

FOCUS 01/2018

STABILITA' PROTEICA DI PRECISIONE



CONSULTING
LAB
ORGANIC SERVICES

L'instabilità proteica dei vini rappresenta uno dei problemi più discussi in enologia. Se da tempo si sa che l'utilizzo di bentonite permette di ridurre drasticamente il quantitativo proteico dei vini e quindi il rischio di instabilità, poco si sa in merito a come utilizzare nel modo più razionale e mirato possibile questo additivo. Questo si traduce in un utilizzo spesso sovrastimato dei quantitativi di bentonite che si ripercuote poi in un impoverimento organolettico dei vini.

In questo focus si andranno ad analizzare alcuni tra gli elementi più importanti su cui ragionare volendo dosare correttamente i quantitativi di bentonite, come ad esempio la tipologia di bentonite utilizzata ed i test di stabilità proteica impiegati per rilevare l'instabilità. Verrà inoltre approfondito il ruolo destabilizzante di alcuni coadiuvanti tecnologici, come la CMC, il metatartarico e il poliaspartato, fornendo delle linee guida per evitare problematiche associate al loro utilizzo.

COS'E' L'INSTABILITA' PROTEICA E COME SI FORMA

Il vino è una matrice complessa in cui coesistono vari equilibri, sostenuti da diversi composti che nel corso del tempo e in seguito alla variazione delle condizioni di stoccaggio possono andare incontro a fenomeni di instabilità, generando alterazioni visive ed organolettiche che possono compromettere la qualità percepita dal consumatore.

Focalizzandoci sui vini bianchi, è possibile quindi distinguere:

- instabilità tartarica, causata dalla cristallizzazione di Sali di bitartrato di potassio che nel vino si trovavano in uno stato di sovrasaturazione;

- instabilità microbiologica, dovuta alla presenza indesiderata di microrganismi (lieviti e/o batteri) che alterano vari substrati (zuccheri, acidi organici ed alcol);
- instabilità proteica, la più importante forma di instabilità da considerare nel caso dei vini bianchi.

Le proteine del vini provengono in gran parte dalla uve e marginalmente dal lievito; la vinificazione con il conseguente aumento del grado alcolico e il cambiamento degli equilibri di solubilità agisce come una sorta di "purificazione" della matrice proteica, con il risultato di far arrivare al vino finito TLP (Taumatin-like protein) e Chitinasi, le due proteine maggiormente coinvolte nei fenomeni di instabilità proteica. TLP e Chitinasi infatti fanno parte delle PR proteins (pathogenesis related proteins), prodotte dalla pianta come risposta all'attacco patogeno e quindi capaci di resistere ad un ambiente acido con presenza di proteasi.

Quella che viene definita "casse proteica" è una denaturazione spontanea, agevolata da condizioni predisponenti del mezzo (pH bassi; alte temperature; ione solfato in soluzione; grado alcolico elevato), seguita da flocculazione delle principali proteine termolabili, fenomeno visivamente rilevabile dalla comparsa di flocculi biancastri in sospensione.

Negli anni sono stati proposti dai ricercatori vari modelli che spiegassero l'insorgere dell'instabilità proteica, basati su ciò che è definito modello a tre fasi:

- 1 - Insolubilizzazione delle proteine
- 2 - Auto-aggregazione
- 3 - Aggregazione incrociata tra gli aggregati

Recentemente un nuovo modello di aggregazione è stato proposto (**Fig. 1**), *'Revised method of protein haze formation'* (Marangon et al., 2015).

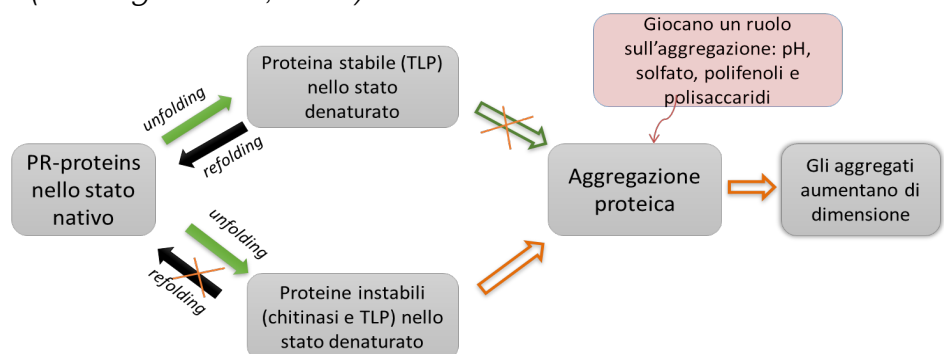


FIGURA 1. Schematizzazione del processo rivisitato di formazione dell'instabilità proteica nei vini (Marangon et al., 2015)

Il modello sottolinea come Chitinasi ed alcune TLP, allo stato denaturato (alte t° , ione solfato...) diventino instabili ed oggetto di aggregazione proteica (principalmente imputabile all'attrazione idrofobica), essendo incapaci di rinaturare tornando allo stato natio, quindi stabile.

Risulta quindi evidente come la comprensione di questo fenomeno sia ancora un processo in divenire, che richiederà anni di studio ed applicazione.

STABILIZZAZIONE PROTEICA: IL DOSAGGIO BENTONITE

Nonostante negli ultimi anni numerosi gruppi di ricerca abbiano cercato soluzioni innovative per risolvere il problema dell'instabilità proteica, come ad esempio l'impiego dell'ossido di zirconio o di enzimi appartenenti alla famiglia delle proteasi, il metodo più comune e che attualmente offre maggiori garanzie per la stabilizzazione di un vino da un punto di vista proteico è rappresentato dall'utilizzo della bentonite. L'elevata superficie adsorbente (in seguito all'idratazione) e la carica elettronegativa di questo particolare tipo di argilla consente infatti di rimuovere le proteine cariche positivamente al pH del vino.

L'utilizzo di bentonite però non è una pratica priva di rischi. A dosaggi eccessivi infatti il suo utilizzo porta ad una "semplificazione" del profilo organolettico del vino, con la rimozione indiretta oltre che di proteine anche di aromi (adsorbimento aroma-proteina) e polisaccaridi, con possibili incrementi di astringenza e problemi connessi alla stabilizzazione della spuma negli spumanti. Inoltre dosaggi eccessivi di bentonite possono incidere sulla shelf-life del vino promuovendo processi ossidativi responsabili dell'invecchiamento precoce, come evidenziato da alcune prove eseguite da GiottoLab utilizzando il **TDO - Test Dinamico di Ossidabilità (Fig. 2)**.



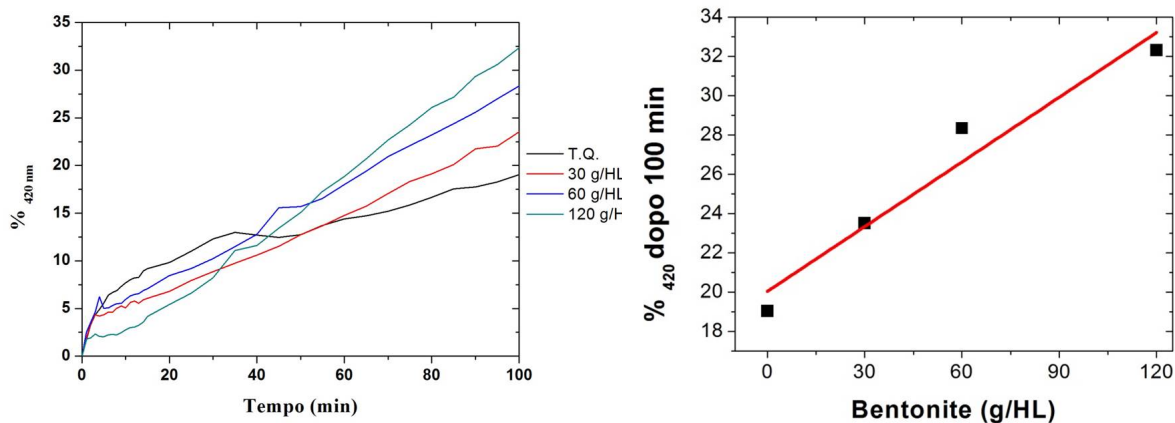


FIGURA 2. Correlazione tra dosaggio bentonite e ossidabilità del vino. Nel grafico a sinistra sono riportate le cinetiche di incremento % del segnale a 420 nm di un vino trattato con 30, 60 e 120 g/HL di bentonite. A destra è riportata la correlazione tra la % di incremento a 420 nm dopo 100 minuti di analisi e il dosaggio bentonite.

Non potendo fare a meno di utilizzare la bentonite al momento, non essendoci ancora delle alternative valide, in termini di efficacia, costi e normative, la scelta più corretta dell'enologo rimane quella di farne un uso razionale e tarato sulle specifiche esigenze di stabilizzazione del vino. Un corretto dosaggio della bentonite diventa quindi un aspetto di fondamentale importanza al fine di ottenere vini stabili proteicamente ma che al contempo non vengano spogliati eccessivamente delle proprietà sensoriali che li contraddistinguono. Si parla in questi casi di **stabilità proteica di precisione**.

Nel determinare la dose ottimale di bentonite necessaria a rendere un vino stabile dal punto di vista proteico le variabili di cui tener conto sono quindi:

- il profilo proteico del vino;
- la natura e la carica della bentonite utilizzata, il tempo di rigonfiamento ma anche il tempo di contatto della chiarifica;
- trattamenti che il vino subirà dopo la stabilizzazione proteica, come ad esempio l'aggiunta di tannini, CMC, metatartarico o poliaspartato.

BENTONTI A CONFRONTO

Uno degli errori più comuni quando si stabilizza un vino proteicamente è quello di scegliere la bentonite esclusivamente in base al prezzo, senza valutare il potere deproteinizzante e la capacità di preservare le note aromatiche fruttato/floreali del vino, proprietà fortemente influenzate dalla natura della bentonite utilizzata (composizione ionica: calcio o sodio) e dalla la tipologia di vino trattato (vino giovane o affinato).

In **Fig. 3** sono rappresentate delle prove di confronto tra diverse bentoniti in commercio, condotte da Giottolab su due vini bianchi (Pinot Grigio e Incrocio Manzoni Bianco), a dimostrazione di quanto sia importante individuare la bentonite migliore da utilizzare al fine di razionalizzare al massimo i dosaggi, riducendo al minimo le interferenze organolettiche di questo coadiuvante enologico. I risultati mostrano una notevole variabilità in termini di potere deproteinizzante delle diverse bentoniti messe a confronto; di conseguenza se volessimo ad esempio stabilizzare il Pinot Grigio con la **bentonite E**, dovremo verosimilmente usarne una dose di almeno 40 g/hl , il doppio di quanto richiesto usando la **bentonite C**, con un conseguente grave impoverimento organolettico del prodotto.

Una considerazione economica merita di essere fatta, considerando che le bentoniti in commercio hanno un prezzo unitario al Kg che può variare dai 2 ai 22 euro/Kg; ecco quindi che a seconda dei casi e dei dosaggi utili, la spesa per la stabilità proteica di un serbatoio risulta essere molto variabile. Nella valutazione economica dell'uso di una bentonite piuttosto che di un'altra bisogna tener conto anche del volume di vino che viene perso in seguito al trattamento di stabilizzazione proteica; come riportato nell'articolo "*Save money and wine by choosing the right bentonite*" di Simon Kinley and Darko Obravovic infatti la perdita in volume di vino può variare dal 3% fino a superare il 10% a seconda della tipologia e della quantità di bentonite utilizzata.



◆ Potere deproteinizzante di diverse bentoniti a confronto

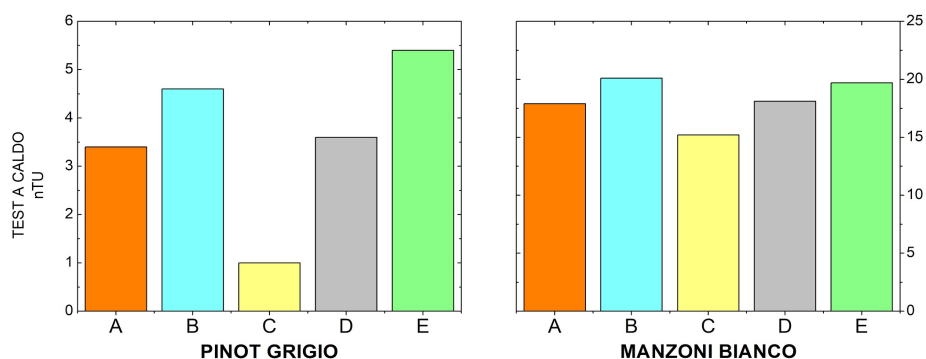


FIGURA 3. Risultati di test a caldo di confronto tra diverse bentoniti.

Le prove sono state condotte reidratando in parallelo e secondo le stesse specifiche (5 g di bentonite in 100 ml di acqua, per 24 ore) le 5 bentoniti oggetto di prova. I 2 vini in prova, Pinot Grigio ed Incrocio Manzoni, sono stati utilizzati per creare 5 tesi ciascuno, ognuna delle quali dosata con 20 g/hl delle varie bentoniti. La stabilizzazione del vino è stata valutata secondo il test a caldo, tra i test più diffusi nei laboratori enologici per la valutazione dell'instabilità proteica. Le differenze in termini di NTU tra i 2 vini testati sono imputabili ad un diverso contenuto proteico che caratterizza le 2 varietà.

METODI ANALITICI A CONFRONTO

La scelta della bentonite è uno degli aspetti alla base di una stabilizzazione proteica di precisione, ma sicuramente non il più importante. Il punto chiave infatti è rappresentato dall'individuazione della metodica analitica in grado di determinare con la massima precisione possibile l'instabilità proteica del campione.

Il mercato offre varie alternative in termini di metodiche analitiche per la determinazione dell'instabilità proteica, il cui ruolo è quello di determinare la dose ottimale di bentonite per evitare che si verifichino intorbidimenti del vino dovuti a fenomeni di precipitazione proteica. Tutti i test normalmente utilizzati vengono detti test "orientativi" perché determinano in modo artificiale ed indiscriminato un'alterazione della matrice colloidale del vino che ha come effetto la comparsa di intorbidamento. Il problema principale per l'enologo è insito nella grande variabilità di risultato, e quindi di determinazione di instabilità proteica che accomuna tutti i test. In tal senso gli articoli tecnico-scientifici che trattano questa tematica non sono certo di aiuto; infatti nonostante numerosi autori abbiano messo a confronto le diverse metodiche esistenti, elencandone in maniera più o meno dettagliata vantaggi e criticità,

raramente viene fornita una linea guida chiara e facilmente applicabile che possa realmente essere d'aiuto all'enologo nel capire quale test applicare e in che contesto. Questo si traduce molto spesso in una scelta poco consapevole da parte dell'enologo che, per evitare problemi di precipitazioni proteiche in bottiglia, tenderà ad optare per metodiche poco selettive, con conseguenti sovradosaggi di bentonite.

Un esempio rappresentativo a supporto di quanto detto è riportato in **Fig. 4**, dove risulta evidente come la scelta della metodica analitica adottata (**test a caldo, tannino a freddo e tannino a caldo**) incida notevolmente sul quantitativo di bentonite utilizzato e, di conseguenza, sulla qualità in termini organolettici del prodotto finale. Quindi quale metodica analitica adottare per valutare la stabilità proteica di un vino?

L'esperienza decennale di GiottoLab ha dimostrato come il **test a caldo** sia l'approccio migliore al fine di valutare la stabilità/instabilità di un vino, purché il test venga fatto sul vino nelle stesse condizioni in cui verrà imbottigliato. Come verrà discusso nel paragrafo seguente infatti l'eventuale aggiunta di coadiuvanti tecnologici potrebbe determinare fenomeni di instabilità non prevedibili utilizzando la sola metodica a caldo.

◆ Metodiche analitiche a confronto: il dosaggio bentonite

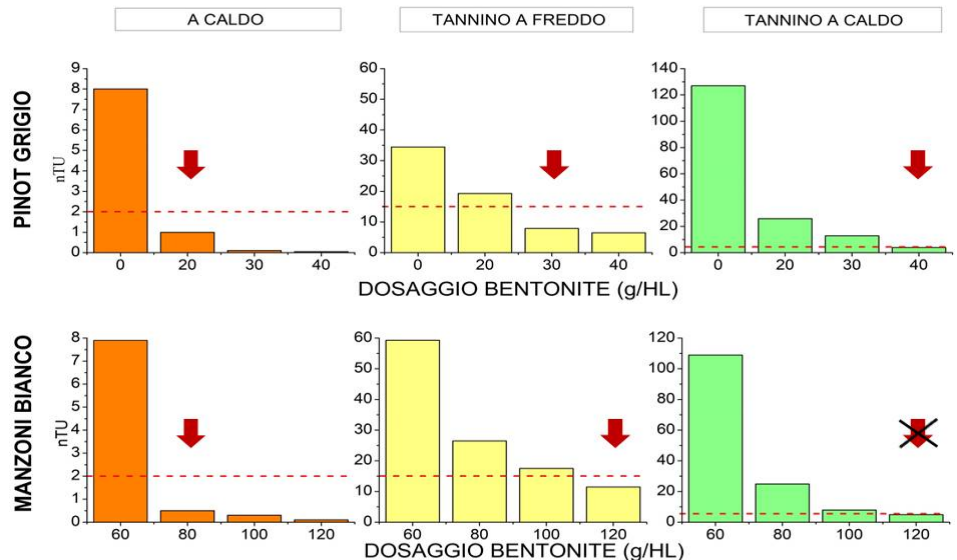


FIGURA 4. Confronto del dosaggio bentonite ottenuto utilizzando il test a caldo, il test tannino a freddo e il test tannino a caldo. Nel caso del Pinot Grigio i quantitativi di bentonite richiesti per portare il vino a stabilità sono pari a 20 g/HL per il test a caldo, 30 g/HL per il tannino a freddo e 40 g/HL per il tannino a caldo. Nel caso del Manzoni bianco invece i quantitativi di bentonite richiesti per portare il vino a stabilità sono pari a 80 g/HL per il test a caldo, 120 g/HL per il tannino a freddo e >120 g/HL per il tannino a caldo.

L'INSTABILITA' PROTEICA DOVUTA ALL'AGGIUNTA DI CMC E METATARTARICO

Prodotti come CMC o acido Metatartarico, agenti inibenti l'accrescimento dei cristalli di bitartrato di potassio, sono utilizzati per evitare l'instabilità tartarica ma, anche se non è noto a tutti, possono destabilizzare il vino proteicamente (**Fig.5A**). Nonostante i meccanismi responsabili di questa instabilità non siano ancora del tutto chiari, è possibile ipotizzare interazioni tra le cariche superficiali negative della CMC e del Metatartarico e le cariche positive delle proteine del vino, con conseguente formazione di flocculi ben visibili ad occhio nudo ed ascrivibili all'instabilità proteica.

Come già anticipato precedentemente il test a caldo viene considerato da molti laboratori come il test più affidabile per la determinazione dell'instabilità proteica ma presenta il grosso limite di valutare soltanto l'instabilità delle proteine termolabili, senza considerare possibili interazioni della frazione proteica con l'acido metatartarico o con la CMC.

Per ovviare a questo problema GiottoLab nel corso degli ultimi anni ha effettuato numerose prove per identificare il metodo analitico migliore per evitare precipitazioni proteiche in seguito all'aggiunta di questi coadiuvanti tecnologici. Come riportato in **Fig.5**, la soluzione da noi individuata è rappresentata dal **test tannino a freddo**, metodica basata sull'utilizzo di particolari tannini estremamente reattivi a temperatura ambiente con le proteine.



◆ Instabilità proteica legata all'uso di CMC e Metatartarico

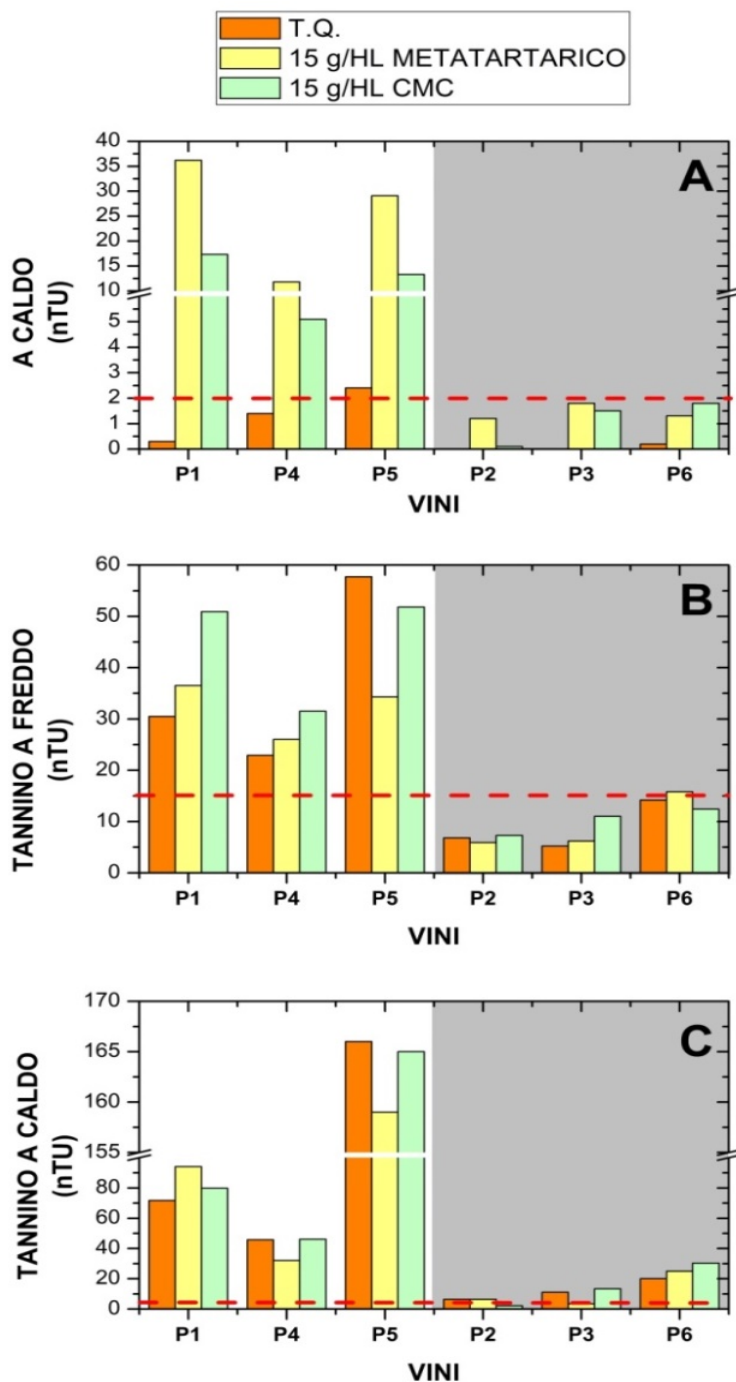


FIGURA 5. Stabilità proteica di sei vini (P1-2-3-4-5-6) prima (T.Q.) e dopo l'aggiunta di metatartarico e CMC.

Metodo:
 - a caldo (A),
 - tannino a freddo (B)
 - tannino a caldo (C)

La linea rossa tratteggiata rappresenta il limite di stabilità proteica per ciascuna metodica. Come si può vedere in FIG. 5A, l'aggiunta di metatartarico/CMC a vini stabili secondo il metodo a caldo ($\Delta nTU < 2$) ma instabili ($nTU > 15$) tramite il metodo tannino a freddo (FIG. 5B) può portare ad una forte instabilità proteica con valori ΔnTU anche superiori a 30 nTU (P1-P4-P5). Vini stabili proteicamente secondo il metodo tannino a freddo (P2-P3-P6) invece risultano stabili a caldo anche in seguito all'aggiunta dei due coadiuvanti tecnologici. Il metodo tannino a caldo (FIG. 5C) invece sovrastima eccessivamente l'instabilità proteica. I tre vini stabili a caldo dopo l'aggiunta di CMC e metatartarico (P2-P3-P6) infatti risultavano essere instabili secondo il metodo tannino a caldo ($\Delta nTU > 5$), richiedendo un superfluo e, in un'ottica di qualità, deleterio trattamento con bentonite.

POLIASPARTATO E STABILITA' PROTEICA

Recentemente è stato introdotto sul mercato un nuovo composto per la stabilizzazione tartarica del vino: il **poliaspartato di potassio**. Questo polimero stabile dell'acido aspartico al pH del vino è dotato di carica negativa



rendendolo capace di sequestrare i cationi potassio e di interferire così sul processo di cristallizzazione.

Essendo carico negativamente però bisogna prestare molta attenzione ad eventuali problemi di destabilizzazione proteica in maniera analoga a quanto avviene utilizzando CMC e Metatartarico. Prove preliminari svolte da GiottoLab sembrerebbero confermare problemi di instabilità proteica dovuti all'aggiunta di questo composto (**Fig.6**). L'uso del test tannino a freddo anche in questo caso quindi diventa imprescindibile per evitare problemi di precipitazione dopo l'imbottigliamento.

Nei prossimi mesi verranno svolte ulteriori prove per capire l'efficacia del poliaspartato nello stabilizzare tartaricamente i vini ed individuare eventuali problematiche associate al suo utilizzo sia nei vini bianchi (precipitazioni proteiche) che nei vini rossi (precipitazioni del colore).

◆ Poliaspartato e instabilità proteica

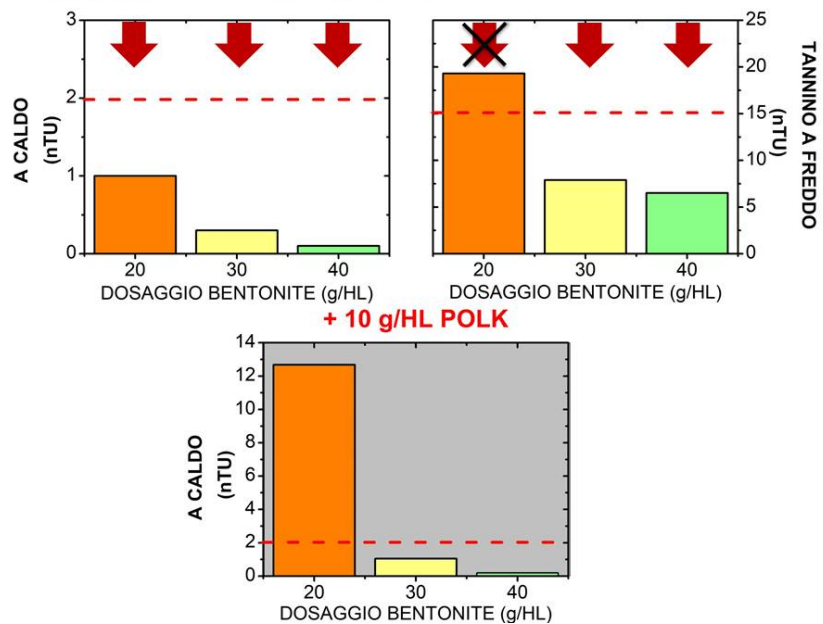


FIGURA 6. Instabilità proteica dovuta all'aggiunta di poliaspartato di potassio.

Le prove sono state eseguite valutando la stabilità proteica a caldo e tramite il metodo tannino a freddo di un vino trattato con tre dosaggi crescenti di bentonite (20 g/HL - 30 g/HL - 40 g/HL). Successivamente le tre prove sono state addizionate di 10 g/HL di poliaspartato per valutare eventuali problemi di instabilità proteica secondo il metodo a caldo. Il risultato di questo test preliminare ha evidenziato un forte effetto destabilizzante del poliaspartato secondo il test a caldo per il campione trattato con 20 g/HL di bentonite, mentre a dosaggi maggiori non si sono riscontrati problemi di instabilità. Da notare come il campione trattato con 20 g/HL di bentonite fosse l'unico instabile secondo il metodo tannino a freddo.

I CONSIGLI DI GIOTTOLAB

In virtù delle considerazioni fatte in questa informativa tecnica, la scelta del test da adottare per valutare la stabilità proteica di un vino dovrà essere fatta dall'enologo in funzione delle caratteristiche del vino e delle sue future condizioni di conservabilità.

Per evitare rischi di intorbidimenti indesiderati nei vini, ed evitare allo stesso tempo il rischio di “snellirli” eccessivamente, GiottoLab consiglia di eseguire il test a caldo o il test tannino a freddo a seconda che il vino venga stabilizzato o meno tartaricamente tramite l'uso di CMC, Metatartarico o Poliaspartato. Nel caso di stabilizzazione mediante Metatartarico o CMC si consiglia di procedere con l'aggiunta almeno 48 h prima della filtrazione. Per i vini spumanti sarebbe preferibile effettuare una stabilizzazione tartarica a freddo per evitare o limitare l'uso di bentonite che andrebbe a rimuovere la frazione proteica (mannoproteine e glicoproteine) in grado di migliorare considerevolmente il processo di presa di spuma.

Su richiesta del cliente GiottoLab fornirà per i vini instabili proteicamente due dosaggi bentonite, uno riferito al test caldo (per chi non intende utilizzare stabilizzanti tartarici) ed uno riferito al test tannino a freddo (per i clienti che hanno intenzione o necessità di stabilizzare tartaricamente il vino tramite coadiuvanti tecnologici).

Fondamentale è il ricontrollo della stabilità proteica in seguito al trattamento con bentonite in quanto il dosaggio fornito da GiottoLab è il risultato di prove di laboratorio effettuate in condizioni estremamente diverse rispetto a quelle di cantina.

