

METODO OTTICO PER LA DETERMINAZIONE RAPIDA DEI TANNINI NEI VINI ROSSI

Arianna Ricci^{1,2}, Giuseppina P. Parpinello^{1,2}, Eleonora Iaccheri^{1,2}, Cristian G. Torres¹, Carolina Alejandra P. Moreno¹, Andrea Versari^{1,2*}, Luigi Ragni^{1,2}

¹Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agroalimentari, Alma Mater Studiorum, Università di Bologna, P.zza Goidanich 60, 47521, Cesena, FC, Italia.

²CIRI-AGRO Centro Interdipartimentale per la Ricerca Industriale, Alma Mater Studiorum, Università di Bologna, Via Q. Bucci, 336, 47521, Cesena, FC, Italia.

*Corrispondenza: andrea.versari@unibo.it

Articolo estratto dalla presentazione di Arianna Ricci in occasione della Enoforum Web Conference (23-25 febbraio 2021)

Introduzione

Il termine “tannini” fa riferimento a composti polifenolici ad elevato peso molecolare e con grado medio di polimerizzazione variabile; tali composti vengono biosintetizzati dalle piante come metaboliti secondari. Le uve rosse sono una importante fonte di tannini condensati (denominati “proantocianidine”) e il loro corretto apporto nei mosti e nei vini viene considerato un indice di qualità, in quanto questa classe di composti esibisce proprietà chimiche in grado di promuovere meccanismi di stabilizzazione dei mosti e dei vini: chiarifica, protezione contro i fenomeni di degrado ossidativo, evoluzione del colore. In aggiunta, i tannini hanno un ruolo chiave nella definizione degli attributi sensoriali dei vini, definendo l’entità e le caratteristiche del fenomeno di astringenza (Versari et al., 2013). I tannini presenti nei mosti e nei vini vengono estratti durante la macerazione delle uve o possono essere aggiunti in forma di estratti liofilizzati ottenuti da diverse fonti botaniche, conformemente all’attuale regolamento OIV (Risoluzioni OIV-OENO 567C-2018; OIV-OENO 613-2019).

La valorizzazione dei tannini (sia endogeni che aggiunti) è un argomento di forte attualità nel mondo enologico, e tale interesse è confermato dal crescente numero di studi scientifici volti ad individuare la correlazione tra reattività chimica e proprietà tecnologiche esibite da questi composti. L’efficacia tecnologica dei tannini nella stabilizzazione e maturazione dei mosti e dei vini rossi è infatti collegata, oltre alla loro peculiare reattività, alla loro concentrazione effettiva rispetto alla frazione polifenolica totale; studi recenti hanno evidenziato come un dosaggio appropriato contribuisca a migliorare le proprietà del vino e la sua stabilità nel tempo e come, viceversa, un contenuto eccessivo possa influenzarne negativamente la stabilità chimico-fisica e le proprietà organolettiche (Vignault et al., 2019; Jeremic et al., 2020).

Allo stato dell’arte, le informazioni qualitative e quantitative sulla presenza di questi composti nei vini possono essere ottenute in seguito a complesse procedure di preparativa dei campioni e tramite l’impiego di metodi analitici piuttosto onerosi in termini di tempi, costi, e personale dedicato; per tale motivo, sebbene il contenuto in tannini debba essere ritenuto un parametro di interesse tecnologico a tutti gli effetti, questo non può essere misurato in tempo reale lungo la filiera ma la sua misura deve essere delegata a laboratori dedicati e ad enti di ricerca.

A fronte di questo, vi è la necessità di colmare la lacuna mettendo a punto sistemi di misura rapidi ed *easy-to-use*, che permettano di monitorare la filiera enologica in modo rapido ed efficace, per guidare l’enologo nelle strategie decisionali.

Il presente studio illustra un metodo analitico innovativo per la quantificazione rapida e accurata dei tannini nei vini, basato sulla reattività selettiva nei confronti delle proteine in condizioni di pH controllato (3,5). La miscela di reazione, composta da vino e da una soluzione di gelatina animale, subisce una variazione delle proprietà ottiche con sviluppo di torbidità lattescente; le caratteristiche

ottiche e la cinetica dell'intorbidimento sono legate al rapporto tannino/proteina nella miscela e possono essere convertite in parametri per la stima quantitativa utilizzando uno strumento prototipo, un fotometro ad impulsi (*Spectral-Sensitive Pulsed Photometer (SSPP)*) già impiegato per la caratterizzazione di matrici alimentari (Ragni et al., 2016).

L'SSPP è dotato di una sorgente elettromagnetica pulsata, con un massimo di emissione fra 800 e 900 nm e contributo spettrale variabile in funzione del grado di accensione, unitamente ad un rivelatore la cui sensibilità massima è attorno a 890 nm; le lunghezze d'onda coinvolte minimizzano le interferenze ottiche dovute al colore dei vini. La torbidità indotta dalla reazione tannini-proteine viene monitorata combinando diverse intensità ed emissioni spettrali della sorgente luminosa (lampada al tungsteno) con la risposta del rivelatore (fotodiodo), sensibile alla lunghezza d'onda.

I primi studi (Ricci et al., 2020) hanno coinvolto soluzioni modello di estratti ad uso enologico ed una selezione di vini rossi commerciali, evidenziando l'esistenza di una correlazione non lineare rispetto ai risultati ottenuti con il metodo di riferimento (Harbertson et al., 2002).

Il metodo ha evidenziato elevata selettività, riproducibilità e accuratezza, a fronte di una procedura rapida e dell'impiego di una strumentazione economica, portatile e facile da impiegare; i primi risultati confermano la possibilità di applicare la tecnologia ai vari prodotti della filiera vitivinicola (succhi, mosti e vini), attraverso l'implementazione del metodo dalla scala di laboratorio alla cantina e l'ottimizzazione della tecnologia (*Technology Readiness Levels (TRL)*) dello strumento.

Vengono di seguito presentati alcuni risultati di questi studi preliminari, rimandando alla letteratura di riferimento per ulteriori approfondimenti (Ragni et al., 2016; Ricci et al., 2020).

Materiali e Metodi

Il dispositivo di misura prototipo utilizzato in questo esperimento (**Figura 1**) è schematicamente composto da: (a) una sorgente ottica (lampada al tungsteno) che opera in un range di lunghezze d'onda definito e continuo, con un massimo di emissione fra 800 e 900 nm; (b) una camera di reazione (cuvetta in vetro, passo ottico 1 cm); (c) un rivelatore (fotodiodo), diversamente sensibile alle lunghezze d'onda, con picco di sensibilità a circa 890 nm; (d) un'interfaccia software per misurare ed elaborare il segnale ottico (Ragni et al., 2016).

I vini rossi utilizzati per la messa a punto e validazione del metodo sono vini rossi commerciali appartenenti a diverse varietà e con diversa origine geografica, che presentano concentrazioni di tannini nel range 10 - 2700 mg/L misurati utilizzando il metodo descritto in Harbertson et al. (2002). I campioni sono stati preparati come segue per le misure ottiche SSPP: una soluzione satura di gelatina è stata preparata dissolvendo la polvere liofilizzata in un tampone pH 3,5 contenente 12% etanolo; successivamente, una aliquota di ogni vino è stata mescolata direttamente con la soluzione di gelatina (1:1 v/v) all'interno della camera di reazione, e sottoposta istantaneamente alla misura ottica. Ogni determinazione è stata mediata su 5 misure successive, ed è stata misurata la risposta ottica dei diversi vini (diluiti in tampone) per confermare l'assenza di interferenze dovuta a proprietà ottiche intrinseche dei vini (colore ed eventuale torbidità). Il metodo ha mostrato prestazioni soddisfacenti in termini di ripetibilità *inter-* ed *intra-day*.

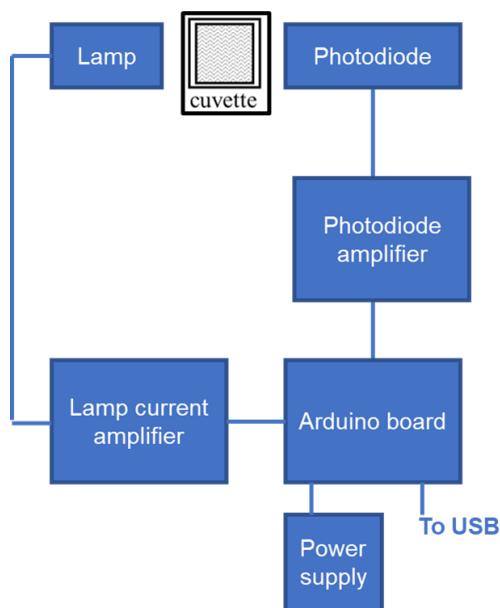


Figura 1. Rappresentazione schematica del dispositivo ottico descritto in Ragni et al., 2016. Immagine adattata da Ricci et al., 2020.

Risultati

Lo studio dei meccanismi di interazione tra tannini e matrici proteiche, argomento già ampiamente affrontato in letteratura, ha fornito la base per lo sviluppo del metodo e per la definizione delle condizioni ottimali di misura.

È stato precedentemente osservato che l'efficienza di formazione dei complessi tannino-proteina è fortemente influenzata dalla struttura della proteina e da diversi fattori chimico-fisici (Hagerman, 2012; Canon et al., 2011). Il materiale proteico utilizzato in questo esperimento, gelatina animale, viene ottenuta industrialmente dall'elaborazione di tessuti animali, ed è composta prevalentemente da una miscela di proline ed idrossiproline; queste proteine esibiscono una elevata reattività nei confronti dei tannini in determinate condizioni di pH e polarità del mezzo di reazione.

In particolare, le misure effettuate confermano i risultati riportati da Calderon et al. (1986), che evidenziano la massima capacità di complessazione delle proteine tipo prolina ad opera delle proantocianidine in soluzione tampone a pH 3,5 e contenuto in etanolo pari al 12%; l'efficacia di complessazione si va progressivamente riducendo aumentando i valori di pH del mezzo fino a 7.

Anche il rapporto di concentrazione tannino: gelatina influenza l'entità, la cinetica e le caratteristiche ottiche dei fenomeni di intorbidimento, come precedentemente osservato da Le Bourvellec e Renard (2012). Più in dettaglio, un basso rapporto tannino/proteina (osservato nei vini a più basso contenuto in tannino) incoraggia la formazione di piccoli complessi che si aggregano tra loro attraverso fenomeni di *interlinking*, con una formazione lenta e progressiva di clusters fino al raggiungimento di una dimensione critica che induce la precipitazione; viceversa, nel caso di rapporti tannino/proteina elevati, la proteina interagisce rapidamente con il tannino, attraverso un meccanismo di adsorbimento di superficie, con formazione di grandi aggregati a partire da singoli centri di nucleazione e cinetica di precipitazione più rapida.

In questo esperimento la concentrazione di gelatina ed il rapporto dei volumi tra i due reagenti (vino e soluzione di gelatina) sono stati mantenuti costanti, per apprezzare le diverse cinetiche di sviluppo della torbidità legate alle diverse concentrazioni di tannino presenti nei vini.

Le curve Voltaggio vs Tempo ottenute dal fotometro sono state elaborate per identificare gli specifici intervalli che mostrano la maggiore correlazione con il contenuto di tannini dei vini. I migliori modelli previsionali sono stati ottenuti utilizzando funzioni di correlazione non lineare (**Figura 2**).

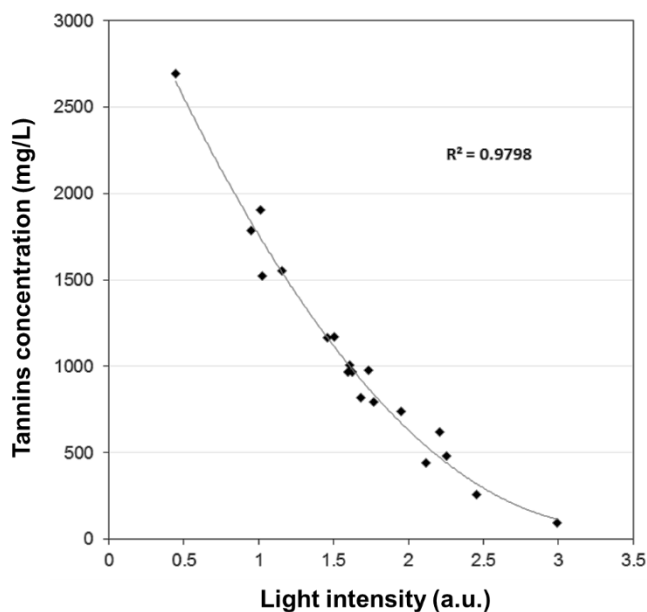


Figura 2. Funzione di correlazione non-lineare tra il contenuto in tannini dei vini rossi e l'intensità di picco della sorgente in seguito allo sviluppo di torbidità in soluzione.

Conclusioni

In questo lavoro viene descritto un metodo innovativo per la misura diretta dei tannini nei vini rossi, progettato per supportare il controllo qualità nella filiera vinicola. L'idea originale e le prospettive di sviluppo futuro sono finalizzate ad ottimizzare un approccio analitico rapido ed economico che possa sostenere il lavoro dell'enologo, dando la possibilità di monitorare un parametro tecnologico chiave della filiera (contenuto in tannini) in tempo reale durante il processo produttivo.

Il metodo analitico è stato brevettato a livello nazionale (Ricci et al., 2021) ed è in fase di valutazione per la tutela internazionale (Ricci et al., 2020b); le attività di ricerca volte all'avanzamento ed implementazione della tecnologia sono attualmente supportate da programmi di sviluppo di tipo Proof Of Concept, finanziati dall'Università di Bologna e dal Ministero per lo Sviluppo Economico (MISE).

Abstract

Il presente studio propone un metodo ottico rapido e riproducibile per la quantificazione dei tannini nei vini rossi. I campioni di vino vengono mescolati direttamente con una soluzione di gelatina animale dissolta in un tampone a pH 3,5, che induce una reazione selettiva dei tannini con le proteine; la variazione qualitativa e quantitativa delle proprietà ottiche della miscela in seguito alla reazione tannino-proteina viene misurata utilizzando un innovativo dispositivo attualmente disponibile come prototipo (Technology Readiness Level TRL: 6, tecnologia dimostrata in ambiente industrialmente rilevante). Il segnale strumentale generato in seguito ad intorbidimento della miscela di reazione è stato elaborato in funzione dell'intensità, ampiezza e curvatura del picco di potenziale (V), ottenendo una correlazione non lineare rispetto ai risultati del metodo di riferimento (saggio colorimetrico di Adams-Harbertson).

Gli esperimenti effettuati su una selezione di vini rossi commerciali hanno mostrato una elevata capacità predittiva rispetto al contenuto in tannini (proantocianidine) dei vini. I risultati hanno confermato che il metodo è idoneo alla misura diretta dei tannini, superando i laboriosi protocolli di laboratorio ad oggi disponibili per la determinazione di questa classe di composti nei vini rossi; ulteriori vantaggi consistono nel costo limitato e nella portabilità della strumentazione ottica.

Sulla base di queste considerazioni, il metodo viene proposto come strumento efficace per il controllo di qualità all'interno della filiera enologica, supportando le strategie decisionali dell'enologo volte alla produzione di vini di qualità.

Parole chiave: Reazione tannino-proteina, torbidità, fotometro a luce pulsata, quantificazione dei tannini, qualità dei vini rossi.

Bibliografia

Calderon, P., Van Buren, J. and Robinson, W.B., 1968. Factors influencing the formation of precipitates and hazes by gelatin and condensed and hydrolyzable tannins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 16(3), pp.479-482.

Hagerman, A.E., 2012. Fifty years of polyphenol-protein complexes. *Recent advances in polyphenol research*, 3, pp.71-97.; Canon, F., Ballivian, R., Chirot, F., Antoine, R., Sarni-Manchado, P., Lemoine, J. and Dugourd, P., 2011. Folding of a salivary intrinsically disordered protein upon binding to tannins. *Journal of the American Chemical Society*, 133(20), pp.7847-7852.

Harbertson, J. F., Kennedy, J. A., & Adams, D. O., 2002. Tannin in skins and seeds of Cabernet Sauvignon, Syrah, and Pinot noir berries during ripening. *American Journal of Enology and Viticulture*, 53(1), 54-59.

Jeremic, J., Vongluanggam, I., Ricci, A., Parpinello, G.P. and Versari, A., 2020. The oxygen consumption kinetics of commercial oenological tannins in model wine solution and Chianti red wine. *Molecules*, 25(5), p.1215.

Le Bourvellec, C. and Renard, C.M.G.C., 2012. Interactions between polyphenols and macromolecules: quantification methods and mechanisms. *Critical reviews in food science and nutrition*, 52(3), pp.213-248.

Ragni, L., Iaccheri, E., Cevoli, C. and Berardinelli, A., 2016. Spectral-sensitive Pulsed Photometry to predict the fat content of commercialized milk. *Journal of Food Engineering*, 171, pp.95-101

Ricci, A., Iaccheri, E., Benelli, A., Parpinello, G.P., Versari, A. and Ragni, L., 2020. Rapid optical method for procyanidins estimation in red wines. *Food Control*, 118, p.107439.

Ricci A., Ragni L., Iaccheri E., Parpinello G.P., Versari A., 2020b. PCT/IB2020/051304: "Device for measuring tannins in a liquid". Alma Mater Studiorum–Università di Bologna. Deposited Mar/2020.

Ricci A., Ragni L., Iaccheri E., Parpinello G.P., Versari A. 2021. Patent nr. 102019000002585: "Dispositivo per la misura di tannini in un liquido". Alma Mater Studiorum–Università di Bologna. Granted Jan/2021.

Versari, A., Du Toit, W. and Parpinello, G.P., 2013. Oenological tannins: A review. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 19(1), pp.1-10.

Vignault, A., Pascual, O., Gombau, J., Jourdes, M., Moine, V., Fermaud, M., Roudet, J., Canals, J.M., Teissedre, P.L. and Zamora, F., 2019. New insight about the functionality of oenological tannins; Main results of the working group on oenological tannins. In *BIO Web of Conferences* (Vol. 12, p. 02005). EDP Sciences.