

## Progetto Vintegro - Integrità e stabilità del vino toscano.

Finanziato dalla Regione Toscana nell'ambito del *Programma di Sviluppo Rurale 2014-2020 – bando relativo al “Sostegno per l’attuazione dei Piani Strategici e la costituzione e gestione dei Gruppi Operativi (GO) del Partenariato Europeo per l’Innovazione in materia di produttività e sostenibilità dell’agricoltura (PEI - AGRI)”*.

Sito: [www.vintegro.eu](http://www.vintegro.eu)

### LA STABILITA' COLLOIDALE

Qual è l’approccio per ottenere vini ad elevata stabilità naturale?

I risultati ottenuti con il progetto VINTEGRO, unitamente alle informazioni reperibili in bibliografia sull’argomento della stabilità macromolecolare, hanno permesso di riunire in questo documento tecnico-scientifico conoscenze e indicazioni operative sulle strategie di vinificazione da intraprendere per ottenere vini ad elevata stabilità naturale, intesa come caratteristica intrinseca e spontanea evoluzione del prodotto che può essere gestita al fine di farla emergere. Tutto ciò con l’obiettivo finale di diminuire o migliorare gli interventi stabilizzanti, sottrattivi o additivi, e mirando ad una maggiore sostenibilità ambientale, economica e sociale delle produzioni vinicole.

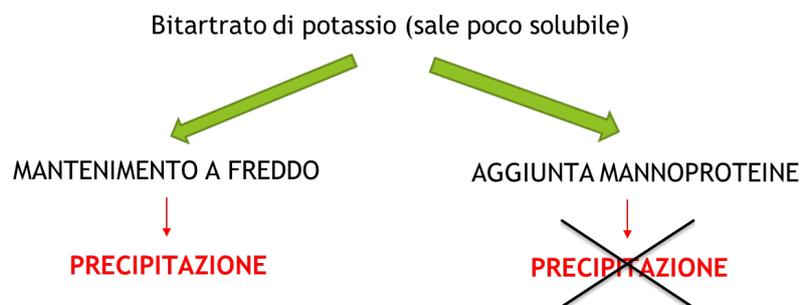
### COS'E' L'INSTABILITA' DEI VINI E QUALI SONO LE CONSEGUENZE SUL PRODOTTO?

“Instabilità” è un termine generico definito come la tendenza a cambiare, anche repentinamente. Questa definizione delinea una situazione di incertezza, che traslata nel settore enologico significa che il vino instabile può cambiare anche rapidamente nel tempo in funzione delle condizioni di conservazione, evolvendo generalmente in modo negativo. L’instabilità del vino riguarda molti dei suoi costituenti sia semplici che macromolecolari e gli aggregati di questi ultimi (colloidi). L’instabilità del vino diventa un problema soprattutto quando essa si manifesta nella fase successiva all’imbottigliamento. Infatti, in cantina per la maggior parte dei problemi di instabilità i tecnici dispongono di soluzioni efficaci. La conseguenza pratica dell’instabilità è la comparsa di difetti del prodotto che vengono percepiti come negativi dal consumatore e spesso proprio rifiutati, con conseguente danno economico e di immagine per le aziende.



Le conseguenze dell'instabilità del prodotto possono manifestarsi in molti modi, per esempio sotto forma di precipitati derivanti da fenomeni che interessano molecole semplici come l'acido tartarico che formano sali insolubili per esempio in seguito ad un abbassamento della temperatura. La materia colorante può andare incontro a reazioni chimiche di natura complessa che portano alla formazione di precipitati da cui deriva la diminuzione del colore dei vini rossi. In generale, le reazioni red-ox che avvengono nel vino in funzione del suo potenziale di ossidoriduzione possono portare a diverse situazioni non conformi a carico del colore che vira da bianco a bruno, da rosso a aranciato, da grigio a rasaceo, con possibile formazione di precipitati che possono interessare i composti fenolici ma anche le proteine del vino. In queste reazioni i cationi metallici (ferro e rame principalmente) giocano un ruolo importante. Talvolta, molecole semplici, come la quercetina che è un composto fenolico, sono responsabili di instabilità del vino. Infatti, la quercetina che si trova nell'uva in forma solubile può evolvere in forme meno solubili che vanno incontro a precipitazione nel corso della vinificazione, situazione che tende a verificarsi soprattutto in certi vitigni come il Sangiovese in funzione di alcune variabili climatiche, agronomiche e produttive. Molecole complesse e poco concentrate nel vino come le proteine possono precipitare in seguito a denaturazione per esempio in funzione della temperatura, fenomeno ben conosciuto per quanto riguarda i vini bianchi. In generale, esistono relazioni complesse fra i diversi fenomeni di instabilità del prodotto che possono essere interpretati solo sulla scorta delle più ampie conoscenze relative alle proprietà chimiche dei costituenti del vino e alle loro interazioni con il solvente.

Da questi esempi emerge che l'instabilità del vino è influenzata da una molteplicità di fattori di natura intrinseca (tipo, proprietà e concentrazione dei soluti e proprietà del solvente) e estrinseca (temperatura, ossigeno, umidità e luce). Per limitare la tendenza del vino a cambiare dopo l'imbottigliamento, evolvendo verso situazioni di non conformità esistono molte soluzioni che comprendono, tradizionalmente, diversi tipi di trattamenti effettuati in cantina a scopo preventivo sulla base di test previsionali più o meno specifici per i diversi tipi di instabilità. I trattamenti possono essere categorizzati come sottrattivi, quando sono volti ad eliminare i composti che possono generare cambiamenti peggiorativi della qualità oppure additivi quando tendono a mantenere nel prodotto i costituenti potenzialmente instabili tramite l'aggiunta di prodotti stabilizzanti. Un esempio di trattamento sottrattivo è l'eliminazione del bitartrato di potassio utilizzando il freddo che ne diminuisce la solubilità mentre l'aggiunta di mannoproteine che inibiscono la crescita dei cristalli di questo sale contribuendo a mantenerlo in soluzione può esemplificare un trattamento additivo.



Le problematiche legate ai trattamenti per la stabilizzazione del vino risiedono nella loro effettiva efficacia, nella specificità e nei costi. In effetti, esistono ben pochi trattamenti che non hanno conseguenze aspecifiche (variazioni a carico di componenti diverse da quelle per le quali si effettua il trattamento) sul prodotto e a questo si aggiunge il fatto che spesso per mettersi al riparo dalle conseguenze negative di un prodotto instabile si ricorre a un utilizzo eccessivo di trattamenti o a dosi eccedenti di prodotti stabilizzanti. Tutto ciò si ripercuote inevitabilmente sulla qualità del vino, che in definitiva può risultare stabile ma in parte spogliato delle sue caratteristiche chimiche e sensoriali, ed anche sui costi sostenuti per raggiungere tale stabilità.

## I DESIDERI DEL CONSUMATORE

I consumatori di vino sono da sempre attenti alla qualità intesa come specifiche percepite del prodotto e, recentemente, sono più sensibilizzati sui temi della sostenibilità e alla salubrità del prodotto. Tuttavia, spesso ignorano i fondamentali del processo produttivo. Generalizzando, possiamo dire che i consumatori non comprendono la naturalità di un precipitato e, chiedendosi da cosa può essere causato senza potersi dare risposta, temono anche effetti nocivi per la salute. La conoscenza e quindi la consapevolezza di certi fenomeni gioca un ruolo indispensabile e la comunicazione è uno strumento importante per dirimere alcune questioni in materia di stabilità. Quindi le aziende dovranno farsi carico, nella piena trasparenza del proprio lavoro, di veicolare fino al consumatore finale gli sforzi intrapresi per enfatizzare la stabilità naturale del vino e la sostenibilità della produzione vitivinicola. In generale, salvo alcune eccezioni, si può affermare che i trattamenti effettuati per raggiungere la stabilità del prodotto non hanno effetti sulla salute ma possono avere alcuni effetti sulla sostenibilità economica del processo produttivo. Tuttavia, l'effetto di questi trattamenti sulla qualità percepita del vino è il fulcro della questione.

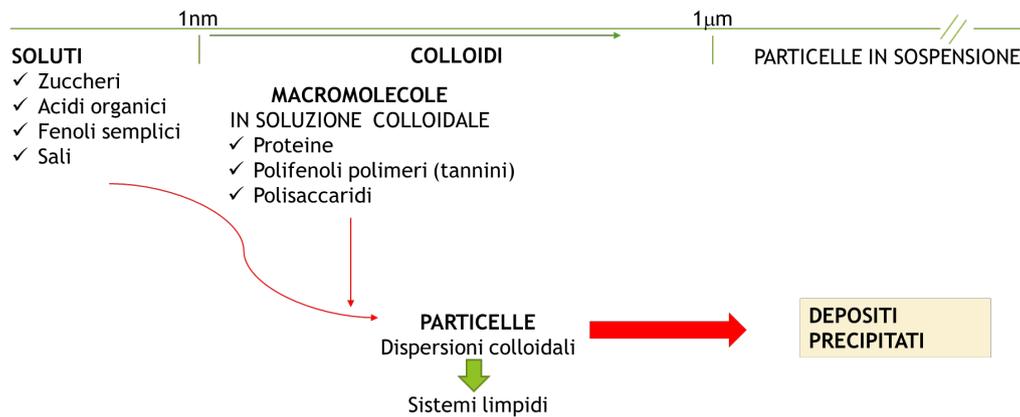
Le domande: Il consumatore come reagisce di fronte ad un precipitato in bottiglia? Possiamo limitare l'uso dei chiarificanti? C'è una convenienza nel tendere verso questa direzione? Possiamo sostituire la parola "difetto" con altro vocabolo, almeno per i precipitati colloidali naturali se essi si limitano ad un "fondo" in bottiglia o a una leggera torbidità? E' possibile contrastare la cultura deviante del vino fatto con l'aggiunta di chissà quali "intrugli", come se "fare il vino" si risolvesse nel seguire una ricetta esoterica?

Comunicare, spiegare, essere trasparenti può aiutare molto a ridurre i trattamenti di stabilizzazione ed anche le aziende nel difficile compito di farsi apprezzare.

## PERCHE' I COLLOIDI DEL VINO POSSONO DARE INSTABILITA'?

Con il progetto Vintegro sono stati affrontati alcuni temi relativi alla stabilità del vino. In particolare, è stato studiato in collaborazione con i partner aziendali il problema della stabilità colloidale dei vini rossi. Per cercare di comprendere i fenomeni che sottendono alla instabilità del vino non si può prescindere dalla conoscenza della sua composizione chimica. Il vino è una soluzione idroalcolica vera e colloidale allo stesso tempo. Le soluzioni vere sono quelle nelle quali i soluti si disperdono nel solvente fino a livello molecolare, ossia ogni molecola di soluto è circondata da solvente (per fare un esempio saccarosio oppure cloruro di sodio disciolto in acqua). Queste soluzioni rispondono alle proprietà colligative delle soluzioni e sono perfettamente omogenee, ossia uguali in tutte le loro parti. Le soluzioni colloidali invece sono soluzioni nelle quali i soluti (colloidi) hanno dimensioni molto più elevate rispetto a quelle delle molecole. Queste soluzioni sono disomogenee e hanno

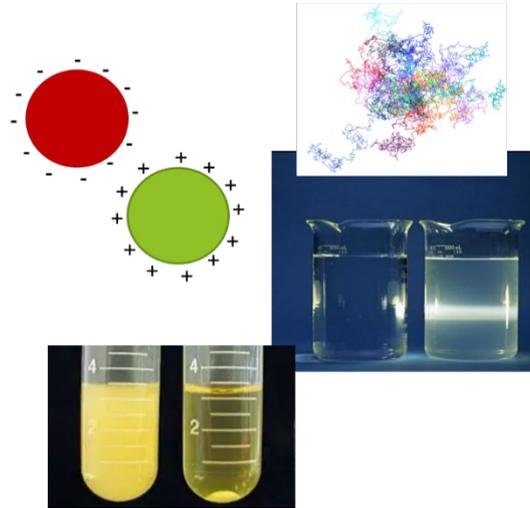
proprietà caratteristiche, diverse da quelle delle soluzioni vere, come la dispersione della luce (effetto Tyndall) o la difficoltà ad attraversare le membrane dializzanti (potere colmatante). I vini rossi si distinguono dai vini bianchi per la concentrazione in colloidali, maggiore nei primi rispetto ai secondi, che derivano principalmente dalla macerazione delle parti solide dell’uva. Tuttavia, in alcune forme di instabilità dei vini bianchi, come la *casse* proteica, sono coinvolti i composti di colloidali.



I colloidali del vino comprendono le macromolecole e le particelle che sono, queste ultime, aggregazioni delle macromolecole stesse e sono di diversa dimensione (da 1 a oltre 100 nm). Le macromolecole del vino comprendono specie chimiche con caratteristiche diverse: i polifenoli che sono molecole complesse, potendo raggiungere un elevato grado di polimerizzazione (mDP 20 - >30 unità), dotate di carica negativa e di una spiccata reattività nei confronti delle proteine, in continua evoluzione nel vino (polimerizzazione, idrolisi e reazioni redo-ox) e in concentrazione variabile fra 150-2000 mg/L di vino; le proteine che provengono dall’uva e ritroviamo nel vino sono macromolecole con pesi molecolari variabili fra 10 e 60 kDa, cariche positivamente al pH del vino, piuttosto stabili e in concentrazione bassa e variabile fra circa 10 e 300 mg/L; i polisaccaridi dell’uva (ramnogalatturonani tipo I e II, arabinogalattani proteine) sono strutture complesse, di grandi dimensioni (10-300 kDa) in concentrazione variabile fra 50 e 250 mg/L; infine le macromolecole di origine microbica (per esempio le mannoproteine) hanno dimensioni variabili (20- 450 kDa), struttura complessa e possono portare carica negativa oppure neutra e la loro concentrazione può variare fra 100 e 150 mg/L; alcune di queste molecole sono in grado di esercitare un effetto stabilizzante nei confronti di intorbidamenti e precipitazioni, si comportano cioè come colloidali protettori.

La formazione delle particelle dipende dalla reattività delle macromolecole del vino (polifenoli/proteine e polifenoli/polisaccaridi). Il loro accrescimento in dimensione è influenzato dalle cariche superficiali dei colloidali, dal loro stato di idratazione e dai moti Browniani (maggiore è il movimento e maggiore è la possibilità che i colloidali interagiscano). I colloidali possono flocculare e precipitare soprattutto quando perdono i loro fattori intrinseci di stabilità (carica superficiale e idratazione) dando torbidità e depositi al fondo dei recipienti. La concentrazione e soprattutto le

dimensioni molecolari dei colloidali influenzano la loro stabilità in soluzione. In base alle loro dimensioni possono essere separati dal vino tramite le normali operazioni di cantina (decantazione e travaso) oppure rimanere in sospensione a lungo divenendo con il tempo possibile causa di instabilità del prodotto.



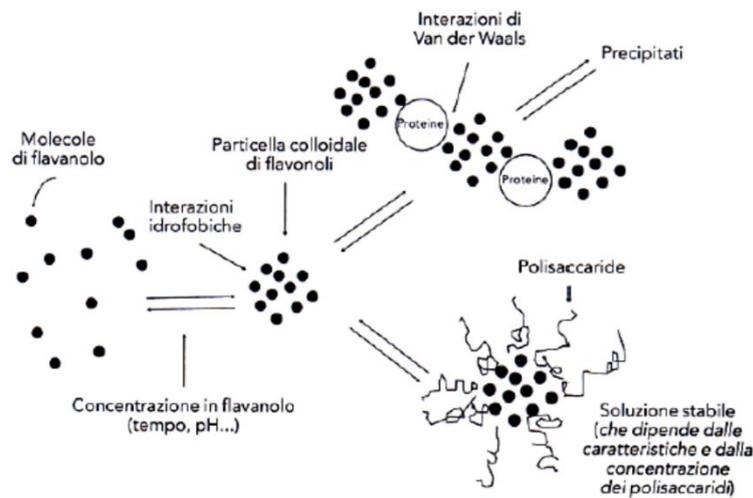
Il vino è un sistema colloidale complesso ma piuttosto diluito, questo determina una cinetica di aggregazione lenta che avviene in virtù di forze di aggregazione deboli come le forze di van der Waals (attrattive e deboli), i legami a idrogeno, le interazioni polari dei colloidali con il solvente (idrofobiche attrazione e idrofile repulsione) e le forze attrattive (segno opposto) o repulsive (stesso segno) dovute alla presenza di cariche superficiali. In generale, si può affermare che se l'energia totale del sistema è repulsiva e positiva il sistema è stabile (limpido) mentre se l'energia totale è attrattiva il sistema è instabile (torbido). Esiste tuttavia una situazione intermedia nella quale il sistema può essere reso instabile, passando da limpido a torbido, se un livello energetico (barriera energetica) viene superato per esempio tramite un innalzamento di temperatura. Queste situazioni intermedie sono particolarmente interessanti nell'analizzare i fenomeni di potenziale instabilità.

In definitiva, possiamo dire che l'evoluzione colloidale del vino può essere intesa come un "continuum", un fenomeno lento senza soluzione di continuità nel quale disaggregazione, aggregazione, precipitazione avvengono naturalmente in adeguate condizioni di conservazione portando a conseguire fondamentali obiettivi enologici come la stabilizzazione del colore e dell'aroma, la diminuzione dell'astringenza. L'insorgenza di difetti, invece, dovuta all'instabilità di alcune componenti del vino appare come una deviazione da questa strada dovuta alla composizione ma fortemente influenzata dalle condizioni di conservazione e dal tempo.

In generale, per i vini rossi si può affermare che vini "veloci" e "mal trattati", ossia sottoposti a stress fisici dopo l'imbottigliamento, necessitano di più interventi di stabilizzazione in cantina per raggiungere il consumatore senza difetti. I vini "lenti", prodotti nel rispetto della qualità dalla vigna alla bottiglia, si stabilizzano naturalmente ma possono comunque nel tempo andare incontro a limitati fenomeni di instabilità colloidale, indipendentemente dalle buone pratiche seguite per produrli.

### I MODELLI DI AGGREGAZIONE

I modelli di aggregazione dei colloidali del vino descrivono le possibili interazioni fra macromolecole di natura diversa. Il modello proposto da Saucier et al., (1997) descrive l'interazione fra colloidali idrofobici di natura fenolica che tendono a separarsi dal mezzo acquoso e ad aggregarsi fra di loro formando particelle colloidali che possono: a) essere stabilizzate da polisaccaridi che si comportano da colloidali protettori e che, bloccando l'aggregazione, mantengono in soluzione le particelle oppure b) interagire con le proteine (interazione fra cariche di segno opposto) tramite forze deboli o addirittura legami covalenti a formare aggregati sempre più grandi che poi precipitano.



Modello di aggregazione dei colloidali del vino proposto da Saucier et al., (1997).

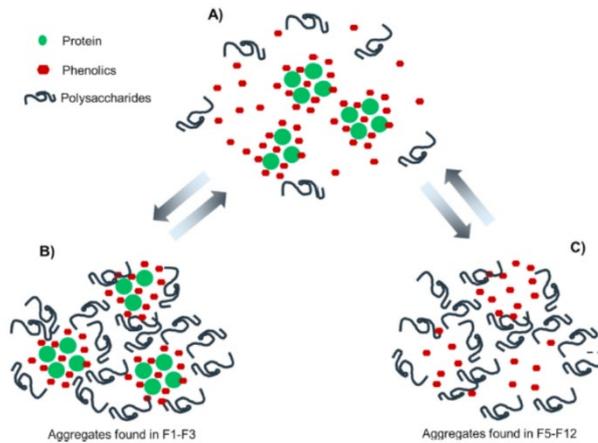
Il ruolo delle proteine nei vini rossi è stato per molto tempo sottovalutato e ritenuto marginale in virtù di alcune considerazioni: la concentrazione delle proteine nei vini rossi è molto bassa rispetto a quella dei fenoli; le proteine dei vini rossi sono eliminate precocemente dal vino tramite reazioni di co-precipitazione con i tannini; lo studio delle proteine dei vini rossi è difficile a causa della loro bassa concentrazione e della interferenza analitica con i più abbondanti fenoli.

Tuttavia, recentemente sono stati fatti alcuni importanti progressi scientifici che hanno portato a conseguire alcuni elementi di novità:

- Metodi di analisi delle proteine più specifici e sensibili
- Presenza di proteine nei vini rossi in quantità abbastanza elevate e di natura è simile a quella dei vini bianchi
- Alcuni progressi sulla conoscenza delle dinamiche colloidali delle proteine nel vino rosso

Recentemente, è stato proposto un modello di aggregazione colloidale nei vini rossi nel quale le proteine giocherebbero un ruolo molto importante (Marassi et al. 2021). In quest'ultimo, la struttura degli aggregati presenta un nucleo costituito da proteine legate covalentemente ai

polifenoli che a loro volta interagiscono tramite forze non covalenti con i polisaccaridi contribuendo, questi ultimi, a mantenere gli aggregati in soluzione colloidale stabile.



Modello di aggregazione dei colloidali del vino rosso proposto da Marassi et al., 2021.

### FOCUS: LE PROTEINE DEL VINO

Nell'uva troviamo più di 300 proteine con varie funzioni. La maggior parte di queste proteine non si ritrova nel vino. Ciò che troviamo nel vino è un ristretto numero di proteine di difesa che costituiscono circa il 20 % delle proteine dell'uva. Tutte le altre proteine vengono perse nel corso della vinificazione per effetto di vari agenti denaturanti quali pH, temperatura, etanolo e attività idrolitiche nel corso della vinificazione.

Tali fenomeni influenzano perciò anche la concentrazione proteica del vino che è bassa rispetto ad altri costituenti macromolecolari. Le principali proteine che hanno caratteristiche tali da superare la vinificazione sono le chitinasi, le proteine taumatina simili, le invertasi e in minor misura le proteine di trasferimento lipidico. Nei vini bianchi queste proteine sono coinvolte nei ben noti fenomeni di instabilità colloidale del prodotto (*casse proteica*) con diversi livelli di coinvolgimento in funzione della loro natura.

Ciò che conosciamo sulle proteine deriva da studi fatti inizialmente su vino bianco dove la *casse proteica* che porta alla formazione di torbidità, è un fenomeno noto da tempo ma è senz'altro vero che molte informazioni sono valide anche per i vini rossi. Le proteine che troviamo nel vino sono l'**invertasi** o saccarasi che catalizza l'idrolisi del saccarosio in glucosio e fruttosio. La  **$\beta$ -1,3-glucanasi** che agisce su substrati con sequenze lineari di glucosio con legami glicosidici di tipo  $\beta$ -1,3. L'enzima  $\beta$ -1,3-glucanasi riveste un ruolo nel ritardare la crescita di funghi patogeni riducendo il danno causato dall'infezione nei frutti. La **chitinasi** è un enzima idrolitico in grado di rompere i legami glicosidici presenti nella chitina, omopolisaccaride presente nell'esoscheletro degli insetti e nella parete cellulare dei funghi. Le **proteine taumatina simili** sono diffuse in tutto il regno vegetale e svolgono funzione di protezione nei confronti di varie patologie e stress abiotici. Le **Proteine di**

**trasferimento lipidico** sono piccole proteine termostabili presenti nella buccia della frutta dove svolgono funzione di difesa contribuendo al rivestimento delle parti delle piante con materiale lipidico che riduce la perdita dell'acqua e si oppone all'ingresso di funghi e batteri patogeni.

In generale, le proteine sono molecole anfotere, cioè dotate di carica positiva, negativa o neutra in funzione del pH. Al pH del vino le proteine hanno carica positiva. Questa proprietà fa sì che le proteine possano interagire con molecole di uguale carica respingendosi e di carica opposta (polifenoli) attraendosi.

La denaturazione delle proteine gioca un ruolo chiave nei fenomeni di instabilità e le proteine del vino meno stabili (chitinasi e taumatina simili) sono anche le più abbondanti. Sotto l'azione di vari fattori le proteine possono perdere la loro struttura originale che è di tipo globulare nel caso delle proteine taumatina simili. La denaturazione è dovuta alla rottura di legami intramolecolari (ponti disolfuro) che causa l'apertura della molecola e l'esposizione delle porzioni interne. Esistono vari fattori che influenzano la denaturazione delle proteine come temperatura, forza ionica (sali - solfati) e condizioni riducenti (SO<sub>2</sub>). Con la denaturazione le proteine taumatina simili si srotolano perdendo anche la loro attività in modo reversibile (solo per alcune isoforme) oppure irreversibile.

In base a queste conoscenze, il meccanismo di precipitazione delle proteine proposto da Van Sluyter et al., (2015) prevede la denaturazione delle proteine al calore che determina l'esposizione dei siti idrofobici della molecola, un successivo step di auto-aggregazione delle proteine denaturate, la crescita degli aggregati e infine un "cross-linking" con molecole di natura diversa a formare un reticolo. Gli aggregati di grandi dimensioni che si formano in questo modo vanno incontro a precipitazione con comparsa della torbidità.

### **CONSEGUIRE LA STABILITA': A QUALE PREZZO? E CON QUALI COMPROMESSI?**

Per conseguire la stabilità colloidale esistono numerose tecniche e molti prodotti che sono spesso efficaci nel raggiungere tale obiettivo enologico. Tuttavia, tecnici e ricercatori indicano possibili effetti collaterali dei trattamenti di stabilizzazione che possono incidere negativamente sulla qualità percepita del prodotto. Nella tabella sono riportati alcuni esempi di effetto collaterale dei trattamenti, dei coadiuvanti e di altri prodotti (**Tabella 1**). I tecnici forniscono anche indicazioni precise sul livello di accettabilità dei difetti del vino che si possono presentare sotto forma di torbidi o precipitati in bottiglia da parte del consumatore e che sono in relazione al prezzo, all'invecchiamento del prodotto e al mercato di riferimento. Esemplicando, per un prodotto che entra nel mercato a 7-8 euro, il consumatore pretende l'assenza di precipitati o torbidi mentre per vini di gamma alta sono tollerati deboli precipitati. Per i vini esportati all'estero sono necessarie ulteriori considerazioni che toccano il tema della tradizione nella produzione vitivinicola e nel consumo di vino; parliamo dunque di conoscenza, di esperienza e di consapevolezza del prodotto da parte di chi lo consuma. Ne deriva che minore è la conoscenza e maggiore è l'esigenza di stabilità. In definitiva, sebbene il consumatore possa percepire variazioni della qualità del prodotto molto spesso non è in grado di capire qual è la relazione fra la qualità del prodotto e i trattamenti che ha subito. Sulla base di queste considerazioni, si procede in cantina alla stabilizzazione del prodotto intervenendo più o meno pesantemente a seconda degli obiettivi e della tipologia di vino,

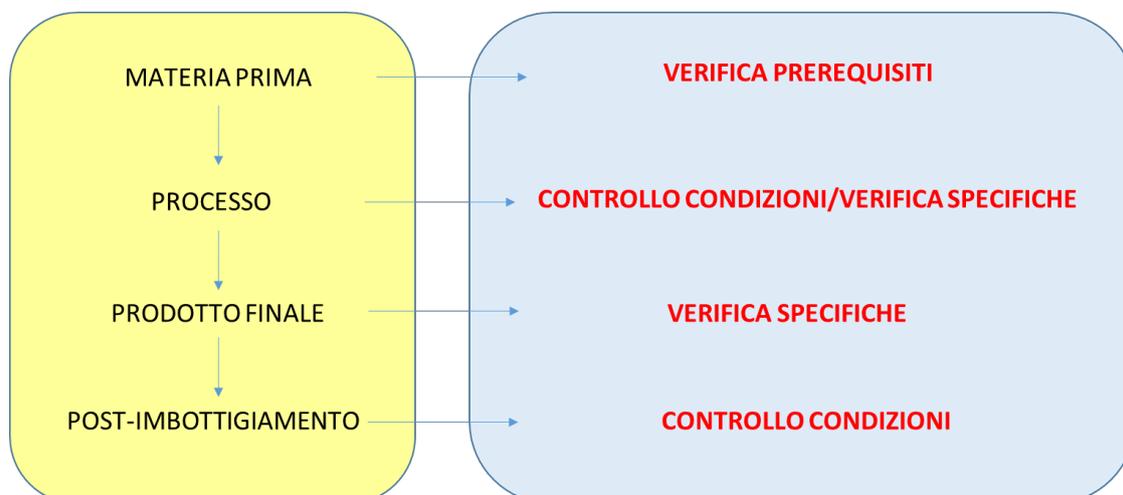
sostenendo costi per queste operazioni ed esponendo il prodotto ai potenziali effetti negativi o semplicemente alla spoliatura a vario livello dei suoi elementi di qualità.

**Tabella 1.** Possibili effetti collaterali dei trattamenti, dei coadiuvanti e di altri prodotti enologici.

Tipo Trattamento	Effetti collaterali
<b>Trattamenti fisici</b>	
Freddo	Effetti sul colore
Filtrazioni	Limitati effetti sul colore, espressione olfattiva, sensazione in bocca
<b>Agenti di chiarifica</b>	
Origine animale	Riduzione fenoli e intensità colorante
Origine vegetale	Limitata riduzione delle componenti fenoliche
Origine fungina	Effetti generici su NTU e % di feccia
Origine minerale	Riduzione antociani e colore
Origine sintetica	Riduzione fenoli, intensità colorante
<b>Coadiuvanti</b>	
Origine fungina	Riduzione tannini e polifenoli a dosi elevate
<b>Estratti vegetali</b>	
Tannini	Perdita equilibrio, note sensoriali negative

### Il diagramma della stabilità

Per cercare di dare delle risposte pratiche alla questione della stabilità colloidale, esaminiamo i fondamentali della vinificazione.



### LA “TRIADÉ”: VARIETA’, MATURAZIONE e MACERAZIONE

I concetti insiti nella “triade” richiamano la composizione del vino. Il tipo, la concentrazione, e l’abbondanza relativa dei costituenti dell’uva influenzano certamente i fenomeni di stabilizzazione che sottendono alla qualità del vino. Vi sono esempi nei quali le suddette variabili giocano un ruolo

nei fenomeni di stabilità del vino come l'importanza della concentrazione degli antociani e dei tannini e del rapporto fra queste concentrazioni nel determinare l'evoluzione del colore del vino rosso, influenzato senz'altro dalle caratteristiche varietali, dallo stato di maturazione dell'uva e dalla macerazione; oppure l'influenza del rapporto fra la concentrazione degli acidi idrossicinnamici e del glutatione sulla ossidabilità del mosto che è in prima battuta una caratteristica varietale. Alcune problematiche di instabilità possono essere migliorate intervenendo a monte, ossia raggiungendo una maturazione bilanciata. Questo per esempio è il caso della quercetina che può precipitare nel vino dando luogo a fastidiosi "fondi". Sappiamo che la varietà, il Sangiovese in particolare soffre di questo problema, è una variabile importante ma sappiamo anche che gli interventi in vigna (defogliazione) possono amplificare il problema. Una corretta gestione della maturazione diventa quindi fondamentale nel proiettare i risultati della vinificazione senza ovviamente nulla togliere al valore della disponibilità di soluzioni enologiche per rimediare a situazioni che rendono necessari gli interventi di stabilizzazione. Rispetto alle dinamiche colloidali, le relazioni sono più confuse a causa della complessità delle strutture e delle molte variabili intrinseche ed estrinseche in gioco. Se esaminiamo le tre classi di macromolecole ci accorgiamo, da un lato, della molteplicità delle informazioni disponibili sui polifenoli e dall'altro della minor disponibilità di quelle che riguardano i polisaccaridi e più ancora le proteine, soprattutto per alcune tipologie di vino. Tuttavia, alcuni studi hanno mostrato che più l'uva è matura e maggiore è la possibilità di estrarre nel succo le proteine di difesa. Un livello più spinto di maturazione influisce anche sull'estrazione dei polifenoli e dei tannini. Questo potrebbe contribuire a ridurre la quantità finale di proteine nel vino attraverso la co-precipitazione dei complessi tannino/proteina oppure, secondo le più recenti acquisizioni scientifiche, contribuire alla stabilità dei colloidi che andranno a formarsi. È ragionevole pensare che entrambe i fenomeni abbiano luogo nel corso della vinificazione sempre in funzione della composizione e delle condizioni di processo. Si auspica invece la comprensione di quello che ancora non è chiaro, ossia quali sono le leve su cui si può spingere verso l'una o l'altra delle due direzioni.

### **I TEST PER VALUTARE E PREVEDERE LA STABILITA' COLLOIDALE**

I test previsionali per valutare la stabilità colloidale dei vini rossi si basano sulla induzione della torbidità, tramite variazione della temperatura, calore o freddo, e nel caso dei vini bianchi (stabilità proteica), anche tramite aggiunta di agenti denaturanti o complessanti, e successiva misura e valutazione del livello di torbidità indotta.

In generale, i test previsionali attualmente disponibili sono piuttosto aspecifici e quindi il loro risultato è fortemente influenzato dalla composizione del vino. Esiste una nutrita letteratura scientifica per quanto riguarda i test previsionali dell'instabilità proteica nei vini bianchi che ne descrive pregi e difetti (Esteruelas et al., 2009, Vincenzi et al., Enoforum 2019). Il rischio maggiore di questi test è la sovrastima dell'instabilità dovuta alla co-precipitazione di macromolecole non proteiche, principalmente tannini e polisaccaridi. La presenza di possibili interferenti è documentata in letteratura (De Bruijn *et al.* 2014; Sarmiento et al. 2000).

Il medesimo problema sussiste per la stabilità colloidale dei vini rossi per i quali il test a caldo (80 °C per 30 minuti) e a freddo (4 °C fino a sei giorni) forniscono indicazioni sul fatto che questo tipo stress piuttosto estremi e aspecifici si risolvono in una precipitazione che può coinvolgere i colloidi del vino e ma anche altre molecole di natura non colloidale.

## Progetto VINTEGRO – Integrità e stabilità del vino toscano

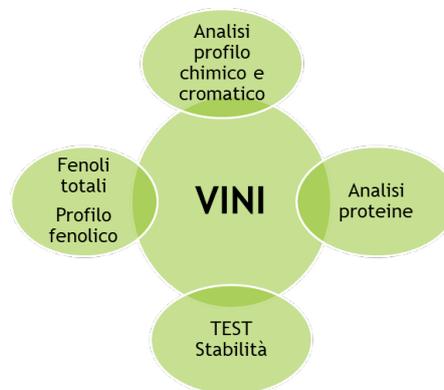
### OBIETTIVI

Alcuni degli obiettivi del progetto:

- ✓ Indagare il potenziale RUOLO DELLE PROTEINE nella stabilità colloidale dei vini rossi
- ✓ Sviluppare un NUOVO TEST AFFIDABILE per valutare la stabilità colloidale

### APPROCCIO

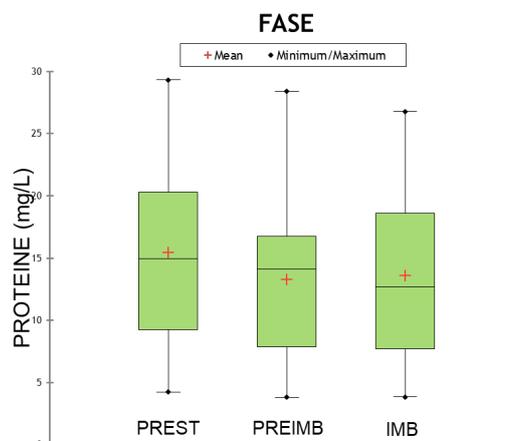
Nel corso del progetto sono stati presi in considerazione vini reali, prodotti in Toscana a livello industriale secondo i protocolli operativi delle diverse cantine partner. Le molte analisi e test di stabilità classici e innovativi effettuati hanno permesso di costruire modelli robusti utili per l'interpretazione dei risultati.



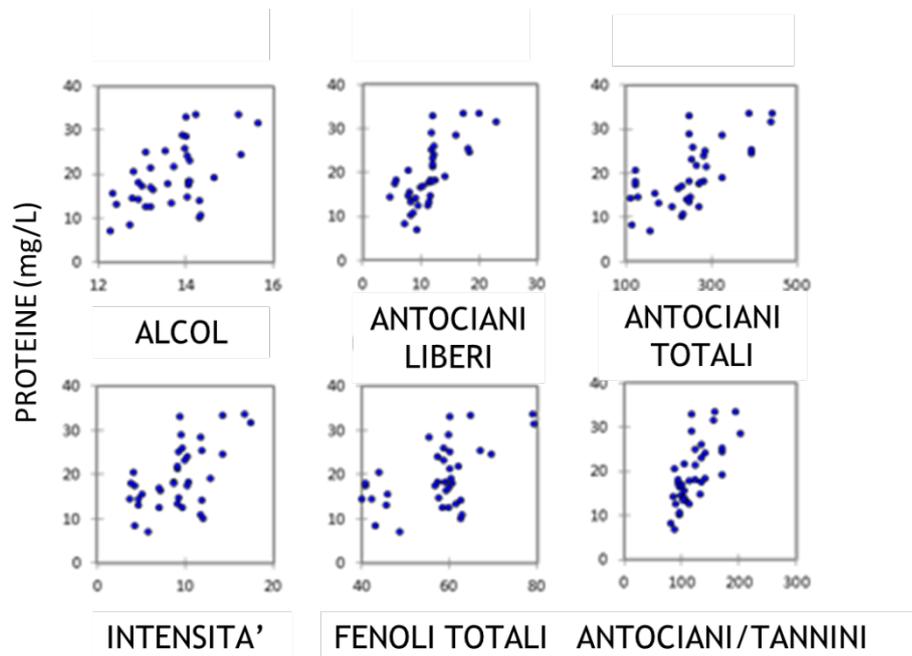
### RISULTATI

#### Ruolo delle proteine nei vini rossi

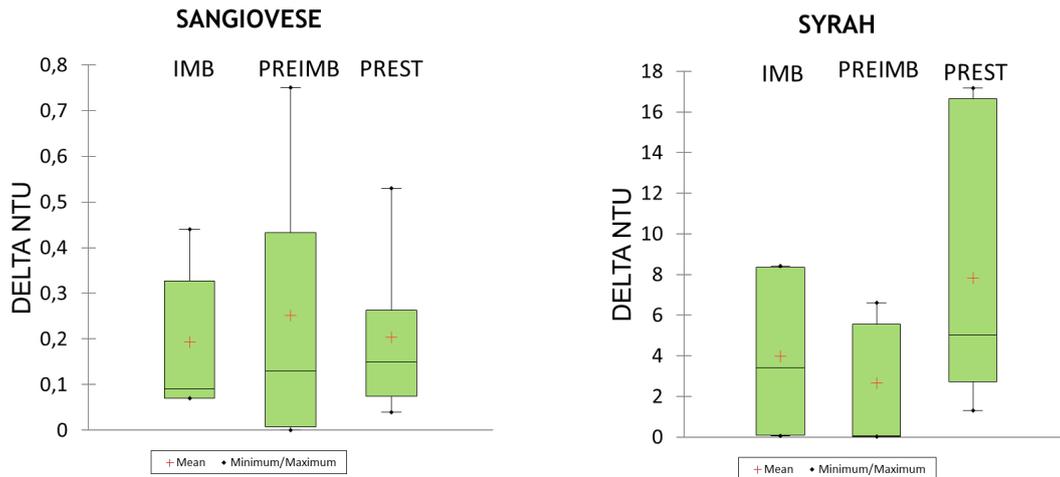
- Le **proteine** sono presenti **in tutte le fasi** della vinificazione, anche dopo l'imbottigliamento, e **in tutti i vini** analizzati



- Non si sono trovate correlazioni significative fra il **contenuto proteico** dei vini e la **torbidità che si sviluppa dopo i test a caldo e a freddo**
- Il **contenuto proteico** dei vini correla positivamente e significativamente con molti parametri relativi alla **composizione fenolica**, indicando che la **varietà** e la **maturità dell'uva** giocano un ruolo importante nel determinare il contenuto proteico del mosto e del vino



- I vini in fase di pre-stabilizzazione contengono **diverse proteine** e **glicoproteine**. Le proteine sono in parte riconducibili alle proteine dell'uva (pesi molecolari compresi fra circa 60 e 10 kDa); quelle più grandi (> 60 kDa) confermano la presenza nel vino di **aggregati con altre macromolecole/particelle di varia natura**
- I vini analizzati in fase di pre-stabilizzazione presentano **diversi profili elettroforetici** che sono in relazione con la diversa **suscettibilità a formare torbidità**
- La **varietà** sembra la variabile che incide maggiormente sullo sviluppo di **torbidità** nel test a caldo

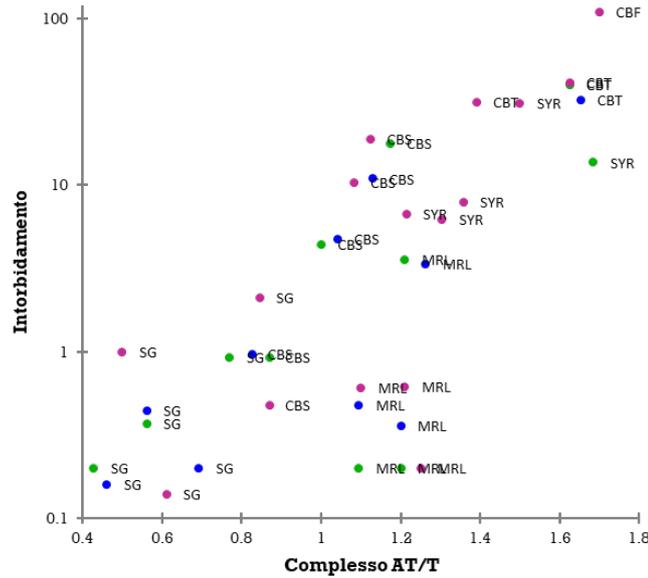


I fattori in gioco nella stabilità naturale:

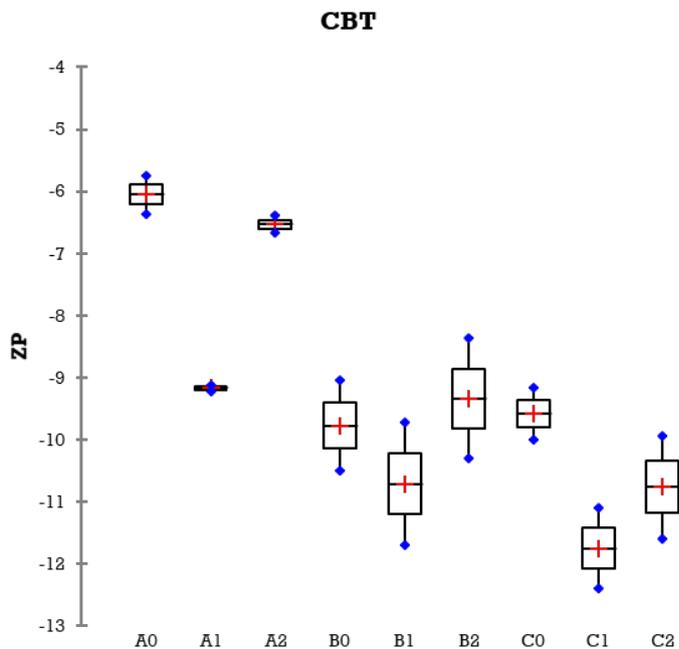
- Varietali
- Stato di maturazione dell'uva
- Tecnica di macerazione

### Test innovativo che si basa sul rapporto Antociani/Tannini

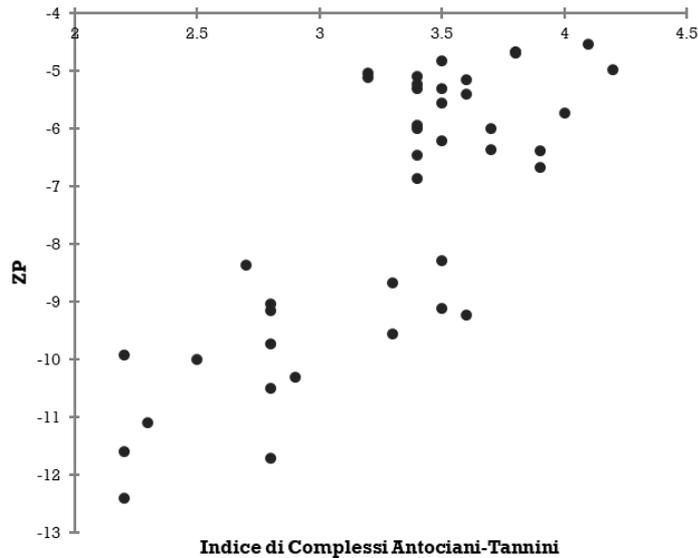
- Sebbene il test a caldo sembri avere valenza generale, le grandezze risultate salienti nella descrizione delle dinamiche colloidali dei vini rossi sono strettamente dipendenti dalla matrice e soprattutto dalla varietà. L'analisi statistica multivariata di tutti i campioni analizzati durante il progetto Vintegro ha evidenziato correlazioni statisticamente significative tra instabilità del campione e complessi antociani-tannini, in particolare con il rapporto tra antociani complessati (misurati con l'uso di un indice spettrofotometrico in Unità di Assorbanza) e tannini totali, in funzione del quale possiamo definire stabile un vino con valore di tale rapporto <1. Inoltre, è risultata interessante anche la valutazione del rapporto tra antociani liberi e tannini.



Tra le tecniche analitiche innovative testate durante il progetto interessanti risultati sono scaturiti anche dalle misure del Potenziale Z, che è una misura delle forze repulsive tra le particelle, non tanto considerando i valori assoluti delle diverse varietà, quanto le sue variazioni in relazione ai trattamenti enologici applicati. A titolo d'esempio si riporta la sua variazione nei campioni di Cabernet sottoposti ad aggiunta di tannino di buccia (B), castagno (C), da soli o in combinazione con due derivati di lievito (A1 e A2). In teoria, aumenti dei valori del potenziale (potenziale che diventa più negativo) indicando maggiore repulsione tra i colloidi in soluzione, e dunque maggiore stabilità.



Il potenziale Z presenta correlazioni statisticamente significative con i complessi antociano-tannino.



## INDICAZIONI OPERATIVE

### Considerazioni generali

Da un punto di vista pratico è quindi fondamentale:

- Osservare, osservare, osservare
- Conoscere a fondo la composizione dell'uva e del vino
- Mettere in relazione l'insorgenza di fenomeni di instabilità con la varietà dell'uva
- Mettere in relazione nelle diverse annate la stabilità del vino con la composizione e le variabili di processo
- Ricerca una maturazione equilibrata della materia prima

Conoscere la materia prima significa giocare d'anticipo rispetto all'evoluzione del vino. Le più recenti acquisizioni sulle variabili in gioco indicano che la varietà, i rapporti fra macromolecole e la reattività delle macromolecole sono fattori importantissimi nel determinare le cinetiche di aggregazione colloidale.

Per quanto riguarda la materia prima in generale, si evidenzia che le pratiche viticole che enfatizzano le componenti fenoliche possono indurre in errori soprattutto oggi che siamo di fronte sempre più spesso ad annate particolari. Recentemente, si sta osservando che l'uso di concimazioni naturali (biodigestato) può contribuire a ritrovare un equilibrio vegeto-produttivo andando a vantaggio sia della qualità che della sostenibilità del prodotto e delle produzioni vitivinicole (Mattii et al., 2021).

Per quanto riguarda le proteine, una delle componenti macromolecolari coinvolte nei fenomeni colloidali, è utile porre attenzione ai trattamenti in vigna con biostimolanti, sostanze che spingono la pianta a migliorare la sua prestazione in termini di difesa ma che al contempo potrebbero indurre la sintesi delle proteine di difesa coinvolte nei fenomeni colloidali.

Recenti acquisizioni hanno mostrato che la solforosa può avere un ruolo nell'aggregazione delle proteine e che i test per valutare la stabilità proteica devono essere eseguiti dopo la solfitazione.

La fermentazione alcolica realizza un cambiamento nella natura del solvente all'interno del quale sono disciolti i costituenti del vino; in generale, la produzione dell'alcol determina da un lato una variazione della solubilità dei costituenti del vino e dall'altro migliora l'estrazione delle parti solide dell'uva nella vinificazione in rosso andando ad arricchire il mezzo di composti macromolecolari, soprattutto tannini e polisaccaridi. Inoltre, durante la fermentazione alcolica iniziano fenomeni di rilascio di mannoproteine che possono giocare un ruolo nella stabilizzazione dei colloidali. La pratica di maturazione sulle fecce di lievito enfatizza il rilascio di tali macromolecole e, se ben gestita, può restituire vini più stabili dal punto di vista colloidale.

### Trattamenti di stabilizzazione: “a ciascuno il suo”

I diversi prodotti di chiarifica e stabilizzazione a disposizione degli enologi sono riassunti nella Tab. 2. I trattamenti di stabilizzazione, compresi quelli fisici (filtrazioni e freddo), sono uno strumento potente per migliorare la stabilità del vino che tuttavia va gestito alla luce del tipo di vino da trattare e tendendo sempre a ridurre le dosi fino ad eliminare i trattamenti stessi laddove non siano necessari. Il progetto Vintegro ha chiaramente indicato che la varietà, che porta con sé profili macromolecolari diversi, è una variabile molto importante nella evoluzione colloidale del prodotto che va tenuta in considerazione quando si pianificano i trattamenti di stabilizzazione. Ad incidere sulla evoluzione colloidale è soprattutto il profilo fenolico diverso per quanto riguarda il tenore e la reattività di questi composti. In effetti, il problema della scelta del trattamento e della dose di prodotto stabilizzante va affrontato caso per caso, in modo puntuale, e non sulla scorta di indicazioni generaliste. Di volta in volta, si procede attraverso la sequenza logica di “diagnosi-trattamento specifico-controllo dei risultati” mirando ad enfatizzare le caratteristiche di stabilità naturale intesa come caratteristica intrinseca di un vino che mostra un'evoluzione spontanea verso questo obiettivo. Sono in effetti molte le motivazioni che possono indurre a trattare il vino eccedendo i trattamenti e le dosi veramente necessarie per raggiungere la stabilità. La disponibilità di test previsionali affidabili, come quello messo a punto nel corso del progetto Vintegro, possono aiutare nella scelta del trattamento migliore e nella produzione di vini che puntano alla stabilità naturale. I blend sono un altro strumento importante che può essere affinato per modulare la stabilità del vino. La temperatura di conservazione e il tempo sono altre due variabili che influenzano molto l'evoluzione colloidale. Se diamo tempo, le lente cinetiche colloidali vanno verso la naturale stabilizzazione del prodotto; se non diamo tempo, è ragionevole pensare di intervenire con trattamenti di stabilizzazione mirati. La temperatura è un acceleratore dei fenomeni chimici e gli shock termici o la sosta prolungata a temperature elevate hanno conseguenze importanti su vini, soprattutto se giovani, che non hanno raggiunto una buona stabilità in cantina. Eliminare selettivamente le componenti fenoliche più reattive con interventi specifici nel processo potrebbe permettere di conseguire una buona stabilità per vini problematici.

**Tabella 2.** Agenti di chiarificazione e stabilizzazione, loro effetti e ambiti di applicazione (tratto da “Prodotti e tecnologie per mosti e vini” Virginie Moine e Nicolas Vivas, Ed Eno-One, 2021).

Prodotto	Effetti	Tipologia di prodotto
Ovalbumina	Chiarifica, stabilizzazione materia colorante	Vini rossi

Caseina e caseinato di potassio	Chiarifica, eliminazione composti fenolici ossidati o ossidabili	Mosti bianchi e rosati, vini bianchi e rosati
Ittiocollo	Chiarifica, brillantezza	Mosti e vini
Gelatina	Chiarifica, stabilizzazione materia colorante	Mosti e vini
Proteine vegetali provenienti da piselli, frumento, patate	Chiarifica, eliminazione composti fenolici ossidati o ossidabili, stabilizzazione materia colorante	Mosti e vini
Alginati	Chiarifica	Vini spumanti
Carbone attivo	Decolorante, decontaminante	Mosti e vini bianchi
Gomma arabica	Stabilizzazione materia colorante	Vini
Estratti proteici di lievito	Chiarifica, eliminazione composti fenolici ossidati o ossidabili, stabilizzazione materia colorante	Mosti e vini
Chitina di <i>Aspergillus niger</i>	Chiarifica	Mosti e vini
Chitosano di <i>Aspergillus niger</i>	Chiarifica	Mosti e vini
Bentoniti	Chiarifica, eliminazione del colorante colloidale, prevenzione casse proteiche e rameiche	Mosti e vini
Biossido di silicio colloidale	Chiarifica, induzione della flocculazione di un coadiuvante di chiarifica proteico	Mosti e vini
Poliasspartato di potassio	Stabilizzazione tartarica	Vini
PVPP	Eliminazione composti fenolici, prevenzione e correzione dell'ossidazione	Mosti e vini
PVP/PVI	Riduzione del tenore di rame, ferro e metalli pesanti	Mosti e vini

## BIBLIOGRAFIA

- Waterhouse AL, Sacks GL, Jeffery DW. Understanding Wine Chemistry. 1st ed. John Wiley & Sons, Ltd, 2016.
- Marassi V et al. Characterization of red wine native colloids by asymmetrical flow field-flow fractionation with online multidetection. Food Hydrocoll 2021; 110: 106204.
- Van Sluyter SC, et al. Wine protein haze: mechanisms of formation and advances in prevention. J Agric Food Chem 2015; 63: 4020–30.

- Wigand P et al. Analysis of protein composition of red wine in comparison with rosé and white wines by electrophoresis and high-pressure liquid chromatography-mass spectrometry (HPLC-MS). *J Agric Food Chem* 2009; 57: 4328–4333.
- Smith MR, et al. Quantitative Colorimetric Assay for Total Protein Applied to the Red Wine Pinot Noir. *J Agric Food Chem* 2011; 59: 6871–6876.
- Mainente F et al. Red wine proteins: Two dimensional (2-D) electrophoresis and mass spectrometry analysis. *Food Chem* 2014; 164: 413–417.
- Kassara, Stella, et al. Quantification of protein by acid hydrolysis reveals higher than expected concentrations in red wines: implications for wine tannin concentration and colloidal stability. *Food Chemistry* (2022): 132658.
- Marangon et al. Macromolecular diversity of Italian red wines. Presented at Macrowine 2018, Zaragoza (Spain).
- Saucier et al., (1997) Characterization of (+)-Catechin-Acetaldehyde Polymers: A Model for Colloidal State of Wine Polyphenols. *J. Agric. Food Chem.* 45, 1045-1049.
- Esteruelas et al., (2009) Comparison of Methods for Estimating Protein Stability in White Wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 60:3.
- Pizzinato et al., (2019) Soluzioni innovative per la stabilizzazione proteica: studi ed esperienze sull'impiego di tecnologie a basso impatto organolettico. *Infowine, Rivista Internet di viticoltura ed Enologia.*
- Sarmiento et al. (2000) Influence of intrinsic factors on conventional wine protein stability Tests. *Food Control* 11, 423-432.
- Mattii et al., (2021) La base per una produzione viticola di qualità è il raggiungimento di un corretto equilibrio vegeto-produttivo. Cosa fare per ottenerlo? *Infowine, Rivista Internet di viticoltura ed Enologia.*