



CESSIONE DI FENOLI DA SUGHERO E STABILITÀ PROTEICA DEI VINI

I tappi di sughero possono cedere tannini al vino in funzione della loro qualità, del materiale costitutivo e delle modalità di lavaggio applicate nella loro produzione. I tannini rilasciati nei vini bianchi possono essere sufficienti per legare le proteine precipitandole irreversibilmente e creare intorbidamenti. Lisozima e residui di gelatina possono causare torbidità, non sono invece destabilizzate le chitinasi dell'uva.



Di
Antonio Tirelli
Mario Gabrielli
Daniela Fracassetti

Dipartimento di Scienze per gli Alimenti,
la Nutrizione e l'Ambiente (DeFENS),
Università degli Studi di Milano

(Da sinistra nella foto)

INTRODUZIONE

■ Il sughero è il materiale tradizionalmente utilizzato per la tappatura delle bottiglie di vino. Le sue caratteristiche tecnologiche, microbiologiche e sensoriali sono influenzate dalle pratiche di sanificazione tra cui il trattamento con vapore, la bollitura e l'uso del perossido d'idrogeno, atte a prevenire la comparsa di muffe e difetti olfattivi (Vlachos

et al. 2007; Rocha *et al.* 1996). Sebbene il 2,4,6-tricloroanisolo sia la molecola maggiormente temuta dagli enologi, anche i tannini del sughero potrebbero influenzare negativamente la qualità del vino. Questi composti sono caratterizzati da gruppi gallici e poli-gallici, sia liberi che glicosidati, e da derivati di tannini ellagici (Fernandes, *et al.* 2009).

■ I tannini idrolizzabili presenti nel sughero sono chimicamente simili a quelli che vengo-

no ceduti dal legno durante l'affinamento del vino in botte, ma difficilmente possono influenzare le proprietà gustativo-tattili del vino rosso a causa delle basse quantità rilasciate attraverso la limitata superficie di contatto tra sughero e vino nel collo della bottiglia (Hale *et al.* 1999), peraltro trascurabili rispetto al contenuto di polifenoli già presenti nel vino.

■ Gli aspetti cinetici e quantitativi della ces-



DOCUMENTO TECNICO

sione dei composti fenolici del sughero in vino bianco non sono stati ancora studiati, così pure la loro interazione con le proteine del vino e la comparsa di torbidità. Chitinasi e proteine taumatina-simili (TLP) sono le proteine principalmente responsabili di questo difetto in vino (Waters *et al.* 2005) a causa della loro elevata sensibilità al calore (Falconer *et al.* 2010) ed alla presenza di tannini d'uva (Waters *et al.* 2005; Esteruelas *et al.* 2011). La loro stabilità non sembra invece essere influenzata da fenoli d'uva a basso peso molecolare (Pocock *et al.* 2007), ma non è noto l'effetto dei tannini del sughero sulla stabilità proteica dei vini bianchi.

■ La formazione di precipitati proteici nel vino bianco può essere anche causata dall'aggiunta di lisozima, proteina comunemente utilizzata per impedire lo sviluppo dei batteri lattici (Gerbaux *et al.* 1997; Gerbaux *et al.* 1999). Il lisozima, nonostante la sua buona solubilità in vino, evidenzia un'elevata sensibilità al calore (Bartowsky *et al.* 2004) e la capacità di interagire con i composti fenolici del vino che lo insolubilizzano rapidamente e irreversibilmente (Gerbaux *et al.* 1999; Tirelli *et al.* 2007). Inoltre, le quantità di lisozima aggiunte in vinificazione sono comparabili o superiori alle concentrazioni di TPL e chitinasi normalmente presenti nel vino prima della stabilizzazione proteica (Waters *et al.* 2005; Le Bourse *et al.* 2011).

■ Anche la gelatina animale è una proteina comunemente utilizzata in vinificazione per la chiarifica (Manfredini 1989; Ribereau-Gayon *et al.* 2006) e quantità residue (surcolaggio) potrebbero essere responsabili della

comparsa di torbidità a causa dall'interazione con i tannini presenti nel vino.

■ In questo lavoro è stato valutato il rilascio di composti fenolici da diverse tipologie di sughero (granulare, rondelle e tappi) in soluzione modello. Inoltre, è stata monitorata la comparsa di torbidità sia in soluzioni modello contenenti lisozima o gelatina animale che in vino bianco prima della stabilizzazione proteica.

MATERIALI E METODI

Sugheri valutati

I sugheri commerciali valutati sono riportati in **Tab. 1**. Tutti i campioni sono stati sanificati con acqua o vapore in fase di produzione con l'eccezione del campione 3. I tappi e le rondelle di sughero naturale sono comunemente classificati in almeno quattro classi di qualità commerciale definite con lettere da A (migliore) a D (peggiore), in base alle irregolarità visibili sulla superficie (Stazione Sperimentale del Sughero 1996). Per tutti i campioni è stata misurata la cessione di tannini e per i tappi (campioni 8-10) è stato valutato l'effetto sulla stabilità proteica.

Rilascio di composti fenolici da sughero granulare, rondelle e tappi di sughero naturale

■ La cessione di tannini da sughero è stata valutata usando aliquote da 30 g di sughero gra-

nulare, o l'equivalente di circa 320 cm² di superficie per i tappi o le rondelle, immersi in 250 mL di una soluzione modello con pH 3.2 costituita da 3 g/L di acido tartarico, 12 % etanolo (v/v), 150 mg/L di EDTA, 100 mg/L di sodio metabisolfito, mantenuta immobile a 25°C.

■ I composti fenolici rilasciati sono stati determinati per via spettrofotometrica a 270 nm ed i risultati sono stati espressi come µg di acido gallico per cm² di sughero.

Instabilità della gelatina animale e del lisozima in soluzioni tanniche modello

■ Le stabilità della gelatina (50 mg/L) e del lisozima (50-75-100 mg/L) in presenza di tannini da sughero è stata valutata nella soluzione modello addizionata di concentrazioni crescenti di composti fenolici (da 5 a 50 mg/L) estratti dal sughero. I campioni sono stati conservati a 20°C ± 1°C sino alla comparsa della torbidità. La precipitazione proteica indotta dal rilascio di composti fenolici ceduti da tappi sughero è stata valutata utilizzando lo strumento Metalomeccanica JAV (Egitron, Mozelos, Portogallo) (**Fig. 1**) che permetteva di eseguire fino a 24 prove da 5 mL ciascuna in parallelo simulando la condizione del collo della bottiglia durante la conservazione di vino. Le valutazioni sono state eseguite usando gelatina (50 mg/L) o lisozima (50 mg/L) e tappi birondellati o di sughero naturale.

■ Le prove sono state svolte parallelamente con soluzione modello priva o aggiunta della proteina. Il prelievo è stato eseguito quanto la torbidità si è presentata nel 50%

Tab. 1 - Prodotti del sughero valutati. In parentesi è riportata la classe commerciale

Codice	Prodotto	Diametro (mm)	Altezza (mm)	Origine	Sanificazione	Paraffinatura
1	Granuli	-	0.5-1.5	Italia	Vapore	No
2	Granuli	-	1	Spagna	Vapore	No
3	Granuli	-	2-4	Spagna	No	No
4	Granuli	-	2-4	Spagna	Vapore	No
5	Granuli	-	2-3	Portogallo	Vapore	No
6	Rondella (A)	26	6	Spagna	Vapore	No
7	Rondella (D)	26	6	Italia	Acqua	No
8	Birondellato (A)	23.5	43	Spagna	Vapore	Si
9	Birondellato (D)	23.5	43	Spagna	Acqua	Si
10	Naturale (A)	26	44	Italia	Vapore	Si



DOCUMENTO TECNICO

Tab. 2 - Quantità di composti fenolici rilasciati da 30 g di granuli di sughero dopo 64 ore di estrazione in soluzione modello

Codice	Superficie stimata (cm ²)	Fenoli	
		(mg/L)	(µg/cm ²)
1	6000	310 ± 7	12.91
2	6000	272 ± 5	11.33
3	2000	319 ± 2	39.88
4	2000	374 ± 9	46.75
5	2400	238 ± 6	24.79

dei campioni. La cessione di composti fenolici è stata quantificata nei campioni di soluzione modello privi di proteine, mentre la torbidità è stata valutata spettrofotometricamente (AU a 630 nm) nei campioni aggiunti di proteina.

Intorbidamento proteico in vino bianco

■ La comparsa di torbidità è stata valutata in vino bianco, prelevato prima del trattamento di stabilizzazione proteica, prodotto da uve Verdicchio nella vendemmia 2014. Le prove sono state effettuate con tappi di sughero naturale ed il controllo è stato rappresentato da campioni tappati con tappi siliconici utilizzando lo strumento Metalomeccanica JAV (Fig. 1).

■ Il contenuto di proteine nei campioni di vino è stato determinato con saggio enzimatico (Bradford, 1976). La torbidità è stata inoltre monitorata nello stesso vino bianco aggiunto di concentrazioni crescenti di composti fenolici estratti dal sughero (da 5 a 50 mg/L) e mantenuto a 20°C ± 1°C per 4 giorni.

RISULTATI E DISCUSSIONE

■ La presenza nel sughero di tannini gallici ed ellagici e fenoli a basso peso molecolare è stata riportata da diversi autori (Conde *et al.* 1997; Mazzoleni *et al.* 1998). Tuttavia, dati relativi alla loro estraibilità e migrazione in soluzione modello sono limitati (Varea 2001). Il rilascio di composti fenolici è influenzato da diversi fattori tra cui l'origine geografica del sughero, le sue fasi di produzione (Conde *et*

al. 1997), porosità, tempo di estrazione e superficie di contatto.

■ Il rilascio di composti fenolici è stato valutato in diversi lotti di sughero granulare (codificati da 1 a 5 in Tab. 1) la cui superficie specifica è stata stimata approssimando la forma dei granuli a cubi con lato di 0.5-4.0 mm (Tab. 2). Dopo circa tre giorni di estrazione i sugheri hanno mostrato cessioni specifiche finali molto diverse fra loro con valori che variavano da 11.33 a 46.75 µg/cm².

■ Entrambe le classi di rondelle (A e D) sono state prodotte con lo stesso trattamento di sanificazione e mostrano un'analoga cinetica di cessione fenolica sebbene la quantità assoluta ceduta dalla classe D sia stata 36% maggiore rispetto alla classe A (Fig. 2). La concentrazione di fenoli rilevata dopo 3 giorni ha mostrato valori di estraibilità specifica di 40.0 ± 4.8 e 92.0 ± 32.0 µg/cm² rispettivamente per le classi A e D (Fig. 2). Tali cessioni specifiche sono fino a 8 volte superiori a quelle evidenziate dalle rondelle probabilmente a causa dell'elevata superficie esposta dai granuli nel lavaggio che potrebbe aver causato un maggiore impoverimento in fenoli.

■ La formazione di torbidità con gelatina solubile a freddo è stata valutata preliminarmente in una soluzione modello addizionata di 50 mg/L di proteina. I valori di torbidità registrati in relazione alla concentrazione fenolica mostrano un andamento sigmoidale (Fig. 3) con salita esponenziale (torbidità visibile) per un rapporto di concentrazione tra fenoli e proteine superiore a 0.3.

■ Tappi bironcellati di classe A e D sono stati impiegati per valutare la comparsa di torbidità in condizioni analoghe al collo di bottiglia. L'intorbidamento prodotto dalla gelatina era chiaramente visibile nella zona adiacente alla

testa del tappo dopo tre giorni, con valori medi inferiori per la classe A (0.204 ± 0.123 AU_{630 nm}) rispetto alla classe D (0.347 ± 0.194 AU_{630 nm}). La quantità di fenoli rilasciati al momento della comparsa dell'intorbidamento è stata di 39.1 ± 13.3 e 86.6 ± 26.0 µg/cm², rispettivamente per le classi A e D.

■ La cessione di composti fenolici è stata anche monitorata in tappi di sughero naturale lubrificati con paraffina ed ha mostrato un comportamento simile a quello mostrato per le rondelle, ma con quantità di fenoli estratti (67 ± 8.2 µg/cm²) significativamente inferiore

Fig. 1 - Apparecchio per l'emulazione dei colli di bottiglia. Sono visibili i tappi bironcellati e la soluzione modello





DOCUMENTO TECNICO

Fig. 2 - Cinetica di rilascio dei composti fenolici da rondelle di sughero naturale (classe A e D) e da tappi di sughero naturale (A) in soluzione modello. Sono riportati i valori medi (n = 3) e la deviazione standard (barre verticali)

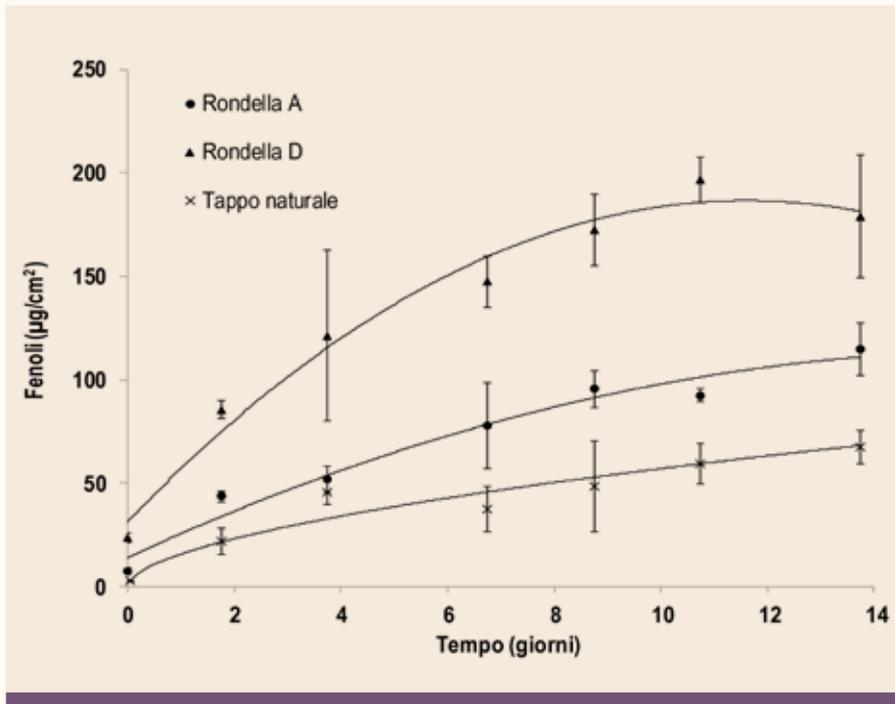
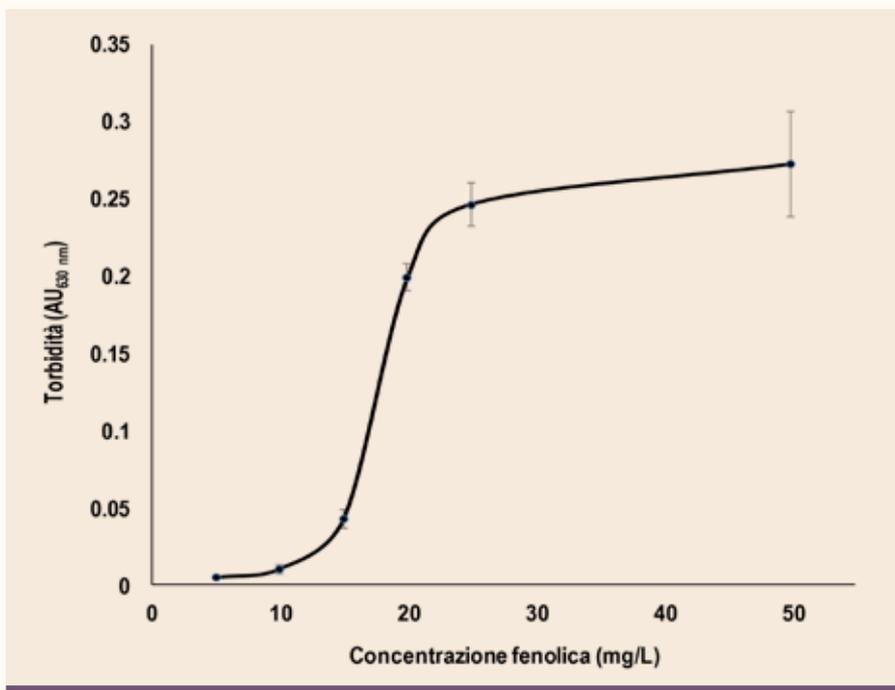


Fig. 3 - Valori di torbidità in soluzione modello addizionata di 50 mg/L di gelatina animale solubile a freddo e quantità crescenti di fenoli da sughero



a quanto osservato per le rondelle (**Fig.2**).

■ I risultati ottenuti evidenziano notevoli differenze tra le repliche a causa della variabilità naturale del tappo e della disomogenea ripartizione della paraffinatura fra i diversi tappi.

■ È stata valutata in analoghe condizioni anche la stabilità del lisozima, enzima spesso aggiunto al vino bianco per prevenire lo sviluppo di batteri lattici (Gerbaux *et al.* 1999). Soluzioni modello contenenti tre livelli di lisozima (50 mg/L, 75 mg/L e 100 mg/L) e aggiunte di concentrazioni crescenti di fenoli estratti da sughero hanno mostrato un aumento lineare ($r > 0.97$) della torbidità con la concentrazione di fenoli (**Fig. 4**).

■ La torbidità prodotta dalla presenza di tannino da sughero aumenta con l'aumentare da 50 a 75 mg/L della concentrazione di lisozima. Diversamente avviene portando la concentrazione di lisozima a 100 mg/L, evidenziando nel tenore proteico il fattore limitante nell'interazione con i tannini da sughero. La concentrazione di 50 mg/L di lisozima è stata considerata adatta per valutare la formazione di torbidità poiché confrontabile col contenuto proteico usuale del vino bianco (Le Bourse *et al.*, 2011; Waters *et al.*, 2005). Anche nel caso dei tappi naturali, la torbidità era chiaramente visibile (0.125 ± 0.041 AU_{630 nm}) nella zona adiacente al tappo ed è comparsa dopo 2 giorni in tutti i test quando il rilascio di composti fenolici era di 9.1 ± 4.1 µg/cm².

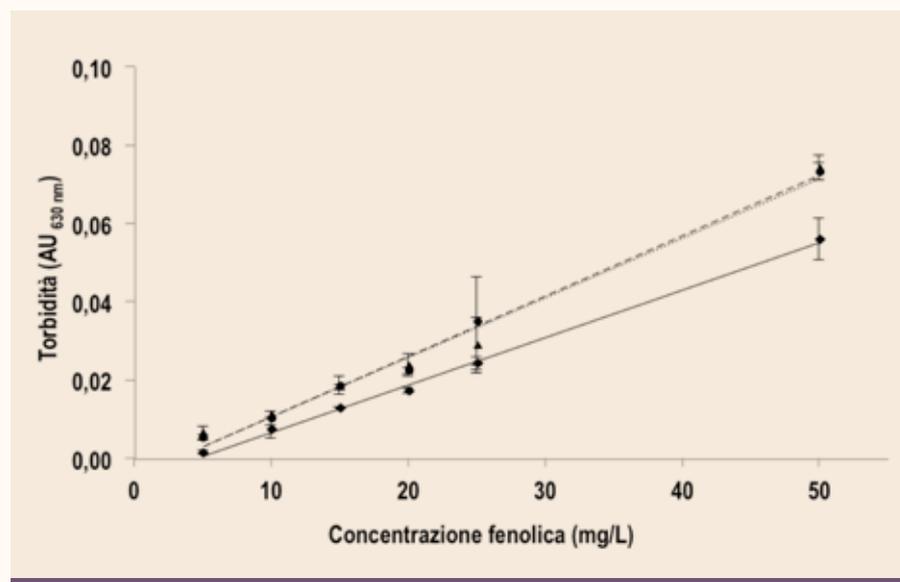
■ La quantità di fenoli ceduti in tali condizioni sperimentali era meno della metà rispetto a quelli rilevati dopo due giorni nella cinetica di rilascio effettuata con naturali tappi (22.0 ± 6.4 µg/cm²) (**Fig. 2**). Tale migrazione, sebbene trascurabile in rapporto ai 750 mL di vino solitamente contenuti in una bottiglia, potrebbe causare la comparsa di torbidità nella zona adiacente al tappo se la bottiglia fosse mantenuta ferma in posizione orizzontale come solitamente avviene durante la conservazione del vino.

■ La formazione di precipitati proteici è stata valutata in vino bianco non stabilizzato utilizzando sia tappi di sughero naturale che tappi siliconici (controllo). La precipitazione proteica è comparsa dopo 3 settimane in tutti i test e i valori di torbidità erano pari a 0.160 ± 0.046 AU_{630 nm} per il sughero e 0.147 ± 0.033 AU_{630 nm} per la plastica in corrispondenza di una cessione in fenoli di 19.9 ± 4.0 mg/L. Tali differenze non sono sufficienti da risultare



DOCUMENTO TECNICO

Fig. 4 - Valori di torbidità in soluzione modello addizionata di 50 (◆), 75 (●) e 100 (▲) mg/L di lisozima e quantità crescenti di fenoli da sughero



significative. Pertanto, la comparsa di precipitati proteici è da considerarsi indipendente dal rilascio di composti fenolici dal tappo di sughero.

■ L'inefficacia dei tannini da sughero nella precipitazione delle proteine del vino è stata ulteriormente confermata dall'assenza di precipitazione in campioni di vino bianco addizionati di 50 mg/L di composti fenolici del sughero. Di conseguenza, l'instabilità proteica del vino non è stata influenzata dalla migrazione di fenoli dal sughero. Come ulteriore prova, non è stata rilevata differenza significativa nel contenuto di proteine determinato nei campioni di vino tappati con sughero naturale (255 mg/L) e silicone (267 mg/L) dopo la comparsa dell'intorbidamento proteico.

■ I dati raccolti evidenziano come il rilascio di composti fenolici da tappi di sughero possa essere responsabile della comparsa di torbidità nel vino bianco in cui residuino colle proteiche usate per il trattamento di stabilizzazione. Maggiori rischi potrebbero verificarsi con l'aggiunta di lisozima come conservante nella fase di imbottigliamento. L'intorbidamento dovuto alla dissoluzione di fenoli dal tappo può verificarsi soprattutto se il rapporto tra tannini rilasciati e proteine è elevato.

■ Tale rapporto è di particolare importanza nella zona adiacente al tappo quando la

bottiglia venga conservata immobile in posizione orizzontale, condizione di conservazione comunemente impiegata che limita la diffusione dei composti fenolici ceduti dal sughero nell'intero volume del vino. Il rischio di precipitazioni proteiche può aumentare quando vengano utilizzati tappi di bassa qualità e/o tappi non lubrificati poiché entrambi i fattori favoriscono una maggiore cessione di composti fenolici. Anche le procedure di lavaggio/sanificazione del sughero potrebbero influenzare il rilascio di fenoli in vino. ■

BIBLIOGRAFIA

- Bartowsky, E. J., Costello, P. J., Villa, A., & Henschke, P. A. (2004). The chemical and sensorial effects of lysozyme addition to red and white wines over six months' cellar storage. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 10, 143-150.
- Conde, E.; Cadahía, E.; García-Vallejo, M. C.; Fernández de Simón, B.; González Adrados, J. R. (1997) Low molecular weight polyphenols in cork of *Quercus suber*. *J. Agric. Food Chem.* 45, 2695-2700.
- Esteruelas, M., Kontoudakis, N., Gil, M., Fort, M. F., Canals, J. M., & Zamora, F. (2011). Phenolic compounds present in natural haze protein of Sauvignon white wine. *Food Research International*, 44, 77-83.
- Falconer, R. J., Marangon, M., Van Sluyster, 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 Agriculture and Food Chemistry*, 58, 975-980.
- Fernandes, A., Fernandes, I., Cruz, L., Mateus, N., Ca-

bral, M., & de Freitas, V. (2009). Antioxidant and biological properties of bioactive phenolic compounds from *Quercus suber* L. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 57, 11154-11160.

■ Gerbaux, V., Meistermann, E., Cottureau, P. H., Barrière, C., Cuinier, C., Berger, J. L., & Villa, A. (1999). Use of lysozyme in enology. *Bulletin de l'O.I.V.*, 819-820, 348-373.

■ Gerbaux, V., Villa, A., Monamy, C., & Bertrand, A. (1997) Use of lysozyme to inhibit malolactic fermentation and to stabilize wine after malolactic fermentation. *American Journal of Enology and Viticulture*, 48, 49-54.

■ Hale, M. D., Mccafferty, K., Larmie, E., Newton, J., & Swan, J. S. (1999). The influence of oak seasoning and toasting parameters on the composition and quality of wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 50, 495-502.

■ Le Bourse, D., Conreux, A., Villaume, S., Lameiras, P., Nuzillard, J. M., & Jeandet, P. (2011). Quantification of chitinase and thaumatin-like proteins in grape juices and wines. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 401, 1541-1549.

■ Manfredini, M. (1989). Coadiuvanti enologici: sol di silice e gelatina. *Vignevini*, 1/2, 43-46.

■ Mazzoleni, V., Caldentey, P., & Silva, A. (1998). Phenolic compounds in cork used for production of wine stoppers as affected by storage and boiling of cork slabs. *American Journal of Enology and Viticulture*, 49, 6-10.

■ Pocock, K. F., Alexander, G. M., Hayasaka, Y., Jones, P. R., & Waters, E. J. (2007). Sulfatea candidate for the missing essential factor that is required for the formation of protein haze in white wine. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 55, 1799-1807.

■ Ribereau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., & Dubourdieu, D. (2006). *Handbook of enology, The chemistry of wine stabilization and treatments* (2nd ed.). Chichester: John Wiley & Sons Ltd (Vol. no. 2, Chapter 5).

■ Rocha, S., Delgado, I., & Ferrer Correia A. J. (1996). Improvement of the volatile components of cork from *Quercus suber* L. by an autoclaving procedure. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 44, 872-876.

■ Stazione Sperimentale del Sughero (1996), *Disciplinare sulla produzione ed utilizzo del tappo di sughero in enologia* (1996). Stazione Sperimentale del Sughero, Eds.; Publisher: Sassari, Italy, Tempio Pausania.

■ Tirelli, A., & De Noni, I. (2007). Evaluation of lysozyme stability in young red wine and model systems by a validated HPLC method. *Food Chemistry*, 105, 1564-1570.

■ Varea, S., García-Vallejo, M. C., Cadahía, E., & Fernández de Simón, B. (2001). Polyphenols susceptible to migrate from cork stoppers to wine. *European Food Research and Technology*, 213, 56-61.

■ Vlachos, P., Kapioti, A., Kornaros, M., & Lyberatos, G. (2007). Development and evaluation of alternative processes for sterilization and deodorization of cork barks and natural cork stoppers. *European Food Research and Technology*, 225, 653-663.

■ Waters, E. J., Alexander, G., Muhlack, R., Pocock, K. F., Colby, C., O'Neill, B. K., Hoj, P. B., & Jones, P. (2005). Preventing protein haze in bottled white wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 11, 215-225.

Si ringrazia la Società "Mureddu Sugheri" (Nerviano, Italia) per il supporto tecnico offerto.