

New device for protein stabilisation of white wines throughout a continuous flow system

Giuseppina P. Parpinello, Arianna Ricci, Carolina Pavez Moreno, Luigi Ragni e Andrea Versari

DISTAL Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agroalimentari, Alma Mater Studiorum Università di Bologna, P.zza Goidanich 60, 47521 Cesena, Italia

Abstract. In this work, a selection of food-grade ceramic materials (CM1, CM2) was evaluated in terms of capacity to adsorb pathogenesis-related proteins (PRPs), thus preventing protein haze in bottled white wines. The CM1 was found as the most effective sorbent material, when used in a nano-structured form (nanopowders and mesoporous films) which magnifies the specific surface available for adsorption. The material showed a high affinity and selectivity to low molecular weight proteins, thus allowing the stabilisation of white wines without altering key quality parameters. The most captivating aspect of using CM1 consisted in the possibility of producing thin and mesoporous films anchored to inert supports, to obtain composite materials that are easy to handle and safe from a food point of view. The composite material CM1 was tested in a wine flow treatment device, confirming excellent performance in terms of stabilisation. Based on the results obtained, the stabilising material and the stabilisation method proposed can be further implemented to be used in a pilot plant and exploited in the wine industry.

1 Introduzione

Le proteine correlate alla patogenesi della vite (comunemente riferite come *Pathogenesis-related proteins*, PRPs) sono molecole di piccole dimensioni (10-35 kDa) che vengono biosintetizzate durante la maturazione delle uve in risposta a stress di varia origine (fitopatie da stress ambientali, attacchi microbici e di insetti patogeni); le PRPs permangono nei mosti e possono originare instabilità fisica nei vini imbottigliati (principalmente vini bianchi) quando questi sono esposti a variazioni di temperatura in grado di indurre denaturazione della struttura proteica, alterandone la solubilità / stabilità colloidale e producendo torbidità e sedimenti visibili a occhio nudo.

Gli incrementi di temperatura in grado di innescare questi processi sono modesti e possono verosimilmente verificarsi durante le fasi di magazzinaggio – trasporto – conservazione dei vini commerciali, per questo motivo la rimozione di PRPs è un trattamento preventivo cruciale a cui vengono generalmente sottoposti i vini nella fase che precede l'imbottigliamento. La rimozione selettiva delle PRPs nell'ambito di un processo efficiente, altamente selettivo e che possa essere facilmente adattato alle esigenze dell'industria enologica è una delle principali sfide dell'enologia moderna; allo stato dell'arte, infatti, la stabilizzazione proteica dei vini viene condotta attraverso l'impiego di trattamenti statici, che prevedono aggiunta in vasca di un materiale adsorbente (es. bentonite) e la sua rimozione a fine trattamento. Molta letteratura è stata dedicata ai limiti legati a questa tipologia di approccio; in sintesi, le principali perplessità risiedono nei tempi lunghi del trattamento statico, che

necessita di vasche e spazi di cantina dedicati; la necessità di rimuovere il materiale trattante, con problematiche correlate alla gestione dei rifiuti prodotti e alla fisiologica perdita di volumi di vino durante i travasi; la scarsa selettività del materiale adsorbente, che se utilizzato in maniera massiva può rimuovere composti volatili chiave e alterare il profilo organolettico del vino. Più recentemente l'OIV ha approvato l'utilizzo di peptidasi aspergillo-glucanica seguita da flash pastorizzazione per la stabilizzazione proteica sui mosti (OIV-ENO 541-A 2021); anche questo approccio non è comunque esente da rischi legati ad aspetti sensoriali, e presenta costi più elevati rispetto al trattamento con bentonite.

Il presente studio indaga la stabilizzazione proteica dei vini bianchi attraverso l'impiego di materiali ceramici nanostrutturati, caratterizzati da elevata superficie adsorbente, selettività e capacità di rigenerazione; in virtù di queste caratteristiche l'impiego di tali materiali è stato testato nell'ambito di esperimenti comparativi, ed ipotizzato all'interno di un dispositivo operante in regime di flusso per la stabilizzazione in continuo dei vini bianchi nella fase pre-imbottigliamento.

La sperimentazione è stata suddivisa in due fasi: nella prima fase, sono stati selezionati due materiali ceramici, CM1 e CM2, reperiti in diverse dimensioni (micropolveri, nanopolveri) da testare in *batch* su diverse varietà di vini bianchi, per verificare l'efficacia stabilizzante, l'assenza di contaminanti e l'impatto sulla stabilità chimica dei vini trattati. Il materiale che ha mostrato le migliori performances in termini di efficacia adsorbente, elevata selettività nei confronti delle PRPs e possibilità di essere sottoposto a trattamento termico

(sinterizzazione) necessario per la produzione di strati mesoporosi ad elevata superficie attiva è stato CM1 nanostrutturato (dimensioni particelle < 100 nm). Lo stesso materiale è stato anche testato per la capacità di rimuovere metalli di transizione, responsabili della *cassee* ossidativa dei vini. Inoltre, è attualmente allo studio una sua ulteriore applicazione per la rimozione di riboflavina/metionina, composti coinvolti nei meccanismi fotochimici alla base del difetto di luce. Scopo di questi ulteriori esperimenti è stato quello di valutare l'impiego del materiale nell'ambito di un singolo trattamento per prevenire i principali fenomeni di instabilità dei vini imbottigliati (*cassee* proteica, *cassee* ossidativa, instabilità fotochimica).

Nella fase due il materiale attivo CM1 è stato depositato su un supporto inerte (sfere di vetro) ottenendo dei film adsorbenti mesoporosi ad elevata superficie attiva; le sfere funzionalizzate hanno permesso di trattare i vini superando le problematiche correlate all'impiego e manipolazione di polveri nanometriche. Sono state effettuate prove preliminari di stabilizzazione in *batch*, successivamente le sfere sono state impiegate all'interno di un dispositivo prototipo operante in regime di flusso continuo.

Nel presente elaborato vengono riportati alcuni risultati preliminari della sperimentazione, che si è sviluppata negli anni producendo un brevetto nazionale (Brevetto N. 10201800004721 concesso in data 19/05/2020) e una proposta internazionale in fase di valutazione (PCT/IB2019/053102). I risultati descritti fanno riferimento agli esperimenti condotti sul prototipo di dispositivo a flusso su scala di laboratorio (TRL4*), mentre è in essere la sperimentazione su un mini-impianto per dimostrazioni in ambiente di rilevanza industriale (TRL6*).

(*Livello di maturità tecnologica definito sulla base della metrica di valutazione applicata dalla Commissione europea).

2 Materiali e metodi

2.1 Materiali

2.1.1 Ossidi ceramici

I seguenti materiali sono stati gentilmente donati da CNR-ISTEC (Istituto di Scienza e Tecnologia dei Materiali Ceramici, Faenza, IT) per le prove in batch: CM1, polvere nanometrica sfere < 100 nm diametro, superficie 90 m²/g (CM1np); CM2 polvere sub-nanometrica superficie 25 m²/g (CM2np); CM2 granulare sub-micrometrica, dimensione particelle 0,8 µm, area superficiale 7.8 m²/g (CM2mp). Tutti i materiali forniti avevano una purezza > 99,8% (dichiarazione del produttore). Anche la CM1 sub-micrometrica in bulk di grado alimentare E171 (CM1mp), ottenuta presso una farmacia locale è stata testata per determinare la capacità di assorbimento delle proteine.

Per lo svolgimento delle prove a flusso è stato

prodotto un materiale composito ottenuto funzionalizzando sfere inerti in vetro (diametro 5 mm) con nanopolveri di CM1 sinterizzate a formare uno strato sottile, nanostrutturato e nanoporoso (CM1-glass). Lo strato di CM1 è stato depositato utilizzando il procedimento sol-gel, con il sol costituito da una sospensione colloidale di nanoparticelle di CM1, depositata sulle sfere in vetro attraverso *dip-coating* (rivestimento per immersione). L'evaporazione del solvente ha indotto la rapida formazione di uno strato sottile di gel amorfo, che è stato essiccato e trattato termicamente a temperature di 450-500°C per ottenere film con le seguenti caratteristiche: strato di CM1 di spessore di circa 2 µm, superficie nanostrutturata e porosa, con nanoparticelle di forma sferica aventi diametro di 20-30 nm e pori superficiali della dimensione media intorno a 50 nm di diametro.

2.1.2 Vini e vini modello

Gli esperimenti in batch e in regime di flusso sono stati condotti su vini pre-stabilizzazione proteica, ottenuti da cantine commerciali e sperimentali. La stabilità colloidale dei vini è un fenomeno soggetto a forte variabilità; mentre in alcuni casi i vini mantengono la loro potenziale instabilità per lunghi periodi (mesi, anni) in altri casi piccole alterazioni delle condizioni ambiente favoriscono la stabilizzazione di vini instabili; trattandosi di fenomeni di natura prevalentemente stocastica, è difficile definire l'intervallo di tempo entro il quale un campione di vino manterrà la sua stabilità ed instabilità. Dal punto di vista sperimentale, questo si è tradotto nella necessità di impiegare diverse varietà di vino per completare il piano sperimentale. Per quanto concerne le prove riassunte in questo elaborato, sono state impiegate 3 varietà di vino appartenenti a diverse annate. Lo Chardonnay 2017 utilizzato per le prove in batch è stato ottenuto presso la cantina didattica/sperimentale di Tebano (Ravenna, IT); il vino è stato trattato con 60 mg/L di SO₂ e conservato a 4°C fino all'impiego.

Per le prove in batch con sfere funzionalizzate è stato impiegato un Traminer 2021 prelevato da una cantina locale (Faenza, IT) prima della stabilizzazione proteica, mentre per gli esperimenti in regime di flusso continuo è stato utilizzato un Müller Thurgau 2019 proveniente da cantina commerciale (Trento, IT). Ulteriori prove di rimozione delle proteine e dei metalli Cu, Fe sono state condotte su soluzioni simil-vino (composizione: 5 g/L acido tartarico, 12% v/v etanolo, pH 3,6), aggiungendo aliquote standard di FeSO₄·7H₂O (titolo Fe(II): 2 mg/L) e CuSO₄·5H₂O (Titolo Cu(II): 1 mg/L).

2.1.3 Reagenti

I seguenti reagenti: sali FeSO₄·7H₂O e CuSO₄·5H₂O, albumina di siero bovino BSA, kit per la determinazione delle proteine Pierce BCA, standard di acido gallico per la determinazione dei polifenoli totali PFT_{280nm}, acido tartarico e solventi per soluzioni simil-vino sono stati acquistati da Thermo (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, US).

2.2 Metodi

2.2.1 Metodi di analisi

I vini e le soluzioni modello trattate con i materiali ceramici sono stati sottoposti alle seguenti analisi: pH (OIV, 2014), analisi spettrofotometrica: polifenoli totali PFT_{280nm} e indice di imbrunimento DO_{420nm} [1,2]; determinazione proteine totali con ©Pierce BCA assay kit [3]; test di invecchiamento accelerato [4]; test di stabilità a caldo [5]. Le analisi ICP-OES di Fe, Cu e del contenuto in Ti nelle acque di lavaggio delle sfere (paragrafo 2.2.3) sono state effettuate presso un laboratorio esterno accreditato (Vassanelli Lab Srl, Bussolengo, IT). Tutti i risultati sono presentati come valore medio delle repliche sperimentali \pm SD; i risultati delle prove in batch sono stati sottoposti ad analisi della varianza (ANOVA) e post-hoc di Tukey (α : 5%).

2.2.2 Prove in batch: disegno sperimentale

Nella prima fase sono stati effettuati esperimenti in batch per valutare l'effetto dei due ossidi ceramici selezionati (CM1, CM2) sulla stabilità del vino e sui parametri chimico-fisici. A questo scopo, sono state aggiunte 5 differenti dosi di CM1np (5, 25, 50, 100, 200 mg) ad un volume standard di vino (50 mL di Chardonnay); lo stesso disegno sperimentale è stato applicato alla CM1mp, e tutti gli esperimenti sono stati condotti in duplicato. È stata prelevata una aliquota di vino ad intervalli di 24h per un periodo di 5 giorni, e sono state effettuate le seguenti misure: pH, proteine totali, PFT_{280nm} e DO_{420nm}. Lo stesso schema è stato impiegato per CM2np e CM2mp, fatta eccezione per il numero di dosaggi testati che è stato di 3 anziché 5 (in particolare 5, 50, 200 mg). In parallelo i vini a contatto con i 4 materiali sono stati sottoposti a test di invecchiamento accelerato, applicando una temperatura di 35°C per un periodo di 10 giorni, e monitorando quotidianamente l'evoluzione del parametro DO_{420nm}.

Un ulteriore esperimento ha previsto la preparazione di soluzioni di vino modello contenenti 1 mg/L di Cu e 2 mg/L di Fe, che sono state trattate con elevati dosaggi di CM1np (200 e 400 mg/ 50 mL similvino), conservate a contatto con il materiale per 4 gg quindi prelevate per analisi ICP-OES.

Per isolare i vini /soluzioni modello dal materiale trattante ai fini delle analisi è stato predisposto il seguente protocollo: decantazione degli ossidi metallici in polvere e prelievo del surnatante, centrifugazione a 4500 rpm per 10 minuti e filtrazione con filtro in acetato di cellulosa (CA) 0,45 μ m (Millipore, Milano, IT).

L'ultimo materiale testato ed impiegato all'interno del dispositivo filtrante era costituito dalle palline in vetro funzionalizzate con lo strato di CM1 mesoporosa CM1-glass (paragrafo 2.1.1.); la prova statica è stata effettuata per confermare l'efficacia del materiale similmente a CM1np nelle condizioni di contatto statico. Per questo esperimento 35 g di sfere funzionalizzate sono stati immersi in 250 mL di vino Traminer 2021; il quantitativo impiegato è pari alla quantità massima di sfere che può

contenere il prototipo di dispositivo a flusso. Il vino è stato sottoposto a prelievi periodici per determinare la stabilità proteica (*dati non riportati*), risultando stabile dopo un tempo di incubazione di 24h.

Tutti gli esperimenti hanno incluso un controllo negativo CN (vino e soluzioni modello senza aggiunta di materiale) che ha subito lo stesso procedimento di centrifugazione e filtrazione prima delle analisi; nelle prove con CM1-glass, il CN è stato sottoposto a trattamento in batch e a flusso in presenza di sfere in vetro non funzionalizzate.

2.2.3 Prove in regime di flusso: disegno sperimentale

Le prove a flusso continuo sono state effettuate utilizzando un piccolo sistema filtrante progettato e realizzato su scala di laboratorio, costituito da un piccolo serbatoio in acciaio AISI 304 per contenere il vino con portella per il caricamento del prodotto, raccordi ingresso e uscita per il ricircolo del vino, pompaggio con pompa peristaltica, rubinetto per il campionamento e serbatoio di scarico per lo svuotamento della linea al termine della prova. Il vino trattato è stato analizzato per i parametri proteine totali e stabilità proteica previa filtrazione con un filtro 0,45 μ m ad uso alimentare, similmente a quanto previsto negli esperimenti condotti in batch. Il dispositivo di laboratorio è adatto al trattamento di piccoli volumi (max 1L), ed è stato successivamente implementato tramite consulenza con un produttore di impianti per l'industria alimentare; il nuovo prototipo è attualmente impiegato per la messa a punto dei parametri di processo, e i risultati di questa fase sperimentale verranno resi disponibili in pubblicazioni future. Verifiche preliminari sono state finalizzate alla misura del metallo rilasciato dal materiale adsorbente; le sfere sono state sottoposte a test di lavaggio e le acque prelevate in campionamenti successivi sono state inviate ad un laboratorio esterno accreditato per le analisi dei metalli. Le prove di lavaggio sono state così strutturate: 500 mL di acqua sono stati flussati per il lavaggio di 100 gr di sfere; l'acqua è stata campionata in uscita dalla colonna di acciaio del dispositivo secondo i tempi indicati nella Tabella 1, sostituendo con acqua pulita dopo ogni campionamento.

Tabella 1. Piano sperimentale per il test di rilascio di CM1.

Prelievo nr	Tempo (min)
1	10
2	30
3	60
4	1440
5	2880

Successivamente, le sfere funzionalizzate sono state inserite all'interno del dispositivo per le prove a flusso su varie tipologie di vini instabili. In questo elaborato vengono riportate le prove effettuate su Müller Thurgau 2019. Il vino è stato preventivamente trattato con filtro carta per la rimozione delle fecce e del particolato

sospeso, e ulteriormente filtrato con filtro CA 0,45 µm. La colonna del dispositivo prototipo di laboratorio è stata riempita con il materiale funzionalizzato (capacità totale 35 ± 2 g), e sono state condotte delle prove in regime di flusso. Il volume di vino trattato in questi esperimenti è stato di 250 mL, con una portata di 25 ± 2 mL/min; è stata applicata una ridotta velocità di flusso per massimizzare il tempo di contatto tra vino e sfere all'interno della colonna del dispositivo e per impedire effetti di dilavamento del materiale e delle proteine adsorbite che potrebbe verificarsi applicando flussi elevati. Il tempo di contatto del vino con le sfere è stato variabile, sono stati effettuati prelievi prelevando il vino in uscita dalla colonna dopo 5 - 10 - 15 - 20 - 30 - 60 - 120 min di flusso continuo. L'esito stabilizzante è stato verificato attraverso prelievi di vino successivamente sottoposto a *heat-test*.

2.2.4 Test di rigenerabilità del materiale

Il test di rigenerabilità è stato condotto sul materiale utilizzato per gli esperimenti a regime di flusso. Le sfere CM1-glass utilizzate nel trattamento dei vini sono state immerse per 1h in soluzione NaOH 1M con un rapporto di 50 mL di soluzione su 50 gr di sfere. Dopo un'ora è stata rimossa la soluzione di lavaggio, le sfere sono state lavate con un flusso di acqua distillata poi asciugate. È stato quindi riprodotto l'esperimento a flusso fatto in precedenza su Müller Thurgau 2019 (inclusa filtrazione CA 0,45 µm) per verificare la riproducibilità dell'effetto stabilizzante. In entrambi i casi, il controllo ha ricevuto gli stessi trattamenti (tempi e volumi di trattamento, filtrazioni). Anche in questo esperimento è stato predisposto un controllo negativo (CN).

3 Risultati e Discussione

3.1 Esperimenti in batch: studio comparativo di materiali adsorbenti ceramici

Il vino Chardonnay utilizzato per lo screening dei materiali (prove in batch) presentava instabilità proteica a fronte di una bassa concentrazione di proteine totali (22 mg/L in equivalenti di BSA). Tipicamente, il contenuto proteico nei vini può variare nel range 10 - 500 mg/L ed è legato a fattori quali la varietà di uva e le strategie di vinificazione [6]. Lo Chardonnay non trattato (CN) ha subito un processo di stabilizzazione spontanea che ha portato ad una riduzione del 50% delle proteine totali nei 5 giorni durante i quali si è svolta la prova; tuttavia, dopo 5 giorni ed in assenza di trattamento, il vino risultava ancora instabile. Si è potuto quindi procedere alla valutazione comparativa delle performances dei materiali in termini di capacità di rimozione delle proteine totali.

I materiali testati hanno mostrato diverse performances in termini di capacità di rimozione delle proteine totali. La Figura 1 riporta il contenuto proteico dei vini in assenza (CN) e in presenza di CM1np ai diversi dosaggi (5 - 200 mg in 50 mL di Chardonnay).

Si può osservare che i vini trattati con CM1np presentano in generale un minore contenuto proteico, che viene ridotto di 4,5%, 15,3%, 25,2% and 42,3% ai

dosaggi di 5, 25, 50, 100 e 200 mg, rispettivamente. La riduzione del contenuto proteico può essere correlata all'incremento del CM1np aggiunto; in particolare, la riduzione di proteine è risultata significativa rispetto all'esperimento di controllo a partire da un dosaggio di CM1np pari a 25 mg/50 mL vino (Fig. 1).

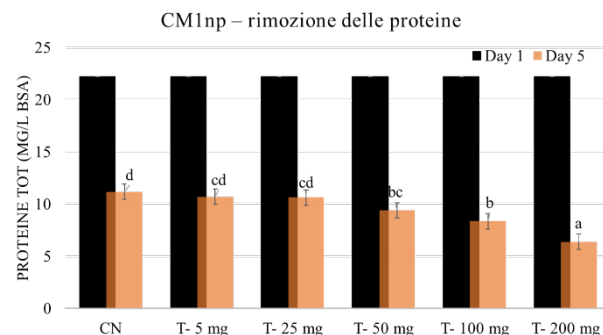


Figura 1. Contenuto proteico nei campioni di vino Chardonnay prima (CN) e dopo il trattamento a diversi dosaggi di CM1np (T) al giorno 1 (barre nere) e al giorno 5 (barre rosse). Le differenze significative ($p < 0.05$) sono designate dalle lettere differenti.

Poiché il test su CM2np (Fig. 2) è stato effettuato in serie e non parallelamente all'esperimento con CM2np riportato precedentemente, viene confermata al giorno 1 dell'esperimento la riduzione di proteine totali nel controllo dovuta a decantazione spontanea dei colloidali presenti nel vino (valore misurato 12 mg/L in equivalenti di BSA). Tale valore si mantiene pressoché costante nel controllo fino al termine dell'esperimento (giorno 5). Per quanto concerne la capacità adsorbente di CM2np, non è stato osservato nessun effetto significativo ai dosaggi testati (Fig. 2).

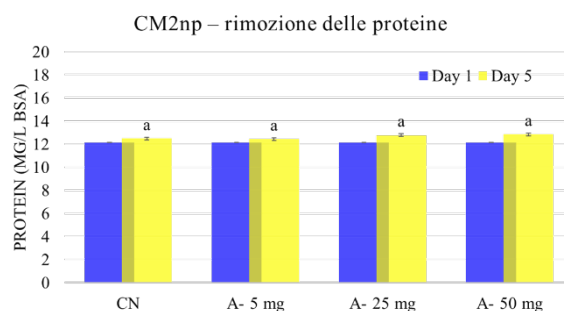


Figura 2. Contenuto proteico nei campioni di vino Chardonnay prima (CN) e dopo il trattamento a diversi dosaggi di CM2 nanometrica (A) al giorno 1 (barre nere) e al giorno 5 (barre blu). Le differenze significative ($p < 0.05$) sono designate dalle lettere differenti.

La stessa tendenza è stata osservata per CM1np e per CM2mp (*dati non riportati*). In queste prove, infatti, non sono stati osservati effetti significativi di rimozione delle proteine per i dosaggi testati.

CM1np ha mostrato le migliori prestazioni in termini di capacità di rimozione delle proteine, ed è stato approfondito lo studio effettuando il monitoraggio dei valori di pH, PFT_{280nm} e delle prestazioni in termini di stabilità ossidativa dei vini trattati (DO_{420nm} e test di

invecchiamento accelerato). I risultati indicano che i trattamenti con CM1np non producono effetti sul pH; infatti, l'analisi statistica dei valori misurati per i diversi dosaggi durante l'esperimento non ha mostrato differenze significative rispetto a CN (*dati non riportati*).

Per quanto concerne PFT_{280nm}, è stato verificato un effetto di rimozione durante l'esperimento e proporzionale all'aumento del dosaggio di CM1np; i due dosaggi più alti, 100 e 200 mg / 50 mL vino, hanno prodotto una riduzione significativa ($p < 0,05$) dell'1,89% e 3,57%, rispettivamente. Tuttavia, la rimozione di polifenoli da parte del materiale non è stata rimarchevole e il PFT_{280nm} dei vini si mantiene entro valori accettabili (CN: PFT_{280nm} 173±2 mg/L equivalenti di acido gallico; valore minimo ottenuto in seguito ai diversi trattamenti: PFT_{280nm} 153 mg/L equivalenti di acido gallico).

Una osservazione interessante riguarda la capacità della CM1np di rimuovere in maniera controllata i composti polifenolici che possono fungere nel tempo da substrati di ossidazione e generare imbrunimento.

La stabilità ed una corretta evoluzione del colore sono tra i principali obiettivi dell'industria enologica. Poiché CM1 nanometrico è noto per le sue proprietà fotocatalitiche, si è proceduto a verificare l'effetto del trattamento sull'indice di imbrunimento DO_{420nm} in condizioni standard di conservazione (T ambiente) ed in seguito ad invecchiamento accelerato (T 35°C). L'effetto del trattamento con i diversi dosaggi di CM1np sul colore del vino Chardonnay è riportato in Figura 3.

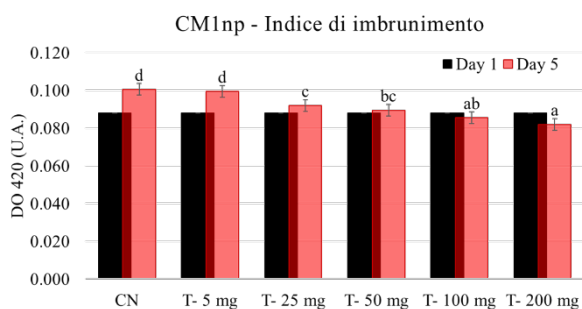


Figura 3. DO_{420nm} dello Chardonnay: controllo (CN) e vino trattato con diversi dosaggi di CM1 nanometrico (T) al giorno 1 (barre nere) e al giorno 5 (barre rosse). I materiali sono stati dissolti in 50 mL di vino. Le differenze significative ($p < 0,05$) vengono identificate con le diverse lettere con intervallo di confidenza al 95%.

Si può osservare che nel campione di controllo la DO_{420nm} ha subito un leggero aumento durante l'esperimento, a causa dell'innescarsi dei tipici meccanismi di ossidazione chimica (contatto con O₂ atmosferico e innesco delle reazioni di Fenton mediate da catalizzatori metallici); viceversa, i vini trattati con CM1np riportano una riduzione della densità ottica proporzionale all'aumento dei dosaggi di materiale; in aggiunta, la riduzione della DO_{420nm} dopo 5 giorni di trattamento è risultata significativa ($p < 0,05$) per ogni dosaggio di materiale se confrontata con il campione di controllo (CN, Fig. 3). Questo effetto è sicuramente di interesse per l'industria enologica, e può essere ascritto ad un meccanismo protettivo esercitato dal materiale (es.

rimozione dei metalli catalizzatori) oppure alla capacità di adsorbire i pigmenti bruni che si formano rimuovendoli dal vino.

In parallelo alle prove condotte a temperature ambiente, lo Chardonnay trattato con CM1np è stato sottoposto a un test di invecchiamento accelerato (temperatura controllata T 35°C) per 5 giorni, monitorando periodicamente l'andamento della DO_{420nm}. L'esperimento ha confermato la tendenza osservata nelle prove a temperatura ambiente, infatti i dosaggi di 25, 50, 100 e 200 mg / 50 mL vino hanno prodotto una significativa riduzione dell'indice di imbrunimento. Nel test di invecchiamento accelerato è stato rimarcato l'effetto protettivo esercitato da CM1np osservando la tendenza del controllo, in quanto il vino tal quale in condizioni di stress termico subisce un incremento della DO_{420nm} pari a +14,2%.

Sono stati poi effettuate misurazioni a DO_{420nm} nelle soluzioni simil-vino per valutare la capacità di rimozione dei principali metalli coinvolti nella catalisi ossidativa, Cu e Fe. Gli esperimenti hanno evidenziato un effetto del trattamento a dosaggi elevati (200 mg / 50 mL vino) nel rimuovere gli ioni Fe (-62,5% in 5 giorni di trattamento) e Cu (-48%). Un effetto ancora più evidente è stato osservato con il dosaggio di 400 mg/50 mL vino, che ha spinto l'efficacia di rimozione a -93% per il Fe e -58% per il Cu, rispettivamente.

Sulla base di questi risultati, e considerando la correlazione tra ossidazione dei vini e loro contenuto in Cu, Fe [7], si può ipotizzare un contributo positivo del trattamento con CM1np alla stabilità ossidativa di vini imbottigliati.

Tuttavia, come atteso l'applicazione di dosaggi elevati di CM1np sotto forma di nanopolvere libera, ha prodotto concentrazioni elevate del metallo costituente nel vino, dovute alla difficoltà dei trattamenti di centrifugazione e filtrazione a rimuovere le strutture nanometriche. Per questo motivo, appurato il potenziale stabilizzante delle strutture nanometriche di CM1, è stato testato il potenziale stabilizzante del materiale CM1-glass.

Trattando il vino con le sfere funzionalizzate secondo il protocollo descritto nel paragrafo 2.2.2, i valori di PFT_{280nm}, DO_{420nm} e pH non hanno subito variazioni significative rispetto al valore di riferimento misurato su CN (PFT_{280nm} 328 ± 3 mg/L equivalenti di acido gallico; DO_{420nm} 0,115 ± 0,01; pH 3,26 ± 0,03).

Per quanto riguarda l'effetto del trattamento sulla stabilità proteica, il Traminer utilizzato risultava instabile in accordo con il valore di ΔNTU determinato tramite test a caldo (3,24 ± 0,05); la stabilizzazione è stata raggiunta dopo 24h di contatto tra vino instabile e sfere, quando tutte le repliche sperimentali hanno raggiunto valori di ΔNTU < 2 (1,27 ± 0,06).

3.2 Esperimenti in regime di flusso: verifiche di cessione e trattamento stabilizzante in continuo

Le sfere funzionalizzate ottenute tramite sinterizzazione sono state sottoposte a cicli di lavaggio secondo lo schema descritto nel paragrafo 2.2.3, e i risultati di questo test sono riportati in Tabella 2.

Tabella 2. Valori del metallo costituente CM1 misurati nei campioni delle acque di lavaggio.

Tempo (min)	CM1 - metal ($\mu\text{g/L}$)
10	18,0 \pm 1,4
30	19,0 \pm 1,4
60	6,1 \pm 0,2
1440	2,5 \pm 0,4
2880	0,7 \pm 0,4

I risultati suggeriscono che le sfere necessitano di cicli di lavaggio importanti (fino a 48 h di flusso) per ridurre il contenuto di metallo costituente libero nelle acque di lavaggio entro limiti accettabili (conc < 1 ppb). L'ente a cui è stato commissionato il materiale funzionalizzato (CNR-ISTEC, Faenza, IT) ha messo a punto un protocollo di lavaggio che contempla l'impiego di acqua e solventi di grado alimentare, che deve essere applicato alle sfere prima del loro impiego per rimuovere tutto il metallo che non è stato immobilizzato sul supporto nella fase di lavorazione del materiale.

Questo step di preparativa del materiale permette di mantenere il rilascio di metallo libero residuo entro i limiti attesi (*dati non riportati*); il protocollo è in fase di ottimizzazione, e verrà sottoposto ad opportuna validazione ai fini dell'accreditamento per l'idoneità alimentare.

Le sfere condizionate sono state utilizzate per il trattamento in continuo del Müller Thurgau 2019, che mostrava instabilità proteica (ΔNTU 3,68 \pm 0,7) a fronte di un ridotto contenuto di proteine (10 \pm 1,6 mg/L). Sono state condotte tre repliche sperimentali del trattamento, secondo il protocollo riportato nel paragrafo 2.2.3.

Il primo prelievo effettuato nel corso dell'Esperimento 1 risultava intorbidito (Fig. 4), nonostante il materiale fosse stato sottoposto preventivamente a lavaggi. Questo fatto, dovuto con tutta probabilità al potere solvente esercitato dal vino, essendo un mezzo idroalcolico e acido, ha confermato la necessità di mettere a punto un protocollo standard per la rimozione del metallo libero dalle sfere funzionalizzate. La filtrazione con membrana CA 0,45 μm del vino in uscita dalla colonna (e, contestualmente, la filtrazione del vino CN a contatto con sfere non funzionalizzate) sembra fornire una soluzione al problema di rilascio del materiale, come si può evincere dall'andamento degli Esperimenti 2 e 3 (Fig. 4).

Gli esperimenti hanno mostrato che l'instabilità di CN permane in seguito al flussaggio su sfere di vetro non funzionalizzate, mentre il contatto con le sfere funzionalizzate induce una progressiva riduzione dell'instabilità del vino nel tempo, fino alla completa stabilizzazione dopo 60 minuti di trattamento (Fig. 4).

Un ulteriore aspetto che è stato approfondito nelle prove preliminari è la rigenerabilità del materiale, intesa come la capacità di reimpiegare le sfere in trattamenti successivi mantenendo la stessa capacità stabilizzante.

Per questo esperimento, le sfere sono state ricondizionate secondo la procedura descritta nel paragrafo 2.2.3, quindi utilizzate per riprodurre l'esperimento in flusso continuo precedentemente effettuato su Müller Thurgau 2019; il vino è risultato nuovamente stabile dopo il ciclo di trattamento di 60 minuti, con valori di ΔNTU misurati in seguito ad *heat-test* pari a 0,7 \pm 0,3.

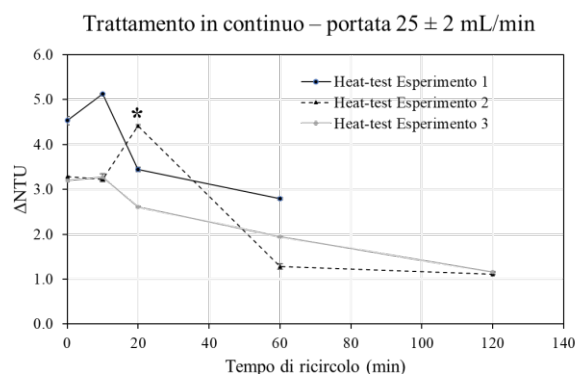


Figura 4. Determinazione della stabilità proteica misurata nelle prove effettuate in regime di flusso. Sono stati effettuati diversi campionamenti per definire i tempi di trattamento. Nelle condizioni sperimentali applicate (vedi paragrafo 2.2.3) si ottiene una stabilizzazione efficace del vino con cicli di trattamento di 60 min. * interruzione e riavvio pompa.

4 Conclusioni

Il presente studio riporta alcuni risultati preliminari di una sperimentazione che si è sviluppata negli anni ed è stata finalizzata alla definizione di un nuovo materiale per la stabilizzazione proteica dei vini bianchi e del relativo processo di stabilizzazione. Un materiale ceramico di uso comune, qui indicato come CM1, è stato studiato ed ingegnerizzato per ottenere le migliori prestazioni in termini di rimozione delle proteine PRPs, ed ulteriormente implementato in un materiale composito (film sottile depositato su sfere in vetro) idoneo all'impiego all'interno di un dispositivo operante in regime di flusso. Secondo lo schema proposto, il trattamento di rimozione delle proteine instabili può essere effettuato in linea (fase pre-imbottigliamento) senza alterare i parametri di qualità (chimico-fisici) dei vini; viceversa, è stato osservato un ipotetico effetto positivo nelle stabilità ossidativa dei vini trattati, che è attualmente allo studio per una descrizione meccanicistica di tale effetto.

Ulteriori esperimenti sono in fase di realizzazione per appurare l'idoneità alimentare del materiale trattante nelle diverse condizioni operative e per determinare l'impatto del trattamento sul profilo organolettico dei vini. Ulteriori esperimenti inerenti all'impatto del trattamento sulla prevenzione del difetto di luce sono in fase di realizzazione.

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.

Il materiale brevettato è stato anche oggetto di

investigazione nell'ambito del Progetto MI-WINE il cui supporto finanziario è fornito da organismi di finanziamento transnazionali, partner di H2020 ERANETs SUSFOOD2 e CORE Organic Cofund, nell'ambito del Joint SUSFOOD2/CORE Organic Call 2019.

Riferimenti

1. J. Ribereau-Gayon, J.C. Milhé, *OENO One* **4**, 1 (1970)
2. P. Sudraud, *Anal. Technol. Agric.* **7** (1958)
3. S. Vincenzi, S. Mosconi, G. Zoccatelli, C. Dalla Pellegrina, G. Veneri, R. Chignola, A. Peruffo, A., Curioni, A., C. Rizzi, *Am. J. Enol. Vitic.* **56**, 2 (2005)
4. A. Ricci, G.P. Parpinello, A. Versari, *Int. J. Food Sci Technol.* **52**, 2 (2017)
5. P. Ribéreau-Gayon, D. Dubourdieu, B. Donèche, A. Lonvaud, *Handbook of enology, Volume 1: The microbiology of wine and vinifications.* John Wiley & Sons (2006)
6. E.J. Waters, G. Alexander, R. Muhlack, K.F. Pocock, C. Colby, B.K. O'Neill, P-B. Høj, *Aust. J. of Grape Wine Res.* **11**, 2 (2005)
7. P. Pohl, *TrAC Trend Anal. Chem.* **26**, 9 (2007)