteggere la vite, nelle regioni climatiche temperate e tropicali, ha provocato un significativo accumulo di rame nei suoli (Komárek et al., 2009).

#### **4 DEPOSITO DEL RAME NEI SUOLI**

Il rame distribuito sulle piante si deposita sulle foglie e sugli altri organi epigei e non viene assorbito dai tessuti vegetali. Di conseguenza, la totalità del prodotto finisce per raggiungere gli orizzonti superficiali del suolo. Evento inevitabile per fenomeni diretti di deriva al momento dell'applicazione, per dilavamento dagli organi trattati o, infine, per la fisiologica caduta a fine stagione delle foglie che ne presentano ancora residui.

Il rame è tossico e non si degrada; rientra per questi motivi tra le sostanze attive candidate alla sostituzione (Zecchin, 2020). È facilmente dilavabile, quindi risulta altamente facilitato l'accumulo nel terreno e lo spostamento verticale verso gli strati più profondi.

L'impatto dei metalli in tracce sul suolo e sull'ambiente circostante nella maggior parte dei casi non può essere previsto semplicemente misurando la loro concentrazione totale. Ciò è dovuto al fatto che, solo le frazioni solubili e mobili hanno il potenziale di lisciviare o di essere assorbite dalle piante ed entrare nella catena alimentare. Inoltre, il contenuto di rame nelle piante solitamente non corrisponde esattamente al contenuto totale di rame nel suolo (Chaignon & Hinsinger, 2003).

La mobilità e la biodisponibilità dei metalli dipendono non solo dalla loro concentrazione totale nel suolo, ma anche dalle loro proprietà, dalle caratteristiche dei metalli e dalle condizioni ambientali (Romic et al., 2014). La maggior parte del rame dei terreni coltivati a vite viene trattenuta nella frazione minerale e successivamente dalla frazione organica, mentre nel bosco naturale, la materia organica è il principale serbatoio dell'elemento (Casali et al., 2008).

Nei solidi e nelle soluzioni del suolo, il rame si trova quasi esclusivamente come catione bivalente  $\text{Cu}^{2+}$ , e la riduzione di  $\text{Cu}^{2+}$  a  $\text{Cu}^+$  e  $\text{Cu}^0$  è possibile in condizioni riducenti.

Per le sue proprietà, il rame, si associa con il solfuro dei minerali molto solubili, dando origine a solfuro di rame. Per questo motivo, la maggior parte del materiale colloidale del suolo, che contiene minerali argillosi, ossidi di manganese, alluminio, ferro e materia organica, assorbe fortemente il rame, e sempre di più con l'aumentare del pH (Golden Jubilee International Symposium on 'Copper in Soils and Plants' (1981 : Murdoch University), 1981).

Gli ossidi amorfi e cristallini di Fe e Al assorbono facilmente il  $\text{Cu}^{2+}$ , indipendentemente dall'eccesso di metalli alcalini nella soluzione (Kinniburgh et al., 1976). Tuttavia, il serbatoio più importante per il Cu è la materia organica e la complessazione con essa è uno dei meccanismi più efficienti di ritenzione del  $\text{Cu}^{2+}$  nel suolo (McBride et al., 1994).

Ciò limita la biodisponibilità ma anche la capacità di migrare verticalmente nel suolo; quindi, si riduce la possibilità di inquinare le acque sotterranee.

La disponibilità di rame nel suolo, ovvero il rapporto tra rame disponibile e rame totale, è influenzata dalla profondità. In genere è più elevata nello strato 0–20 cm (10,3%) rispetto a quello 20–40 cm (4,7%) (Provenzano et al., 2010). Dal punto di vista ecotossicologico, è importante anche determinare la biodisponibilità del rame, che rappresenta la frazione che può essere utilizzata da microrganismi e piante.

La natura non biodegradabile del rame, in combinazione con la sua scarsa mobilità nei suoli, ne ha determinato l'accumulo nello strato coltivato nei vigneti dei paesi produttori di vino in Europa. Nel mondo il valore medio nel suolo è di circa 30 mg/kg (Alloway, 1995), e in linea generale, valori più bassi nei suoli sabbiosi e maggiori nei suoli argillosi.

Valori superiori a 100 mg/kg sono da considerare anomali. Da un'indagine condotta in Italia è emerso che il contenuto medio di Cu nei suoli dei vigneti era di 297 mg/kg nelle regioni umide montuose settentrionali, dove sono frequenti i trattamenti fungicidi contro la peronospora, di 200 mg/kg nelle pianure umide e di soli 75 mg/kg nelle zone aride del Sud, dove i trattamenti fungicidi, soprattutto quelli per il controllo della peronospora, sono molto meno frequenti (Deluisa et al., 1996).

La concentrazione di rame totale nel suolo pari a 100-150 mg/kg è convenzionalmente riconosciuta come la soglia al di sopra della quale la crescita delle piante e il funzionamento del suolo possono essere negativamente influenzati (Manici & Caputo, 2019).

Alte concentrazioni di rame nel suolo riducono la biodiversità batterica e aumentano la prevalenza delle poche specie più resistenti.

Si può individuare un deficit nell'efficienza metabolica dei suoli conseguente anche alla riduzione della massa fungina.

L'arricchimento con sostanza organica dei suoli contaminati con rame permette in generale di attenuare gli effetti negativi della contaminazione a lungo termine attraverso l'immobilizzazione dello stesso (Manici & Caputo, 2019).

## 5 ASSIMILAZIONE DEL RAME DALLE PIANTE

Il rame non è facilmente mobile nelle piante e la concentrazione delle radici è considerata un buon indicatore del contenuto di rame della pianta.

È stato ipotizzato che i fattori che influenzano il frazionamento dei metalli e la biodisponibilità nel suolo includano i cambiamenti di pH indotti dalle radici, il legame dei metalli da parte degli essudati radicali, le attività microbiche indotte dalle radici e l'esaurimento delle radici come conseguenza dell'assorbimento delle piante (Ernst, 1996). La capacità di assorbimento della radice per il metallo diminuisce con l'aumentare del pH della soluzione.

Le modifiche del pH della rizosfera da parte della pianta sono un evento noto e l'alcalinizzazione della zona radicale può ridurre l'esposizione delle radici delle piante al rame, promuovendo la formazione di complessi organici e riducendo la solubilità del rame in tutta l'area della rizosfera (Youssef & Chino, 1989). La pianta può quindi ridurre direttamente la biodisponibilità del rame vicino alle radici attraverso l'escrezione di composti leganti i metalli che possono complessare gli ioni cuprici liberi. Ciò determina tolleranza da parte della vite, riuscendo a detossificare i metalli pesanti, e resistenza agli stress indotti da essi.

Le radici trattengono la maggior parte del metallo nelle loro strutture come meccanismo protettivo contro la tossicità, riducendo così l'assorbimento e la traslocazione al germoglio (Errichiello et al., 2024).

Elevate concentrazioni di Cu nel terreno hanno determinato una bassa sopravvivenza, una bassa biomassa totale delle piante, un ritardo nella fioritura e nella fruttificazione e una bassa produzione di semi (Brun et al., 2003).

Il contenuto di rame nell'uva aumenta con l'aumentare del numero di applicazioni, ma è spesso stato registrato inferiore al livello massimo residuo (LMR). L'intervallo preraccolta può risultare a volte insufficiente a ridurre il contenuto di rame al di sotto dell'LMR (Provenzano et al., 2010).

## **6 STRATEGIE PER LA RIDUZIONE DELL'USO DI RAME**

Per riuscire a garantire una sufficiente difesa dalla peronospora con quantitativi ridotti di rame, è necessario innanzi tutto limitare la vigoria delle piante, ridurre l'umidità ristagnante nella parete fogliare e, in principio, evitare la coltivazione in aree poco ventilate e fortemente soggette a ristagni di umidità. Si consiglia di scegliere i formulati che: per le loro peculiari caratteristiche di composizione, consentono una buona efficacia a dosaggi più bassi. L'intervento va eseguito poche ore prima dell'evento infettante, in modo da avere il massimo della copertura, in termini di quantità di sostanza attiva per unità di superficie fogliare. Inoltre, è utile aggiungere coadiuvanti come bagnanti e adesivanti in grado di migliorare la distribuzione sulla vegetazione e la persistenza del prodotto. Adattare il volume di miscela all'effettivo sviluppo della vegetazione e integrare l'uso del rame con altre sostanze quali olio essenziale di arancio dolce o induttori di resistenza (Zecchin, 2020).

## **7 RAME IN ENOLOGIA**

Il contenuto di rame nelle uve deve essere inferiore al livello massimo consentito di residui (LMR) di 20 mg/kg. Tuttavia, data la presenza di tale molecola all'interno degli acini attraverso l'assorbimento radicale e all'esterno come residuo dei fitosanitari, sono riscontrabili anche minime quantità di rame nei mosti e di conseguenza nei vini.

Le concentrazioni di rame nei vini sono circa 6-19 volte inferiori a quelle determinate negli acini d'uva; quindi, si può presumere che il rame assorbito dalla vite sia probabilmente sequestrato negli acini, nella polpa e nelle bucce degli acini, che vengono scartati dopo la pigiatura dei grappoli (Provenzano et al., 2010). Le varie metodologie di vinificazione determinano valori altamente variabili nel contenuto di metalli pesanti nel mosto, possono così avere effetti differenti sulla fermentazione. È solito riscontrare una marcata differenza nel contenuto di rame tra i vini bianchi e rossi, probabilmente dovuta al fatto che, a differenza dei vini bianchi, i vini rossi subiscono una maggiore aerazione del mosto durante il processo di vinificazione. Pertanto, il loro contenuto di ossigeno più elevato può aumentare l'ossidazione del rame e la precipitazione dei sali. Ciò causa, di solito, un contenuto di rame più elevato nei vini bianchi (Ostapczuk et al., 1997). Nella vinificazione, concentrazioni elevate di rame possono essere tossiche per i lieviti, influenzando la crescita e l'attività cellulare. Un livello elevato di  $\text{Cu}^{2+}$  nel mosto influenza l'attività dei microorganismi in diversi modi: prevenzione o limitazione della crescita, riduzione dell'assorbimento di zuccheri riducenti che di conseguenza provoca una diminuzione della produzione di etanolo.

## 8 ASSORBIMENTO DA PARTE DEI LIEVITI

L'adsorbimento di metalli pesanti dai lieviti può essere ottenuto in due modi, adsorbimento non biologico (cellule morte) o biologico (cellule vive) (Capece et al., 2018). Inoltre, l'adsorbimento da parte di cellule viventi può essere suddiviso in adsorbimento extracellulare e intracellulare. Nel passaggio denominato "biosorbimento passivo" o extracellulare, le interazioni tra i gruppi funzionali metallici presenti sulla superficie cellulare, come carbossile, fosfato, idrossile, ammonio, composti di zolfo, ecc., catturano gli ioni metallici sulla superficie cellulare.

Questo processo è indipendente dal metabolismo, inizia rapidamente, entro diversi minuti, ed è un equilibrio dinamico di adsorbimento-desorbimento reversibile, poiché gli ioni metallici adsorbiti sulla superficie cellulare possono essere rimossi da diversi agenti: come altri ioni, agenti chelanti o acidi.

Durante il "biosorbimento attivo" o intracellulare, un processo lento e continuo, gli ioni metallici entrano nelle cellule attraversando la membrana cellulare. È stato recentemente riportato che dopo l'adsorbimento del rame, la superficie cellulare e i compartimenti intracellulari di *S. cerevisiae* presentano caratteri irregolari (Capece et al., 2018).

Risultati recenti (Sun et al., 2015) hanno dimostrato che in *S. cerevisiae* il meccanismo principale coinvolto nell'adsorbimento del rame durante la fermentazione alcolica è l'adsorbimento sulla superficie cellulare, che raggiunge la saturazione in 24 ore.

Il sequestro dei metalli dipende per la maggior parte dallo strato esterno di mannoproteine.

Detto questo, l'eventuale residuo di rame che si riscontra nel mosto prima della fermentazione, è considerato abbastanza sicuro, perché il residuo eccedente viene rimosso da fecce, formazione di solfuri e legame sulle pareti cellulari dei lieviti ('Copper', n.d.).

## 9 IMPATTO SUI LIEVITI E LA VINIFICAZIONE

Indagini condotte presso l'AWRI hanno dimostrato che concentrazioni di rame nel mosto inferiori a 10 mg/l non hanno alcun effetto sulla velocità di fermentazione.

Tuttavia, se presenti altri fattori inibitori è possibile che tali livelli possono recare disturbo (residui fitofarmaci, acido acetico, alto contenuto di alcool...).

La presenza di bucce e polpe nei vini rossi fornisce ai lieviti ulteriori nutrienti e precursori per fattori essenziali di sopravvivenza, ritardando o mitigando potenzialmente la risposta allo stress, osservata nelle fermentazioni dell'uva bianca.

Le vinacce inducono probabilmente fenomeni di adsorbimento minerale sottraendo il rame dal mezzo (Errichiello et al., 2024).

Nonostante l'effetto di detossificazione esercitato dalle cellule di lievito nella prima fase della fermentazione, i mosti contenenti un'elevata concentrazione di rame rimangono un ambiente inadatto all'attività di *Saccharomyces cerevisiae* (Guzzon, 2012).

Tromp & Klerk, (1988) hanno scoperto che valori superiori ai 10 mg/L di rame inibivano la fermentazione e che i vini risultanti erano più scuri rispetto ai controlli, a causa dell'aumentata ossidazione.

Per garantire una fermentazione lineare, in questi casi è opportuno scegliere ceppi di LSA robusti, fare una buona preparazione della pied de cuvée, aggiungere un adeguato contenuto di APA, aggiungere scorze di lievito o lievito inattivato, mantenere lievito in sospensione e ridurre le fluttuazioni di temperatura ('Copper', n.d.).

## 10 EFFETTI SULLA CELLULA DI LIEVITO

Un attento controllo dell'omeostasi dello ione di rame è importante perché le concentrazioni in tracce sono essenziali per la sopravvivenza del lievito, mentre, come detto in precedenza, le concentrazioni elevate sono tossiche (CUP1-1/YHR053C. *Saccharomyces* genome database). Il rame, ad alte concentrazioni è in grado di portare alla formazione di radicali liberi attraverso il ciclo redox tra  $\text{Cu}^{2+}$  e  $\text{Cu}^+$  con conseguenti danni alle membrane cellulari, ai lipidi, agli acidi nucleici, alle proteine e ad altre biomolecole (Yruela, 2009). Inoltre, la capacità del rame di formare complessi stabili con amminoacidi e sostanze fenoliche (Pohl, 2007) può contribuire a fermentazioni bloccate, ossidazione del mosto e modifica del gusto, del colore e dell'aroma del vino (Roubelakis-Angelakis & Kliewer, 2010; Vilanova et al., 2007).

Pertanto, il rame può influenzare il processo di fermentazione interferendo inizialmente con la composizione metabolica delle bacche (V. Martins et al., 2014), modulando il microbioma delle bacche (G. Martins et al., 2012) e le prestazioni del lievito durante la fermentazione anche attraverso l'interazione diretta con i componenti del mosto (V. Martins et al., 2015).

Nelle cellule di lievito, gli enzimi glicolitici sono tra i principali bersagli dello stress ossidativo (Shanmuganathan et al., 2004) e la riconfigurazione metabolica del flusso di carboidrati verso la via del pentoso fosfato è una strategia chiave per contrastare lo stress ossidativo (Grant, 2008; Ralser et al., 2008).

Adamo et al., (2012) hanno riportato che i livelli di alcuni enzimi glicolitici e degli enzimi della via del pentoso fosfato sono altamente aumentati in cellule evolute e cresciute in presenza di Cu.

Le interferenze sopra elencate possono portare di conseguenza a morte massiva delle cellule di lievito, causando un ritardo significativo nell'avvio e nel progresso della fermentazione alcolica e una riduzione della produzione di alcool.

La riduzione della vitalità cellulare è di circa due unità logaritmiche se il contenuto di rame dei mosti aumenta a 20-25 mg/l.

L'inibizione del lievito però non è permanente e diminuisce nel tempo con l'avanzare della fermentazione (Guzzon, 2012). Una spiegazione a questo comportamento può essere data dai meccanismi sopra descritti, quali la capacità delle cellule di chelare gli ioni (Wang & Chen, 2006) e la precipitazione dei Sali (García Esparza et al., 2006). Queste alterazioni su vigore e potenza fermentativa sono caratteristici solamente dei ceppi sensibili poiché quelli resistenti, che assorbono meno rame, non mostrano nessun effetto (Capece et al., 2018).

Per quanto riguarda l'omeostasi del Cu, sono stati identificati meccanismi complessi che proteggono le cellule dagli eccessi: riduzione dell'assorbimento, induzione di metallotioneine ed enzimi antiossidanti (Adamo et al., 2012).

## **11 MECCANISMI DI RESISTENZA**

La resistenza al rame è stata classificata come un tratto di domesticazione (Warringer et al., 2011). Uno dei meccanismi che consentono resistenza è quello di ridurre l'assorbimento intracellulare (Adamo et al., 2012). Quindi la tolleranza e la capacità di adsorbimento del rame dai ceppi mostrano correlazione negativa (Capece et al., 2018).

La resistenza al rame è causata dall'amplificazione della proteina ricca di zolfo Cup1p.

Essa rappresenta un tratto di adattamento specifico dei ceppi enologici. L'amplificazione del gene CUP1 porta a una maggiore sintesi proteica, fornendo resistenza alle elevate concentrazioni di rame nel mosto d'uva, derivanti dall'uso massiccio di rame come fungicida. Quest'ultimo corrisponde a una sequenza di DNA che codifica per una rame-chelatina, a basso peso molecolare, che è contenuta all'interno di un'unità amplificabile di 2,0 kb.

L'unità di ripetizione di base ospita anche una seconda sequenza di DNA che codifica per un trascritto di mRNA più lungo di funzione sconosciuta. L'aumento del numero di copie geniche porta a un aumento dell'accumulo di mRNA della chelatina, che a sua volta porta alla produzione di livelli più elevati di proteine leganti il rame.

Poiché le cellule sono in grado di produrre livelli più elevati di un composto legante il rame, possono resistere agli effetti tossici di concentrazioni più elevate nell'ambiente esterno (Fogel et al., 1983).

Il gene CUP1 codifica per Cup1p, una proteina legante il rame e cadmio con attività antiossidante e superossido-dismutasi. È coinvolta nella detossificazione degli ioni metallici e nella rimozione dei radicali superossido, si localizza nel citosol ed è attiva nello spazio intermembranale mitocondriale. È un gene non essenziale e il mutante nullo non ha fenotipo, perché sono presenti più copie del gene. L'eliminazione di tutte le copie conferisce sensibilità al rame ( $\text{Cu}^{2+}$ ) mentre, la sovraespressione conferisce una maggiore resistenza.

Come principale metallotioneina attivata dal rame nel lievito, Cup1p lega e sequestra il rame rameoso  $\text{Cu}^+$ , fornendo il metodo principale per rimuovere questo ione metallico dalla cellula. In presenza di rame, Cup1p è anche capace di attività antiossidante e quindi contribuisce in modo significativo, seppur minore, alla detossificazione dei radicali dell'ossigeno (CUP1-1/YHR053C. Saccharomyces genome database).

La metallotioneina è ricca in residui di cisteina nella quale i gruppi solfidrilici, prevalentemente in forma ridotta, sono responsabili dell'azione chelante nei confronti di metalli e di specie radicaliche. Le metallotioneine in tutti i sistemi cellulari di cui fanno parte, esercitano una sorta di "potere tampone" nei confronti delle specie metalliche essenziali: in presenza di elevate concentrazioni intracellulari di oligoelementi, quali rame e zinco, guidano alla secrezione extracellulare di tali ioni; a differenza di una situazione di deprivazione, nella quale i metalli legati da tali proteine verranno resi disponibili per il metabolismo cellulare.

In un ceppo evoluto di *S. cerevisiae*, l'aumento del numero di copie di CUP1 è l'evento più marcato associato a una maggiore tolleranza al Cu (Adamo et al., 2012).

## 12 CONSEGUENZE SUGLI AROMI DEL VINO

L'esposizione del lievito al rame per anni ha portato ad una selezione di ceppi portanti più copie di CUP1, che causa: maggiore resistenza al metallo ma elevata produzione di  $\text{H}_2\text{S}$ , dannoso per la qualità del vino. Questa maggiore produzione di  $\text{H}_2\text{S}$  è ulteriormente intensificata in presenza di solfiti, un altro additivo comune nella vinificazione (de Guidi et al., 2024).

La scelta del ceppo giusto di lievito è il fattore più importante nel limitare la produzione di  $\text{H}_2\text{S}$  in fermentazione; quindi, consente in seguito di evitare successivi trattamenti con il rame (usato in piccole quantità per ridurre gli odori di riduzione) o aerazione per eliminare idrogeno solforato.

L' $\text{H}_2\text{S}$  prodotto durante le prime o le fasi intermedie della fermentazione può spesso essere contrastato aggiungendo DAP o preparati di nutrienti per la fermentazione che contengono azoto.



Tuttavia, le aggiunte di DAP sono spesso inefficaci contro l' $\text{H}_2\text{S}$  prodotto durante le fasi avanzate della fermentazione. In questa situazione, è meglio eseguire una piccola aggiunta di rame verso la fine della fermentazione, quando la maggior parte dello zucchero è stato utilizzato, ma quando è anche presente un numero significativo di cellule di lievito ancora presenti per legare qualsiasi eccesso di rame ('Copper', n.d.).

Gli ioni metallici in genere influiscono negativamente sulla frazione aromatica del vino, e Ribeiro-Filho et al., (2021) hanno registrato una diminuzione degli esteri acetici con fermentazioni in presenza di rame.

Con fermentazioni svolte da ceppi sensibili, si assiste ad aumenti significativi di acidità volatile; probabilmente correlata alla condizione di fermentazione sotto stress (Capece et al., 2018). Inoltre, vista la elevata affinità per i composti solforati, la presenza di residui di rame nel mosto può avere anche degli effetti negativi sull'espressione aromatica delle varietà aromatiche come il Sauvignon blanc, il cui profilo aromatico caratteristico è dato proprio dalla presenza di tioli volatili, cioè molecole odorose caratterizzate dalla presenza di un atomo di zolfo.

### 13 RIFLESSI IN POST-VINIFICAZIONE

Il rame residuo nel vino è stato collegato a processi di deterioramento sia ossidativo che riduttivo: le reazioni ossidative catalizzate dal rame che coinvolgono composti fenolici possono essere molto pericolose per la qualità del vino, determinando la produzione di perossido di idrogeno, chinoni e acetaldeide (Danilewicz, 2011).

Per quanto riguarda l'off-flavour riduttivo, Clark et al., (2015) hanno dimostrato l'interazione negativa tra il rame residuo e l'idrogeno solforato nei vini conservati in condizioni di carenza di ossigeno. Inoltre, il rame può destabilizzare le proteine del vino, portando alla formazione di casse rameosa (Ribéreau-Gayon et al., 2006). La casse rameosa è una delle instabilità di metalli più comuni grazie alla scarsa concentrazione del metallo necessario perché si verifichi. L'eccesso di rame viene eliminato sotto forma di solfuri, tra i sali meno solubili, o rimosso con lieviti e fecce, anche loro con proprietà assorbente. Ma, se a fine fermentazione permangono concentrazioni maggiori di 0,3 mg/l, date da un arricchimento per contatto con ottone o bronzo o aggiunta di solfato di rame per eliminazione dei composti solforati, si può incorrere nell'insorgenza di casse rameosa. Il rame solitamente si trova in stato di ossidazione bivalente  $\text{Cu}^{2+}$ , ma se il vino è mantenuto al riparo da aria, quindi in condizioni riducenti, il rame viene ridotto in presenza di anidride solforosa a  $\text{Cu}^+$  suscettibile a causare intorbidamento da colloide instabile.

Il solfuro di rame colloidale formato da  $\text{Cu}^+$  più idrogeno solforato, proveniente dalla riduzione di anidride solforosa, precipita con le proteine.

Il contatto prolungato con il vino dei lieviti induce un sensibile abbassamento del potenziale di ossidoriduzione, quindi riduzione del rame che favorisce casse rameose. Tuttavia, la presenza dei lieviti, in soste prolungate, sequestra il rame che previene tale evento.

La casse rameosa avviene solitamente nei vini bianchi, meno protetti dei rossi, che invece possiedono polifenoli in grado di tamponare le reazioni redox e in genere hanno un contenuto di proteine insufficiente da reagire con il rame perché impegnate con i polifenoli (Ribéreau-Gayon, 2017b). Nei vini bianchi si può evitare questo evento sgradevole eliminando le proteine con bentonite o il rame con ferrocianuro di potassio o gomma arabica (Ribéreau-Gayon et al., 2006).

Sapendo che il limite massimo residuo, per legge, di rame è di 1 mg/l; gli ioni di rame in eccesso nei vini possono essere rimossi aggiungendo adsorbenti, come recentemente consentito dal OIV, quali: ferrocianuro di potassio, bentonite, gomma arabica, polivinilimidazolo, copolimeri di polivinilpirrolidone, chitina, chitosano ecc. Ciononostante, in seguito a questi trattamenti, i vini presentano un contenuto inferiore di polifenoli e composti aromatici, che si riflette sulle proprietà organolettiche del vino (Benítez et al., 2002).

Detto ciò, si può pensare di sfruttare la riduzione biotecnologica del metallo da parte dei lieviti, il che rappresenterebbe un metodo più sostenibile rispetto alle alternative chimico-fisiche sopra elencate.

## **OBIETTIVO**

L'obiettivo di questa tesi è studiare la correlazione che intercorre tra il rame contenuto nel mosto ed i suoi effetti sulla vinificazione.

Saranno studiati, di conseguenza, i parametri che mostrano correlazioni significative rispetto i residui di rame risultanti dopo la fermentazione.

## **MATERIALI E METODI**

Durante il periodo vendemmiale, sono stati raccolti vari campioni di mosti e i successivi vini provenienti da uve, derivanti da viticoltura biologica, all'interno del Consorzio di Tutela del Prosecco di Conegliano Valdobbiadene.

Tutti i campionamenti sono stati eseguiti all'interno di un'azienda biologica, cercando di ottenere una panoramica sul contenuto medio di rame nei mosti e nei relativi vini.

Oltre all'analisi dei mosti, sono stati analizzati i vini e raccolti i dati inerenti ai protocolli di lavorazione e ai ceppi di lieviti secchi attivi utilizzati, con l'obiettivo di trovare eventuali effetti dei ceppi di lievito sul contenuto finale del rame.

Il numero di campioni iniziali di mosto era 27, poi diminuito fino a 14 a causa delle difficoltà nell'abbinare il mosto al proprio vino a fine fermentazione.

### **Analisi di base:**

Per ogni campione di mosto e vino sono stati raccolti i dati analitici, determinati internamente alla cantina grazie al Foss WineScan SO<sub>2</sub>.

Il Foss WineScan SO<sub>2</sub> è uno strumento in grado di fornire un'analisi multiparametrica rapida grazie alla tecnologia FTIR (spettroscopia ad infrarossi a trasformata di Fourier). La spettroscopia FTIR utilizza energia modulata nella banda dell'infrarosso per studiare un campione. La luce infrarossa viene assorbita a frequenze specifiche che corrispondono direttamente ai livelli energetici vibrazionali dei legami tra atomi presenti nella molecola. I diversi legami in una molecola vibrano a diversi livelli energetici e quindi assorbono lunghezze d'onda diverse delle radiazioni infrarosse. La frequenza e l'intensità delle singole bande di assorbimento contribuiscono allo spettro complessivo, creando l'impronta digitale caratteristica della molecola.

La prova è stata svolta campionando mosti a fine flottazione; poiché con questo procedimento si va ad eliminare buona parte del rame. Una volta prelevato e analizzato con il Foss, il campione è stato posto in congelatore in falcon per centrifuga da 50 ml, fino al momento delle analisi su rame e acetaldeide. Lo stesso procedimento è stato seguito per la collezione dei campioni di vino.

### **Analisi del rame:**

La quantificazione del rame è stata svolta mediante l'utilizzo di uno spettrometro ad assorbimento atomico. I mosti e i vini sono stati filtrati e analizzati con lo strumento utilizzando una opportuna lampada a catodo cavo e una lunghezza d'onda di lettura di 324.8 nm.

Lo strumento è stato preventivamente calibrato con soluzioni di rame a 0,5, 1 e 1,5 mg/L.

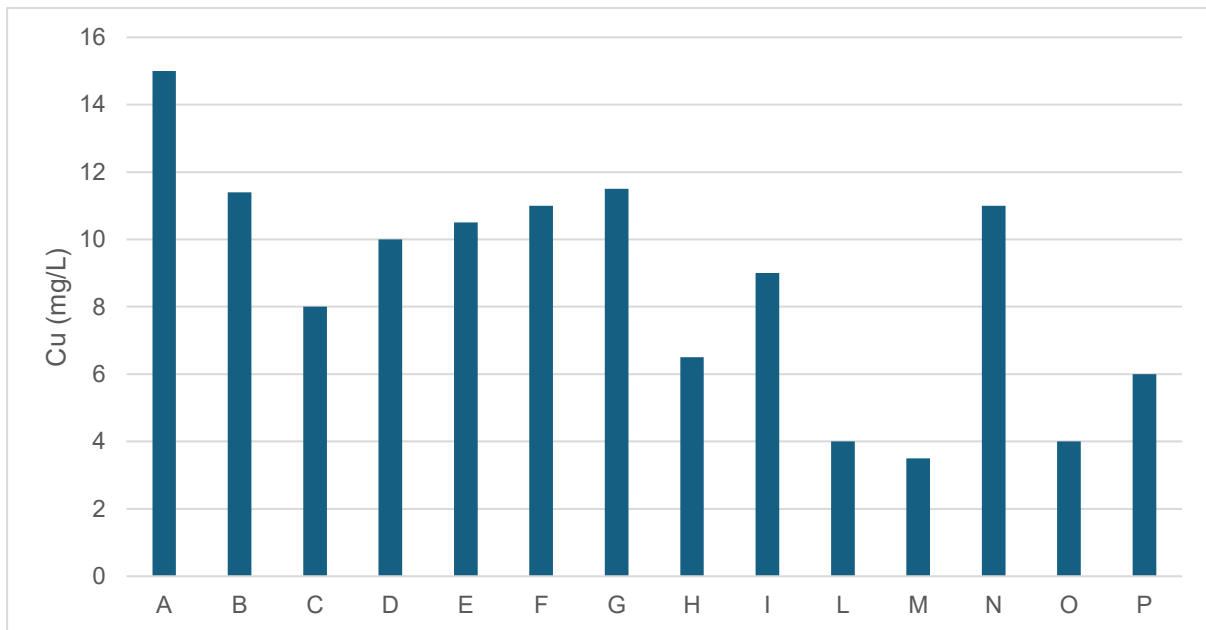
### Analisi dell'acetaldeide:

L'analisi dell'acetaldeide è stata eseguita con un analizzatore enzimatico (Qubio, R-Biopharm) utilizzando l'apposito kit e seguendo le istruzioni fornite dalla casa costruttrice.

## RISULTATI E DISCUSSIONE

In un primo momento è stato eseguito uno screening sui mosti in entrata nell'azienda per valutare l'effettivo contenuto di rame nel prodotto di partenza. I valori sono mostrati in Grafico 1.

Come detto, il numero di mosti analizzati è stato ridotto tenendo solo quelli per i quali è stato possibile tenere traccia in cantina del vino corrispondente.



**GRAFICO 1.** VALORI DI RAME RISCONTRATI NEI MOSTI IN ENTRATA NELL'AZIENDA

Come si può osservare la quantità di rame riscontrata nei mosti (dopo la flottazione, e quindi già dopo la eventuale perdita dovuta al legame con le fecce e alla precipitazione) è molto variabile con valori compresi tra 3.5 e 15 mg/L e una media di 8.7 mg/L.

Questo dimostra che in cantina, almeno in alcuni casi, il lievito può essere esposto a livelli di rame fino a 15 mg/L, per cui è molto importante capire innanzitutto se questi residui possono essere ridotti al di sotto del limite di legge con la sola fermentazione, ma anche l'effetto che questo residuo può avere sulle caratteristiche finali del vino.

Infatti, analisi preliminari svolte presso il laboratorio di Chimica Enologica dell'Università di Padova, hanno evidenziato come livelli di rame paragonabili a quelli riscontrati in questa tesi, possono causare un aumento nella produzione di acetaldeide, pur non modificando in maniera significativa la cinetica di fermentazione.

Per ogni mosto analizzato è stato prelevato ed analizzato anche il corrispondente vino.

È noto che in cantina si eseguono spesso dei tagli di masse differenti per raggiungere determinati parametri qualitativi o semplicemente per esigenze legate alla capienza dei contenitori, per cui è stato ristretto il campo di indagine ai soli prodotti per i quali esisteva una corrispondenza certa tra il mosto di partenza e il vino corrispondente.

I dati delle analisi sono riportati nella tabella seguente.

	<b>Rame nel mosto</b>	<b>Rame nel vino</b>	<b>Acetaldeide</b>	<b>Acidità volatile</b>	<b>APA mosto</b>	<b>Alcol</b>	<b>Glicerolo</b>
<b>A</b>	15	0,6	39	0,25	169	9,94	7,58
<b>B</b>	11,4	0,3	26	0,16	197	10,03	5,3
<b>C</b>	8	0,6	20	0,52	166	11,84	6,62
<b>D</b>	10	0,1	19	0,14	179	10,26	4,8
<b>E</b>	10,5	0,4	17	0,22	204	10,25	6,69
<b>F</b>	11	0,1	19	0,11	150	9,88	5,73
<b>G</b>	11,5	0,2	18	0,19	180	10,07	5,71
<b>H</b>	6,5	0,4	24	0,19	152	10,47	7,07
<b>I</b>	9	0,1	49	0,17	170	10,08	6,75
<b>L</b>	4	0,2	16	0,17	162	10,07	6,47
<b>M</b>	3,5	0,1	19	0,21	172	10,31	6,5
<b>N</b>	11	1	40	0,17	199	11,82	7,81
<b>O</b>	4	0	15	0,2	155	10,25	6,43
<b>P</b>	6	0	10	0,08	163	9,99	6,53

**TABELLA 1.** ANALISI DEI MOSTI E DEI VINI OGGETTO DELLA TESI

Dal momento che, come riportato in introduzione, anche l'azoto prontamente assimilabile (APA) dei mosti può avere un effetto sulla capacità dei lieviti di rispondere allo stress del rame, è stato preso in considerazione anche questo parametro.

È stata quindi eseguita un'analisi di correlazione per trovare eventuali legami tra il contenuto di rame nel mosto e i parametri enologici del vino finito.

	<b>Rame nel mosto</b>	<b>Rame nel vino</b>	<b>Acetaldeide</b>	<b>Acidità volatile</b>	<b>APA finale</b>	<b>Alcol</b>	<b>Glicerolo</b>
<b>Rame nel mosto</b>	1						
<b>Rame nel vino</b>	<b>0,465</b>	1					
<b>Acetaldeide</b>	<b>0,486</b>	<b>0,486</b>	1				
<b>Acidità volatile</b>	0,014	0,436	0,047	1			
<b>APA finale</b>	0,450	0,452	0,229	-0,005	1		
<b>Alcol</b>	-0,022	<b>0,734</b>	0,191	<b>0,629</b>	0,232	1	
<b>Glicerolo</b>	-0,005	<b>0,620</b>	<b>0,471</b>	0,244	-0,020	0,410	1

**TABELLA 2.** ANALISI DI CORRELAZIONE

Il contenuto di azoto nel mosto non ha mostrato correlazioni significative con gli altri parametri, probabilmente perché i valori erano tutti comunque in un range (150-200 mg/L) considerato ottimale per lo svolgimento della fermentazione alcolica. Probabilmente per vedere degli effetti significativi sulla resistenza al rame il lievito deve trovarsi in una condizione di carenza nutrizionale.

Nonostante la drastica diminuzione del rame causata dalla fermentazione, con riduzione ben al di sotto del limite di legge di 1 mg/L (Tabella 1) (*Gazzetta Ufficiale*, 2017), si riscontra una correlazione significativa tra il contenuto del rame iniziale e quello finale.

L'unico altro parametro che effettivamente ha una correlazione significativa con il rame di partenza è l'acetaldeide, a conferma dei dati già ottenuti in precedenza.

Questo indicherebbe che, anche se non c'è un effetto diretto del rame sulla velocità di fermentazione, la presenza della molecola nel mezzo causa, comunque, degli effetti sul metabolismo del lievito. La maggiore presenza di acetaldeide nel vino, che è una molecola con elevata affinità per la anidride solforosa, determinerà la necessità di eseguire maggiori correzioni con solfiti per garantire la minima protezione antiossidante e antimicrobica richiesta. Non è chiara invece la correlazione positiva tra il contenuto di rame residuale nel vino e il contenuto di alcol e glicerolo. Una possibile ipotesi è che il grado alcolico più elevato sia un ulteriore fattore di stress per il lievito, riducendo quindi la sua capacità di abbattere il rame presente nel mezzo. In questo caso quindi il maggiore contenuto di rame residuo nel vino sarebbe una conseguenza, e non una causa, del maggiore contenuto alcolico.

La correlazione con il glicerolo andrebbe di pari passo con questa ipotesi: il glicerolo viene sintetizzato di lieviti in particolare nelle prime fasi della fermentazione per far fronte allo stress

osmotico causato dall'elevata concentrazione di zuccheri, di conseguenza, è logico che un maggiore contenuto di alcol corrisponda anche a livelli maggiori di glicerolo.

Infine, l'acidità volatile ha mostrato una correlazione positiva e significativa con l'etanolo, e anche in questo caso la relazione dipende esclusivamente dal metabolismo del lievito.

È invece interessante notare che l'acidità volatile non è correlata con il contenuto iniziale di rame: considerando che il rame può essere un fattore di stress per il lievito, ci si aspetterebbe un aumento di tutti i parametri legati allo stress, tra cui anche la produzione di acido acetico.

Il fatto che invece ci sia un effetto solo sull'acetaldeide suggerisce che il meccanismo di azione del rame sia molto più specifico e non generalizzato.

Un fattore da considerare è sicuramente il ceppo di lievito utilizzato per la fermentazione, in quanto è noto che ceppi diversi possono avere diversa sensibilità al rame.

I dati presentati finora non hanno tenuto conto di questo fattore. Purtroppo, come si può vedere dalla tabella successiva, i lieviti utilizzati in azienda per l'elaborazione dei vini sono stati molti e quasi tutti diversi tra loro, per cui non è stato possibile trovare delle corrispondenze tra un determinato ceppo e la sua risposta al rame.

<b>CAMPIONE</b>	<b>LSA</b>
A	OPALE
B	PR106
C	GVS107
D	PR106
E	VIN13
F	VIV SMART
G	LB8
H	PR106
I	NT116 – SAUVAGE
L	OPALE
M	QA23
N	ALBA
O	NT106
P	ALBA

**TABELLA 3.**

È comunque interessante notare che due dei vini con il maggior contenuto residuale di rame sono quelli ottenuti con il lievito ALBA.

## CONCLUSIONI

I dati presentati in questa tesi hanno confermato che la presenza di rame nel mosto può avere un effetto sul metabolismo del lievito, in particolare causando una maggiore produzione di acetaldeide. Questo dato, finora non dimostrato in altri esperimenti, pone le basi per una gestione più mirata della fermentazione dei mosti, in particolare di quelli provenienti da coltivazione biologica.

Ulteriori studi saranno necessari per capire tramite quale meccanismo il rame determina questo effetto sul lievito e quali sono i dosaggi di rame necessari per attivare questo meccanismo di risposta.

L'osservazione sul possibile diverso comportamento del lievito ALBA suggerisce inoltre che una parte degli studi si dovrà rivolgere alla selezione di ceppi che siano in grado di rispondere meglio alla presenza del rame senza causare produzioni eccessive di acetaldeide.



## BIBLIOGRAFIA

- Adamo, G. M., Lotti, M., Tamás, M. J., & Brocca, S. (2012). Amplification of the CUP1 gene is associated with evolution of copper tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology (Reading, England)*, *158*(Pt 9), 2325–2335. <https://doi.org/10.1099/mic.0.058024-0>
- Alloway, B. J. (1995). *Heavy Metals in Soils*. Springer Science & Business Media.
- Benítez, P., Castro-Mejías, R., & Barroso, C. G. (2002). Removal of iron, copper and manganese from white wines through ion exchange techniques: Effects on their organoleptic characteristics and susceptibility to browning. *Analytica Chimica Acta*, *458*, 197–202. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(01\)01499-4](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(01)01499-4)
- Berk, Curt, Berl, & De Toni. (n.d.). *Principali ampelopatie*. veneto agricoltura. [https://www.venetoagricoltura.org/upload/pubblicazioni/GUIDA\\_PER\\_IL\\_VITICOLTORE/6%20Principali%20Ampelopatie.pdf](https://www.venetoagricoltura.org/upload/pubblicazioni/GUIDA_PER_IL_VITICOLTORE/6%20Principali%20Ampelopatie.pdf)
- Brun, L. A., Le Corff, J., & Maillet, J. (2003). Effects of elevated soil copper on phenology, growth and reproduction of five ruderal plant species. *Environmental Pollution*, *122*(3), 361–368. [https://doi.org/10.1016/S0269-7491\(02\)00312-3](https://doi.org/10.1016/S0269-7491(02)00312-3)
- Capece, A., Romaniello, R., Scrano, L., Siesto, G., & Romano, P. (2018). Yeast Starter as a Biotechnological Tool for Reducing Copper Content in Wine. *Frontiers in Microbiology*, *8*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02632>
- Casali, C., Moterle, D., dos Santos, D., Brunetto, G., Corcini, A., Kaminski, J., & Melo, G. (2008). Copper forms and desorption in soils under grapevine in the Serra Gaúcha of Rio Grande do Sul. *R. Bras. Ci. Solo*, *32*, 1479–1487.
- Chaignon, V., & Hinsinger, P. (2003). A Biotest for Evaluating Copper Bioavailability to Plants in a Contaminated Soil. *Journal of Environmental Quality*, *32*(3), 824–833. <https://doi.org/10.2134/jeq2003.8240>

- 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. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 21(1), 30–39. <https://doi.org/10.1111/ajgw.12114>
- Corazzina, E. (2018). *Coltivare la vite: Tradizione, innovazione, sostenibilità* (5. ed. riveduta). L'informatore agrario.
- D'Ambra, V., & Rui, D. (1990). *Fondamenti di patologia vegetale*. Liviana Editrice.
- Danilewicz, J. (2011). Review of Oxidative Processes in Wine and Value of Reduction Potentials in Enology. *American Journal of Enology and Viticulture*, 63, 1–10. <https://doi.org/10.5344/ajev.2011.11046>
- de Guidi, I., Galeote, V., Bruno, B., & Legras, J.-L. (2024). Copper-based grape pest management has impacted wine aroma. *Scientific Reports*, 14. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-60335-9>
- Deluisa, A., Giandon, P., Aichner, M., Bortolami, P., Bruna, L., Lupetti, A., Nardelli, F., & Stringari, G. (1996). Copper pollution in Italian vineyard soils. *Communications in Soil Science and Plant Analysis - COMMUN SOIL SCI PLANT ANAL*, 27, 1537–1548. <https://doi.org/10.1080/00103629609369651>
- Ernst, W. H. O. (1996). Bioavailability of heavy metals and decontamination of soils by plants. *Applied Geochemistry*, 11(1), 163–167. [https://doi.org/10.1016/0883-2927\(95\)00040-2](https://doi.org/10.1016/0883-2927(95)00040-2)
- Errichiello, F., Picariello, L., Forino, M., Blaiotta, G., Petruzzello, E., Moio, L., & Gambuti, A. (2024). Copper (II) Level in Musts Affects Acetaldehyde Concentration, Phenolic Composition, and Chromatic Characteristics of Red and White Wines. *Molecules*, 29. <https://doi.org/10.3390/molecules29122907>

- Fogel, S., Welch, J. W., Cathala, G., & Karin, M. (1983). Gene amplification in yeast: CUP1 copy number regulates copper resistance. *Current Genetics*, 7(5), 347–355. <https://doi.org/10.1007/BF00445874>
- García Esparza, M., Capri, E., Pirzadeh, P., & Trevisan, M. (2006). Copper content of grape and wine from Italian farms. *Food Additives and Contaminants*, 23, 274–280. <https://doi.org/10.1080/02652030500429117>
- Golden Jubilee International Symposium on ‘Copper in Soils and Plants’ (1981 : Murdoch University) (with Internet Archive). (1981). *Copper in soils and plants: Proceedings of the Golden Jubilee International Symposium on ‘Copper in Soils and Plants,’ held at Murdoch University, Perth, Western Australia on May 7-9, 1981, under the sponsorship of the Australian Academy of Technological Sciences*. Sydney ; New York : Academic Press. <http://archive.org/details/copperinsoilspla0000gold>
- Grant, C. M. (2008). Metabolic reconfiguration is a regulated response to oxidative stress. *Journal of Biology*, 7(1), 1. <https://doi.org/10.1186/jbiol63>
- Guzzon, R. (2012). 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. *Vitis -Geilweilerhof-*, 52, 149–155.
- Kinniburgh, D. G., Jackson, M. L., & Syers, J. K. (1976). Adsorption of Alkaline Earth, Transition, and Heavy Metal Cations by Hydrous Oxide Gels of Iron and Aluminum. *Soil Science Society of America Journal*, 40(5), 796–799. <https://doi.org/10.2136/sssaj1976.03615995004000050047x>
- Komárek, M., Cadková, E., Chrástný, V., Bordas, F., & Bollinger, J.-C. (2009). Contamination of vineyard soils with fungicides: A review of environmental and toxicological aspects. *Environment International*, 36, 138–151. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2009.10.005>

- Manici, L., & Caputo, F. (2019). *Impatto del rame sulle comunità microbiche del suolo—Accademia dei Georgofili*. <https://www.georgofili.net/articoli/impatto-del-rame-sulle-comunit-microbiche-del-suolo/5773>
- Martins, G., Miot-Sertier, C., Lauga, B., Claisse, O., Lonvaud-Funel, A., Soulas, G., & Masneuf-Pomarède, I. (2012). Grape berry bacterial microbiota: Impact of the ripening process and the farming system. *International Journal of Food Microbiology*, *158*, 93–100. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.06.013>
- Martins, V., Teixeira, A., Bassil, E., Blumwald, E., & Gerós, H. (2014). Metabolic changes of *Vitis vinifera* berries and leaves exposed to Bordeaux mixture. *Plant Physiology and Biochemistry: PPB / Societe Francaise de Physiologie Vegetale*, *82C*, 270–278. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2014.06.016>
- Martins, V., Teixeira, A., & Gerós, H. (2015). Changes in the volatile composition of wine from grapes treated with Bordeaux mixture: A laboratory-scale study. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, *21*(3), 425–429. <https://doi.org/10.1111/ajgw.12150>
- McBride, M. B., MCBRIDE, M. B. A., & McBride, P. D. of S. C. M. B. (1994). *Environmental Chemistry of Soils*. Oxford University Press.
- Morando, A., & Guercio, P. (1984). La peronospora della vite. *VigneVini*, *4*.
- Ostapczuk, P., Eschnauer, H. R., & Scollary, G. R. (1997). Determination of cadmium, lead and copper in wine by potentiometric stripping analysis. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, *358*(6), 723–727. <https://doi.org/10.1007/s002160050498>
- Pohl, P. (2007). What do metals tell us about wine? *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, *26*(9), 941–949. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2007.07.005>
- Provenzano, M. R., El Bilali, H., Simeone, V., Baser, N., Mondelli, D., & Cesari, G. (2010). Copper contents in grapes and wines from a Mediterranean organic vineyard. *Food Chemistry*, *122*(4), 1338–1343. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.03.103>

- Ralsler, M., Wamelink, M., Kowald, A., Gerisch, B., Heeren, G., Struys, E., Klipp, E., Jakobs, C., Breitenbach, M., Lehrach, H., & Krobitsch, S. (2008). Dynamic rerouting of the carbohydrate flux is key to counteracting oxidative stress. *Journal of Biology*, 6, 10. <https://doi.org/10.1186/jbiol61>
- Ribeiro-Filho, N., Linforth, R., Powell, C. D., & Fisk, I. D. (2021). Influence of essential inorganic elements on flavour formation during yeast fermentation. *Food Chemistry*, 361, 130025. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130025>
- Ribéreau-Gayon, P. (2017). *Trattato di enologia 2* (4. ed). Edagricole.
- Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., & Dubourdieu, D. (2006). Handbook of Enology. *Handbook of Enology*, 2, 1–441. <https://doi.org/10.1002/0470010398>
- Ricciolini, M., & Rizzo, D. (2007). *Avversità della vite e strategie di difesa integrata in Toscana*. ARSIA.
- Romic, M., Filipović, L., Baki, H., & Romi, D. (2014). *Copper Accumulation in Vineyard Soils: Distribution, Fractionation and Bioavailability Assessment*. <https://doi.org/10.5772/57266>
- Roubelakis-Angelakis, K., & Kliewer, W. (2010). Nitrogen Metabolism in Grapevine. In *Horticultural Reviews* (Vol. 14, pp. 407–452). <https://doi.org/10.1002/9780470650523.ch9>
- Shanmuganathan, A., Avery, S. V., Willetts, S. A., & Houghton, J. E. (2004). Copper-induced oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae* targets enzymes of the glycolytic pathway. *FEBS Letters*, 556(1–3), 253–259. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(03\)01428-5](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(03)01428-5)
- Sun, X., Zhao, Y., Liu, L., Jia, B., Zhao, F., Huang, W., & Jicheng, Z. (2015). Copper Tolerance and Biosorption of *Saccharomyces cerevisiae* during Alcoholic Fermentation. *PLOS ONE*, 10, e0128611. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0128611>

- Tromp, A., & Klerk, C. A. de. (1988). Effect of Copperoxychloride on the Fermentation of Must and on Wine Quality. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 9(1), Article 1. <https://doi.org/10.21548/9-1-2307>
- Vilanova, M., Ugliano, M., Varela, C., Siebert, T., Pretorius, I., & Henschke, P. A. (2007). Assimilable nitrogen utilisation and production of volatile and non-volatile compounds in chemically defined medium by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 77, 145–157. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-1145-z>
- Wang, J., & Chen, C. (2006). Biosorption of heavy metals by *Saccharomyces cerevisiae*: A review. *Biotechnology Advances*, 24(5), 427–451. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2006.03.001>
- Warringer, J., Zörgö, E., Cubillos, F. A., Zia, A., Gjuvslund, A., Simpson, J. T., Forsmark, A., Durbin, R., Omholt, S. W., Louis, E. J., Liti, G., Moses, A., & Blomberg, A. (2011). Trait Variation in Yeast Is Defined by Population History. *PLoS Genetics*, 7(6), e1002111. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002111>
- Youssef, R. A., & Chino, M. (1989). Root-induced changes in the rhizosphere of plants. I. pH changes in relation to the bulk soil. *Soil Science and Plant Nutrition*, 35(3), 461–468. <https://doi.org/10.1080/00380768.1989.10434779>
- Yruela, I. (2009). Copper in plants: Acquisition, transport and interactions. *Functional Plant Biology: FPB*, 36(5), 409–430. <https://doi.org/10.1071/FP08288>
- Zecchin, G. (2020). *Manuale difesa integrata della vite*. Regione del Veneto. [https://drive.google.com/file/d/147iYezO6kpbrHpK-6yb6drWQqrOsreya/view?usp=sharing&usp=embed\\_facebook](https://drive.google.com/file/d/147iYezO6kpbrHpK-6yb6drWQqrOsreya/view?usp=sharing&usp=embed_facebook)

## SITOGRAFIA

Copper. (n.d.). *The Australian Wine Research Institute*. Retrieved 10 September 2024, from [https://www.awri.com.au/industry\\_support/winemaking\\_resources/frequently\\_asked\\_questions/copper/](https://www.awri.com.au/industry_support/winemaking_resources/frequently_asked_questions/copper/)

*Gazzetta Ufficiale*. (2017, August 29). <https://www.gazzettaufficiale.it/eli/id/2017/08/29/17A06065/sg>

(n.d.). CUP1-1/YHRO53C Overview. *Saccharomyces genome database*. <https://www.yeastgenome.org/locus/S000001095>.