



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di Agronomia, Alimenti, Risorse naturali, Animali e Ambiente

Corso di Laurea in Scienze e Tecnologie viticole ed enologiche

TITOLO

Impatto della bentonite sulla componente proteica in relazione all'epoca di esecuzione del trattamento di chiarifica.

Relatore:

Prof. Simone Vincenzi

Laureando Francesco Bedin

Matricola n. 2044867

ANNO ACCADEMICO 2023/2024

Sommario

1. RIASSUNTO	3
2. ABSTRACT	4
3. INTRODUZIONE	5
3.1 Composizione proteica del vino	5
3.2 Bentonite	6
3.3 Stato dell'arte sull' utilizzo della bentonite in enologia	8
3.4 Effetti secondari legati all'utilizzo di bentonite	9
3.4.1 Assorbimento di aromi	9
3.4.2 Complesso tannino-bentonite	9
3.4.3. Assorbimento della Riboflavina	10
3.4.4 Assorbimento di Ammine biogene	10
3.5 Strategie e opportunità di chiarifica con bentonite	11
3.5.4 Valorizzazione degli aromi varietali	13
3.5.5 Riduzione dei reflui enologici	14
4 SCOPO DELLA TESI	14
5 MATERIALI E METODI	15
5.1 Mosto	15
5.2 Bentonite	15
5.3 Test di Stabilità	16
5.4 Quantificazione delle Proteine	16
5.5 Prove Preliminari e Scelta del Dosaggio	17
5.6 Procedimento e raccolta dati	17
6 RISULTATI	20
6.1 Effetti della Bentonite sulla Fermentazione	20
6.2 Effetto della bentonite sulle proteine	21
6.3. Effetto sulla stabilità proteica	24
8. BIBLIOGRAFIA	26

1.RIASSUNTO

L'uso della bentonite per rimuovere le proteine nei vini bianchi e prevenire la formazione di torbidità dovuta alla loro coagulazione è una pratica consolidata nell'industria vinicola. Tuttavia, questa argilla è nota per avere una modalità di assorbimento aspecifica, che comporta l'interazione e la sottrazione di un ampio spettro di molecole, come aromi fermentativi (esteri acetici, acidi grassi) e fenoli, con una conseguente diminuzione delle qualità organolettiche dei vini trattati.

La tendenza attuale è quella di ridurre al minimo le dosi impiegate di questo coadiuvante. Storicamente è pratica comune l'aggiunta di bentonite nel periodo di affinamento post-fermentativo.

In questo lavoro, abbiamo analizzato l'efficacia della riduzione delle proteine tramite un ipotetico trattamento di chiarifica con bentonite effettuato in momenti diversi (pre-fermentazione, durante la fermentazione, post-fermentazione) con la stessa dose di bentonite, al fine di individuare la massima efficienza deproteinizzante in relazione all'epoca di esecuzione del trattamento. Nello specifico è stata misurata la concentrazione di proteine iniziali e residue per ognuna delle tre tesi, sono stati eseguiti test di stabilità proteica sul mosto di partenza e sul vino per ciascuna sperimentazione.

Abbiamo inoltre verificato con due ceppi di lievito se il trattamento pre-fermentativo/fermentativo potesse influenzare la fermentescibilità dei mosti e quindi la cinetica di fermentazione.

2. ABSTRACT

The use of bentonite to remove proteins in white wines and prevent the formation of turbidity due to their coagulation is a well-established practice in the wine industry. However, this clay is known for its nonspecific absorption mode, which leads to the interaction and removal of a wide range of molecules, such as fermentative aromas (acetic esters, fatty acids) and phenols, resulting in a decrease in the organoleptic qualities of the treated wines. The current trend is to minimize the doses of this coadjuvant. Historically and still today, it is common practice to add bentonite during the post-fermentation aging period.

In this work, we analyzed the effectiveness of protein reduction through a hypothetical bentonite fining treatment performed at different stages (pre-fermentation, during fermentation, post-fermentation) with the same dose, in order to identify the maximum deproteinizing efficiency in relation to the timing of the treatment. Specifically, the initial and residual protein concentrations were measured for each of the three scenarios. Protein stability tests have been carried out on the starting must and wine for each trial.

We also verified using two strains of yeast whether the pre-fermentation/fermentation treatment could affect the fermentability of the musts and consequently the fermentation kinetics.

3. INTRODUZIONE

L'instabilità proteica è una delle problematiche principali nei vini bianchi. La formazione di torbidità comporta un deprezzamento significativo della qualità del vino percepita dai consumatori (Pocock et al., 2011).

Ne consegue che le cantine hanno la necessità di produrre vini stabili nel tempo, soprattutto se destinati all'esportazione o a lunghi affinamenti in bottiglia. Storicamente, ci fu un salto di qualità con l'introduzione della bentonite in sostituzione al caolino per fronteggiare questa problematica. Tuttavia, l'uso di questa argilla è stato spesso banalizzato, sottovalutando gli effetti secondari che comporta. Lavori di ricerca recenti stanno facendo luce sull'assorbimento aspecifico della bentonite, evidenziando quanto sia essenziale un uso consapevole e ragionato per preservare la qualità del vino.

3.1 Composizione proteica del vino

Le proteine presenti nel vino sono una miscela derivata dalle proteine contenute nell'uva e dalle proteine rilasciate dall'idrolisi delle cellule di lievito. Paradossalmente, le proteine dell'uva, che sono ritenute la principale causa di instabilità nei vini, sono anche quelle più resistenti alla vinificazione. Queste proteine possono essere suddivise in due classi: chitinasi (PR-3) e Thaumatine-like proteins (PR-5), entrambe appartenenti alla famiglia delle proteine di patogenesi (PR) prodotte dalla vite (Vincenzi et al., 2011).

In altri studi è stato attestato il contributo marginale alla formazione di torbidità delle β -1,3-glucanasi (PR-2) rilasciate dal lievito. Inoltre, l'idrolisi delle stesse cellule comporta una cessione al vino di mannoproteine glicosilate, molto resistenti al pH del vino, che si comportano da colloidali protettori, riducendo il rischio di casse proteiche (Esteruelas et al., 2009) (Sauvage et al., 2010).

La potenziale formazione di torbidità dipende non solo dalla quantità totale di proteine, ma anche dalla loro composizione (Esteruelas et al., 2009).

Le proteine PR sono note per avere una bassa massa molecolare (15-35 kDa) e un punto isoelettrico (pI) più basso (Marangon et al., 2011).

Le PR-3 sono considerate la principale causa di torbidità poiché hanno una bassa temperatura di denaturazione, una durata inferiore rispetto alle condizioni del vino (pH), e tendono ad aggregarsi in maniera irreversibile, precipitando più facilmente rispetto ad altre classi di proteine (Marangon et al., 2010).

3.2 Bentonite

Le bentoniti utilizzate in enologia sono classificabili come silicati idrati di alluminio, composti principalmente da montmorillonite. La provenienza geografica della bentonite influisce sulla composizione e sulla concentrazione dei cationi scambiabili contenuti in essa (Mg^{2+} , Ca^{2+} , Na^+). Si può quindi dedurre che esistono molte tipologie di bentoniti commerciali con proprietà chimico-fisiche anche molto diverse tra loro.

Le bentoniti che si trovano in commercio non sono quasi mai grezze; vengono trattate per rimuovere eventuali metalli che potrebbero essere ceduti al vino. Inoltre, una volta purificate, vengono attivate con l'utilizzo di acido solforico o sali alcalini. Questo processo permette di ottenere bentoniti "attivate" con gli ioni desiderati, ottenendo così bentoniti acide (H^+), sodiche (Na^+) e calciche (Ca^{2+}).

Queste bentoniti possono essere classificate in due gruppi in base alle loro proprietà e utilizzi:

1. Bentoniti acide/calciche: utilizzate principalmente per la loro capacità sedimentante, creano un deposito compatto che limita la produzione di reflui enologici. Tuttavia, la dimensione ridotta degli ioni con cui vengono caricate provoca un limitato distanziamento delle lamelle che formano la montmorillonite (10 Å), limitando la capacità di assorbire proteine.
2. Bentoniti sodiche: queste sono le più diffuse. Gli ioni di sodio hanno un ingombro sterico maggiore, permettendo una buona spaziatura delle lamelle (100 Å). Questa

caratteristica consente una maggiore interazione con le proteine, conferendo alle bentoniti sodiche un alto potere deproteinizzante.

La struttura fisica della montmorillonite a fogli distanziati le conferisce un comportamento colloidale. Il suo utilizzo prevede la preventiva reidratazione in acqua (rapporto 1:10/1:20) per 24-48 ore prima dell'impiego, al fine di raggiungere il massimo grado di rigonfiamento, traducibile in una maggiore superficie di scambio e interazione con le proteine. Effettuare una corretta reidratazione e una buona omogeneizzazione nel vino da trattare è fondamentale per ottenere la massima efficienza del processo ed evitare perdite economiche.

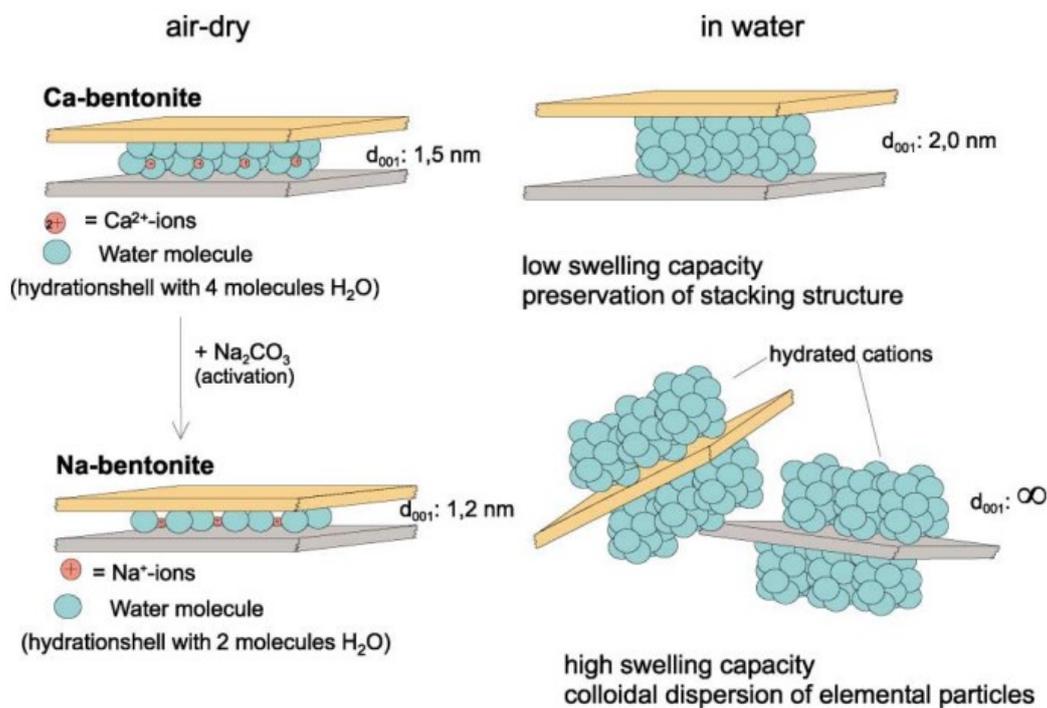


Fig. 1. Bentonite activation.

Figura 1 Influenza dei cationi nel distanziamento delle lamelle di bentonite.

(Koch, 2002)

L'interazione elettrostatica tra le proteine, che al pH del vino sono cariche positivamente, e la bentonite avviene poiché è presente una carica negativa sulla superficie interfogliare della

montmorillonite. Questa carica negativa è generata dalla differenza di carica tra gli ioni Si^{4+} e gli ioni $\text{Al}^{3+}/\text{Mg}^{2+}$ presenti nella struttura dei foglietti.

Tanto più è basso il pH del mezzo da trattare tanto più forte è l'interazione elettrostatica, ne consegue un'efficienza maggiore della bentonite (Ribéreau-Gayon et al., 1977).

3.3 Stato dell'arte sull' utilizzo della bentonite in enologia

Attualmente, la pratica più diffusa per prevenire la formazione di torbidità proteica in bottiglia prevede l'aggiunta di bentonite durante il periodo di affinamento post fermentazione. Tuttavia, questa tecnica comporta alcuni svantaggi significativi. I tempi necessari per la sedimentazione e la compattazione delle fecce di chiarifica possono protrarsi fino a 15 giorni al fine di minimizzare le perdite di vino. Inoltre, l'assorbimento aspecifico della bentonite comporta una riduzione degli aromi e della componente fenolica. Secondo Lambri e colleghi (2012), l'effetto è trascurabile nei vini bianchi, ma in questo caso gli aromi analizzati erano esclusivamente terpenoli. Uno studio successivo ha confermato che i terpeni non sono rimossi dal trattamento con bentonite, mentre sono molto più affini alla bentonite gli esteri di fermentazione e gli acidi grassi (Vincenzi et al., 2015), che sono una frazione molto importante della componente aromatica dei vini, anzi quella più importante quando si considerano vini ottenuti da varietà non aromatiche. Per questo motivo un trattamento su mosto avrebbe il vantaggio di svolgere la sua funzione in una fase in cui gli esteri di fermentazione non si sono ancora formati.

La tendenza odierna diffusa tra gli enologi è quella di ridurre l'uso di bentonite, poiché si è sviluppata una sensibilità generale volta a minimizzare gli effetti negativi e i costi di legati all'utilizzo di questo coadiuvante nonché le perdite economiche generate dalla produzione di reflui enologici non necessari.

Ad avvalorare questa tendenza un'indagine ha stimato le perdite economiche annue dovute all'uso improprio della bentonite, intese come eccessive dosi di impiego e conseguente

perdita di vino nelle fecce: queste perdite sono state quantificate in circa 300-500 milioni di dollari (USD) per l'industria vinicola globale (Majewski et al., 2011).

Esistono alternative conosciute come "Free bentonite", che prevedono l'utilizzo della flash-pastorizzazione insieme all'aggiunta di proteasi (o proteinasi, peptidasi, enzimi proteolitici). Tuttavia, sia questa che altre tecniche ancora in fase sperimentale, come l'uso di nanoparticelle magnetiche, l'assorbimento delle proteine con ossido di Zirconio (ZrO₂), la carragenina e la zeolite non sono ammesse nella legislazione dell'Unione Europea (Lukic e Horvat, 2020).

3.4 Effetti secondari legati all'uso di bentonite

3.4.1 Assorbimento di aromi

La chiarifica con bentonite impatta negativamente sulla componente aromatica del vino. Ne consegue che, nel momento in cui le proteine vengono sedimentate con la bentonite, si ha una perdita di aromi. Come già detto precedentemente la classe di molecole più influenzata è quella degli esteri fermentativi, in particolare quelli a catena più lunga. Gli aromi varietali, come i terpeni, sono invece meno soggetti a questo fenomeno.

3.4.2 Complesso tannino-bentonite

L'uso di tannini enologici nella produzione di vini bianchi è una pratica ormai nota e diffusa per i molteplici vantaggi che essi apportano, come il miglioramento della percezione gustativa, la protezione dall'ossidazione e la stabilizzazione del colore. Nelle etichette dei tannini commerciali viene promossa la loro capacità di formare complessi tannino-proteina attraverso la formazione di legami idrogeno e interazioni idrofobiche. Tuttavia, questo fenomeno è strettamente influenzato dalla natura delle proteine presenti nel vino, poiché dipende dall'affinità tra i gruppi idrossile del fenolo del tannino e il numero di legami peptidici disponibili.

Spesso, quando le proteine sono presenti in eccesso e le catene peptidiche non hanno abbastanza tannini a cui legarsi, questo tipo di complesso tannino-proteina non risulta abbastanza idrofobico e, di conseguenza, non precipita, rimanendo solubile e instabile.

Un lavoro di ricerca ha esplorato l'effetto sinergico tra bentonite e tannini nella rimozione di proteine con lo scopo di ridurre la dose di bentonite necessaria e, al contempo, assorbire e precipitare i complessi solubili generati dai tannini grazie alla bentonite.

I risultati dello studio hanno dimostrato che l'aggiunta di bentonite e tannini verso la fine della fermentazione (in momenti separati) ha ridotto la presenza di complessi tannino-proteina solubili. Inoltre, è stato osservato un maggiore abbattimento di alcune classi di proteine rispetto al solo trattamento con bentonite. Si è visto che la bentonite ha un effetto preferenziale nell'assorbimento di complessi solubili generati dai tannini rispetto alle sole proteine. Tuttavia, gli effetti non sono stati statisticamente rilevanti al punto da permettere una riduzione significativa della dose di bentonite da impiegare. Rimane comunque utile conoscere questo fenomeno, dato che l'uso di tannini per i vini bianchi e le basi spumante è sempre più diffuso (Lukic e Hornet, 2020).

3.4.3. Assorbimento della Riboflavina

Il "gusto di luce" si origina dall'esposizione del vino in bottiglia alla luce diretta e può causare la produzione di composti solforati (cavolo cotto, uova marce). La causa di questo fenomeno è una vitamina fotosensibile chiamata riboflavina (RF) che, in presenza della metionina (MET) e di radiazione luminosa (370 nm e 450 nm), può generare questo difetto. La bentonite riesce ad assorbire la RF; tuttavia, questa è considerata una proprietà secondaria poiché il carbone enologico si è dimostrato molto più efficiente in questo ruolo (Fracassetti et al., 2019).

3.4.4 Assorbimento di Ammine biogene

La bentonite si è dimostrata il coadiuvante migliore per l'abbattimento delle ammine biogene (BA) nel vino (Mannino et al., 2006).

In particolare, l'ammina con cui interagisce meglio sembra essere l'istamina, con una riduzione fino al 60% (Kallay e Body-Szalkai, 1996).

Studi più recenti hanno dimostrato che la riduzione delle BA effettuata trattando il vino è significativamente inferiore rispetto al campione di mosto equivalente. Tuttavia, va considerato che la produzione di BA è spesso dovuta allo sviluppo di batteri lattici che, si sviluppano quasi esclusivamente nel vino poiché non sono così competitivi come i lieviti nel colonizzare il mosto (Košmerl et al., 2013).

3.5 Strategie e opportunità di chiarifica con bentonite

Attualmente, per l'industria vinicola italiana non esiste un'alternativa concreta all'uso della bentonite per la stabilizzazione proteica. Esistono, tuttavia, strategie e protocolli che possono limitarne l'uso, preservando al meglio la qualità del prodotto da trattare e riducendo i costi associati all'intervento.

La relazione tra la concentrazione di proteine nel vino/mosto e la dose di bentonite da impiegare non è lineare, poiché la diversa composizione proteica tra mosto e vino, oltre che la componente non proteica, determinano un'efficienza variabile. Per questo motivo, la letteratura riporta studi che analizzano l'interazione della bentonite con le proteine quando utilizzata nel mosto durante fase di vinificazione (Pocock et al., 2011). L'andamento stagionale potrebbe influenzare il trattamento con bentonite a causa della variazione della concentrazione di zuccheri presenti nel mosto. Infatti, un aumento della viscosità, osservabile nelle annate calde (con maggiore accumulo di zuccheri), potrebbe rallentare le interazioni tra bentonite e proteine, questo fenomeno potrebbe essere amplificato dal fatto che le stagioni più calde denotano un pH dei mosti più elevato, il quale ridurrebbe la forza delle interazioni elettrostatiche tra bentonite e proteine (Lambri et al., 2011).

Questi studi mirano a fornire agli enologi nuovi protocolli per ottimizzare l'uso della bentonite semplicemente modificando l'epoca del trattamento.

Una sperimentazione condotta su Sauvignon Blanc, Semillon e Riesling ha dimostrato che l'aggiunta di bentonite durante la fermentazione è il metodo più efficiente per raggiungere la stabilità proteica, a parità di dose, rispetto alle aggiunte in pre-fermentazione e post-fermentazione. (Pocock et al., 2011).

Lambri e colleghi (2011) hanno eseguito delle prove di stabilizzazione proteica con bentonite (100 g/hL) su mosto (A), con rimozione del deposito feccioso prima della fermentazione alcolica, e con medesima dose su vino (B). La varietà utilizzata è stata Moscato di Chambave, che mostra un elevato contenuto medio di proteine (180 mg/L). Nell'annata 2006, nei campioni A, è stata osservata una forte capacità deproteinizzante (-39,7%), e un moderato effetto stabilizzante (+19,7%) ad opera della bentonite. L'anno successivo (2007), ripetendo l'esperimento, nei trattamenti A si è osservata invece una limitata riduzione di proteine (-5,1%) associata però ad un significativo aumento della stabilità (+40,3%), inoltre nel 2007 era stato molto più importante il contributo deproteinizzante svolto dalla fermentazione alcolica (FA). Nonostante in entrambe le annate la diminuzione di proteine da parte della bentonite sul mosto (A) sia stata maggiore rispetto a quella dei campioni trattati a vino (B), è fondamentale notare che per raggiungere la completa stabilità nei vini trattati a mosto era stata necessaria un'ulteriore aggiunta di bentonite pari al 50% della dose iniziale. Questo ha portato il doppio trattamento (mosto+vino) a una dose totale di bentonite pari a 150 g/hL (50% superiore rispetto ai campioni B). Tuttavia, va considerato che il doppio trattamento ha permesso di dimezzare la dose di bentonite aggiunta nel vino rispetto al trattamento B, risultando in un effetto qualitativamente migliore poiché meno impattante sugli aromi varietali. Da questo lavoro è emersa la complessa interazione tra le proteine e la matrice del mosto; infatti, la diversa composizione chimica delle uve è stata determinante per la capacità deproteinizzante della bentonite. Viceversa, l'aggiunta di bentonite nei trattamenti A e B non ha condizionato i principali parametri analitici del vino (zuccheri, alcol, acidità, pH).

Considerando il principio elettrostatico che sta alla base dell'interazione tra bentonite (-) e proteine (+), è importante tener presente che un'eventuale acidificazione preventiva del

mezzo, sia esso vino o mosto, aumenta l'efficienza del processo, permettendo un maggiore assorbimento di proteine per grammo di bentonite impiegata (Ribéreau-Gayon et al., 1977).

Un'ulteriore ricerca su scala industriale ha analizzato gli effetti dell'uso della bentonite sugli aromi e sull'effervescenza dei vini spumanti, confrontando quattro epoche di intervento: a mosto, inizio fermentazione, metà fermentazione e fine fermentazione.

In questo lavoro sono state considerate solo le molecole odorose percepibili con Odour Activity Values (OAV) > 1, è stato possibile valutare l'effetto sensoriale del trattamento sugli aromi fermentativi analizzando il rapporto OAV tra esteri etilici e acetati. Un rapporto OAV basso è associato a descrittori tropicali, mentre un rapporto alto è legato ad aromi di frutta come mela e banana (Ferreira et al., 1995).

È emerso che l'aggiunta eseguita al mosto produce un rapporto OAV inferiore del 25% rispetto a quello calcolato su tutti gli altri campioni, incluso il controllo non trattato.

Lo stesso studio ha confermato che la bentonite influisce negativamente sulla persistenza (HS) e sulla quantità (HM) di schiuma nei vini spumanti. Tuttavia, anche l'epoca di trattamento influisce su questi parametri. I vini base che subiscono l'aggiunta di bentonite durante la fermentazione mostrano parametri HS e HM più elevati (Lira et al., 2014).

3.5.4 Valorizzazione degli aromi varietali

Di recente è stata condotta una sperimentazione sulla varietà Moscato di Chambave per valutare gli effetti della bentonite sui terpeni (aromi varietali). Come nei casi precedenti, gli effetti sono stati verificati paragonando diverse epoche di intervento. Anche in questo caso, il campione trattato prima della fermentazione presentava una concentrazione di terpenoli liberi superiore a tutti gli altri campioni trattati in fasi successive della vinificazione. Inoltre, il campione trattato prima della fermentazione è stato ritenuto il migliore anche dal panel di esperti che ha condotto l'analisi sensoriale (Lambri et al., 2008).

3.5.5 Riduzione dei reflui enologici

Per ridurre i reflui enologici e le perdite economiche, un esperimento condotto in Australia su scala reale con diverse bentoniti a diversi dosaggi ha dimostrato che il tempo necessario alla bentonite per interagire e flocculare con le proteine è di soli 30 secondi. Ciò consente alle cantine che producono grandi volumi di ripensare l'approccio alla stabilizzazione proteica, riducendo drasticamente i tempi necessari per il trattamento attraverso il dosaggio e la filtrazione in continuo del vino da trattare, abbinando la chiarifica con bentonite alle tecniche di filtrazione tangenziale o centrifugazione normalmente utilizzate (Muhlack et al., 2006).

Per quanto riguarda l'effetto dell'epoca di trattamento, è chiaro che un trattamento con bentonite fatto a mosto o durante la fermentazione permette di rimuovere la bentonite insieme alle fecce in un unico passaggio, mentre il trattamento a vino prevede per forza la necessità di un ulteriore travaso (con perdita ulteriore di volume di vino) in aggiunta a quelli già eseguiti precedentemente.

4 SCOPO DELLA TESI

Il distaccamento di Conegliano dell'Università di Padova svolge un ruolo chiave nella ricerca scientifica viticola ed enologica, sia a livello territoriale che oltre. Per questa ragione, abbiamo voluto sperimentare e verificare alcune delle informazioni bibliografiche riguardanti l'utilizzo della bentonite in diverse fasi del processo di vinificazione. Il nostro lavoro su scala pilota si propone di confrontare gli effetti di una stabilizzazione proteica ipotetica eseguita nel mosto, durante la fermentazione e infine nel vino. In particolare, volevamo verificare se l'efficienza della bentonite fosse maggiore quando utilizzata nel mosto prima (rimossa) o durante la fermentazione, e se la presenza della bentonite potesse rappresentare un fattore di inibizione dell'attività fermentativa del lievito.

Questo studio può fornire dati complementari a quelli riportati da altre ricerche sull'uso della bentonite in vinificazione, che già attestano miglioramenti nella valorizzazione aromatica e

nella qualità dell'effervescenza dei vini spumanti. La nostra sperimentazione è stata condotta utilizzando un mosto ricavato da uve Glera.

Se combinati con quelli già verificati in letteratura, questi dati possono rappresentare, nelle mani degli enologi uno supporto decisionale che permetterebbe di raggiungere risvolti qualitativi significativi; considerata la rilevanza produttiva, sociale ed economica che questa varietà ha nella filiera produttiva del Prosecco.

5 MATERIALI E METODI

5.1 Mosto

Il mosto utilizzato per le sperimentazioni è stato ottenuto al 100% da uva Glera dell'annata 2023, proveniente da una cantina specializzata nella produzione di Prosecco. Dopo essere stato flottato (chiarificato senza bentonite) e sterilizzato con un filtro tangenziale a 0,45µm, è stato poi conservato a una temperatura di 0°C per tutto il periodo invernale. Le prove sono state condotte nel periodo febbraio-marzo 2024.

5.2 Bentonite

Abbiamo utilizzato la stessa bentonite sodica impiegata dall'azienda che ci ha fornito il mosto, al fine di garantire che il nostro lavoro su scala pilota possa costituire la base per una sperimentazione su scala industriale con la medesima bentonite già in uso e inserita nei protocolli di chiarifica dell'azienda. Il prodotto commerciale utilizzato è PLUSGRAN GEL, prodotto dall'azienda Enologica Vason S.p.A. Si tratta di una montmorillonite sodica attivata di origine americana, la cui formulazione granulata la rende più facilmente attivabile, riducendo i tempi di reidratazione. Prima dell'uso, è stata reidratata in acqua con un rapporto di diluizione 1/20 (p/v) per più di 48 ore.

5.3 Test di Stabilità

Per ogni campione, la torbidità iniziale è stata misurata utilizzando un nefelometro. Successivamente, il liquido è stato posto in una provetta Pyrex, riscaldato a 80°C per 6 ore, e poi raffreddato a 4°C durante la notte per permettere la coagulazione delle proteine instabili (Pocock e Rankine, 1973). Dopo questo processo, la torbidità è stata misurata nuovamente. Il vino è considerato stabile se il Δ tra la torbidità finale e quella iniziale è ≤ 2 NTU.

5.4 Quantificazione delle Proteine

Il metodo KDS (Vincenzi et al., 2005) è stato utilizzato per estrarre le proteine dai vini. Questo metodo è rapido e semplice rispetto ad altri metodi che possono richiedere sistemi complessi per la purificazione delle proteine e possono essere influenzati da sostanze interferenti. Da ogni campione filtrato, è stato prelevato 1 mL a cui sono stati aggiunti 10 μ L di SDS al 10% (p/v). Sono state eseguite tre repliche (A, B e C) per ogni campione.

Ogni campione è stato bollito in acqua per 5 minuti, seguito dall'aggiunta di 250 μ L di KCl 1M. Il sodio-dodecil-solfato (SDS) denatura le proteine, mentre il cloruro di potassio (KCl) si lega formando il KDS (potassio-dodecil-solfato). Il KDS, legato alle proteine, non è solubile e crea una soluzione torbida. I campioni sono stati centrifugati a 13000 giri per 10 minuti e sottoposti a tre lavaggi con 1 mL di KCl 1M. Dopo ogni lavaggio, il campione è stato nuovamente centrifugato. Il pellet rimanente è stato risospeso in 500 μ L di acqua deionizzata e utilizzato per la quantificazione proteica mediante saggio con BCA (acido bicinconinico, Pierce). Prima del prelievo, le provette sono state scaldate a bagnomaria per omogeneizzare il campione. Come standard per la retta di taratura, è stata utilizzata albumina di siero bovino (BSA) in concentrazioni scalari da 62.5 a 1000 μ g/mL.

La lettura è stata effettuata su una piastra di polistirene da 96 pozzetti, con 25 μ L di campione e 200 μ L di reattivo (preparato mescolando 50 parti di reattivo A e 1 parte di reattivo B). Dopo 30 minuti di incubazione a 37°C, la lettura è stata eseguita mediante lettore di piastre (Microplate reader, Euroclone) a 550 nm.

5.5 Prove Preliminari e Scelta del Dosaggio

Al fine di determinare il corretto dosaggio di bentonite da impiegare per raggiungere la stabilità proteica, sono state condotte sette prove con una dose incrementale di 3 g/hL, partendo dal campione non trattato fino ad arrivare a 18 g/hL. Le diverse prove sono state effettuate trattando 50 mL di vino in tubi tipo Falcon. Dopo una corretta agitazione, i campioni sono stati centrifugati e filtrati sottovuoto (0,45 μ m), verificando che la torbidità residua fosse inferiore a 2 NTU. Successivamente, i campioni sono stati messi in stufa per sottoporli al test di stabilità termica (Heat Test) e, infine, è stata misurata nuovamente la torbidità.

In base alle torbidità registrate, abbiamo verificato che la dose necessaria per la stabilizzazione sarebbe addirittura superiore a 18 g/hL. Si è deciso di utilizzare per le prove comparative un dosaggio pari a 8 g/hL. In modo da non arrivare a stabilità ma avere ancora una torbidità residua che permetta di apprezzare le differenze tra i trattamenti.

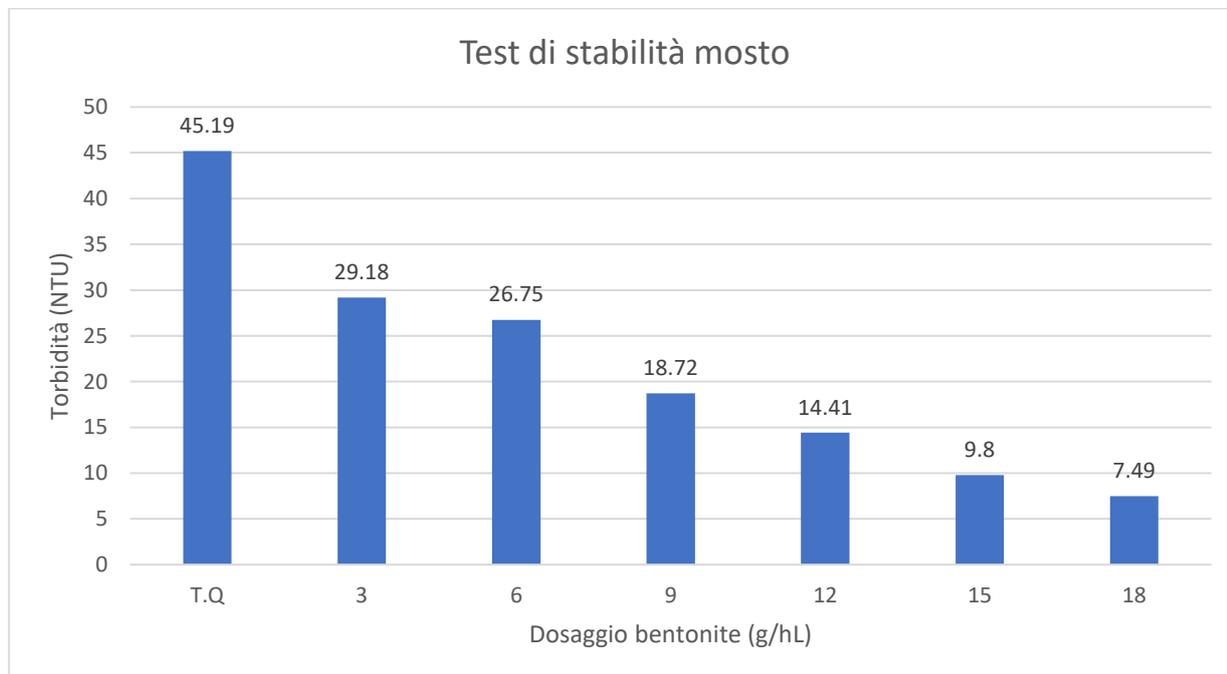


Grafico 1. Δ NTU sviluppati dall' "Heat Test" nei saggi per individuare il dosaggio di bentonite

5.6 Procedimento e raccolta dati

Per ognuna delle tre sperimentazioni con bentonite era prevista una prova in triplicato: l'aggiunta e la rimozione attraverso filtrazione prima della fermentazione (B/A, B, C), l'aggiunta durante la fermentazione prima della fase esponenziale (BF/A, B, C) e i campioni di controllo da trattare al termine della fermentazione (TQ/A, B, C). Queste prove sono state eseguite parallelamente utilizzando due ceppi di lieviti diversi (QA23 e SOEC7). In totale, sono state preparate 18 beute, ciascuna contenente 220 mL di mosto.

I campioni SOEC B/A, B, C e QA23 B/A, B, C sono stati addizionati di bentonite per poi rimuoverla con la filtrazione sterile sottovuoto (0,45µm) alla quale comunque sono stati sottoposti tutti i campioni per rimuovere eventuali lieviti contaminanti. Prima di iniziare la vinificazione, è stato integrato azoto prontamente assimilabile (APA) con di-ammonio fosfato alla concentrazione di 200 mg/L.

Le beute, 9 per ciascun lievito, sono state inoculate con i rispettivi ceppi e tappate con un gorgogliatore tipo Pasteur per mantenere costante la tensione di vapore. La fermentazione alcolica (FA) è stata condotta in un ambiente termocondizionato, inizialmente a 18°C per favorire l'acclimatemento del lievito, poi abbassata a 16°C. I campioni sono stati pesati con una bilancia di precisione (risoluzione 0,01g) ogni 24 ore per monitorare l'andamento della FA, poiché il consumo di zuccheri è direttamente proporzionale alla produzione di CO₂, che corrisponde alla perdita di peso rilevata durante la FA

N.B. ($C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2CH_3CH_2OH + 2CO_2 + 18Kcal$).

Una volta sviluppati i primi 2 grammi di CO₂ (circa 1,2% Vol.), anche i campioni SOEC BF/A, B, C e QA23 BF/A, B, C sono stati addizionati di bentonite. Infine, al termine della FA, anche le beute SOEC7 TQ/A, B, C e QA23 TQ/A, B, C hanno subito il trattamento. Tutti i campioni sono stati nuovamente filtrati sottovuoto (0,45µm). Un'aliquota di ciascun campione è stata estratta per la quantificazione delle proteine, mentre la restante parte è stata sottoposta al test di stabilità, comprendente la verifica della torbidità iniziale (< 2 NTU), "Heat Test" e la misurazione finale della torbidità sviluppata.

Sono stati sottoposti alla quantificazione proteica anche un campione di mosto tal quale, precedentemente isolato e conservato in frigo, per quantificare le proteine totali di partenza e un campione di vino tal quale ricavato prelevando un'aliquota dalle beute SOEC7 TQ e QA23 TQ prima del trattamento con bentonite. Questo secondo campione è tornato utile per quantificare le proteine che vengono perse naturalmente nel processo di vinificazione.

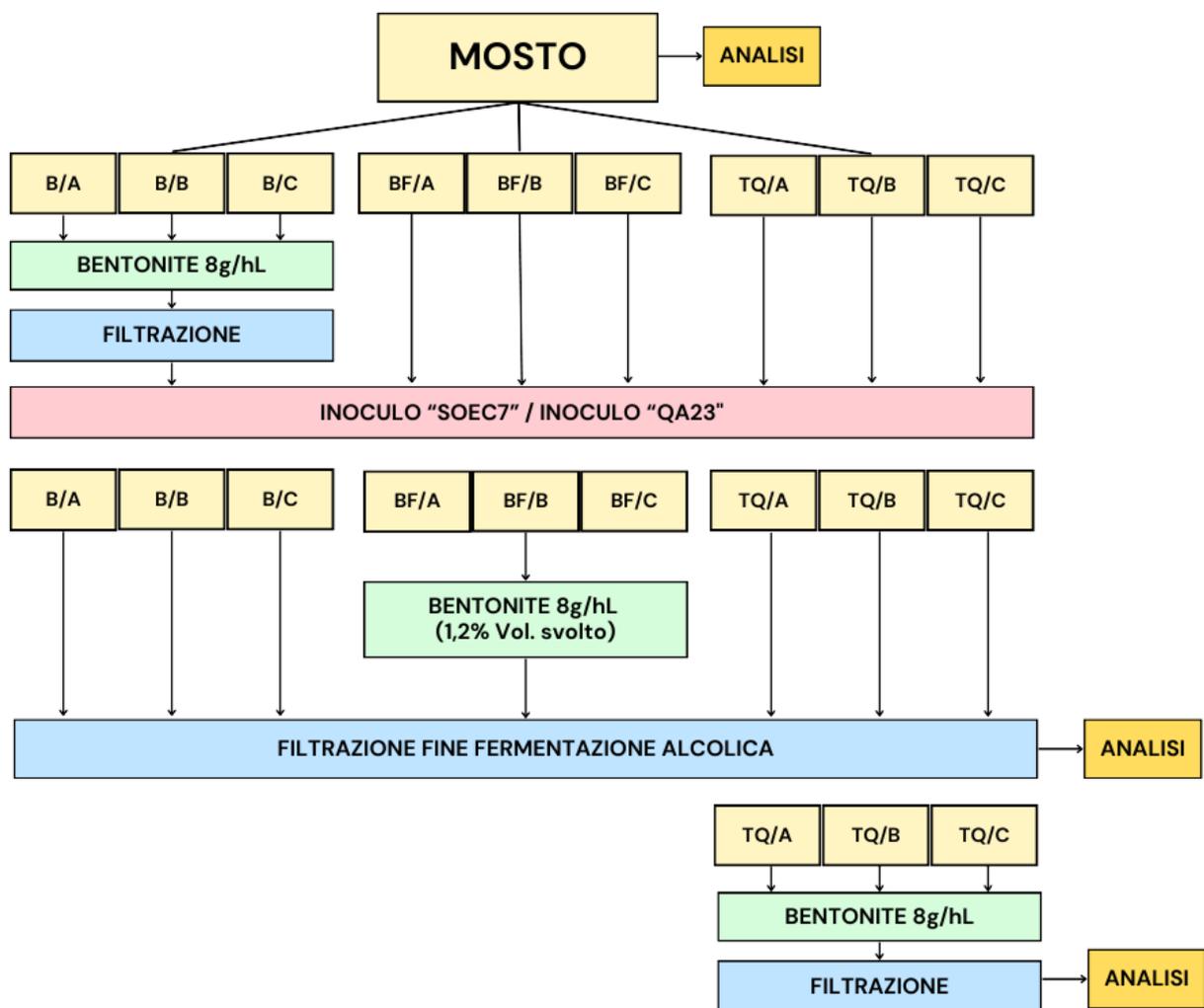


Figura 2. Schema di lavoro seguito nella sperimentazione, questo modello è stato applicato per ognuno dei 2 ceppi di lievito.

6 RISULTATI

6.1 Effetti della Bentonite sulla Fermentazione

Osservando le curve di fermentazione si può notare che non ci sono effetti evidenti del trattamento con bentonite sulla cinetica di produzione di anidride carbonica. Nonostante in letteratura sia riportato che un trattamento con bentonite su mosto potrebbe rimuovere delle sostanze nutritive rallentando la fermentazione, in questo caso non si notano grandi differenze, probabilmente anche perché è stata comunque eseguita una correzione dell'azoto prontamente assimilabile prima dell'inoculo dei lieviti. Inoltre, i lieviti sono stati reidratati con l'ausilio di un prodotto specifico per la reidratazione il cui scopo è proprio quello di fornire gli steroli necessari al lievito per le prime fasi di moltiplicazione.

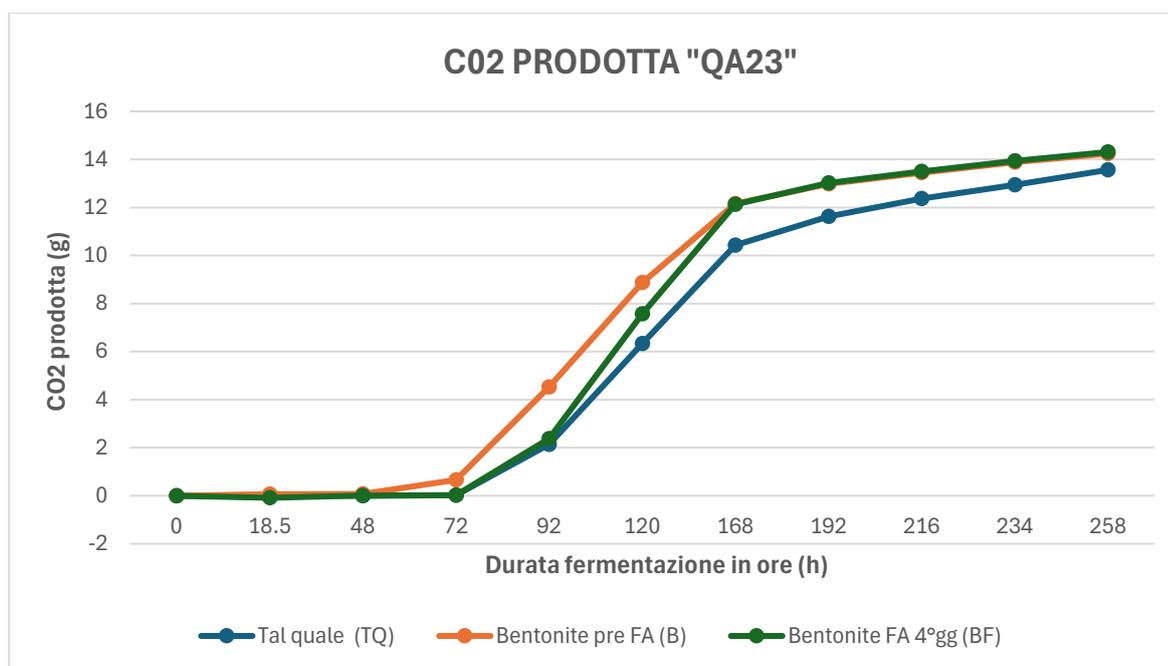


Grafico 2. Andamento delle fermentazioni dei campioni inoculati con il ceppo di lievito "QA23"

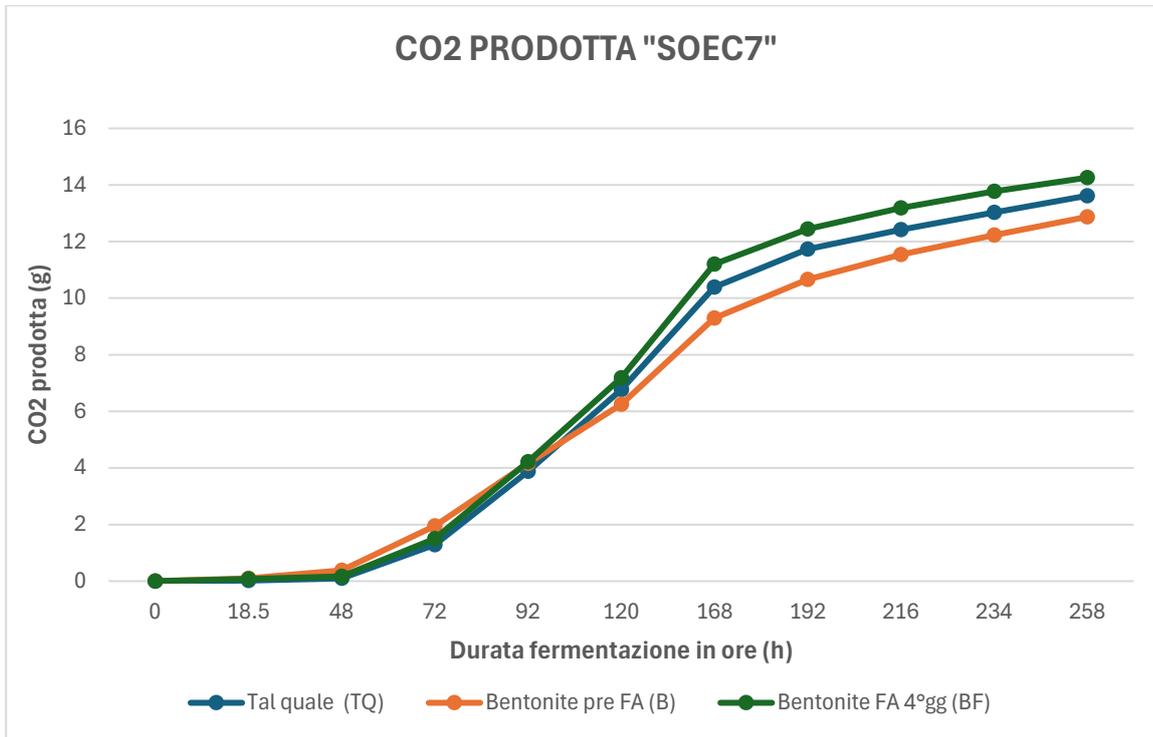


Grafico 3. Andamento delle fermentazioni dei campioni inoculati con il ceppo di lievito "SOEC7"

6.2 Effetto della bentonite sulle proteine

L'analisi per la quantificazione delle proteine ha fornito dati molto interessanti. Il trattamento con bentonite eseguito sul vino al termine della fermentazione (TQ) è risultato il meno efficace, asportando solo il 23,8% delle proteine totali misurate nel mosto. In presenza di bentonite aggiunta prima della fermentazione (B), si osserva un incremento delle proteine assorbite, raggiungendo il 32,9% di quelle totali. Il risultato più significativo si nota aggiungendo la bentonite durante la fermentazione (BF), dove le proteine totali vengono ridotte del 50,6%.

Rielaborando i dati, emerge che, se consideriamo l'aggiunta di bentonite durante la fermentazione (BF) come la condizione con la massima efficienza di riduzione proteica (ipotizzata al 100%), possiamo confrontare l'efficacia degli altri trattamenti in relazione a quest'ultimo. Il trattamento eseguito prima della fermentazione (B) ha una resa inferiore del

34,9% rispetto a BF. Nel campione trattato dopo la fermentazione (TQ) la bentonite ha un rendimento paragonato a BF praticamente dimezzato (53%). Questa interpretazione evidenzia quanto sia ridotto il fabbisogno di bentonite nei campioni trattati nel corso della fermentazione (BF) che permetterebbe addirittura di dimezzare la dose per assorbire la stessa quantità di proteine del canonico trattamento a vino. Risultati simili hanno ottenuto Lambri e colleghi (2012) che con il trattamento a mosto hanno raggiunto un contenuto di 45 mg/L di proteine, mentre con lo stesso dosaggio di bentonite eseguito su vino hanno invece misurato 75 mg/L di proteine. In questo caso i ricercatori non avevano eseguito un trattamento durante la fermentazione per cui non è possibile avere una comparazione per questo tipo di trattamento.

L'analisi statistica non ha mostrato un'influenza del ceppo di lievito in nessuna delle 3 tipologie di trattamento. Tuttavia, si può osservare una tendenza che mostra una quantità maggiore di proteine in tutti i campioni "SOEC7". Nel caso del QA23, la riduzione di proteine ottenuta aggiungendo la bentonite durante la fermentazione è significativa, mentre non è significativa la differenza tra gli altri due trattamenti. Per il ceppo SOEC7, nonostante sia evidente una maggiore rimozione di proteine con il trattamento durante la fermentazione, la differenza non risulta significativa dal punto di vista statistico. Si conferma invece che il trattamento a mosto o a vino non ha mostrato differenze significative in termini di proteine rimosse.

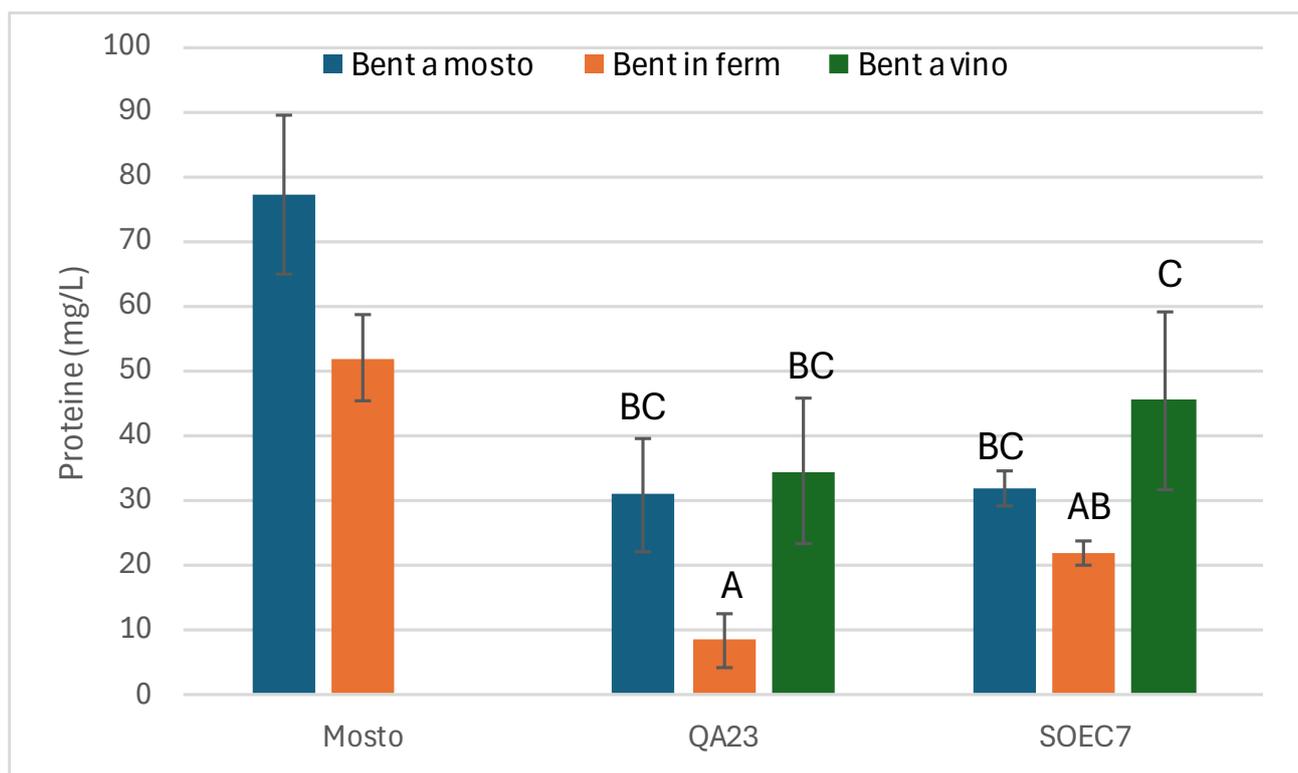


Grafico 4. Analisi statistica delle proteine residue per ogni campione. N.B. le prime due colonne mostrano il mosto tal quale e il mosto trattato con la dose di riferimento. (8g/hL)

Tabella 5. % Proteine rimosse dalla bentonite, % dalla fermentazione alcolica, % sul totale di proteine residue a fine trattamento e informazioni relative all' efficacia deproteinizzante della bentonite in relazione all' epoca di intervento.

CAMPIONE	PROTEINE RIMOSSE % SU MOSTO T.Q.		
	% BENTONITE	% FA	% PROTEINE RESIDUE
QA23 TQ	28.2	27.3	44.5
QA 23 B	32.9	27.3	39.8
QA 23 BF	62.1	27.3	10.6
SOEC7 TQ	19.3	26.3	54.4
SOEC7 B	32.9	26.3	40.8
SOEC7 BF	39.0	26.3	28.1
MEDIA TQ	23.8	26.8	49.4
MEDIA B	32.9	26.8	40.3
MEDIA BF	50.6	26.8	19.3
EPOCA DI TRATTAMENTO	% EFFICIENZA BENTONITE		
TQ/POST FA	47.0		
B/PRE FA	65.1		
BF/FA	100.0		

6.3. Effetto sulla stabilità proteica

Nonostante l'uso di una dose non stabilizzante di bentonite individuata con il test di stabilità proteica eseguito sul mosto (8 g/hL), tutti i campioni nel test finale sono risultati stabili, ovvero hanno sviluppato un Δ di torbidità < 2 NTU (o prossimo). Questa potrebbe essere una indicazione del fatto che il test di stabilità eseguito su mosto non è del tutto attendibile. In questo caso è stato utilizzato un test a caldo, che è considerato uno dei più affidabili per stimare la stabilità proteica, ma questo tipo di test potrebbe risentire della presenza degli zuccheri, e quindi sovrastimare il dosaggio di bentonite da utilizzare. Questo potrebbe essere un limite per un eventuale trattamento su mosto, a meno che non si riesca a trovare un test di stabilità alternativo all' heat test che sia applicabile anche sul mosto senza rischio di sovrastima.

Un'altra possibile spiegazione potrebbe essere dovuta ad un effetto stabilizzante della fermentazione. Infatti, la fermentazione potrebbe causare, anche semplicemente mediante aumento del grado alcolico, la precipitazione naturale di una parte delle proteine del mosto. Inoltre, bisogna considerare che durante la fermentazione i lieviti rilasciano nel vino anche delle mannoproteine che sono note per avere funzione di colloidali protettori, per cui la stessa quantità di proteine che risulta instabile nel mosto potrebbe invece risultare stabile nel vino.

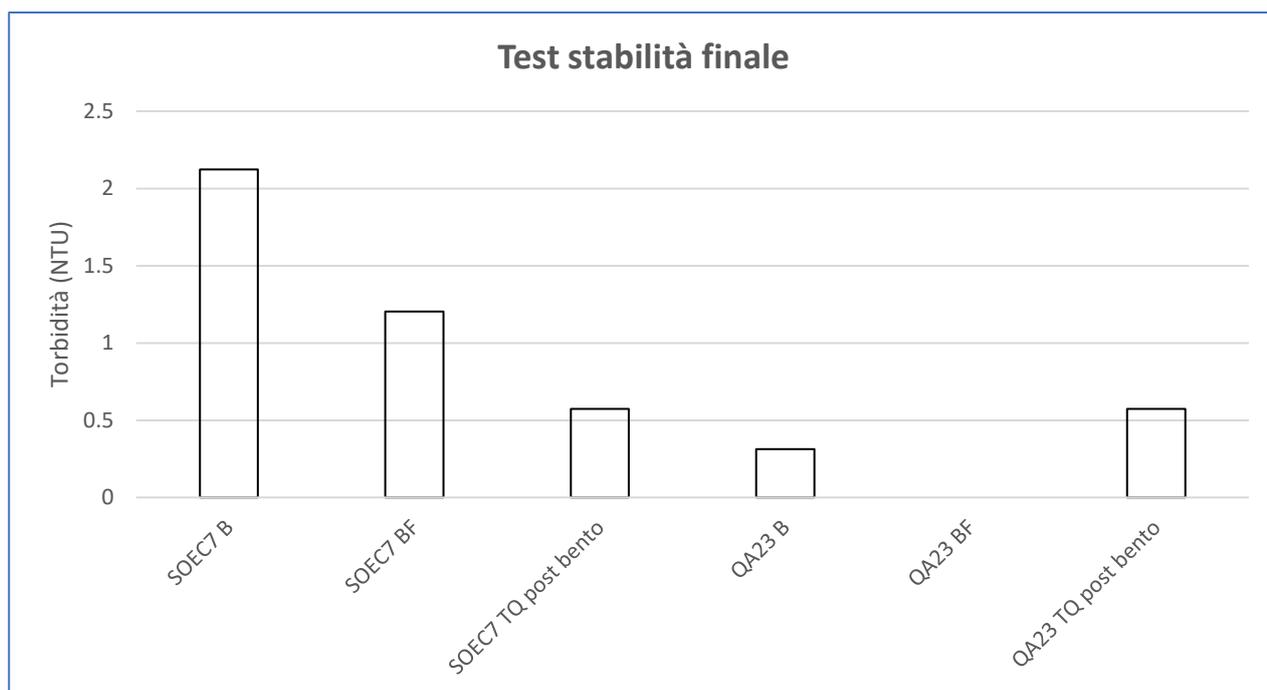


Grafico 6 Instabilità generata dall'Heat test espressa come delta torbidità pre e post test

7. CONCLUSIONI

Secondo quanto rilevato con questa sperimentazione e confrontando i dati ottenuti con le citazioni bibliografiche, possiamo affermare che trattare il vino con la bentonite durante la fermentazione risulta essere il metodo più efficiente per precipitare le proteine instabili. Questo approccio riduce i costi dell'intervento sia per la dose ridotta da impiegare, sia perché al termine della fermentazione la bentonite può essere rimossa insieme alle fecce di fermentazione. Tuttavia, data l'attuale impossibilità di eseguire un test di stabilità attendibile sul mosto, l'approccio che può adottare l'enologo è quello di basarsi sullo storico dei dati registrati per ogni varietà.

Il tecnico può impiegare nel mosto una dose \leq al 50% di quella utilizzata solitamente nel vino per ottenere la stabilità, per poi eseguire un test di "rifinitura" sul vino finito. Questo ulteriore trattamento, se necessario sarà comunque meno invasivo sia in termini di fecce prodotte che di aromi rimossi dal prodotto.

Per quanto riguarda l'influenza della bentonite sulla cinetica fermentativa non abbiamo riscontrato differenze molto significative e comunque, almeno in questo caso, non abbiamo avuto prove che la bentonite possa inibire la crescita del lievito.

Dovrebbe essere tenuto conto del fatto che il mosto iniziale presentava un contenuto medio-basso di proteine. È probabile che l'utilizzo di un mezzo molto più instabile e ricco di proteine possa esaltare le differenze rilevate tra le varie prove.

8. BIBLIOGRAFIA

Esteruelas, M., Poinaut, P., Sieczkowski, N., Manteau, S., Fort, M., Canals, J., & Zamora, F. (2009). Characterization of natural haze protein in sauvignon white wine. *Food Chemistry*, 113(1), 28–35. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.07.031>

Falconer, R. J., Marangon, M., Van Sluyter, S. C., Neilson, K. A., Chan, C., & Waters, E. J. (2010). Thermal Stability of Thaumatin-Like Protein, Chitinase, and Invertase Isolated from Sauvignon blanc and Semillon Juice and Their Role in Haze Formation in Wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(2), 975–980. <https://doi.org/10.1021/jf902843b>

Ferreira, V., Fernández, P., Peña, C., Escudero, A., & Cacho, J. F. (1995). Investigation on the role played by fermentation esters in the aroma of young Spanish wines by multivariate analysis. *Journal of the Science of Food and Agriculture/Journal of the Science of Food and Agriculture*, 67(3), 381–392. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740670316>

Fracassetti, D., Limbo, S., Pellegrino, L., & Tirelli, A. (2019). Il difetto di luce nel vino bianco: Effetto ed evoluzione nel corso della conservazione. *Bio Web of*

Conferences/BIO Web of Conferences, 15, 02028.
<https://doi.org/10.1051/bioconf/20191502028>

Kallay, M. e Bodi Szalkai, M. (1997) Biogenic amines in Hungarian wines. *Rivista Di Viticoltura E Di Enologia*, 49(3), 0370–7865.
<https://agris.fao.org/search/en/providers/122556/records/64775cbd5eb437ddff76e774>

Koch, D. (2002). Bentonites as a basic material for technical base liners and site encapsulation cut-off walls. *Applied Clay Science*, 21(1–2), 1–11.
[https://doi.org/10.1016/s0169-1317\(01\)00087-4](https://doi.org/10.1016/s0169-1317(01)00087-4)

Košmerl, T., Šučur, S., & Prosen, H. (2013). Biogenic amines in red wine: The impact of technological processing of grape and wine / BIOGENI AMINI V RDEČEM VINU: VPLIV TEHNOLOŠKE PREDELAVE GROZDJA IN VINA. *Acta Agriculturae Slovenica*, 101(2).
<https://doi.org/10.2478/acas-2013-0021>

Lambri, M., Dordoni, R., Silva, A., & De Faveri, D. M. (2011). Comparing the impact of bentonite addition for both must clarification and wine fining on the chemical profile of wine from Chambave Muscat grapes. *International Journal of Food Science & Technology*, 47(1), 1–12. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2011.02800.x>

Lambri, M., Dordoni, R., Silva, A., & Manara, M. (2008). Impiego di bentonite su mosto e vino di una cultivar aromatica. *IRIS PubliCatt*, 2008, 1–6.
<https://publicatt.unicatt.it/handle/10807/21784>

Lira, E., Salazar, F. N., Rodríguez-Bencomo, J. J., Vincenzi, S., Curioni, A., & López, F. (2013). Effect of using bentonite during fermentation on protein stabilisation and sensory properties of white wine. *International Journal of Food Science & Technology*, 49(4), 1070–1078. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12402>

Lukić, I., & Horvat, I. (2020). Moment of Bentonite Addition, Co-Addition of Tannins, and Bentonite Type Affect the Differential Affinity of Pathogenesis-Related Grape Proteins towards Bentonite during Fermentation. *Foods*, 9(11), 1534. <https://doi.org/10.3390/foods9111534>

Majewski, P., Barbalet, A., & Waters, E. (2011). 1 billion hidden cost of bentonite fining. Deleted Journal, 569, 58–62. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=3684251>

Mannino, M., Vassanelli, G., & Triulzi, G. (2006). Trattamenti al vino per ridurre il contenuto in ammine biogene e loro quantificazione. *Vignevini: Rivista Italiana Di Viticoltura E Di Enologia*, 33(1), 72–76. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=2505073>

Marangon, M., Lucchetta, M., & Waters, E. (2010). Protein stabilisation of white wines using zirconium dioxide enclosed in a metallic cage. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 17(1), 28–35. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2010.00112.x>

Muhlack, R., Nordestgaard, S., Waters, E., O’neill, B., Lim, A., & Colby, C. (2006). In-line dosing for bentonite fining of wine or juice: Contact time, clarification, product recovery and sensory effects. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 12(3), 221–234. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2006.tb00062.x>

Pocock, K. F., & Rankine, B. C. (1970). Heat test for detecting protein instability in wine. *Australian Wine, Brewing and Spirit Review*, 91(42–34).

Pocock, K., Salazar, F., & Waters, E. (2011). The effect of bentonite fining at different stages of white winemaking on protein stability. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 17(2), 280–284. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2011.00123.x>

Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B., & Lonvaud, A. (2017). *Trattato di enologia*.

Salazar, F. N., Marangon, M., Labbé, M., Lira, E., Rodríguez-Bencomo, J. J., & López, F. (2017). Comparative study of sodium bentonite and sodium-activated bentonite fining during white wine fermentation: its effect on protein content, protein stability, lees volume, and volatile compounds. *European Food Research & Technology*, 243(11), 2043–2054. <https://doi.org/10.1007/s00217-017-2917-z>

Sauvage, F., Bach, B., Moutounet, M., & Vernhet, A. (2010). Proteins in white wines: Thermo-sensitivity and differential adsorption by bentonite. *Food Chemistry*, 118(1), 26–34. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.02.080>

Vincenzi, S., Marangon, M., Tolin, S., & Curioni, A. (2010). Protein evolution during the early stages of white winemaking and its relations with wine stability. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 17(1), 20–27. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2010.00113.x>

Vincenzi, S., Mosconi, S., Zoccatelli, G., Pellegrina, C. D., Veneri, G., Chignola, R., Peruffo, A., Curioni, A., & Rizzi, C. (2005). Development of a new procedure for protein recovery and quantification in wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 56(2), 182–187. <https://doi.org/10.5344/ajev.2005.56.2.182>

Vincenzi, S., Panighel, A., Gazzola, D., Flamini, R., & Curioni, A. (2015). Study of combined effect of proteins and bentonite fining on the wine aroma loss. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(8), 2314–2320. <https://doi.org/10.1021/jf505657h>