

## RICERCA DELLE CONDIZIONI DI STABILITÀ COLLOIDALE DEI VINI: IL RUOLO DELLE INTERAZIONI TRA TANNINI E POLISACCARIDI

<sup>1</sup>Paola FERRARETTO, <sup>1</sup>Valentina CACCIOLA, <sup>2</sup>Susan E. EBELER, <sup>1</sup>Emilio CELOTTI

<sup>1</sup>Dipartimento di Scienze degli Alimenti – Università degli Studi di Udine, Via Sondrio 2/a - 33100- Udine, Italy [emilio.celotti@uniud.it](mailto:emilio.celotti@uniud.it)

<sup>2</sup>Department of Viticulture and Enology – University of California – Davis, CA, USA

*Lavoro presentato alla 8a edizione di Enoforum, Arezzo, 7-9 maggio 2013*

Le interazioni tra tannini e polisaccaridi producono effetti positivi sulle caratteristiche chimiche e sensoriali dei vini, in particolare nei vini rossi. Tuttavia, le caratteristiche colloidali di macromolecole complesse come tannini e polisaccaridi possono causare stabilità o instabilità, a seconda delle condizioni del mezzo. Al fine di effettuare una stima approfondita di questi effetti colloidali, spesso difficili da prevedere, sono state valutate alcune caratteristiche relative ai tannini e polisaccaridi con tecniche analitiche convenzionali e non.

E' stata inoltre considerata l'influenza dei tannini sulla volatilità di alcuni composti aromatici caratteristici dei vini che, nella maggior parte dei casi, ha causato una riduzione della volatilità, a conferma di quanto riportato in bibliografia.

Le valutazioni delle macromolecole endogene ed esogene presenti in forma colloidale possono essere utilizzate per effettuare un utilizzo razionale dei coadiuvanti esogeni e per gestire le varie tecniche di stabilizzazione chimico-fisica e microbiologica dei vini in maniera più appropriata.

### **Introduzione**

#### *Interazione tannini-polisaccaridi*

L'utilizzo di coadiuvanti enologici è senza dubbio uno dei punti critici nella filiera di produzione del vino e risulta spesso un intervento necessario per assicurare la stabilità fisica, chimica e microbiologica dei vini. Tuttavia un loro scorretto impiego, carenze compositive e funzionali o situazioni di non conformità a particolari esigenze possono compromettere la qualità dei vini.

Le cause possono essere ricercate nella mancanza di efficacia del coadiuvante di fronte a specifiche performance qualitative, all'eccessivo o carente dosaggio impiegato in vinificazione, alla non corretta procedura di utilizzo.

Il vino, come è noto, è un sistema colloidale complesso, dove i colloidi possono essere rappresentati da proteine, polisaccaridi e complessi proteine-polifenoli e polisaccaridi-polifenoli. Lo stato colloidale del vino è, dunque, caratterizzato da particelle solide più grandi di quelle presenti in soluzione, diverse per composizione ed origine, mantenuto in dispersione liquida da un insieme di forze che impediscono l'aggregazione e la flocculazione, promuovendo, in tal modo, la stabilità colloidale (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2007; Feuillat, 1994; Langourieux e Crouzette, 1993). Due sono, in particolare, i fattori che determinano la stabilità di queste particelle: la repulsione elettrostatica, derivante dalla loro carica superficiale, e lo strato di solvatazione. Se queste condizioni cambiano o vengono meno, la stabilità colloidale è compromessa, con conseguente aggregazione di particelle, responsabili dei fenomeni di torbidità e della formazione di depositi.

I tannini sono sostanze in grado di originare combinazioni stabili con proteine e altri polimeri vegetali, quali ad esempio i polisaccaridi (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2007).

I tannini interagiscono con le proteine e questo tipo di interazioni è stato ampiamente studiato (Siebert *et al.*, 1996; Charlton *et al.*, 2002; Poncet-Legrand *et al.*, 2007), in funzione del loro importante ruolo nella formazione della torbidità, nella percezione dell'astringenza (De Freitas *et al.*, 2003). L'interazione tra flavanoli e proteine dipende dalle interazioni di Van der Waals, dalle

interazioni idrofobiche e dai ponti ad idrogeno (Oh *et al.*, 1980; Luck *et al.*, 1994; Murray *et al.*, 1994; Charlton *et al.*, 1996).

I polisaccaridi rappresentano uno dei principali gruppi di macromolecole presenti nel vino. Tra di essi, alcuni provengono dall'uva, come le sostanze pectiche ed i polisaccaridi neutri, altri sono invece di origine fungina, come ad esempio i glucani. Esiste infine un gruppo importante di polisaccaridi, prodotti o liberati dai lieviti durante la fermentazione alcolica (Llaubères, 1988) o per l'autolisi del lievito (Feuillat *et al.*, 1989), con importanti effetti sulla stabilità del vino.

La maggior parte dei polisaccaridi presenti nel vino, comprese le mannoproteine originate dai lieviti e dai costituenti della parete cellulare della pianta, hanno mostrato la capacità di interagire con i flavanoli (Riou *et al.*, 2002). La gomma arabica inoltre può essere aggiunta come colloide protettore per limitare o prevenire l'aggregazione, la flocculazione e la precipitazione di tannini e dei complessi tanno-proteici (Pellerin e Cabains, 1998). Tuttavia, a dosi elevate, può condurre a instabilità (Saucier *et al.*, 1996; Siebert *et al.*, 1996; Celotti *et al.*, 2003; Riou *et al.*, 2002).

Alcuni ricercatori francesi hanno sviluppato un modello teorico che sarebbe in grado di spiegare le interazioni tra polisaccaridi e tannini, che sembrano comportare un aumento della morbidezza dei vini (Saucier *et al.*, 1996).

Altri studi (Saucier, 2000) hanno messo in risalto la capacità, da parte di certe molecole polisaccaridiche complesse originate dai lieviti, di stabilizzare la materia colorante nei vini rossi.

Un altro aspetto interessante è dato dall'assorbimento, da parte di alcune classi di polisaccaridi, dei tioli volatili indesiderati. È stato dimostrato che alcune molecole, tra cui metantiolo ed etantiolo, vengono inattivate grazie alla formazione di ponti disolfuro tra mannoproteine e gruppi tiolici (Lavigne e Dubourdieu, 1996).

L'effetto inibitore dei polisaccaridi nei confronti dell'aggregazione tannino-proteina è stata proposta come risultato della capacità del polimero di formare un complesso ternario proteina-polifenolo-carboidrato, aumentando la relativa solubilità in mezzo acquoso, oppure da associazioni molecolari in soluzione tra carboidrati e polifenoli in competizione tra loro per aggregarsi alla proteina (Mateus *et al.*, 2004).

Visto lo stato attuale delle conoscenze è stato impostato un piano di lavoro che prevede l'utilizzo di analisi convenzionali e non per approfondire lo studio delle interazioni tra tannini e polisaccaridi e valutare il limite tra stabilità e instabilità colloidale allo scopo di ridurre il rischio di impreviste precipitazioni colloidali nel tempo.

#### Interazione macromolecole-aromi

Le interazioni che avvengono su scala molecolare, tra i composti volatili e gli altri componenti delle matrici alimentari, sono legati al modello generale riportato da Lubbers (1993). Le interazioni che si possono stabilire tra le molecole sono di due tipi: legami di valenza (legami ionici e covalenti) ed interazioni fisiche e chimiche (forze di Van der Waals, legami idrogeno, interazioni idrofobiche). In base a quanto definito da Lubbers (1993), i legami che si stabiliscono tra i composti aromatici e le altre molecole sono deboli e reversibili, ma rappresentano un fattore importante per l'aroma percepito.

Le caratteristiche sensoriali di un prodotto dipendono dalle interazioni tra i costituenti non volatili e le sostanze aromatiche; un cambiamento delle condizioni del mezzo, può pesantemente modificarne le caratteristiche, variando la volatilità degli aromi (King e Solms, 1982; Dufour e Bayonove, 1999b; Saenz-Navajas et al., 2010).

Le antocianine possono formare legami idrogeno con alcuni composti aromatici quando presenti in concentrazioni elevate (Voilley et al., 1991). Inoltre alcuni composti fenolici estratti da botti di legno (tannini ellagici) possono partecipare a reazioni di polimerizzazione con i composti aromatici (Escalona et al., 2002). Pertanto i polifenoli possono avere effetti diversi a seconda del tipo di composto aromatico con cui interagiscono (Hartmann et al., 2002; Aronson e Ebeler, 2004).

Gli studi sulle interazioni aroma-polisaccaridi hanno dimostrato che queste sono dovute a legami relativamente deboli e che dipendono da fattori quali la natura e la concentrazione delle molecole coinvolte (Solms, 1986; Reineccius et al., 1997; Voilley, 1991).

Diversi polisaccaridi isolati dal vino (arabinogalattani, ramnogalatturonani II monomeri e dimeri e mannoproteine) hanno dato effetti diversi sui coefficienti di attività di alcuni composti volatili (isoamile acetato, etil esanoato, 1-esanolo, diacetile), a seconda del tipo di polisaccaride e della natura del composto aromatico (Dufour e Bayonove, 1999b).

Le mannoproteine, rappresentanti circa il 35% del totale dei polisaccaridi del vino, esse possono interagire con i composti aromatici e le loro interazioni sono, anche in questo caso, soprattutto di tipo idrofobo e dipendono dal tipo di composto aromatico e dalla natura del substrato (Lubbers et al., 1993; Chalier et al., 2007).

Oltre a questi studi sul ruolo delle mannoproteine, rilasciate dai lieviti durante l'autolisi, sull'aroma del vino, pochi sono i lavori sulle interazioni di altre proteine con composti aromatici; Druaux et al. (1995) valutarono tali interazioni in soluzioni simil-vino usando come proteina la albumina siero bovina (BSA).

Nello stato colloidale del vino si ritrovano tutte queste macromolecole, conseguentemente, cambiamenti di tale stato possono causare interazioni tra le sostanze colloidali andando ad influenzare la componente aromatica del vino aumentando o diminuendo la volatilità e la percezione di alcuni composti aromatici. Infatti, oltre alle interazioni dirette con le macromolecole, i composti volatili possono essere intrappolati negli aggregati che si originano, ad esempio, dalle interazioni tra i polifenoli e le proteine senza apportare ulteriori contributi alla frazione aromatica dei vini.

È importante, quindi, capire come le interazioni con i principali componenti dei vini possano influenzare la loro percezione. Gli studi condotti finora si sono concentrati sulle interazioni delle singole classi di macromolecole con sostanze aromatiche in soluzioni di vino modello.

Nella seconda parte del lavoro è stata valutata l'influenza di macromolecole quali polifenoli (tannini) e proteine (BSA), aggiunte separatamente o insieme tra loro in soluzioni di vino modello, sulla volatilità di alcuni composti volatili tipici del vino.

### **Materiali e Metodi**

Il piano sperimentale ha previsto lo studio e la valutazione dell'interazione tra tannini e polisaccaridi in soluzioni simil-vino ed in vino bianco e rosso.

Per la prova su simil-vino, ad una soluzione idroalcolica contenente acido tartarico (5 g/L) ed alcol al 12% e tamponata a pH 3,5 con NaOH è stato aggiunto un tannino idrolizzabile (quercia) in tre concentrazioni (1-2-4 g/L) e quattro diversi polisaccaridi anch'essi in tre diverse concentrazioni. In particolare sono stati addizionati Carbossimetilcellulosa in concentrazione di 50-100-300 mg/L; Polisaccaride d'uva in concentrazione di 100-200-300 mg/L; Gomma arabica in concentrazione di 300-500-1000 mg/L e Mannoproteina in concentrazione di 100-200-500 mg/L: tutti prodotti commerciali e alcuni sperimentali. Le prove sono state svolte in triplo in modo da poter valutare statisticamente le differenze tra i dati ottenuti. E' stata applicata l'analisi della varianza (ANOVA) utilizzando il pacchetto STATISTICA per Windows, versione 7,0.

E' stata condotta quindi una prova su un vino bianco che presentava i seguenti parametri chimico-analitici: pH 3,3, acidità totale 5 g/L ac. tartarico, 50 ppm di SO<sub>2</sub> totale e 12% v/v di alcol.

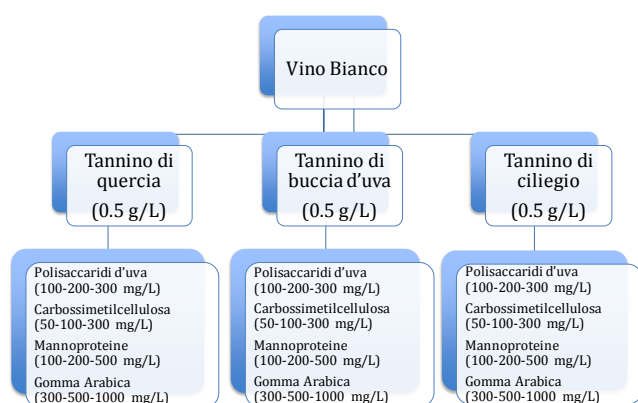


Figura 1: Piano sperimentale su vino bianco

In questo caso sono stati aggiunti tre diversi tannini (quercia, buccia d'uva e ciliegio) in concentrazione di 0,5 g/L e i quattro diversi polisaccaridi nelle stesse concentrazioni della prova su simil-vino (Fig.1)

Infine è stata condotta una prova su un vino rosso al quale sono stati addizionati i quattro diversi polisaccaridi nelle stesse concentrazioni di cui sopra senza aggiunte di tannino in quanto la matrice già mostrava un elevato tenore di tali composti.

Il vino presentava i seguenti parametri chimico-analitici: acidità totale 5 g/L ac. tartarico, pH 3,5, 12% v/v, polifenoli totali (Abs 280nm) 45, tannini totali 3,5 g/L e antociani liberi 350 mg/L.

Le soluzioni così ottenute sono state monitorate per un periodo di 45 giorni (in particolare ai tempi t<sub>0</sub>, t<sub>7</sub>, t<sub>15</sub>, t<sub>30</sub> e t<sub>45</sub>) valutando la misura del diametro idrocolloidale mediante Dinamic Light Scattering, DLS (Nicomp™ 380 Zeta Potential/Particle Sizer – PSS, Santa Barbara, California, USA), la quantità di carica elettrica superficiale mediante misura del potenziale di streaming (Mütek PCD-02, Germany), la torbidità (su campione dopo agitazione) ed i polifenoli totali (Abs 280 nm) per la prove su simil-vino; test di ossidabilità - POM-test (Muller-Späth H.,1992), torbidità, carica elettrica superficiale e misura del diametro delle particelle per le prove sul vino bianco e torbidità, carica elettrica superficiale, diametro delle particelle, antociani (Riberau-Gayon e Stonestreet, 1965), indice dei pigmenti polimerizzati (Glories, 1978), intensità colorante e catechine (Zironi *et al.*, 1992) per le prove sul vino rosso.

Le modificazioni dello stato colloidale possono ripercuotersi sulla componente aromatica dei vini, pertanto sono state condotte delle prove con l'obiettivo di osservare l'influenza di macromolecole

quali polifenoli (tannini) e proteine (BSA) aggiunti separatamente o in miscela ad una soluzione simil-vino sulla volatilità di alcuni composti tipici della matrice vino.

Ai fini sperimentali sono stati presi in considerazione nove composti volatili rappresentativi di diverse categorie di aromi presenti nel vino ed in particolare linalolo,  $\beta$ -ionone, benzaldeide, etilacetato, feniletilacetato, etilottanoato, 1-ottanolo, 3-ottanolo, 3-ottanone.

Il piano sperimentale ha previsto la preparazione di una soluzione simil-vino contenente acido tartarico (5 g/L), alcol al 14% e tamponata a pH 3,5 con NaOH, addizionata con i composti aromatici in due diverse concentrazioni (1ppm e 0,1 ppm), tannino (2,5 g/L) e Albumina Siero Bovina (100mg/L) come riportato in tabella 1:

Soluzione simil-vino + aroma (1 – 0,1 ppm)
Soluzione simil-vino + tannino + aroma (1 – 0,1 ppm)
Soluzione simil-vino + BSA + aroma (1 – 0,1 ppm)
Soluzione simil-vino + tannino + BSA + aroma (1 – 0,1 ppm)

Tabella 1: Piano sperimentale sulle interazioni con aromi

I campioni così preparati, replicati 3 volte, sono stati analizzati attraverso Microestrazione in Fase Solida in spazio di testa (HS-SPME) dopo equilibratura per 12 ore a temperatura ambiente. Lo spazio di testa è stato campionato per 1 minuto a temperatura ambiente, quindi la fibra è stata desorbita a 240°C per 10minuti; (Fibra 50  $\mu$ m DVB/CAR/PDMS-SUPELCO).

Tutte le prove sono state condotte con un autocampionatore Gerstel MPS2 (Linthicum, Maryland, USA) accoppiato al gas cromatografo Agilent 6890N accoppiato a spettrometro di massa Agilent 5975 (Santa Clara, California, USA). Forno GC equipaggiato con colonna capillare DB-WAX (30m x 0.25 mm d.i. e spessore del film 0,25  $\mu$ m (Santa Clara, CA, USA).

I risultati ottenuti sono stati valutati mediante analisi della varianza.

## Risultati e discussioni

### Simil-vino

Nelle prove su simil-vino, relativamente alla carica elettrica l'aggiunta dei polisaccaridi ha evidenziato un aumento della carica elettrica negativa, rispetto al controllo, per tutte le soluzioni, evidente in particolare per i campioni aggiunti di gomma arabica e carbossimetilcellulosa (confermato anche dall'analisi della varianza- Fig.2).

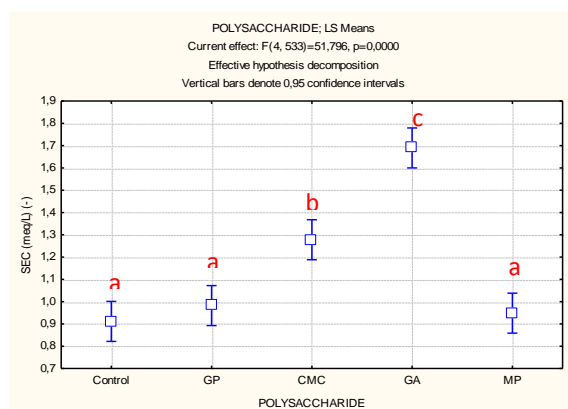


Figura 2: ANOVA della carica elettrica superficiale correlata alla concentrazione dei polisaccaridi aggiunti. Lettere diverse identificano campioni che differiscono significativamente per  $p < 0.05$

Risulta interessante notare come dopo l'iniziale aumento dovuto all'aggiunta dei polisaccaridi (Figura 3), i valori della carica elettrica si mantengano pressoché costanti nel tempo: le interazioni che portano alla formazione di aggregati che poi precipitano non dipendono, pertanto, solo dalla carica elettrica delle particelle dei campioni (Celotti *et al.*, 2003; Riou *et al.*, 2002).

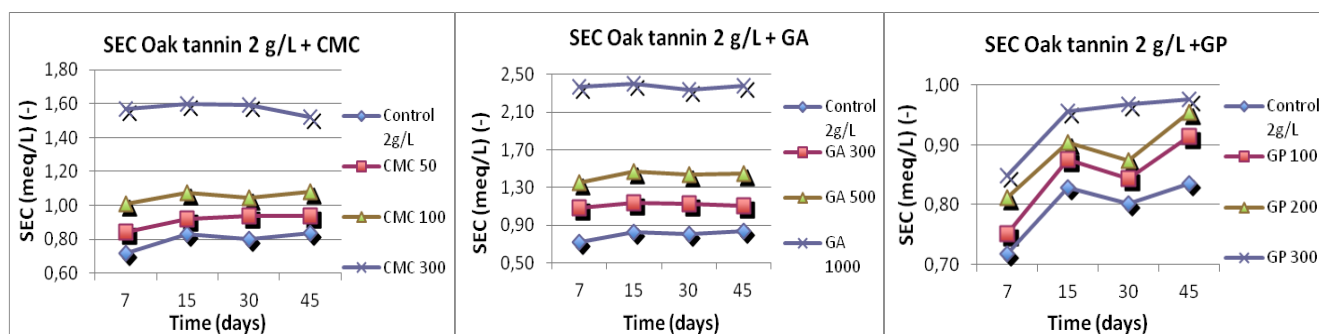


Figura 3: Esempi dell'andamento della carica elettrica superficiale misurata nel tempo in campioni di similvino aggiunti di tannino di quercia (2 g/L) e i diversi polisaccaridi nelle tre diverse concentrazioni.

L'analisi della varianza (Figura 4) ha evidenziato differenze significative tra i campioni con diverse concentrazioni di tannino aggiunto: cedendo il tannino stesso cariche elettriche negative alla soluzione, all'aumentare della concentrazione di tannino aumenta la carica elettrica negativa. La stessa considerazione vale per la concentrazione dei polisaccaridi aggiunti: una concentrazione più alta, porta ad una maggiore carica elettrica negativa al sistema.

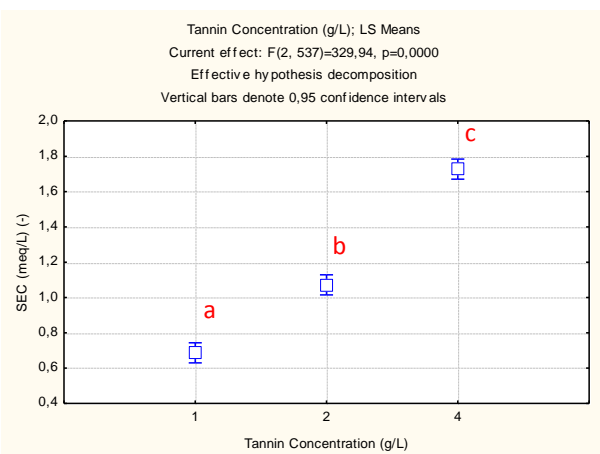


Figura 4: ANOVA della carica elettrica superficiale correlata alla concentrazione di tannino aggiunto. Lettere diverse identificano campioni che differiscono significativamente per  $p < 0.05$

L'analisi di varianza tra le tre concentrazioni di tannino e i polisaccaridi aggiunti ha mostrato che valori di carica elettrica superficiale sono influenzati da entrambi i parametri, indicando un effetto sinergico dei due.

La stessa analisi condotta per valutare l'effetto del tempo (7 e 45 giorni) e dei diversi polisaccaridi su questo parametro, non ha evidenziato differenze significative tra i campioni. Solo i campioni aggiunti di gomma arabica hanno dato valori statisticamente diversi, differenza che però non è cambiata nel corso del tempo, restando i valori costanti.

L'ANOVA fattoriale tra le variabili concentrazione del tannino e tempo (7 e 45 giorni) ha indicato valori di carica elettrica superficiale statisticamente differenti a seconda solo dalla concentrazione del tannino.

Per quanto riguarda i polifenoli totali, valutati come assorbanza a 280 nm, dopo un aumento iniziale rispetto al controllo dovuto all'aggiunta del tannino e dei polisaccaridi, i valori restano poi costanti nel tempo. Questo sembra confermare il ruolo stabilizzante dei polisaccaridi nei confronti dei polifenoli.

I vari polisaccaridi sembrano aver influenzato questo parametro in modi diversi, in particolare l'aggiunta di carbossimetilcellulosa ha portato valori molto prossimi a quelli del controllo. Le diverse concentrazioni di polisaccaridi non hanno portato differenze tra i campioni.

Le misure di torbidità (Figura 5), dopo agitazione dei campioni, hanno dato valori più alti nel tempo rispetto al controllo per tutti i campioni con differenze significative a ogni intervallo di misura (7-15-30-45 giorni). I valori aumentano all'aumentare della concentrazione del tannino di quercia.

In questo caso i campioni che hanno mostrato i più alti valori di torbidità (Fig.6) sono stati quelli aggiunti di mannoproteine e polisaccaridi d'uva ed in particolare quelli con le concentrazioni più elevate di tali polisaccaridi.

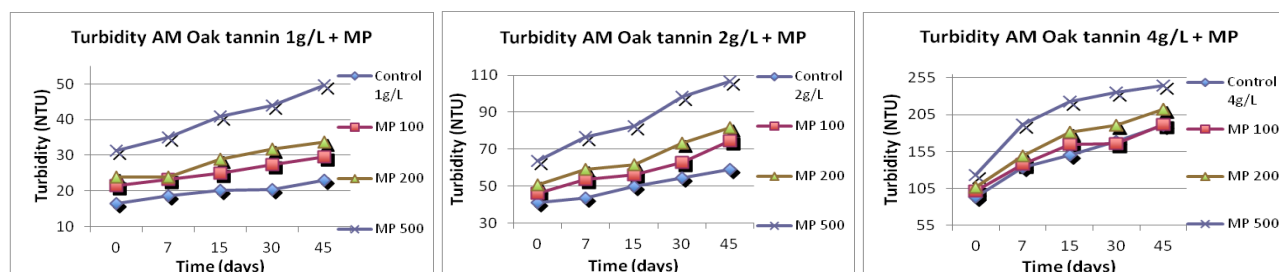


Figura 5: Esempio dell'andamento della torbidità misurata nel tempo in campioni simil-vino aggiunti di tannino di quercia (1-2-4 g/L) e mannoproteine nelle tre diverse concentrazioni.

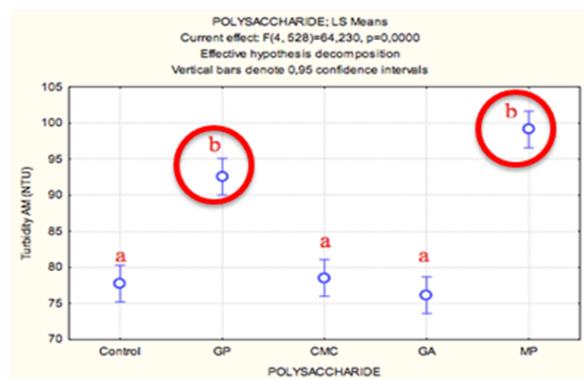


Figura 6: ANOVA della torbidità correlata ai polissaccaridi aggiunti. Lettere diverse identificano campioni che differiscono significativamente per  $p < 0.05$

Si presume che la precipitazione sia dovuta ai soli polisaccaridi dal momento che i polifenoli totali non variano nel tempo.

L'aggiunta di carbossimetilcellulosa non ha influenzato il parametro torbidità, questo potrebbe suggerire il suo utilizzo ad esempio per la stabilità tartarica, senza che vi sia interazione negativa con le altre macromolecole, evitando pertanto l'instabilità del sistema colloidale.

Per quanto riguarda i valori delle dimensioni delle particelle relative alle repliche dei campioni preparati in soluzione con l'aggiunta del tannino di quercia a tre diverse concentrazioni, al fine di rendere i dati comparabili è stato necessario riportare nella tabella 2 solo una delle misure effettuate a 7 e a 45 giorni.

	Particle Size at 7 days (nm)						Particle Size at 45 days (nm)					
	Peak 1		Peak 2		Peak 3		Peak 1		Peak 2		Peak 3	
	Diameter	%	Diameter	%	Diameter	%	Diameter	%	Diameter	%	Diameter	%
Control OT 1	62	24	1118	76,4			178	22	2019	78		
GP 100	67	8,9	745	91,1			245	23,1	1047	76,9		
GP 200	43	14	959	85,9			185	20,5	1263	79,5		
GP 300	154	100					119	15,9	1188	84,1		
CMC 50	67	22	1077	77,7			72	15,5	2340	84,5		
CMC 100	240	24	1409	75,8			146	10,5	461	22,4	3028	67
CMC 300	136	15	1460	84,6			278	27	1599	73		
GA 300	141	20	1199	80,5			136	21,4	1165	78,6		
GA 500	96	25	639	75,4			120	16,5	849	83,5		
GA 1000	96	19	1028	80,8			60	9,4	554	90,6		
MP 100	111	17	977	83,5			327	15,3	778	84,7		
MP 200	132	17	830	83,4			84	22	814	78		
MP 500	178	34	1317	66,3			206	33,5	1324	66,5		
Control OT 2	238	21	1561	79,3			181	18,5	1244	81,5		
GP 100	96	17	1271	82,6			309	25,3	2078	74,7		
GP 200	237	20	1603	79,9			57	8,8	866	91,2		
GP 300	78	2,2	497	36,8	2003	61	26	1,1	785	98,9		
CMC 50	227	24	1611	75,9			35	3,7	588	58,2	8845	30
CMC 100	135	15	1301	84,8			33	7,3	693	55,7	4484	31
CMC 300	277	22	1562	78,5			179	15,1	1534	84,9		
GA 300	195	14	1316	85,9			375	28,4	2008	71,6		
GA 500	47	3	371	31,2	1998	66	72	6,5	760	93,5		
GA 1000	283	29	1761	71			72	9,3	856	90,7		
MP 100	127	10	984	89,8			85	3,6	765	76	4664	20
MP 200	12	20	617	55	2572	25	90	10,5	863	89,5		
MP 500	156	12	804	87,8			76	6,8	586	93,2		
Control OT 4	66	7,6	631	92,4			442	100				
GP 100	216	20	1173	79,7			505	64,4	3217	17	5470	19
GP 200	895	21	1163	79,3			404	37,6	1288	62,4		
GP 300	506	100					274	16,8	1275	83,2		
CMC 50	67	22	1077	77,7			637	100				
CMC 100	135	7,6	681	92,4			189	12,1	833	87,9		
CMC 300	206	6,2	705	93,8			580	100				
GA 300	122	6,5	607	93,5			266	21,7	996	78,3		
GA 500	201	16	1113	84			220	13,6	973	86,4		
GA 1000	175	13	1001	87,2			142	8,9	903	91,1		
MP 100	205	17	972	82,7			186	15,8	1301	84,2		
MP 200	293	28	1128	72,2			499	100				
MP 500	332	35	1116	64,9			574	74,9	1865	14,2	4243	11

Tabella 2: Dimensioni delle particelle presenti nelle soluzioni simil-vino aggiunte di tannino di quercia e dei diversi polisaccaridi, misurate a 7 e a 45 giorni

Dai dati ottenuti risulta difficile predire l'evoluzione delle interazioni tra questi composti nel tempo; vi è una notevole variazione che dipende sia dal tannino che dai polisaccaridi utilizzati e dalle loro concentrazioni.

Le soluzioni a 1 g/L di tannino hanno evidenziato un aumento delle dimensioni delle particelle del controllo nei 45 giorni. L'aggiunta di polisaccaridi d'uva e di mannoproteine ha favorito la formazione di particelle di dimensioni più piccole rispetto a quelle del controllo alle basse concentrazioni di tannino. Per le soluzioni di tannino alla concentrazione di 4 g/L sono state riscontrate invece particelle di dimensioni più grandi rispetto al controllo che presenta particelle con dimensioni invariate nel tempo.

La CMC in soluzione a 1 e 2 g/L di tannino ha comportato un aumento delle dimensioni delle particelle, superiori anche a quelle del controllo, per le concentrazioni di 50 e 100 mg/L, invariate nel tempo e con valori inferiori al controllo per la concentrazione di CMC più alta (300 mg/L). L'aggiunta di CMC alla soluzione a 4 g/L di tannino ha provocato la formazione, a 45 giorni, di particelle con dimensioni ancora più grandi che a 7 giorni e comunque maggiori di quelle del controllo.

Con l'aggiunta di gomma arabica, invece, si sono formate particelle di dimensioni inferiori rispetto al controllo per la soluzione di tannino a 1 g/L. Si è verificato il fenomeno opposto nelle soluzioni a 4 g/L di tannino, dove le particelle hanno raggiunto dimensioni maggiori rispetto a quelle del controllo, che è rimasto costante nel tempo.

Nonostante le dimensioni siano paragonabili a quelle del controllo, l'aggiunta di gomma arabica a 7 giorni, provoca la formazione di particelle più grandi rispetto al controllo per le concentrazioni più basse del polisaccaride e più piccole per le altre concentrazioni, in soluzioni a 2 g/L di tannino. Le diverse risposte date dai polisaccaridi con il tannino e nelle loro diverse concentrazioni, suggerisce una diversa reattività di queste sostanze verso tannini.

La formazione di colloidali stabili di grandi dimensioni comporta il rischio di ritenzione nei sistemi di filtrazione, d'altra parte la presenza di un gran numero di particelle di piccole dimensioni che permangono in soluzione può causare torbidità al prodotto.

Queste indicazioni risultano pertanto interessanti in quanto forniscono indicazioni su quale dei coadiuvanti testati è più adatto nelle varie fasi della filiera del vino.

#### Vino bianco

Per quanto riguarda il parametro torbidità, questa è stata considerata per tutti i campioni, dopo loro miscelazione, al fine di verificare l'eventuale aumento della torbidità a causa della presenza di sedimenti dovuti a precipitazioni colloidali.

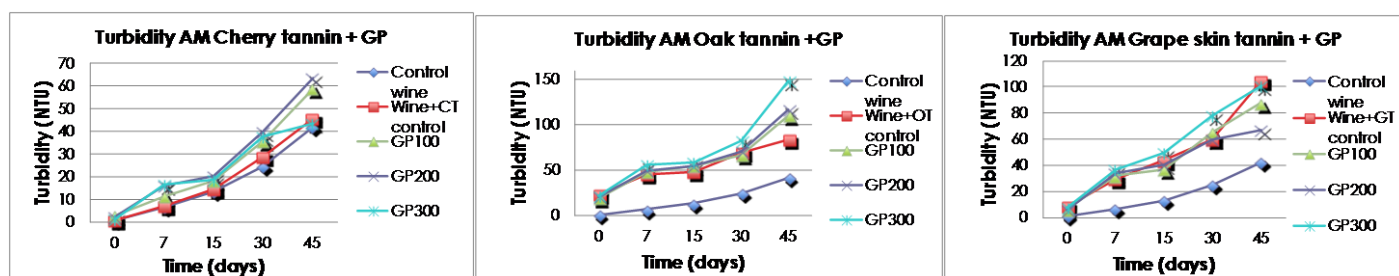


Figura 7: Esempio dell'andamento della torbidità misurata nel tempo nei campioni di vino bianco aggiunti dei tre diversi tannini e delle diverse concentrazioni di polisaccaridi d'uva.

I valori hanno evidenziato un aumento della torbidità per l'evidente formazione di sedimento nel tempo; in particolare, i valori più alti di torbidità sono stati rilevati nei campioni aggiunti con tannino di quercia. Anche le prove effettuate aggiungendo tannino di ciliegio hanno mostrato un comportamento simile: a 45 giorni, i campioni con polisaccaridi d'uva e mannoproteine presentavano i più alti valori di torbidità.

Per i campioni con tannino di quercia la torbidità finale più alta è stata riscontrata nei campioni contenenti i polisaccaridi d'uva, mentre per i campioni con tannino di buccia d'uva i valori più alti sono stati rilevati nei campioni aggiunti con mannoproteine.

Le differenze tra il controllo ed il vino aggiunto di tannino di quercia e di buccia sono risultate più marcate di quelle del vino aggiunto di tannino di ciliegio.

Il POM-test ha dimostrato che i tannini di quercia e di buccia d'uva, unitamente ai polisaccaridi, possono proteggere il vino bianco dall'ossidazione. Al contrario, l'aggiunta di tannino ciliegio non sembra fornire un effetto antiossidante così marcato (Figura 8). Per i campioni aggiunti con tannino di quercia, ma soprattutto per quelli con tannino di buccia d'uva, vi è una diminuzione di tale valore nei primi 15 giorni seguito da un aumento, in particolare per i campioni con tannino di quercia e MP 100, GA 300 e 1000 o CMC 50 e per campioni con tannino di buccia d'uva e CMC 50 e 100, MP 100 e GA 300 e 500.

Il tannino di ciliegio nel vino bianco è stato quello che ha fornito una protezione minore rispetto a quello di quercia e di buccia d'uva.

I valori ottenuti indicano anche che i polisaccaridi aggiunti non interferiscono con l'attività antiossidante dei tannini. Nel caso di tannino ciliegio, i valori variano a seconda del polisaccaride aggiunto. I campioni con CMC hanno fornito valori superiori rispetto al controllo e al vino aggiunto solo con tannino di ciliegio.

Lo stesso risultato è stato ottenuto anche con l'aggiunta di gomma arabica e mannoproteine. Solo i polisaccaridi d'uva aggiunti al vino con tannino di ciliegio hanno dato valori simili al controllo, senza comportare effetti positivi né negativi.

Per quanto riguarda i campioni aggiunti con tannino di quercia, l'aggiunta di polisaccaridi d'uva ha fornito i valori finali più bassi: in questo caso la loro aggiunta ha avuto un effetto positivo nella protezione dall'ossidazione, probabilmente a causa di un effetto sinergico con il tannino di quercia.

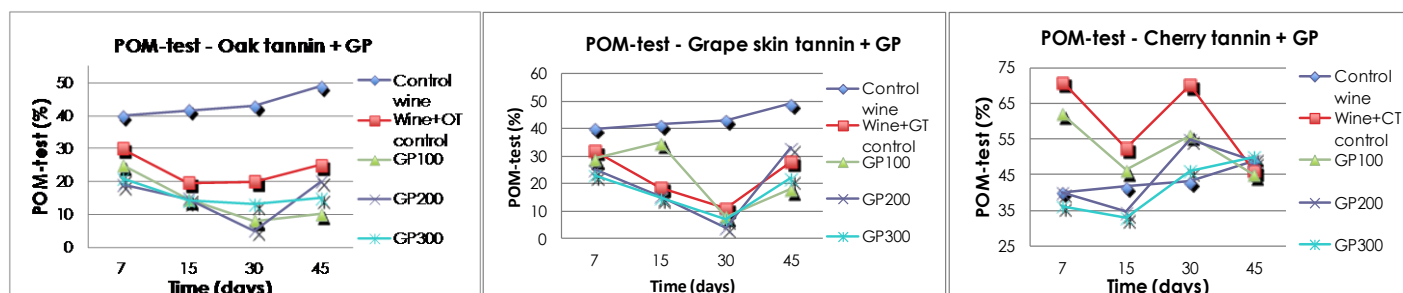


Figura 8: Esempio dell'andamento del test di ossidabilità nel tempo nei campioni di vino bianco aggiunti dei tre diversi tannini e delle diverse concentrazioni di polisaccaridi d'uva.

Per gli altri polisaccaridi aggiunti, la protezione dall'ossidazione sembra derivare più dal tannino di quercia che dalla loro aggiunta.

Vino rosso

Per quanto riguarda il contenuto di antociani liberi nel vino rosso aggiunto dei vari polisaccaridi nelle tre diverse concentrazioni è stata riscontrata una graduale diminuzione sia per i campioni che per il controllo; quest'ultimo presentava, a 45giorni, il valore di antociani più alto (Figura 9).

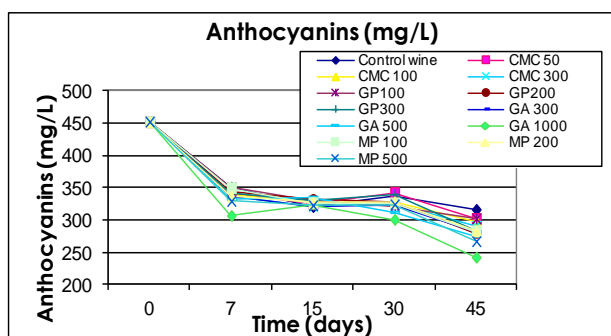


Figura 9: Andamento del contenuto degli antociani liberi (mg/L) nel tempo.

L'aggiunta di polisaccaridi sembra interessare più o meno significativamente questo parametro. In particolare, presentando il controllo a 45 giorni il valore più alto di antociani liberi (316 mg/L) rispetto a quella di tutti gli altri campioni, i polisaccaridi possono contribuire alla riduzione di questo parametro (fino a -75 mg/L). I valori più bassi sono stati registrati per i campioni aggiunti di gomma arabica (241 mg/L) e mannoproteine (266 mg/L) alle concentrazioni più alte.

La riduzione del contenuto di antociani liberi può essere correlata alla loro ossidazione nel tempo o alla loro tendenza a combinarsi con tannini. Questa seconda possibilità può essere confermata dalla diminuzione del contenuto di catechine nel tempo, dall'aumento dell'indice dei pigmenti polimerizzati e dal leggero aumento dell'intensità colorante.

Questo parametro è di solito legato all'andamento dell'indice dei pigmenti polimerizzati, indicando la percentuale di antociani polimerizzati con tannini: con la diminuzione del contenuto di antociani liberi, aumenta la percentuale di pigmenti polimeri e viceversa. I due parametri sembrano essere quindi legati. Le interazioni antociani-tannini portano ad un miglioramento della stabilità del colore ed il calo riscontrabile a 45 giorni potrebbe essere indice di una maggiore stabilità per tutti i campioni rispetto al controllo. E' possibile ipotizzare quindi un effetto indiretto dei polisaccaridi aggiunti sulle interazioni antociani-tannini.

Per quanto riguarda il contenuto di catechine, si è registrata una diminuzione nei 45 giorni con andamento simile per tutti i campioni, compreso il controllo (Figura 10.). Poiché questo è un parametro che valuta la presenza di catechine non polimerizzate, il calo può essere associato alla tendenza alla polimerizzazione di tali composti. La maggior parte dei campioni ha evidenziato un calo maggiore rispetto al controllo, soprattutto nel caso della gomma arabica alla concentrazione più elevata.

Questi risultati possono suggerire che vi sia un effetto indiretto dell'aggiunta dei polisaccaridi sulla riduzione del contenuto di catechine, probabilmente favorendo le interazioni tra tannini ed antociani o la polimerizzazione del tannino.

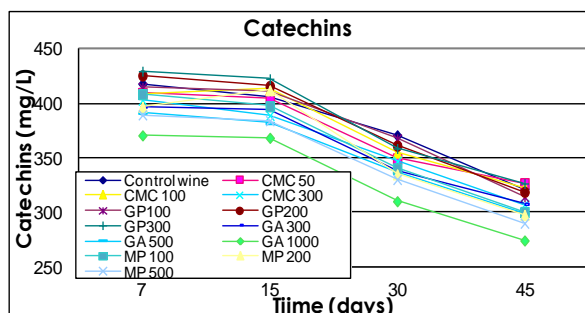


Figura 10: Andamento del contenuto di catechine (mg/L) nel tempo.

Relativamente alle misure di torbidità: l'aggiunta di polisaccaridi, in genere, ha aumentato il valore iniziale di torbidità comparato a quello del controllo e nel tempo è stato riscontrato un ulteriore aumento di tali valori, in particolare a 30 e a 45 giorni, conseguente alla formazione di precipitato. I valori di torbidità più alti sono stati notati nei campioni aggiunti dei polisaccaridi alle concentrazioni più alte (Figura 11).

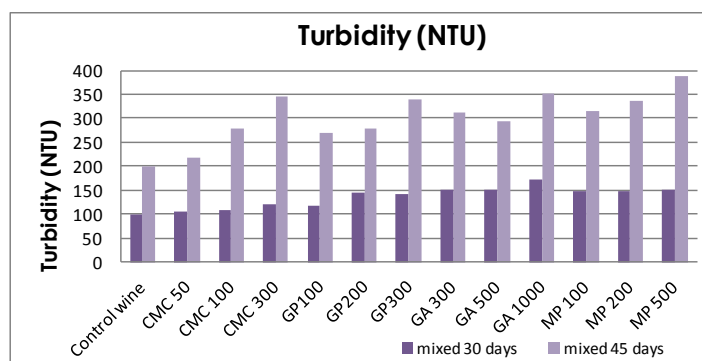


Figura 11: Torbidità, dopo agitazione dei campioni, a 30 e a 45 giorni.

La misura della carica elettrica superficiale a 45 giorni (Figura 12) non ha evidenziato differenze significative dovute all'aggiunta dei polisaccaridi: soltanto l'aggiunta di gomma arabica ha portato ad un aumento della carica elettrica negativa. La misurazione della carica elettrica superficiale dei campioni prima e dopo miscelazione fornisce pressoché lo stesso risultato, questo indica che la formazione del precipitato non sembra contribuire alla carica elettrica superficiale totale.

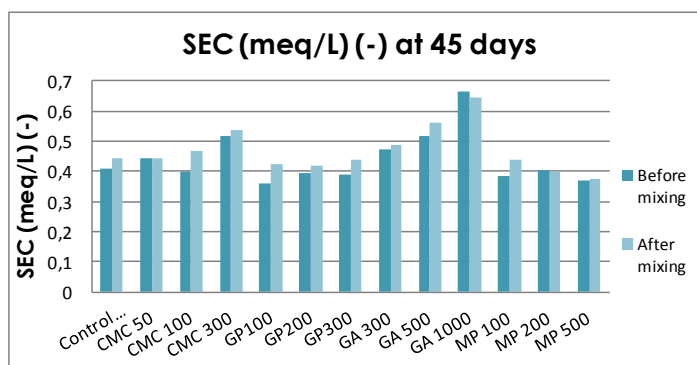


Figura 12: Carica elettrica superficiale (meq/L) (-)

Infine, per quanto riguarda la valutazione del diametro colloidale, tutti i campioni hanno presentato una singola distribuzione delle dimensioni delle particelle (Figura 13.). I dati mancanti per le mannoproteine (100 mg/L) a 30 giorni e per la gomma arabica (300 e 1000mg/L) a 45 giorni sono dovuti al fatto che i valori erano fuori scala, indicando la presenza di particelle la cui dimensione era fuori scala.

Dai valori riscontrati si è notato inoltre che questo parametro non è correlato alla torbidità: infatti, i valori più elevati di torbidità non corrispondono sempre la presenza di particelle di grandi dimensioni. In generale, solo l'aggiunta di CMC nel vino rosso, ha mantenuto bassi valori di size; tutti gli altri polisaccaridi aggiunti sembrano aver contribuito alla formazione di particelle di grandi dimensioni.

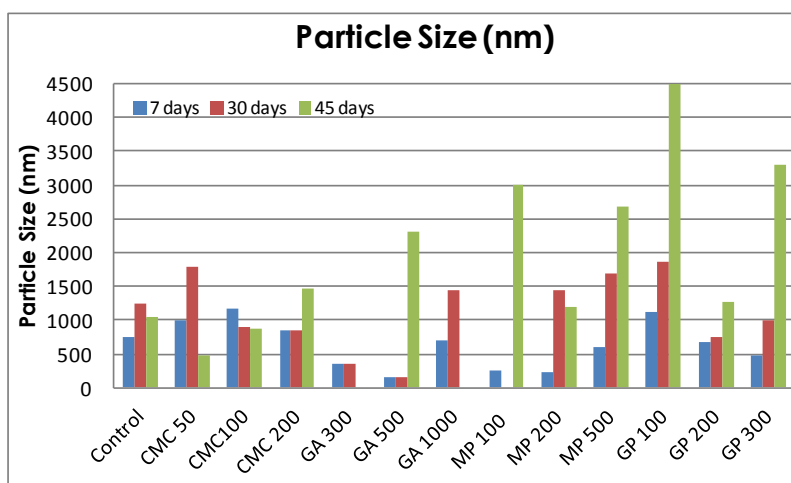


Figura 13: Dimensioni delle particelle presenti nel vino rosso (nm)

Un fattore importante da considerare è rappresentato proprio dalla dimensione delle particelle macromolecolari in quanto legato alla stabilità colloidale del vino nel tempo.

Interazioni aromi-macromolecole

I risultati di queste prove sono stati valutati e discussi in base all'area dei picchi ottenuti dalla gascromatografia in spazio di testa dei campioni.

Per i campioni contenenti benzaldeide (Figura 14), è stato possibile vedere che, alla concentrazione di 1 ppm, l'aggiunta di tannino ha influenzato negativamente la volatilità del composto aromatico riducendo significativamente il contenuto nello spazio di testa. Questo conferma quanto riportato in letteratura circa la capacità dei polifenoli di legare i composti aromatici (Dufour e Suvaitre, 2000, Jung et al., 2000).

L'aggiunta di BSA ha provocato una diminuzione della volatilità (12%), ma non è statisticamente differente rispetto al controllo.

La torbidità data da tannino-BSA, sembra essere stata influenzata più dalle caratteristiche del tannino che da quelle della proteina; la sua presenza in soluzione, infatti, ha ridotto la volatilità del composto.

La situazione cambia per lo stesso composto alla concentrazione di 0,1 ppm. A tale concentrazione, l'aggiunta di BSA è stata l'unica a dare un effetto notevole rispetto al controllo, aumentando la volatilità del composto stesso. Si può presumere, quindi, un effetto salting-out di questa proteina alle basse concentrazioni di benzaldeide.

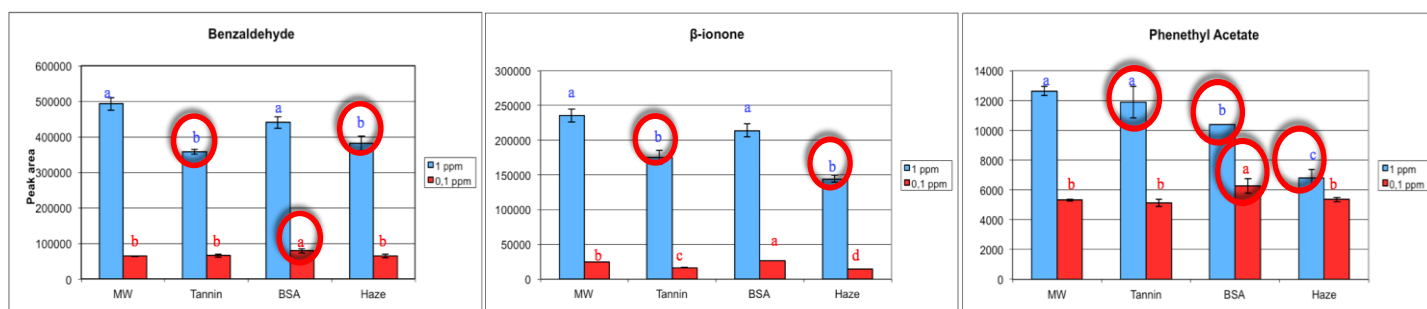


Figura 14-15-16: Area dei picchi dei campioni aggiunti di benzaldeide, β-ionone e Feniletacetato nelle concentrazioni di 1 e 0,1 ppm. Lettere diverse identificano campioni significativamente diversi per p < 0.05

Per il  $\beta$ -ionone (Figura 15) sono stati ottenuti risultati simili per le due concentrazioni, in entrambi i casi, infatti, gli effetti maggiori sono quelli dovuti al tannino, e, soprattutto nel caso della torbidità generata da tannino + BSA, la loro presenza ha ridotto la volatilità del composto rispettivamente del 25 e 30% rispetto al controllo, nel primo caso e del 34 e 41% nel secondo caso. Ad una concentrazione di 0,1 ppm la BSA ha anche mostrato un leggero effetto salting-out, aumentando il contenuto dell'aromanello spazio di testa del 7%.

Per il feniletilacetato (Figura 16) ad una concentrazione di 1 ppm, sia la presenza di tannino che quella di BSA hanno portato ad una riduzione del 6 e 18% rispetto al controllo. I dati più interessanti sono quelli relativi all'insieme tannino-BSA, poiché l'effetto sinergico derivante dal tannino e proteina nell'aggregato ha comportato una riduzione del 46% della volatilità del composto.

Alla concentrazione di 0,1 ppm, tuttavia, questo comportamento non è stato ripetuto, si è notato solo un leggero effetto salting-out dovuto alla BSA, che ha aumentato la volatilità dell' 8%.

## Conclusioni

Lo studio delle interazioni tra tannini e polisaccaridi, effettuato sfruttando tecniche non convenzionali, è stato utile per definire alcuni dei comportamenti di queste sostanze in soluzioni modello e nel vino.

La valutazione nelle soluzioni modello ha mostrato una diversa reattività dei polisaccaridi aggiunti nei confronti dei diversi tannini ed un diverso comportamento colloidale a seconda della loro concentrazione e dalla concentrazione del tannino aggiunto in soluzione.

Relativamente alla componente colore ed alle sostanze fenoliche, si è notato che i polisaccaridi aggiunti non sembrano avere effetti negativi, mantenendo generalmente tali valori costanti nel tempo o addirittura migliorando la stabilità del colore.

Le valutazioni relative all'attività antiossidante dei tannini e dei polisaccaridi nel vino bianco hanno confermato l'elevato potere antiossidante del tannino di quercia e di buccia d'uva e quello ben più basso del tannino di ciliegia. Inoltre l'aggiunta di polisaccaridi non ha influenzato la loro capacità antiossidante.

Per quanto concerne la carica elettrica superficiale, il valore per tutte le prove è rimasto invariato nel tempo, evidenziando che i fenomeni legati alle interazioni tra i composti testati non dipendono soltanto dalla loro carica elettrica.

Le misure di torbidità hanno evidenziato un aumento dei valori nel tempo, soprattutto per i campioni contenenti mannoproteine e polisaccaridi d'uva, sia sul surnatante che dopo agitazione, indicando la formazione di un evidente sedimento. L'aggiunta di carbossimetilcellulosa non sembra invece influenzare il parametro torbidità.

Le misure del diametro idrocolloidale delle particelle sono state utilizzate per valutare la dimensione delle particelle di sedimento dopo 45 giorni, così come quella dei colloidi rimasti stabili in soluzione. L'effetto combinato di tannini e polisaccaridi ha mostrato, variazioni significative a seconda del tannino, del polisaccaride utilizzato che delle rispettive concentrazioni.

La misura di torbidità nel tempo ha fornito informazioni utili relativamente a quello che potrebbe essere il problema di formazione di instabilità prima e dopo l'imbottigliamento di un vino. Fenomeni di instabilità colloidale dopo l'imbottigliamento potrebbero comportare la perdita della limpidezza del vino stesso, causando una diminuzione della qualità del prodotto.

Il fattore tempo è fondamentale per questi fenomeni sia per la gestione delle componenti naturalmente presenti nel vino che per quella dei coadiuvanti aggiunti.

Un eventuale rischio di precipitazione può anche comportare perdita di parte della componente aromatica dal momento che gli aggregati colloidali formati possono trascinarsi nella loro precipitazione, compromettendo la qualità finale del prodotto anche dal punto di vista sensoriale. In riferimento alle interazioni con gli aromi, le prove hanno confermato che le macromolecole presenti in soluzione possono influenzare la volatilità dei composti aromatici.

Nella maggior parte dei casi, la presenza del tannino ha portato ad una riduzione della volatilità, mentre l'aggiunta della proteina ha mostrato, in quasi tutti i campioni, un effetto salting-out, aumentando la volatilità degli stessi composti.

È molto probabile che in presenza di torbidità l'aroma venga intrappolato negli aggregati formati interagendo direttamente con le macromolecole. Queste sostanze sono parte del sistema colloidale, pertanto, variazioni dello stesso, possono portare a variazioni della componente aromatica. La formazione di colloidali stabili nel tempo promuove la stabilità sensoriale, mentre interazioni colloidali che determinano precipitazioni comportano una perdita di sostanze aromatiche.

Il presente lavoro non ha la pretesa di fornire indicazioni definitive applicabili a tutti i vini, tuttavia le informazioni ottenute sull'evoluzione colloidale potranno essere utilizzate per cercare di identificare il confine tra stabilità ed instabilità dei colloidali solubili, esogeni ed endogeni, nel rispetto della qualità globale del vino.

### **Ringraziamenti**

Si ringraziano le aziende EVERINTEC e Enartis per la fornitura dei diversi coadiuvanti. Lavoro realizzato con il contributo della Regione FVG, LR 26/2005 sull'innovazione, progetto GISVI (Gestione Integrata e Sostenibile Vite Vino)

## Bibliografia

- Aronson J. e Ebeler S. (2004). Effect of polyphenol compounds on the headspace volatility of flavors. *Am. J. Enol. Vitic.*, 55, 13–21.
- Celotti E., Ferrarini R., Battistutta F. and Zironi R. (2003). Importance de la taille et de la charge électrique superficielle des fractions colloïdales des vins rouges. Proceedings of The VIIth International Oenology Symposium, Arcachon 19-21 June 2003, 525-527.
- Chalier P., Angot B., Delteil D., Doco T. and Gunata Z. (2007). Interactions between aroma compounds and whole mannoprotein isolated from *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Food Chem.*, 100, 22–30.
- Charlton A., Baxter N.J., Khan M.L., Moir A.J.G., Haslam E., Davis A.P. and Williamson M.P. (2002). Polyphenol/peptide binding and precipitation. *J. Agric. Food Chem.*, 50, 1593–1601.
- De Freitas V., Carvalho E. and Mateus N. (2003). Study of carbohydrate influence on protein-tannin aggregation by nephelometry. *Food Chem.*, 81, 503-509.
- Dufour C. e Bayonove C.L. (1999b). Influence of wine structurally different polysaccharides on the volatility of aroma substances in a model system. *J. Agric. Food Chem.*, 47, 671–677.
- Escalona H., Birkmyre L., Piggott J.R. and Paterson A. (2002). Effect of maturation in small oak casks on the volatility of red wine aroma compounds. *Anal. Chim. Acta.*, 458, 45–54.
- Feuillat M., Lurton L., Segain J.P., 1989. Etude de la proteolyse au cours de l'autolyse de levures en milieu acide. *J. Agric. Food Chem.*, 9:111–124.
- Feuillat, M. (1994). Fermentation dans le bois sur lies des vins blancs. Influence des macromolécules de levures sur les arômes. *Rev. Enol.*, 71, 19-21.
- Glories Y. (1978). Recherches sur la matière colorante des vins rouges. Thèse de Doctorat, Université de Bordeaux II.
- Hartmann P.J., Mc Nair H.M. and Zoecklein W. (2002). Measurements of 3-alkyl-2-methoxypyrazine by Headspace Solid Phase Microextraction in spiked model wines. *Am. J. Enol. Vitic.*, 53, 285–288.
- King B.M. e Solms J. (1982). Interactions of volatile flavour compounds with propyl gallate and other phenols as compared with caffeine. *J. Agric. Food Chem.*, 30, 838–840.
- Langourieux, S., Crouzet, J. (1993). Interactions between wine aroma compounds and macromolécules. *Connassance aromatique des cépages et qualité des vins*, Montpellier (France), 9-10 Feb 1993.
- Luck G., Liao H., Murray N.J., Grimmer H.R., Warminski E.E., Williamson M.P., Lilley T.H. and Haslam E. (1994). Polyphenols, astringency and proline-rich proteins. *Phytochemistry*, 37, 357–371.
- Lavigne V. e Dubourdieu D. (1996). Demonstration and interpretation of the yeast lee ability to adsorb certain volatile thiols contained in wine. *J. Int. Sci. Vigne Vin*, 30 (4), 201-206.
- Llaubères R.M., 1988. Les polysaccharides sécrétés dans le vin par *Saccharomyces cerevisiae* et *Pediococcus* sp. Thèse de doctorat es sciences. Université de Bordeaux II.
- Lubbers S., Leger B., Charpentier C. and Feuillat M. (1993). Effet colloïde-protecteur d'extraits de parois de levures sur la stabilité tartrique d'une solution hydro-alcoolique modèle. *J. Int. Sci. Vigne Vin*, 27, 13-22, 65-66.
- Mateus N., Carvalho E., Luís C., de Freitas V., 2004. Influence of the tannin structure on the disruption effect of carbohydrates on protein-tannin aggregates. *Analitica Chimica Acta*, 3rd Symposium In Vino Analytica Scientia, 513 (1): 135-140.

Muller-Späth H. (1992). Der POM-test. *Deutscher Weinbau*, 23, 1099-1100.

Murray N.J., Williamson M.P., Lilley T.H., Haslam E., 1994. Study of the interaction between salivary proline-rich proteins and a polyphenol by <sup>1</sup>H-NMR spectroscopy. *Eur. J. Biochem.*, 219: 923-925.

Oh H.I., Hoff J.E., Armstrong G.S. and Haff L.A. (1980). Hydrophobic interaction in tannin-protein complexes. *J. Agric. Food Chem.*, 28 (2), 394-398.

Pellerin P., Cabanis J.C., 1998. Les glucides et l'oenologie. In C. Flanzky, *Fondements scientifiques et technologiques*. Lavoisier TEC & DOC. 41-92.

Poncet-Legrand C., Doco T., Williams P. and Vernhet A. (2007b). Inhibition of grape seed tannin aggregation by wine mannoproteins: Effect of polysaccharide molecular weight. *Am. J. Enol. Vitic.*, 58(1), 87-91

Reineccius G., Schirle-Keller J.P. and Hatchwell L.C. (1997). The interaction of aroma compounds with simple sugars and aspartame. In: *Proceedings of Cost Action 96. Interaction of food matrix with small ligands influencing flavour and texture*. 9-11 Ottobre 1997. P. Schieberle (Ed.), 25-37. European Commission, Directorate-General Research, Garching (Germany).

Ribereau-Gayon P., Glories Y., Maujean A., Dubourdieu D. 2007. *Trattato di enologia II (chimica del vino – stabilizzazione – trattamenti)*. (3° ed.), Edagricole

Ribéreau-Gayon P. e Stonestreet E. (1965). Le dosage des anthocyanes dans le vin rouge. *Bull. Soc. Chim.*, 9, 2649-2652.

Riou V., Vernhet A., Doco T., Moutounet M., 2002. Aggregation of grape seed tannins in model wine – effect of wine polysaccharides. *Food Hyd.*, 16: 17-23.

Saenz-Navajas M.P., Campo E., Culleré L., Fernandez-Zurbano P., Valentin D. and Ferreira V. (2010). Effects of the non-volatile matrix on the aroma perception of wine. *J. Agric. Food Chem.*, 58, 5574–5585.

Saucier C., Roux D. and Glories Y. (1996). Stabilité colloïdale polymers catéchiques. Influence des polysaccharides. In: *Oenologie. 5e Symposium International d'Oenologie*. Lavoisier TEC&DOC, Paris, 395-400.

Saucier C. e Glories Y. (2000). Interactions tanins-colloïdes: nouvelles avancées concernant la notion de «bons» et de «mauvais» tanins. *Rev. Enol.*, 27 (94), 9-10

Siebert K.J., Carrasco A. and Lynn P.Y. (1996). Formation of protein-polyphenol haze in beverages. *J. Agric. Food Chem.*, 44 (8), 1997–2005.

Solms J. (1986). Interactions of non-volatile and volatile substances in foods. In: *Interactions of foods components*. G.C. Birch, e M.G. Lindley (Eds.), 189-210. Elsevier Applied, London.

Voilley A., Beghin V., Charpentier V., Charpentier C. and Peyrond D. (1991). Interactions between aroma substances and macromolecules in a model in a model wine. *Food Sci. Technol- Leb.*, 24, 469–472

Zironi R., Buiatti S., Celotti E. (1992). Evaluation of a new colourimetric method for the determination of catechins in musts and wines. *Vitic. Enol. Sci*, 47 (1), 1-7.