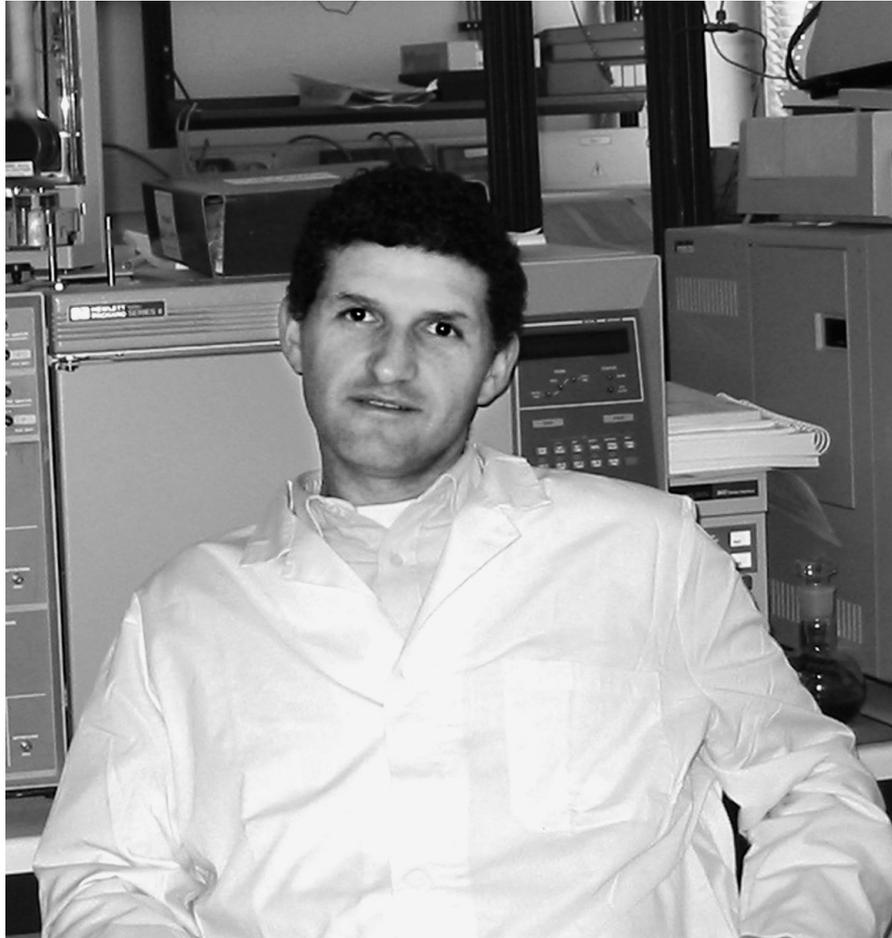


DOCUMENTO
TECNICO

***Roberto Larcher**
***Daniela Bertoldi**
****Massimo R. Luzzana**
****Dario Agnellini**
***Giorgio Nicolini**

** UO Enologia e Chimica
Agraria, Istituto Agrario di San
Michele all'Adige*

*** Dip. Scienze e Tecnologie
Biomediche, Facoltà di
Medicina, Università di Milano*



R. Larcher

ANALISI DELL'UREA: NUOVO METODO IN PH-METRIA DIFFERENZIALE E SUA APPLICAZIONE AGLI SPUMANTI

Viene presentata una nuova metodica di analisi dell'urea con la tecnica della pH-metria differenziale, valutando le prestazioni in comparazione con la usuale metodica enzimatica. Si presentano inoltre i risultati di un'indagine sui tenori di urea, potenziale precursore del carbammato di etile, in spumanti di Franciacorta, del Trentino e dell'Oltrepò Pavese.

Introduzione

Basse concentrazioni di carbammato di etile (uretano) sono naturalmente presenti in molti alimenti e bevande fermentati. Tale composto, presente normalmente anche nei vini in bassissime concentrazioni, si è rivelato essere potenzialmente cancerogeno, così da imporre in talune nazioni l'adozione di limiti alla sua presenza ed in generale l'utilizzo di particolari attenzioni tanto nelle fasi di produzione delle uve che nei

processi di trasformazione. L'origine della formazione di carbammato di etile nei vini risiede principalmente nella reazione acido-catalizzata tra urea ed etanolo, anche se pure citrullina e carbammilfosfato sono dei possibili precursori [Kodama et al., 1994; Monteiro et al., 1989; Ough et al., 1988; Stevens e Ough, 1993]. Diversi fattori possono essere annoverati tra quelli favorevoli alla formazione di uretano, e tra questi la predisposizione di talune cultivar (ad es. i Pinot) ad accumulare

arginina [Nicolini et al., 2001], spesso in concorso con particolari condizioni climatico-ambientali o scelte agronomiche [Millery et al., 1986; Versini et al., 1995; Bertamini et al., 1998], o l'impiego di attivanti di fermentazione azotati [Monteiro e Bisson, 1992]. I ceppi di lievito evidenziano specifica capacità di produrre rapidamente urea durante la fermentazione a partire dall'arginina, mostrando invece, in generale, maggiore difficoltà nella sua metabolizzazione



Fig. 1 - Linearità delle misure ottenute operando in tampone secondo le modalità di analisi "fix time" e "end point"

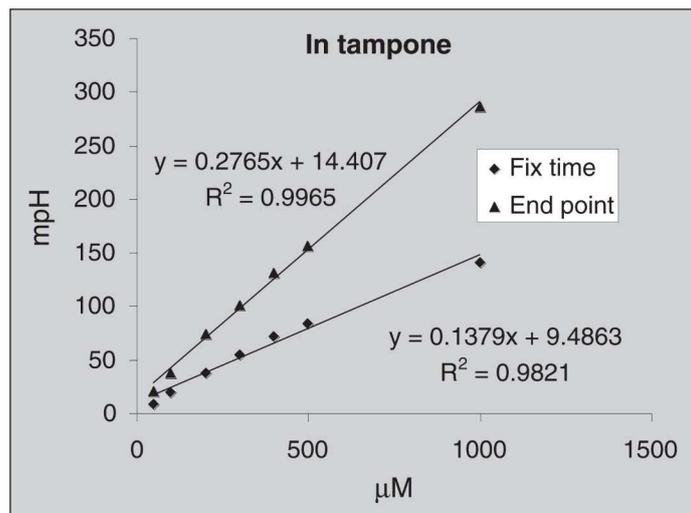
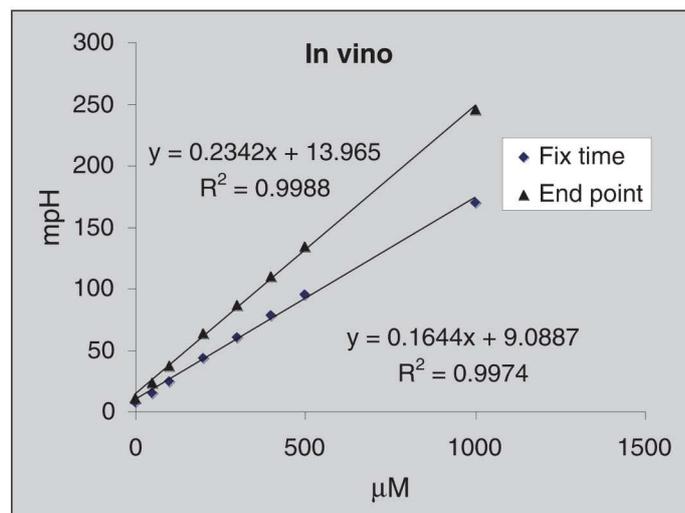


Fig. 2 - Linearità delle misure ottenute operando in vino secondo le modalità di analisi "fix time" e "end point"



[Monteiro e Bisson, 1991]. La sosta dei vini sulle fecce di lievito è un ulteriore fattore di potenziale incidenza, potendo contribuire, in conseguenza dei fenomeni di autolisi, ad un aumento del contenuto di amminoacidi, tra cui l'arginina [Margheri et al., 1984].

L'utilizzo dell'ureasi [Fujinawa et al., 1990, 1992] è attualmente l'unica via per abbattere eventuali elevati contenuti di urea, nella prospettiva di limitare il rischio di produzione di uretano. Come per altri enzimi di utilizzo enologico, però, i bassi valori di pH nei vini, ed ancor più negli spumanti, e la presenza di etanolo tendono ad una parziale limitazione della sua attività. Nel presente lavoro si propone l'utilizzo innovativo della tecnica della pH-metria differenziale quale strumento per una veloce ed accurata quantificazione dell'urea nei vini. La tecnica - già applicata per l'analisi degli zuccheri in campo alimentare ed enologico [Larcher, 1998; Luzzana et al., 2001], e per l'analisi dell'urea in campo medicale [Bonucchi et al., 1987] e nel settore lattiero-caseario [Luzzana e Giardino, 1999] - viene qui validata sui vini in confronto con la tradizionale metodica enzimatica. Si riportano inoltre i contenuti di urea misurati in 50 vini spumanti commercia-

li prodotti col metodo classico in Trentino, Franciacorta ed Oltrepò Pavese. Per eventuali approfondimenti circa le metodiche per l'analisi dell'urea, si rimanda a quanto riportato tra i riferimenti bibliografici [Almy e Ough, 1989; Douglas e Bremner, 1970; Francis et al., 2002; Kodama e Suzuki, 1995; Matsudo e Sasaki, 1995; Nagel e Weller, 1989].

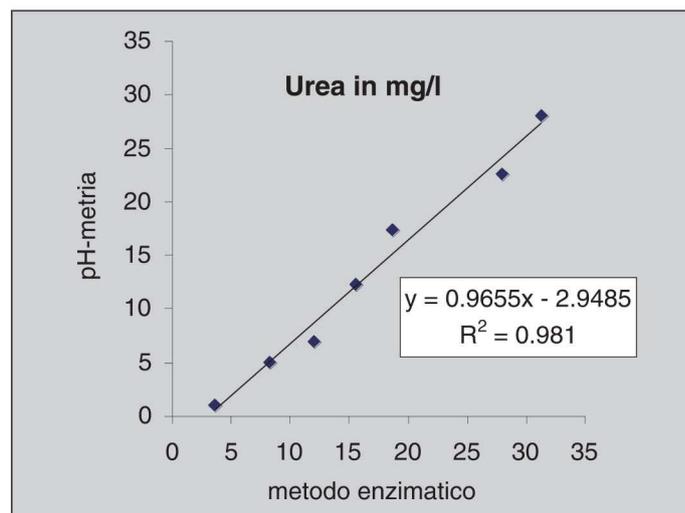
Materiali e metodi

La pH-metria differenziale. La tecnica si basa sulla possibilità di correlare variazioni di pH, misurabili tra due elettrodi a vetro, alla quantità di H⁺ prodotti o consumati da una reazione chimica attivata dall'aggiunta di uno specifico enzima. L'utilizzo analitico di questo processo richiede di tamponare opportunamente il mezzo al fine di mantenere costante, in un intervallo di pH sufficientemente esteso (circa 500 mpH), la relazione tra la variazione di pH del mezzo e la quantità di substrato consumato dalla reazione.

I vantaggi di tale tecnica sono riconducibili principalmente ai seguenti aspetti:

- trattandosi di una misura differenziale, il segnale rilevato è unicamente proporzionale alla quantità di analita

Fig. 3 - Contenuti di urea (mg/L) misurati per pH-metria differenziale in confronto con i contenuti misurati per via enzimatica



trasformato; eventuali reazioni aspecifiche avvengono contemporaneamente nei due canali dello strumento, annullandosi.

- A differenza delle metodiche colorimetriche o delle tradizionali enzimatiche con misura spettrofotometrica, è esente da interferenze di tipo ottico. Ciò permette di analizzare, senza preventiva diluizione, prodotti caratterizzati da una elevata assorbanza, come nel caso di campioni di vino intensamente colorati o di mosti di elevata torbidità.

- I tempi di misura sono contenuti.

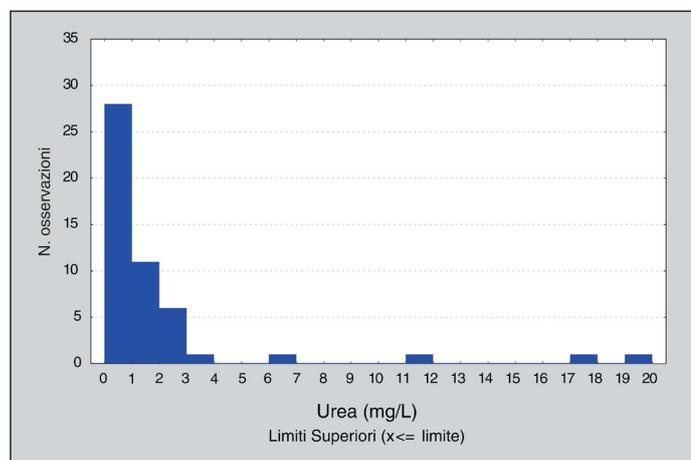
L'analisi. È stata eseguita con il pH-metro differenziale CL 10 Micro Plus controllato dal software dedicato installato su PC. I reattivi sono costituiti da un tampone di lavoro a pH 6.2 (citrato 5 mM, fosfato 5 mM, KCl 0.1 M, MgCl₂ 10 mM, Triton 2%, Na₂N₃ 10 mg/L) e dall'ureasi (3000 U/ml) in glicerolo al 50%. La stabilità delle soluzioni così preparate è dell'ordine dei 6 mesi circa.

Come soluzioni di calibrazione sono state utilizzate sia soluzioni acquose di urea aggiustate a pH 6.2 che vino preventivamente privato dell'urea per via enzimatica



Tab. 1 - Contenuti di urea (mg/L) in spumanti commerciali italiani per zona di origine

Franciacorta	Trentino	Oltrepo' pavese
2.3	0.7	1.0
1.1	0.8	0.6
0.9	0.8	0.7
2.3	1.7	0.7
0.6	1.1	0.4
0.6	0.5	0.5
0.4	2.6	2.7
1.0	0.9	0.9
0.5	17.2	1.2
1.0	2.5	0.7
0.3	0.8	1.0
1.2	1.1	
19.5	3.7	
0.4	1.9	
11.4	2.4	
0.6	1.2	
0.5	6.2	
1.1	0.7	
0.6		
1.2		
1.1		

Fig. 4 - Distribuzione dei contenuti di urea (mg/L) in 50 spumanti metodo classico commerciali italiani

(aggiunta di ureasi successivamente inattivata), decarbonicato, portato a pH 6.2 e quindi riaggiunto di urea a diversi livelli di concentrazione.

I campioni di vino da sottoporre all'analisi devono essere adeguatamente decarbonicati ed il loro pH preventivamente portato al valore di 6.2 con NaOH 1M. Tale correzione di pH, oltre a ad otti-

mizzare l'attività dell'enzima, permette di ottenere la migliore sensibilità analitica.

La procedura di analisi prevede l'introduzione manuale del campione mediante micropipetta in una cella, ove avviene la miscelazione automatica con il tampone. Dopo 30 secondi, necessari per la termostatazione, una piccola aliquota del campione tamponato viene automaticamente

trasferita verso i due elettrodi di pH per una misura prima della reazione. Successivamente si aggiungono 8 µL di soluzione di ureasi al campione, si omogeneizza, ed un'aliquota viene trasferita per la misura al secondo elettrodo (il primo elettrodo rimane immerso nel campione tamponato, ma senza aggiunta di enzima). Il progredire della cinetica di reazione è visualizzato a schermo in tempo reale come differenza del pH agli elettrodi. Ciò consente un controllo visivo diretto del profilo della reazione per una immediata valutazione di eventuali anomalie nella cinetica, quali ad esempio quelle dovute a reagenti esauriti, alla non corretta introduzione del campione o ad una eventuale inibizione della reazione enzimatica. La misura di un secondo valore di pH al secondo elettrodo, dopo un tempo di reazione opportunamente fissato, consente di definire un delta di pH (pH finale - pH iniziale) direttamente correlabile con la concentrazione di urea nel campione. L'analisi di soluzioni a titolo noto consente la creazione di un modello di taratura per la quantificazione di campioni a titolo incognito.

Nel presente lavoro sono state valutate sia condizioni di misura dopo un tempo di reazione opportunamente predefinito (Fix point), sia a completamento della reazione e conseguente stabilizzazione del pH (End point). Al termine di ogni misura la strumentazione viene lavata con una soluzione di HCl 25 mM per l'eliminazione di ogni residuo di enzima o di campione.

Risultati della ricerca

Operando su soluzioni acquose di standard opportunamente tamponate in un range di concentrazione da 0 a 1500 µM di urea (Figura 1), la metodica ha evidenziato livelli di linearità simili tra le tecniche in "end point" ($R^2 = 0.9965$) e "fix time" ($R^2 =$

0.9821), con una maggiore sensibilità per la prima (pendenza di 0.2765 contro 0.1379 mpH/ µM).

Operando su campioni di vino spumante aggiunti di urea (Figura 2), la metodica ha confermato la linearità sia in "end point" che in "fix time", evidenziando una limitata differenza di sensibilità tra le due tecniche (pendenza di 0.2342 contro 0.1644 mpH/ µM), tuttavia meno marcata rispetto a quanto osservato operando in tampone.

La risposta strumentale osservata, sia operando in fix time che in end point, sia su soluzioni acquose che su vino, permette di ritenere adottabile un modello di calibrazione lineare, operativamente definibile con l'analisi di un campione di bianco (acqua) e di un solo campione a titolo noto (soluzione acquosa o vino). In considerazione dei livelli di sensibilità analitica richiesti per la quantificazione dell'urea nei vini, si propone di operare con l'approccio "fix time" così da ottenere un significativo risparmio nel tempo d'analisi.

La metodica enzimatica in pH-metria differenziale è stata messa inoltre a confronto con il tradizionale metodo enzimatico per via spettrofotometrica Boehringer-Mannheim. I risultati ottenuti su campioni di vino con aggiunta di urea in un range da 0 a 30 mg/L sono risultati ben correlati ($R^2 = 0.981$; Figura 3) con una buona corrispondenza tra i valori misurati, come indicato dalla pendenza della retta (0.9655) molto prossima all'unità. Le misure effettuate su 50 vini spumanti presentavano uno scarto medio tra le due tecniche pari a 0.9 mg/L in larga parte riconducibili alla scarsa sensibilità (1-2 ppm) della metodica enzimatica Boehringer-Mannheim [Fujinawa et al., 1990]. I metodi enzimatici tradizionali quantificano infatti l'urea come differenza tra i contenuti di ammonio prima e dopo trattamento con ureasi. Ciò richiede ulteriori diluizioni nel caso di presenza di maggiori li-



velli di ammonio nel campione, come nel caso del vino spumante, con conseguente perdita di sensibilità e precisione.

Urea nei vini spumanti.

Nella figura 4 è riportata la distribuzione dei valori di concentrazioni di urea misurati con la tecnica della pH-metria differenziale nei campioni di spumante metodo classico. Nella tabella 1 sono riportati gli stessi valori ripartiti per zona di produzione. Tutti i valori riscontrati nei campioni di vino spumante analizzati rientravano nel campo di linearità del metodo in pH-metria differenziale, tra 0 e 60 mg/L. In particolare si può osservare che, in 11 dei 50 campioni analizzati, il contenuto di urea superava i 2 mg/L e, tra questi, in 4 casi venivano superati i 5 mg/L, livello ritenuto da FDA di rischio per la produzione di carbammato di etile. Due campioni presentavano contenuti tra i 17 ed i 20 mg/L ca.

Considerazioni conclusive

L'approccio impiegato nella determinazione dell'urea nel vino mediante la pH-metria differenziale è risultato essere specifico e sufficientemente sensibile. La correzione iniziale del pH del campione e la decarbonizzazione sono le sole operazioni preparative all'analisi. Il limite di rilevabilità è stimabile a 5 mM, corrispondenti a 0.3 mg/L di urea, significativamente più basso di quello riportato per la metodica enzimatica tradizionale Boehringer-Mannheim. L'analisi del campione viene completata in circa due minuti.

L'approccio di pH-metria differenziale, quantificando direttamente l'urea, non risulta essere interferito dalla eventuale presenza di elevate concentrazioni di ione ammonio.

L'utilizzo della metodica in pH-metria differenziale ha consentito di porre in luce

come il livello dei contenuti di urea anche in prodotti commerciali di ottima qualità possa talora essere abbastanza elevato e comunque tale da far meditare circa le scelte viti-enologiche aziendali e le loro ricadute in termini di potenziale produzione indesiderata di carbammato di etile. ■

Summary

Urea analysis: new method by differential pH-metry and its application to sparkling wines. The spontaneous reaction in wine of urea with ethyl alcohol can form ethyl carbamate with aging. As this compound has been recognized as potentially carcinogenic and limits have been established to its concentration in wine in USA and Canada, the availability of effective methods for the analysis of urea, main potential precursor, is welcome. An innovative method by Differential pH Technique is presented for the quantitative determination of urea in wine, and compared with Boehringer's traditional enzymic method. The new method was applied to the measurement of the content of urea in 50 "classic method" sparkling wines from the most renowned Italian areas: Trentino, Franciacorta and Oltrepo' Pavese.

Ringraziamenti. Si ringrazia la dottoressa Claire Victoria Marchitti per la fattiva collaborazione.

Bibliografia

Almy J., Ough C.S. Urea analysis for wines. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 37, 968-970. 1989.

Bertamini M., Malossini U., Nicolini G. Free amino acid levels of musts: role of training system (cv. Chardonnay). *Proc. 10th Meeting GESCO, Changins (CH)*, 180-184. 1988.

Bonucchi D., Ripamonti M., Castellani A., Orlandini G.C., Luzzana M. Uremia monitoring. *Differential pH technique*

for urea determination. *Medical focus* 3, 12-13. 1987.

Douglas L.A., Bremner J.M. Colorimetric determination of microgram quantities of urea. *Analytical letters* 3[2], 79-87. 1970.

Francis P.S., Lewis S.W., Lim K.F. Analytical methodology for the determination of urea: current practice and future trends. *TRAC-Trends in Analytical Chemistry* 21[5], 389-400. 2002.

Fujinawa S., Todoroki H., Ohashi N., Toda J., Terasaki M. Application of an acid urease to wine: determination of trace urea in wine. *Journal of Food Science* 55[4], 1018-1038. 1990.

Fujinawa S., Kodama S., Todoroki H., Suzuki T. Trace urea determination in red wine and its degradation rate by acid urease. *American Journal of Enology and Viticulture* 43[4], 362-366. 1992.

Kodama S., Suzuki T. Highly sensitive method for urea determination in wine. *Journal of Food Science* 60[5], 1097-1099. 1995.

Kodama S., Suzuki T., Fujinawa S., De La Teja P., Yotsuzuka F. Urea contribution to ethyl carbamate formation in commercial wines during storage. *American Journal of Enology and Viticulture* 45[1], 17-24. 1994.

Larcher R. Quantification by Differential pH-metry of the reducing sugar content in must through enzymatic reaction. Comparison with Fehling's oxidimetric technique. *Journal of Commodity Science* 38 [3], 157-165. 1998.

Luzzana M., Giardino R. Urea determination in milk by differential technique. *Lait* 79, 261-267. 1999.

Luzzana M., Agnellini D., Cremonesi P., Caramenti G. Enzymatic reactions for the determination of sugars in food samples using the differential pH technique. *Analyst* 126, 2149-2152. 2001.

Margheri G., Versini G., Dalla Serra A., Gianotti L., Pellegrini R., Mattarei C. L'autolisi del lievito in enologia. *VigneVini XI*[5], 25-28. 1984.

Matsudo T., Sasaki T. Determination of urea and citrulline in fermented foods and

beverages. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 59[5], 827-830. 1995.

Millery A., Duteutre B., Boudaille J. P., Maujean A. Differentiation des trois cépages champenois a partir de l'analyse des acides aminés libres des mouts des récoltes 1983 et 1994. *Rev. Fr. Oenologie, Cahier Scientifique* 103, 32. 1986.

Monteiro F.F., Trousdale E.K., Bisson L.F. Ethyl carbamate formation in wine - use of radioactively labeled precursor to demonstrate the involvement of urea. *Am. J. Enol. Vitic.* 40[1], 1-8. 1989.

Monteiro F.F., Bisson L.F. Amino acid utilization and urea formation during vinification fermentations. *Am. J. Enol. Vitic.* 42, 199-208. 1991.

Monteiro F.F., Bisson L.F. Nitrogen supplementation of grape juice. II. Effect on amino acid and urea release following fermentation. *Am. J. Enol. Vitic.* 43, 11-17. 1992.

Nagel C.W., Weller K.M. Colorimetric determination of urea in wine. *American Journal of Enology and Viticulture* 40[2], 143-144. 1989.

Nicolini G., Larcher R., Ramponi M. Contenuto di ammonio e profilo aminoacidico di mosti varietali dell'annata 1999. *L'Enologo* 37[3], 79-87. 2001

Ough C.S., Crowell E.A., Mooney L.A. Formation of ethyl carbamate precursor during grape juice (Chardonnay) fermentation. I. Addition of amino acids, urea, and ammonia: effects of fortification on intracellular and extracellular precursor. *American Journal of Enology and Viticulture* 39[3], 243-249. 1988.

Stevens D.F., Ough C.S. Ethyl carbamate formation: reaction of urea and citrulline with ethanol in wine under low to normal temperature condition. *American Journal of Enology and Viticulture* 44[3], 309-312. 1993.

Versini G., Lunelli M., Sepi A., Dalla Serra A., Volontario G. Aspetti connessi alla produzione di vini base-spumante da Chardonnay e Pinot nero. *L'Enotecnico*, 31[4], 49. 1995.

