

l'Enologo

DAL 1893 LA VOCE DELLA CATEGORIA

MENSILE DELL'ASSOCIAZIONE ENOLOGI ENOTECCNICI ITALIANI. ORGANIZZAZIONE NAZIONALE DI CATEGORIA DEI TECNICI DEL SETTORE VITIVINICOLO - N° 12 DICEMBRE 2019



74° CONGRESSO
LA CRONACA DI UN VIAGGIO
INTORNO AL MONDO
DAI SANTUARI ALLE NUOVE FRONTIERE
DELLA VITICOLTURA E DELL'ENOLOGIA

PRIMA PARTE

Editoriale del Presidente
L'ECCELLENZA È UN'ABITUDINE



ASSOENOLOGI
IL VINO PER CULTURA E PROFESSIONE

NUOVO DISPOSITIVO PER LA STABILIZZAZIONE IN FLUSSO CONTINUO DEI VINI BIANCHI



In questo lavoro vengono presentati i risultati preliminari del progetto "Steady Wine". Vini bianchi proteicamente instabili sono stati stabilizzati con impiego di materiali ceramici in un sistema a flusso. Il dispositivo filtrante ha dimostrato selettività nella rimozione delle proteine e una efficace prevenzione della instabilità proteica, senza influire sui parametri chimici del vino.



©Università di Bologna

Di
Giuseppina Paola Parpinello
Arianna Ricci
Marina Serantoni
Andrea Balducci
Luigi Ragni
Andrea Versari

Alma Mater Studiorum
Università di Bologna - Dipartimento di Scienze
e Tecnologie AgroAlimentari - Cesena (FC)
giusi.parpinello@unibo.it

Da sinistra: Ragni, Balducci, Ricci, Parpinello,
Versari, Serantoni.

INTRODUZIONE

- Le proteine del vino possono derivare dalle uve o essere prodotte durante il processo di vinificazione. Le prime vengono biosintetizzate nell'uva e si accumulano durante il processo di maturazione, le seconde vengono prodotte dal metabolismo dei lieviti durante la fermentazione, e rilasciate nel vino a seguito della lisi cellulare dei lieviti stessi.
- Il tenore proteico nei vini può variare notevolmente, da tracce fino a centinaia di mg/L, e può essere causa di fenomeni di instabilità indipendentemente dalla concentrazione, inducendo alterazione delle proprietà ottiche, torbidità e formazione di precipitati. Studi scientifici sono stati finalizzati alla comprensione dei meccani-

smi alla base del fenomeno di instabilità proteica, ma finora le strutture molecolari e i meccanismi di reazione coinvolti sono stati solo parzialmente elucidati.

- L'instabilità proteica viene generalmente considerata un processo che si svolge in due fasi: nella prima fase, le proteine vengono denaturate in risposta a specifici fattori (es. variazioni repentine di temperatura), successivamente, in questo nuovo arrangiamento strutturale, esse tendono a produrre aggregati e flocculi in sospensione, visibili ad occhio nudo come torbidità (Dufrechou *et al.* 2010). Le proteine presenti nel vino possono essere descritte in base alla loro dimensione e alla carica elettrica, ed entrambe le caratteristiche sono determinanti per la loro reattività.
- Diversi studi scientifici hanno eviden-

ziato un ruolo primario delle cosiddette Pathogenesis-Related Proteins (PRP) nei fenomeni di instabilità proteica. Le PRP sono caratterizzate da basso peso molecolare (10–35 kDa), vengono biosintetizzate dalla pianta in risposta all'attacco di patogeni e la loro struttura non viene alterata durante il processo di vinificazione.

- Le principali PRP presenti nei vini sono chitinasi, proteine tipo taumatina (TLPs), 1,3-glucanasi e Lipid Transfer Proteins (LTP), (Waters *et al.* 1996; Pocock *et al.* 2000; Marangon *et al.* 2014; Van Sluyter *et al.* 2015), insieme ad altri piccoli polipeptidi di varia natura e peso molecolare (Sauvage *et al.* 2010; Meier *et al.* 2016; Perutka *et al.* 2018).
- I vini bianchi sono particolarmente inclini all'instabilità proteica principalmente a

causa del basso contenuto in procianidine, tannini dell'uva coinvolti nella complessazione e precipitazione delle proteine instabili durante la vinificazione, e tenori variabili di PRP possono causare alterazioni ed intorbidimenti durante le lavorazioni e lo stoccaggio, in conseguenza di fluttuazioni di temperature anche di lieve entità.

- Sulla base di ciò, si può affermare che la rimozione delle PRP è una questione cruciale per gli enologi al fine di garantire la stabilizzazione a lungo termine dei vini. L'approccio tecnologico più comune consiste nell'impiego di coadiuvanti che reagiscono selettivamente con le PRP, coprecipitandole dal mosto/vino. Tra questi la bentonite, che agisce come scambiatore cationico interagendo elettrostaticamente con le proteine, è il prodotto maggiormente impiegato.

- Negli ultimi anni sono stati condotti molti studi con l'obiettivo di trovare nuovi agenti di affinamento e sperimentare approcci innovativi e più sostenibili per la stabilizzazione dei vini su scala industriale.

- In questo scenario, la nanotecnologia può rappresentare un valido strumento per la progettazione di materiali innovativi, le cui caratteristiche strutturali possono essere modulate al fine di ottimizzarne le prestazioni. I nanomateriali presentano il vantaggio di poter modulare le proprietà chimico-fisiche del materiale di partenza agendo su dimensioni, forma e geometria delle nanostrutture, e offrono il vantaggio di elevate superfici specifiche per l'assorbimento (Khan *et al.*, 2017).

- Il lavoro qui presentato, denominato progetto "Steady Wine", descrive la ideazione di una tecnologia sviluppata presso l'Università di Bologna (brevetto depositato n. 102018000004721), finalizzata all'impiego di nuovi nanomateriali ceramici per la rimozione delle PRP da vini e mosti attraverso un sistema a flusso continuo; questo approccio risulta adatto per un potenziale trasferimento su scala industriale. Lo studio è stato effettuato su vini bianchi caratterizzati da instabilità proteica sui quali sono stati valutati i parametri chimico-fisici e la stabilità proteica a lungo termine a seguito del trattamento con il nanomateriale progettato.

- È stato inoltre impiegato un prototipo di dispositivo a flusso, con l'obiettivo di elaborare un modello previsionale utile a ottimizzare le caratteristiche del materiale e i parametri di processo indispensabili per il trasferimento tecnologico.

MATERIALI E METODI

- In questo studio sono state impiegate due tipologie di materiali ceramici (MC) *food grade*, con proprietà fisiche ed elettrostatiche tali da ipotizzare una capacità di adsorbimento nei confronti delle PRP. I due materiali sono stati testati come nano-polvere (denominati MC1 e MC2, dimensione >100 nm) e micro-polvere (denominati MC1A e MC2A, dimensione >800 nm) per valutare l'impatto della granulometria sull'efficienza di adsorbimento delle proteine.

- Tutte e quattro le polveri, utilizzate in un range di concentrazione 0,1–4,0 g/L, sono state aggiunte a due vini bianchi entrambi con instabilità proteica (Chardonnay e Moscchetto casauriense), e lasciate in contatto fino a cinque giorni.

- Durante l'esperimento, sui vini trattati sono stati analizzati giornalmente i seguenti parametri: pH, densità ottica (420 nm), contenuto di proteine totali (PT), polifenoli totali (PFT), e i valori ottenuti sono stati confrontati con il vino di controllo (senza aggiunta di MCl o MC2). Per simulare eventuali effetti negativi dovuti alla prolungata esposizione ai materiali ceramici, i vini sono stati altresì sottoposti a invecchiamento accelerato (5 giorni a 35±1°C) e analizzati per i sopracitati parametri.

- La stabilità proteica dei vini è stata valutata utilizzando un test a caldo (*heat-test*) basato sulla misura dell'intorbidimento del vino dopo riscaldamento. In riferimento allo studio della stabilità proteica, prima e dopo i trattamenti si è proceduto ad analisi elettroforetica su gel di poliacrilammide (SDS-PAGE). Tutti gli esperimenti sono stati effettuati in duplicato; i risultati sono stati sottoposti ad analisi statistiche mediante l'analisi

della varianza (ANOVA) e il post-hoc di Tukey (α : 5%).

- A seguito dello screening preliminare, il materiale che ha fornito le migliori prestazioni in termini di selettività della rimozione delle proteine PR e conservazione della qualità del vino è stato utilizzato per ottenere una superficie nanostrutturata, nella quale venivano massimizzati i siti di legame attivi. Il materiale funzionale è stato ottenuto sottoponendo la nano-polvere a cicli di sinterizzazione ad alta temperatura (T_{max} 550°C) per ottenere uno strato mesoporoso, cioè un film con porosità nell'ordine di poche decine di nm.

- Ad ultimo, sono state effettuate analisi al microscopio elettronico a scansione e microanalisi mediante sonda EDS (SEM-EDS) per visualizzare e descrivere dimensionalmente le nanostrutture, e per verificare l'assenza di contaminanti metallici, escludendo così eventuali trasmissioni al vino.

DISCUSSIONE DEI RISULTATI

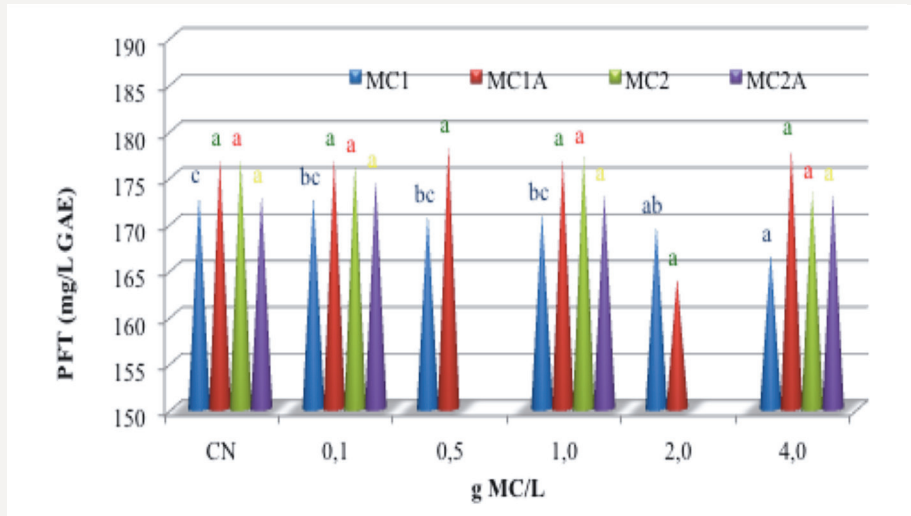
- Le analisi eseguite sui vini dopo il trattamento con i due materiali MC di diversa granulometria hanno mostrato un profilo sostanzialmente stabile dei parametri analizzati. Ad esempio, in **Tab.1** è riportato il valore di pH dal quale si evince che non vi sono variazioni significative rispetto al vino non trattato (CN). Risultano inalterati anche acidità totale e titolo alcolometrico volumico (dati non riportati).

- Allo stesso modo, la concentrazione dei polifenoli totali (PFT) non ha subito variazioni importanti per tutti i materiali MC testati (**Fig.1**). Le variazioni significative riscontrate tra MC1 e MC1A, con riduzioni di composti fenolici nell'ordine di 5–20 mg/L, dal punto di vista pratico sono da considerare di piccola entità e limitate ri-

Tab. 1 - L'impatto dell'aggiunta dei materiali ceramici MC a diversa granulometria e a diverse concentrazioni (0–4,0 g/L) sui valori di pH nel vino Chardonnay dopo cinque giorni di trattamento.

pH	CN	0,1	0,5	1,0	2,0	4,0
MC1	2,93	2,91	2,94	2,93	2,93	2,92
MC1 A	2,89	2,89	2,9	2,92	2,92	2,93
MC2	2,89	2,91	-	2,93	-	2,94
MC2 A	2,93	2,95	-	2,96	-	2,93

Fig. 1 - Contenuto totale di polifenoli (PFT) nel vino Chardonnay dopo cinque giorni di trattamento con i diversi materiali ceramici (MC) utilizzati a diverse concentrazioni.



spetto alle perdite attese in seguito ai trattamenti classici con bentonite, pertanto si ritengono trascurabili rispetto alla qualità del vino trattato.

- La misura della densità ottica a 420 nm (indice di imbrunimento) è un parametro utilizzato per valutare l'insorgenza di fenomeni ossidativi nel vino, che dal punto di vista chimico sono catalizzati da metalli di transizione (es. ferro e rame) che possono essere presenti anche a seguito di

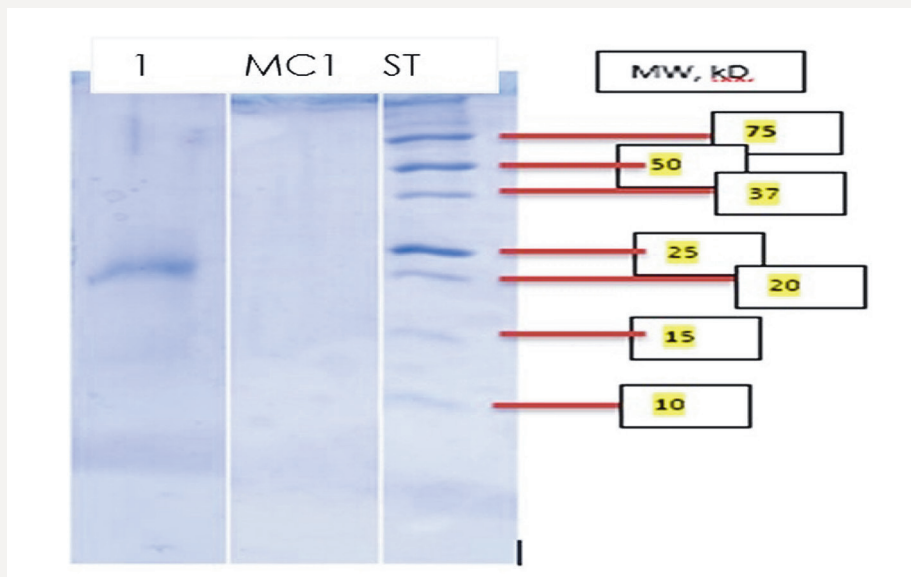
contaminazioni occasionali che si possono verificare lungo le fasi produttive.

- In questo studio l'indice di imbrunimento è stato monitorato durante il trattamento con i materiali ceramici in condizioni standard (5 giorni di contatto, temperatura ambiente) e in condizioni di invecchiamento accelerato (5 giorni di contatto a 35±1°C), per escludere una eventuale attività catalitica indotta dal materiale. I risultati hanno confermato che l'utilizzo dei

Tab. 2 - Riduzione percentuale del contenuto proteico totale nel vino Moscatello casauriense dopo il trattamento con MC1 (polvere nanometrica) a diverse concentrazioni (0,1 - 4,0 g/L), PT: Proteine Totali - CN: Controllo.

PT (mg/L BSA)	CN	0,1	0,5	1,0	2,0	4,0
MC1-5	66d	63cd	63cd	56bc	49b	38a
Δ (%)	-	4,5	4,5	15,3	25,2	42,3

Fig. 2 - SDS-PAGE su vino prima (1) e dopo (MC1) il trattamento; ST: marcatore di peso molecolare.



materiali ceramici non determina alcuna variazione della densità ottica a 420 nm (dati non riportati).

- Per quanto concerne gli effetti dei materiali ceramici sulla stabilità proteica del vino, il materiale MC1 è risultato particolarmente incline a rimuovere le proteine PR, stabilizzando i vini. La Tab.2 riporta il contenuto proteico totale (PT) dei vini dopo cinque giorni di contatto (MC1-5) con il materiale attivo; i risultati evidenziano una riduzione significativa con l'impiego di concentrazioni crescenti del materiale MC1.

- L'analisi SDS-PAGE ha confermato la rimozione delle proteine con peso molecolare <35 kDa (Fig.2) e ha dimostrato efficacia ed elevata selettività di MC1 quando utilizzato nel trattamento del vino instabile alle concentrazioni maggiori (4 g/L).

I risultati hanno mostrato che, massimizzando la superficie disponibile per l'assorbimento, MC1 può produrre una efficace stabilizzazione proteica.

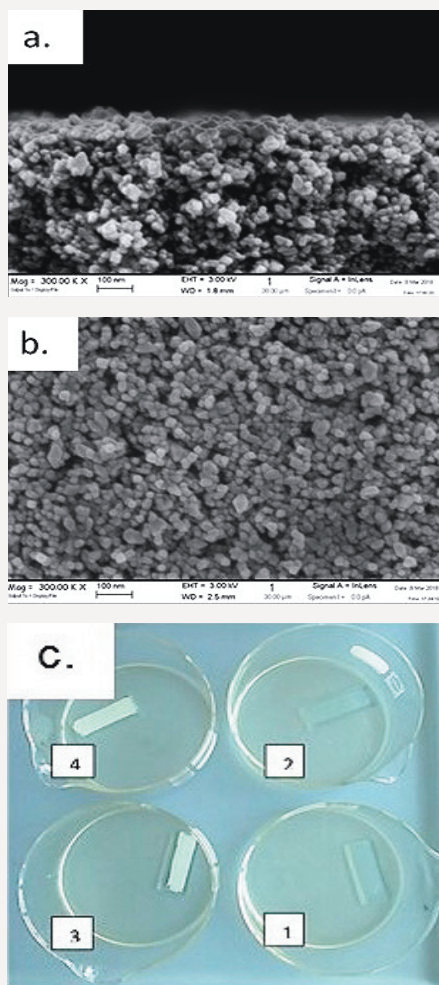
- La nanotecnologia, consentendo di modulare dimensione e distribuzione delle strutture nanometriche, offre la possibilità di progettare materiali con superfici attive che presentino le caratteristiche volute. In questa ottica, la sinterizzazione permette di ottenere questa tipologia di materiali su larga scala.

- Il processo prevede l'applicazione di emulsioni di nanoparticelle (dimensioni nell'ordine di 10-100 nm) su supporti inerti di grandezza e dimensione variabili; il supporto così funzionalizzato viene sottoposto ad un adeguato trattamento termico, che consente alle nanoparticelle di organizzarsi in una struttura mesoporosa (Fig. 3) simile ad una "spugna" con proprietà chimico-fisiche simili al materiale nanometrico di partenza e in grado di soddisfare i requisiti di sicurezza attesi per un materiale ad uso alimentare.

- I materiali funzionali ottenuti con questo procedimento sono stati utilizzati per definire il rapporto superficie materiale attivo/volume di vino da trattare; a tal fine tutti i campioni di vino trattati sono stati sottoposti a *heat-test* per valutare la variazione di torbidità (ΔNTU); ciò ha permesso di quantificare l'estensione della superficie attiva necessaria per la stabilizzazione del vino (Fig.4a, b).

- Il punto stazionario nella curva (a) corrisponde alla superficie necessaria per la completa stabilizzazione proteica del vino, mentre nella curva (b) corrisponde

Fig. 3 - Le immagini SEM del materiale mesoporoso prodotto tramite sinterizzazione: sezione (a.) e superficie (b.) dello strato attivo. In basso, i film mesoporosi depositati su vetro inerte utilizzati per gli esperimenti (c.).



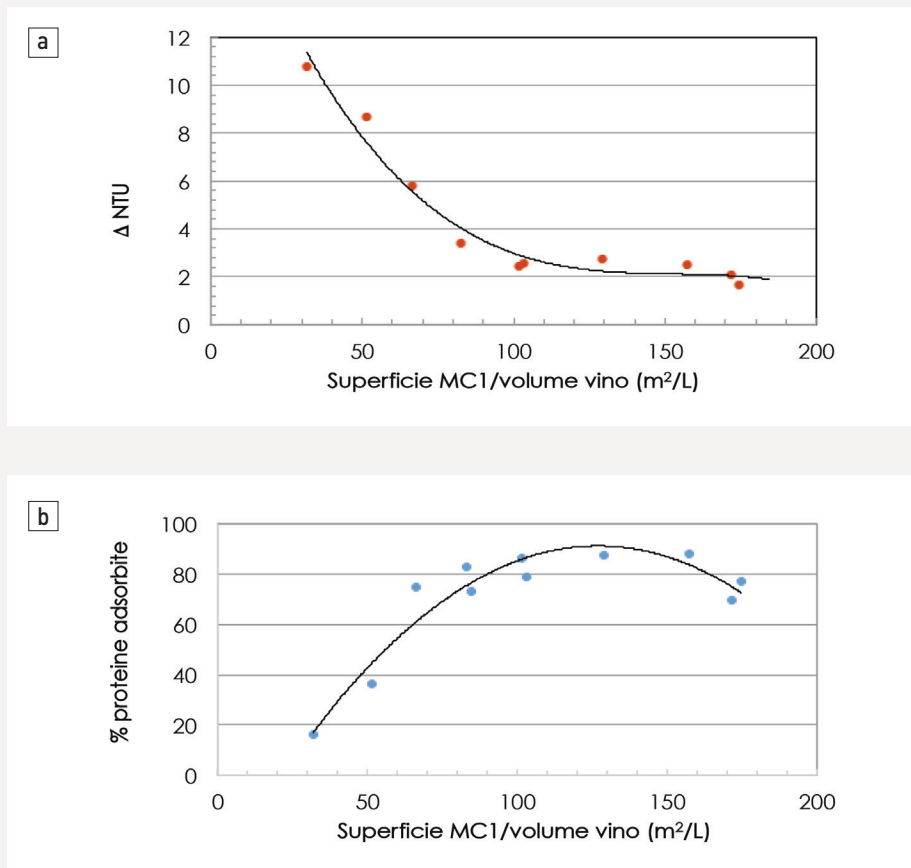
alla massima percentuale di proteine adsorbite. Nel materiale è stata valutata la capacità di rigenerazione tramite cicli di lavaggio blandi, con soluzioni debolmente alcaline. I primi risultati hanno mostrato una buona capacità di ripristino delle proprietà adsorbenti.

● I materiali funzionali ottenuti sono attualmente utilizzati per trattamenti di piccoli volumi in regime di flusso, con l'obiettivo di definire numero di cicli, durata e portata del trattamento utili ad un processo di *scaling-up* per l'applicazione a livello produttivo.

CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE

● In questo lavoro sono stati perseguiti due obiettivi principali finalizzati alla stabilizzazione proteica dei vini: a) l'individuazione di materiali adsorbenti ceramici innovativi, con capacità di adsorbimento

Fig.4 -Relazione tra superficie di materiale attivo (MC1) e rimozione delle proteine. (a) Variazione della Δ NTU all'aumento della superficie attiva di MC1. (b) Adsorbimento di proteine (%) all'aumento della superficie attiva di MC1.



selettivo e caratteristiche *food grade*; b) rimozione delle proteine responsabili della instabilità dei vini bianchi senza alterazione dei parametri chimici.

● La prosecuzione dello studio prevede la realizzazione di un sistema 'pilota' che consenta il trattamento in flusso continuo. Il presente lavoro è tutelato tramite domanda di brevetto (numero di brevetto 102018000004721), i cui diritti di proprietà intellettuale appartengono all'Alma Mater Studiorum - Università di Bologna.

● *Ringraziamenti.* Gli autori ringraziano la dottoressa Elena Babini (UniBo) per le analisi SDS-PAGE. ■

BIBLIOGRAFIA

● Dufrechou, M., Sauvage, F. X., Bach, B., & Vernhet, A. (2010). Protein aggregation in white wines: influence of the temperature on aggregation kinetics and mechanisms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 10209-10218.

● Khan, I., Saeed, K., & Khan, I. (2017). Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. *Arabian Journal of Chemistry*. doi.org/10.1016/j.arabjc.2017.05.011

● Marangon, M., Van Sluyter, S. C., Waters,

E. J., & Menz, R. I. (2014). Structure of haze forming proteins in white wines: *Vitis vinifera* thaumatin-like proteins. *PLoS One*, 9, e113757.

● Meier, M., Jaekels, N., Tenzer, S., Stoll, M., Decker, H., Fronk, P., & Will, F. (2016). Impact of drought stress on concentration and composition of wine proteins in Riesling. *European Food Research and Technology*, 242, 1883-1891

● Pocock, K. F., Hayasaka, Y., McCarthy, M. G., & Waters, E. J. (2000). Thaumatin-like Proteins and Chitinases, the haze-forming proteins of wine, accumulate during ripening of grape (*Vitis vinifera*) berries and drought stress does not affect the final levels per berry at maturity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 1637-1643.

● Sauvage, F. X., Bach, B., Moutounet, M., & Vernhet, A. (2010). Proteins in white wines: Thermo-sensitivity and differential adsorption by bentonite. *Food Chemistry*, 118, 26-34.

● Van Sluyter, S.C., McRae, J.M., Falconer, R.J., Smith, P.A., Bacic, A., Waters, E.J., Marangon, M. (2015) Wine Protein Haze: Mechanisms of Formation and Advances in Prevention. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 63,4020-4030.

● Waters, E. J., Shirley, N. J., & Williams, P. J. (1996). Nuisance proteins of wine are grape pathogenesis-related proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 3-5.