

NUOVO METODO PER LA VALUTAZIONE DELLA POTENZIALE INSTABILITÀ PROTEICA DEI VINI

Emilio CELOTTI

Dipartimento di Scienze degli Alimenti, Università degli Studi di Udine

Articolo tratto dalla relazione presentata all'ENOFORUM 2005, Piacenza, 21-23 marzo.

Le proteine del vino

Le proteine dei vini sono composti che potenzialmente possono determinare instabilità chimico-fisica del sistema in funzione delle condizioni del vino e delle loro caratteristiche strutturali.

Se il sistema rimane inalterato, le proteine permangono in soluzione stabile, però se almeno un fattore di instabilità interviene, il vino si intorbida.

In particolare la sequenza degli amminoacidi e la disposizione sterica della proteina comportano notevole reattività e differenziazione della struttura molecolare delle diverse molecole.

L'origine degli amminoacidi e delle proteine è nota, in particolare derivano dall'uva, dai lieviti di fermentazione ed eventualmente da aggiunte esogene. Dopo la fermentazione rimangono prevalentemente le proteine che sono passate indenni durante la vinificazione, mentre gli amminoacidi sono poco rappresentati in quanto utilizzati dai lieviti.

In termini quantitativi rimangono mediamente 300-400 mg/L di proteine, tuttavia si possono raggiungere anche valori prossimi a 1000 mg/L.

I fattori che possono destabilizzare le proteine, sono molteplici. Ricordiamo la temperatura, i metalli, l'ossigenazione, la presenza di tannini, variazioni di pH e variazioni dello stato di solvatazione colloidale delle particelle.

Le proteine in forma stabile nel vino sono colloidali idrofili, presentano carica elettrica positiva in quanto il loro punto isoelettrico varia tra 4 e 7 ed è pertanto superiore al pH del vino; hanno alta reattività con i tannini e il loro peso molecolare (PM) varia tra 16 e 100 KDa; possiedono inoltre capacità adsorbenti e si legano di preferenza con tannini ad alto peso molecolare.

Le proteine a più alto PM sono più stabili in quanto legate a polisaccaridi (glicoproteine), il loro PM arriva anche a 100 KDa, quelle legate all'instabilità dei vini sono paradossalmente le più piccole, con PM variabili tra 16 e 30 KDa.

Una particolare caratteristica delle proteine dei vini è la loro reattività con i tannini, questo determina una stabilizzazione naturale nei vini rossi, mentre in quelli bianchi le proteine possono rappresentare un rischio di instabilità futura, in funzione delle condizioni di conservazione del vino.

La reattività con i tannini è anche funzione delle caratteristiche strutturali delle proteine, le particelle colloidali che si formano per interazione con i tannini hanno dimensioni variabili tra qualche decina di nm e 600-800nm di diametro idrocolloidale.

In questa complessità di struttura e reattività ne consegue che le proteine possono dare instabilità per:

- caratteri costitutivi della molecola
- condizioni del mezzo

Si tratta spesso di fenomeni colloidali di difficile previsione in virtù della complessità e della variabilità delle interazioni e della combinazione dei fattori di instabilità.

Da recenti studi sui sistemi colloidali, i principali fattori di stabilizzazione sono:

- solvatazione
- carica elettrica

Ne consegue che l'eliminazione dello strato di solvatazione e l'elisione della carica elettrica sono le principali cause di instabilità.

Nel vino sono presenti contemporaneamente una soluzione vera e un sistema colloidale, quest'ultimo può destabilizzarsi determinando alterazioni chimico-fisiche con probabile precipitazione di particelle in forma più o meno evidente. La stabilità colloidale dipende da diversi fattori; citiamo i moti browniani, le interazioni di Van der Waals, l'idrofobicità, la solvatazione, la

e accurati, senza significativi effetti di interferenti non proteici. La sovrastima diventa molto rischiosa in quanto comporterebbe un trattamento deproteinizzante eccessivo e quindi a rischio di impoverimento organolettico del vino.

Il nuovo metodo di valutazione

(ProtoCheck, Brevetto dell'Università degli Studi di Udine, prodotto e distribuito in licenza esclusiva da EVER srl/Pramaggiore/VE/Italy +390421200455, www.ever.it)

Considerata la disomogeneità di risposta dei metodi presenti ed i loro problemi intrinseci, è stato realizzato un nuovo test che riduce in modo significativo le problematiche sopra citate in quanto è:

- Standardizzabile (il reagente anionico è una soluzione titolata e perfettamente standardizzabile)
- Rapido (il tempo di reazione è brevissimo e dopo 1 minuto il valore è stabile)
- Ad alta specificità (si sfrutta l'elettropositività delle proteine)
- Interferenze limitate (tannini, polisaccaridi, torbidità non interferiscono sulla reazione)
- Utilizzabile direttamente in cantina (è sufficiente un piccolo turbidimetro ed una provetta con il reattivo)
- Non serve filtrare il campione (il valore è una misura differenziale di torbidità tra il campione tal quale e lo stesso dopo il test)

Per cercare di soddisfare al meglio tutte queste esigenze si valuta la potenziale instabilità proteica sfruttando le caratteristiche di elettropositività delle proteine al pH del vino, praticamente le uniche sostanze a carica elettrica positiva.

Il test realizza l'elettroneutralizzazione delle proteine che, una volta arrivate al punto isoelettrico, diventano insolubili e determinano una torbidità misurabile. ProtoCheck è una miscela standardizzabile e titolata di reagenti anionici stabilizzati. L'aggiunta del reattivo provoca la rapida neutralizzazione delle sole proteine, senza interagire con gli altri componenti del vino come tannini, polisaccaridi, siano essi in soluzione o in forma colloidale.

Il campione infatti non deve essere filtrato poiché si valuta un differenziale di torbidità tra il campione tal quale e lo stesso dopo l'aggiunta del reattivo.

Analogamente agli altri test, non sforna nessuna ricetta, fornisce invece in tempi rapidissimi (1 minuto) una stima della potenziale instabilità proteica del vino, informazione che l'enologo dovrà interpretare e utilizzare in modo ragionato in funzione del tipo di prodotto da elaborare e delle successive condizioni di conservazione del vino prima e dopo l'imbottigliamento.

La risposta delle proteine su soluzione modello (Figura 2) è perfettamente lineare anche se l'intensità di reazione può variare da proteina a proteina; quest'ultimo aspetto non è influente in quanto è effettivamente quello che interessa, vale a dire valutare la potenziale instabilità, che pertanto può essere diversa in funzione del tipo di proteina e della sua reattività.

La valutazione di proteine animali e vegetali ha sempre fornito risposte lineari, anche l'aggiunta tarata su vino analizzata dopo equilibratura del sistema, ha fornito risposte lineari.

In base ai risultati ottenuti con le proteine analizzate, si è ricavata una sensibilità analitica di 10 mg/L, valore più che accettabile per le esigenze enologiche.

Figura 2. Risposta delle proteine al test ProtoCheck, su soluzione simil-vino ed effetto dell'etanolo

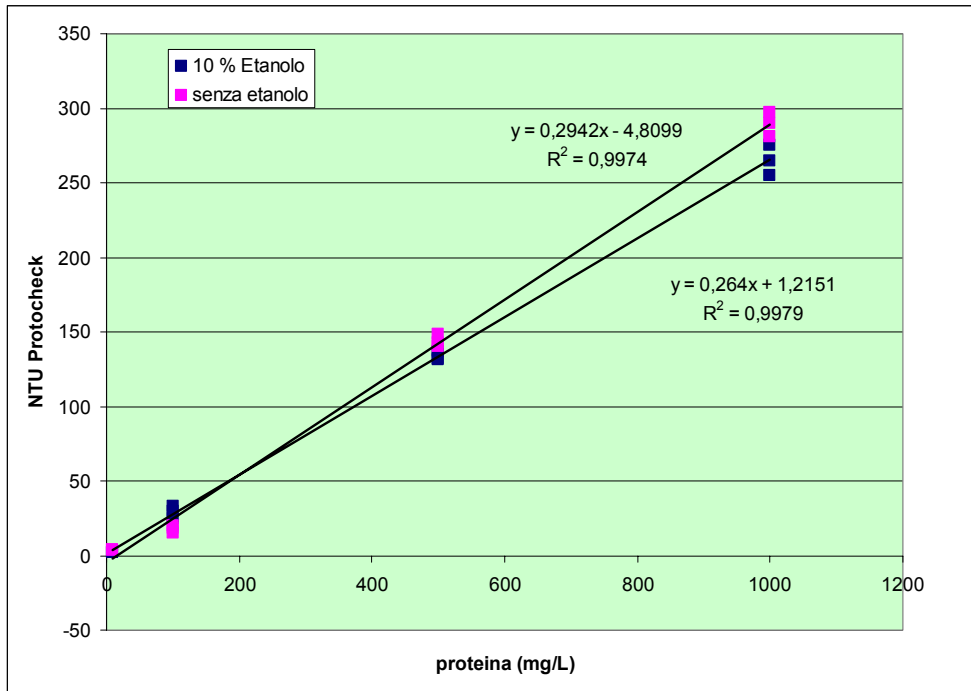


Figura 3. Applicazione del test ProtoCheck su soluzioni simil-vino a diverse concentrazioni di tannino d'uva

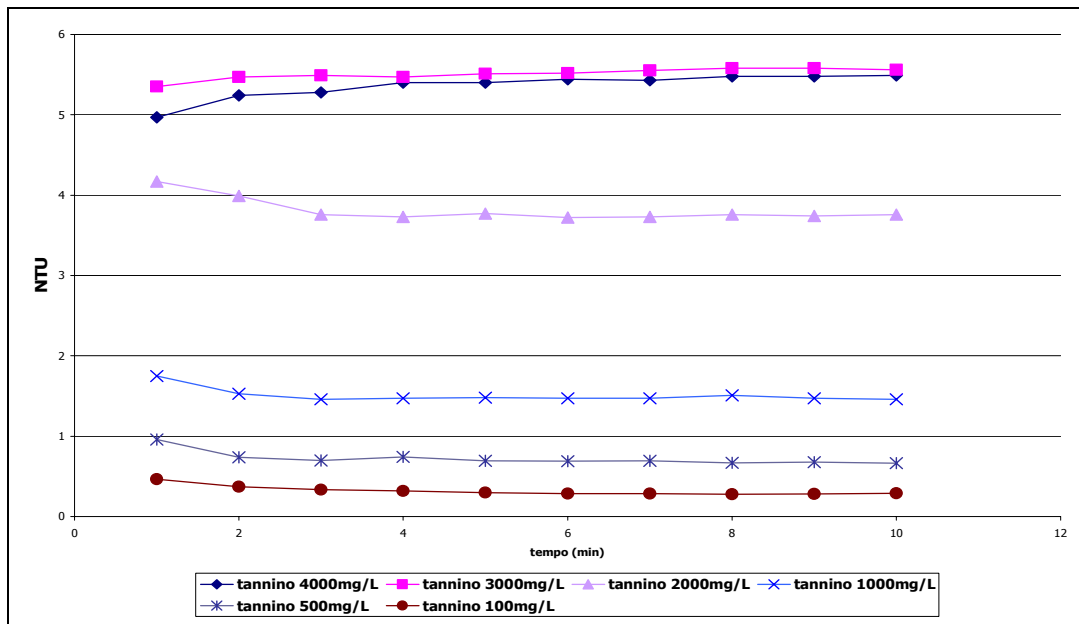
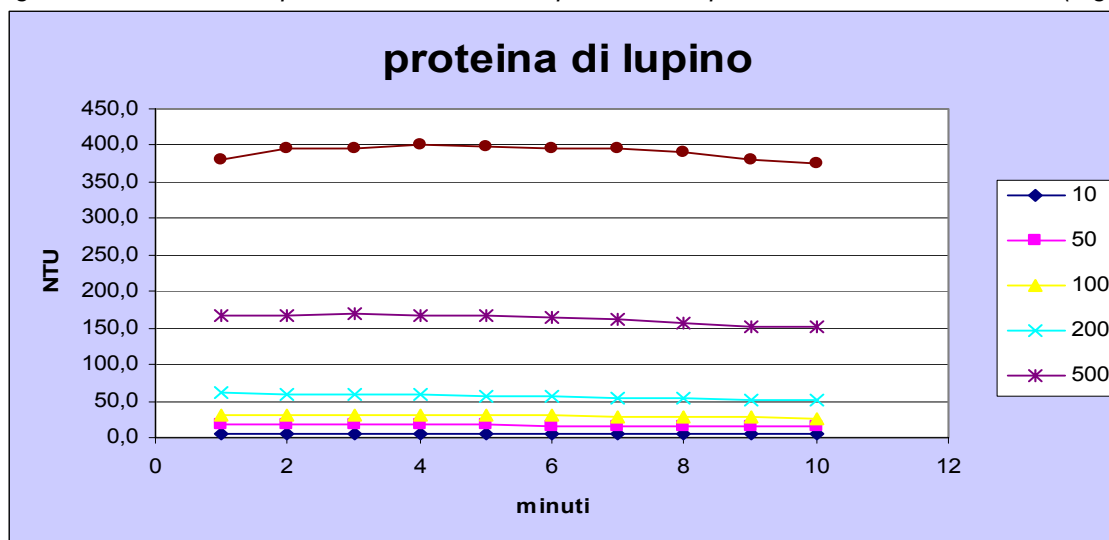


Figura 4. Cinetiche di risposta al ProtoCheck di proteina di lupino a diverse concentrazioni (mg/L)



La valutazione dei principali interferenti ha permesso di dimostrare l'assenza di effetto del tannino (Figura 3), inoltre si è dimostrato che l'etanolo non modifica in modo significativo la risposta (Figura 2), ciò significa che la valutazione può essere realizzata anche su succhi a pH acido. L'assenza di effetto del tannino, alle diverse concentrazioni permette di utilizzare il test in tutte le tipologie di vino grazie alla sola reattività del reagente con le cariche positive delle proteine.

Le cinetiche di risposta al reagente hanno confermato la rapidità di reazione (Figura 4) e questo consente di avere un test che dopo soli 60 secondi fornisce un valore di stima della potenziale instabilità proteica del vino. La figura evidenzia che a tutte le concentrazioni di proteina la risposta è praticamente immediata e stabile nel tempo; a seguito delle numerose esperienze effettuate con diverse proteine animali e vegetali, si è dimostrato che è sufficiente 1 minuto per avere il risultato finale del test.

Le condizioni finali della procedura possono essere così riassunte:

1. utilizzo del campione tal quale, non serve filtrare
2. misura della torbidità del campione tal quale
3. aggiunta del reagente anionico (2 volumi di vino e 1 volume di reagente)
4. agitare capovolgendo 2-3 volte la provetta
5. lettura della torbidità dopo 1 minuto
6. **ProtoCheck** = differenziale di torbidità (torbidità dopo il test – torbidità iniziale/1,5*)
*1,5 è il fattore di diluizione

Dalle esperienze realizzate si può considerare stabile un vino che presenta un valore fino a 5 NTU, valori superiori sono legati a rischi di instabilità variabili.

La figura 5 evidenzia alcuni esempi di risposta tra l'impiego del test con tannino e con il reagente anionico. E' evidente che il tannino sovrastima il problema, in particolare quello di tipo condensato, mentre il reagente specifico anionico presenta mediamente valori molto bassi di torbidità provocata.

Anche in confronto al bentotest sono interessanti i risultati della figura 6 dove si evidenzia che spesso esiste una sovrastima del problema, con il rischio di sovradosare in cantina i trattamenti deproteinizzanti, mettendo a rischio il profilo organolettico del prodotto.

Tuttavia si osservano differenze di risposta tra i diversi test legate certamente al diverso principio di reazione con le proteine.

In alcune situazioni studiate (Figura 7) è emerso che dopo trattamento con bentonite il test con tannino ha evidenziato instabilità simile al prodotto non trattato, evidenziando una potenziale

instabilità solo per effetto dell'alta reattività del tannino con le poche proteine rimaste, mentre il test con reagente anionico ha risposto negativamente dopo trattamento con bentonite, evidenziando un buon effetto stabilizzante con soli 20 g/hL di bentonite. Questo esempio è significativo in quanto mette in luce il limite di utilizzo del tannino come test di controllo; nel caso riportato in figura l'enologo sarebbe costretto ad aggiungere ulteriore bentonite che avrebbe esclusivamente un effetto adsorbente su colore e aromi.

Figura 5. Confronto su alcuni vini tra test con tannino (A=galla; B=uva) e ProtoCheck

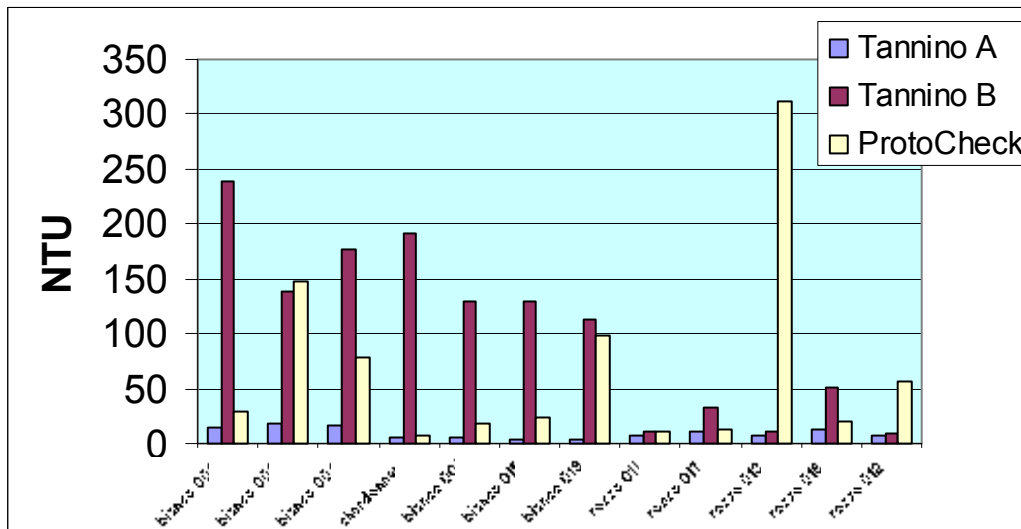


Figura 6. Confronto su alcuni vini tra Bentotest e ProtoCheck

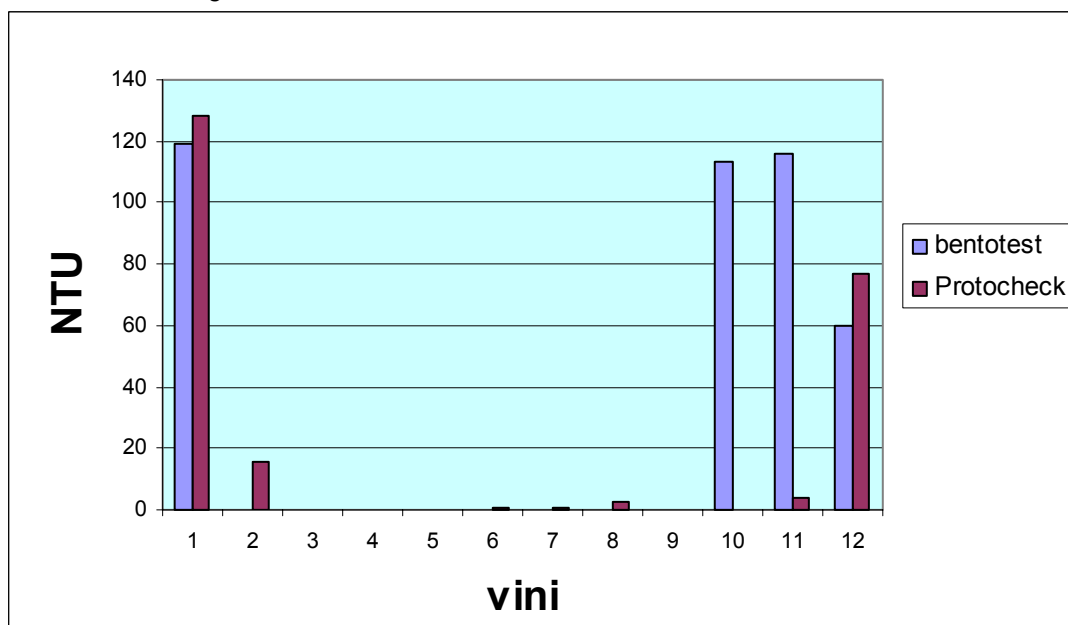
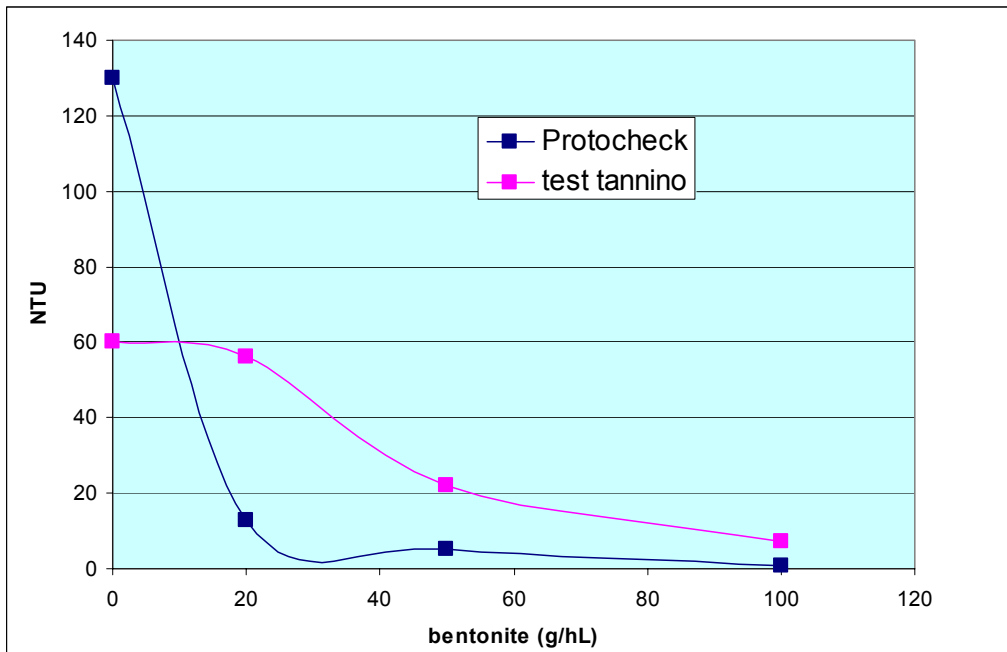


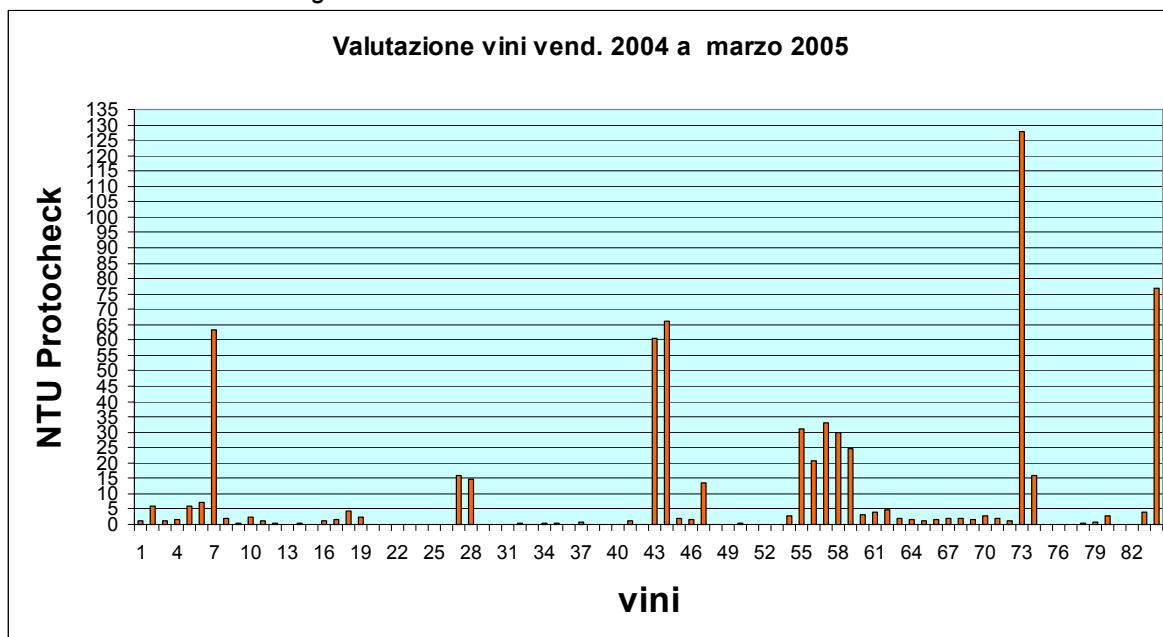
Figura 7. Confronto tra test dopo trattamento con bentonite



Nella figura 8 si riportano alcune valutazioni della stabilità proteica su un campionario di vini della vendemmia 2004, analizzati a marzo 2005. La maggior parte dei vini rossi ha dimostrato di essere stabile, evidenziando valori al test quasi sempre inferiori a 5 NTU, nel caso invece dei vini bianchi, si evidenziano casi a media instabilità e casi con alta instabilità proteica potenziale.

La rapidità del test e la semplicità di esecuzione lo rendono applicabile direttamente in cantina, questo può consentire all'enologo di effettuare dei controlli on-line sulla stabilizzazione proteica, senza necessità di mandare il campione in laboratorio, pertanto l'informazione risulta immediatamente utilizzabile e gestibile in cantina; inoltre il tutto è semplificato dalla possibilità di effettuare il test sul campione grezzo, senza necessità di filtrare.

Figura 8. Valutazione di alcuni vini con il nuovo test



Conclusioni

L'approccio analitico mediante elettroneutralizzazione della carica positiva delle proteine del vino rappresenta un metodo più specifico rispetto ad alcuni sistemi in uso e consente così di valutare esclusivamente la potenziale instabilità proteica senza sovrastimare il problema.

Inoltre la rapidità del test e la standardizzazione dell'analisi possono consentire un più facile ed immediato confronto tra tecnici e tra laboratori, utilizzando un valore di torbidità assolutamente confrontabile.

Questo test (ProtoCheck) si aggiunge agli altri come ulteriore possibilità analitica, l'importante comunque è conoscere i limiti e i vantaggi di ciascun metodo al fine di scegliere quello più idoneo alle specifiche esigenze analitiche, finalizzate ad ottimizzare interventi tecnologici di stabilizzazione proteica rispettosi della qualità globale del vino.

Principale bibliografia consultata

Achaerandio et al., 2001, *Am. J. Enol. Vitic.*; Blade e Boulton, 1988; Boulton, 1981, *Am. J. Enol. Vitic.*; Boulton et al., 1996. *Principle and Practices of Winemaking*, The Chapman & Hall Pub.; Cordonnier et Dugal, 1968; Dawes et al., 1994, *Am. J. Enol. Vitic.*; Dubourdieu et al., 1986; Ferreira et al., 2001, 2002, *Trends in Food Sciences and Tech.*; Feuillat, 1983; Hunter R.J. 1986. *Zeta potential in colloid science, Principles and Applications*. Ed. *Academic Press Inc.* Orlando, Florida.; Hsu et al., 1987, *Am. J. Enol. Vitic.*; Hsu e Heatherbell, 1987, *Am. J. Enol. Vitic.*; Jackobs L. Bentotest, 1962. *Das Weinblatt*, 34/35; Lubbers et al., 1995, *Bull. OIV*; Marchal et al., 2002, 2003, *J.Int. Sci. Vigne Vin*; Masakazu e Yokotsuka, 2003, *Am.J.Enol.Vitic.*; Mascolo et al., 2004, *Applied Clay Science*; Mesquita et al., 2001, *Am. J. Enol. Vitic.*; Modra et al., 1989; Moine-Ledoux et al., 1993; Moine Ledoux, 1997, dati non pubblicati; Murphey et al., 1989. *Am.J. Enol. Vitic.* 40 (3).; OIV, *Resolution Oeno 11/2003*; Paetzold et al., 1990°, 1990b; Paronetto L. 1970. Ausiliari fisici chimici biologici in *Enologia*, Ed. Enostampa VR; Paronetto L., Paronetto L. 1986, Ausiliari chimici e biologici in *Enologia*, Ed. INTEC VR; Pashova et al., 2004. *Am.J. Enol. Vitic.* 55(2). ; Poinsaut et al., *Revue des Oenologues*, 75, 76, 77 ; Ribéreau-Gayon J. et al.,. 1980. *Trattato di Scienza e Tecnica Enologica*, vol. IV, Ed. AEB Brescia. ; Ribéreau-Gayon P. et al. 1998. *Traité d'Enologie*, Tome II, Ed : Dunod, Paris.; Ruanet et al., 1983, *Vinodelie I Vinogradarstvo*; Sarmiento et al., 2000, *Food Control*; Toland et al., 1996, *Am. J. Enol. Vitic.*; Tomasset L.U. , 1978. *Chimica enologica*, Ed. AEB Brescia; Waters et al., 1992; Weiss et al., 2001, *Am. J. Enol. Vitic.*; Weiss e Bisson, 2001, *J. Sci. Food Agric.*; Yokotsuka e Singleton, 1995, *Am. J. Enol. Vitic.*; Zoeklein B, 1991 *Viticulture/Enology*, Virginia State