

DOCUMENTO
TECNICO

S. Moretti

Simonetta Moretti
Domenico Tiberi
Paolo Pietromarchi

*Istituto Sperimentale per
 l'Enologia - S.O.P. Velletri (RM)*

LA PH-METRIA DIFFERENZIALE APPLICATA SU ALCUNE ANALISI ENOLOGICHE DI ROUTINE

È stata valutata l'affidabilità della pH-metria differenziale per la determinazione dell'acidità totale, degli zuccheri, dell'acido L-malico, dell'acidità volatile e del glicerolo. Il metodo adottato è risultato preciso ed accurato, oltre ad essere rapido e di semplice esecuzione, grazie alla completa automazione ed all'assenza di pretrattamento del campione.

Introduzione

I sistemi automatici o semiautomatici di analisi stanno prendendo sempre più piede nei laboratori. Questa presenza, favorita dall'evoluzione tecnica dei materiali e dei sistemi di rivelazione, è in relazione alla necessità di velocizzare i tempi di analisi, per liberare il tecnico da incombenze di tipo routinario ed assegnarlo quindi maggiormente a mansioni di controllo del processo e della tecnologia di produzione.

La determinazione dell'acidità totale, degli zuccheri, dell'acido L-malico, dell'acidità volatile, e del glicerolo sono tra le analisi più importanti in campo enologico. Le prime tre sono necessarie anche prima della vendemmia, per la determinazione delle curve di maturazione dell'uva e stabilire, quindi, in maniera più consapevole il periodo ottimale per la raccolta. Tutti questi parametri, inoltre, sono utili per controllare la regolarità del decorso della fermentazione

alcolica, come pure per il controllo del vino finito e per monitorare eventuali fermentazioni batteriche durante lo stoccaggio.

I metodi da utilizzare nei laboratori di analisi enologiche sono quelli del Regolamento Comunitario della Cee n. 2676/90 in cui sono descritti i metodi di analisi comunitari (1). Per l'esecuzione delle analisi in alcuni casi, come per il dosaggio degli zuccheri, è richiesta una preparazione preliminare del campione e la manualità ope-

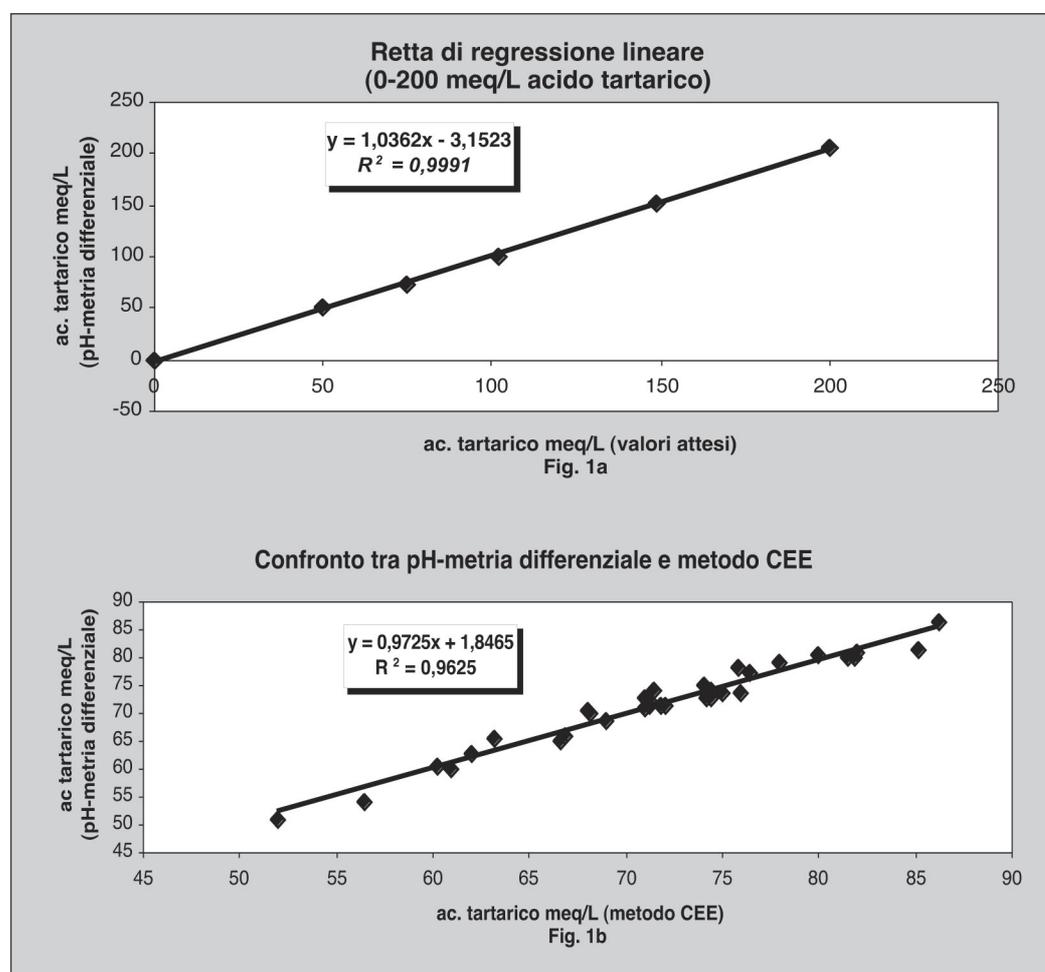


Tab 1A - Ripetibilità

	Media meq/L	r	CV%
Standard	99,69	0,69	0,69
12 B Torgiano Rosso	74,53	0,27	0,37
101 B Sagrantino Rosso	80,80	0,34	0,42

Tab. 1B - Riproducibilità

	Media meq/L	R	CV%
Standard	99,66	1,00	1,00
12 B Torgiano Rosso	74,16	0,84	1,13
101 B Sagrantino Rosso	80,72	0,51	0,63

Fig. 1 - Determinazione dell'acidità totale

rativa in sé risulta laboriosa, come pure accade anche per la determinazione dell'acidità volatile, condizioni che possono influenzare il valore analitico oltre ad allungare notevolmente il tempo di analisi.

In questa ottica è sembrato importante considerare uno

strumento che utilizza la tecnica elettrochimica nota come pH-metria differenziale, già ampiamente applicata in chimica clinica, e che potrebbe costituire un'alternativa interessante alle metodologie usualmente adottate per il controllo di qualità aziendale.

La tecnica della pH-metria differenziale si colloca fra le tecniche elettrochimiche (potenziometria), basate sul principio che la concentrazione di uno ione può essere valutata attraverso una misura di differenza di potenziale. In particolare, la pH-metria differenziale si basa sul-

la correlazione tra la variazione di pH (mpH), misurata da due elettrodi di vetro, e la concentrazione di ioni H⁺ prodotta o consumata da una reazione enzimatica.

Materiali e metodi

Il pH-metro differenziale utilizzato, completamente automatizzato, è costituito da un blocco di misura termostato alla temperatura di lavoro ideale dell'enzima (nella maggior parte dei casi 37°C) contenente la cuvetta di miscelazione (il cui contenuto è omogeneizzato da un piccolo magnete) e due elettrodi capillari di vetro. Il segnale (mV) proveniente dagli elettrodi viene convertito in mpH tramite un amplificatore differenziale ed elaborato da un microprocessore per il calcolo dell'unità di misura.

Tutti i reattivi necessari alla reazione enzimatica ed i campioni vengono aggiunti alla cella di misurazione tramite un braccio automatico. Lo strumento è gestito da un Software che risulta di facile ed immediata gestione per l'utilizzatore e soprattutto permette la catalogazione dei dati, tramite un database, dal momento dell'installazione all'ultima sessione di lavoro.

I metodi con cui si è confrontata la metodologia in esame sono quelli descritti nel Regolamento Comunitario della Cee n. 2676/90 (1). Più precisamente il dosaggio dell'acidità totale, quale somma delle acidità titolabili allorché si porta il pH a 7, mediante titolazione in presenza di blu di bromotimolo, come riportato all'allegato 13 del Reg. Cee. L'acidità volatile è stata dosata mediante titolazione degli acidi volatili separati dal vino per trascinamento in corrente di vapore d'acqua e dopo rettificazione dei vapori, secondo quanto descritto all'allegato 14 del Reg. Cee. Infine, l'acido L-malico è stato determinato mediante metodo enzimatico come previsto all'allegato 19 del Reg. Cee. Per quanto attiene al dosag-



gio del glicerolo si è utilizzato un metodo enzimatico che garantisce la specificità e la sensibilità del dosaggio di tale composto e che costituisce il metodo più utilizzato nei laboratori enologici, anche se ancora non incluso nella metodologia ufficiale. Solo il dosaggio degli zuccheri riduttori è stato effettuato utilizzando il metodo ufficiale italiano (2) che prevede la titolazione diretta di un volume noto di soluzione cupro-alcaina (liquido Fehling) con il campione defecato; pur non avendo questo metodo riconoscimento quale metodo di riferimento, risulta ancora il più diffuso nei laboratori aziendali.

Al fine di determinare la attendibilità della metodologia elettrochimica, si è provveduto a determinare, per ogni parametro analizzato:

- La riproducibilità
- La ripetibilità
- L'accuratezza (confronto con i metodi Cee)
- Linearità della risposta (calcolo del coefficiente di correlazione r^2)

Di seguito è riportata la tabella riassuntiva delle fasi seguite a tale scopo per ogni parametro (Tab. 6).

I campioni utilizzati (34 vini nazionali diversi) sono stati selezionati utilizzando i seguenti criteri:

- regione di provenienza (Piemonte, Triveneto, Toscana, Lazio, Campania, Puglia, Sicilia, Sardegna, Umbria e Molise);
- colore (bianchi, rosati e rossi).

Tale selezione ha interessato anche il contenuto dei composti in dosaggio, per coprire tutte le possibili varianti di un vino.

Prima di ogni ciclo di analisi e per ogni parametro la strumentazione è stata calibrata con una soluzione a concentrazione nota; il valore ottenuto in ΔmpH rappresenta il punto di taratura dello strumento. Per controllare la riproducibilità di quest'ultimo, viene eseguito un ulteriore controllo sulla soluzione nota che deve fornire uno scarto rispetto al valore teorico atteso non superiore al 3%.

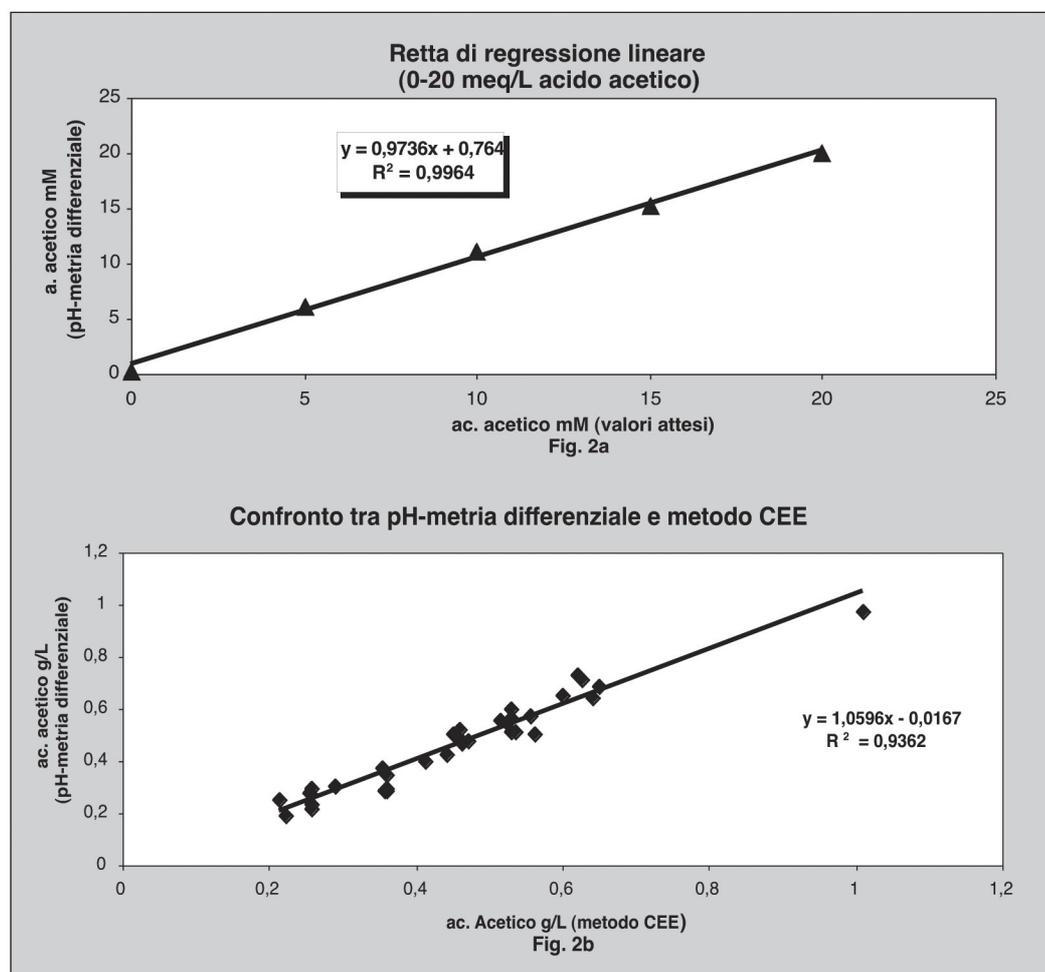
Tab 2A - Ripetibilità

	Media meq/L	r	CV%
Standard	20,14	0,11	0,52
Sagrantino Rosso	9,89	0,10	1,06
Falanghina	6,04	0,04	0,69

Tab. 2B - Riproducibilità

	Media meq/L	R	CV%
Standard	20,10	0,11	0,54
Sagrantino Rosso	9,78	0,18	1,86
Falanghina	5,59	0,08	1,42

Fig. 2 - Determinazione dell'acido acetico



Risultati e discussione

Le reazioni enzimatiche adottate per ogni singolo parametro sono state individuate come le più idonee ad avere un rilascio chemiosettivo nel mezzo di ioni H^+ .

Nel caso della determinazione degli zuccheri, la reazione di fosforilazione del glucosio e del fruttosio ad opera dell'ATP catalizzata dall'enzima esochinasi è da considerarsi senz'altro come la più adatta (7).

Per il dosaggio dell'acidità titolabile l'introduzione

del campione nella camera di misura produce nel tampone di lavoro una variazione di mpH direttamente proporzionale agli ioni H^+ liberati nel tampone stesso dai componenti acidi del campione. L'equazione su cui si basa la misura è: $\Delta\text{mpH} = \Delta\text{H}^+/\beta$

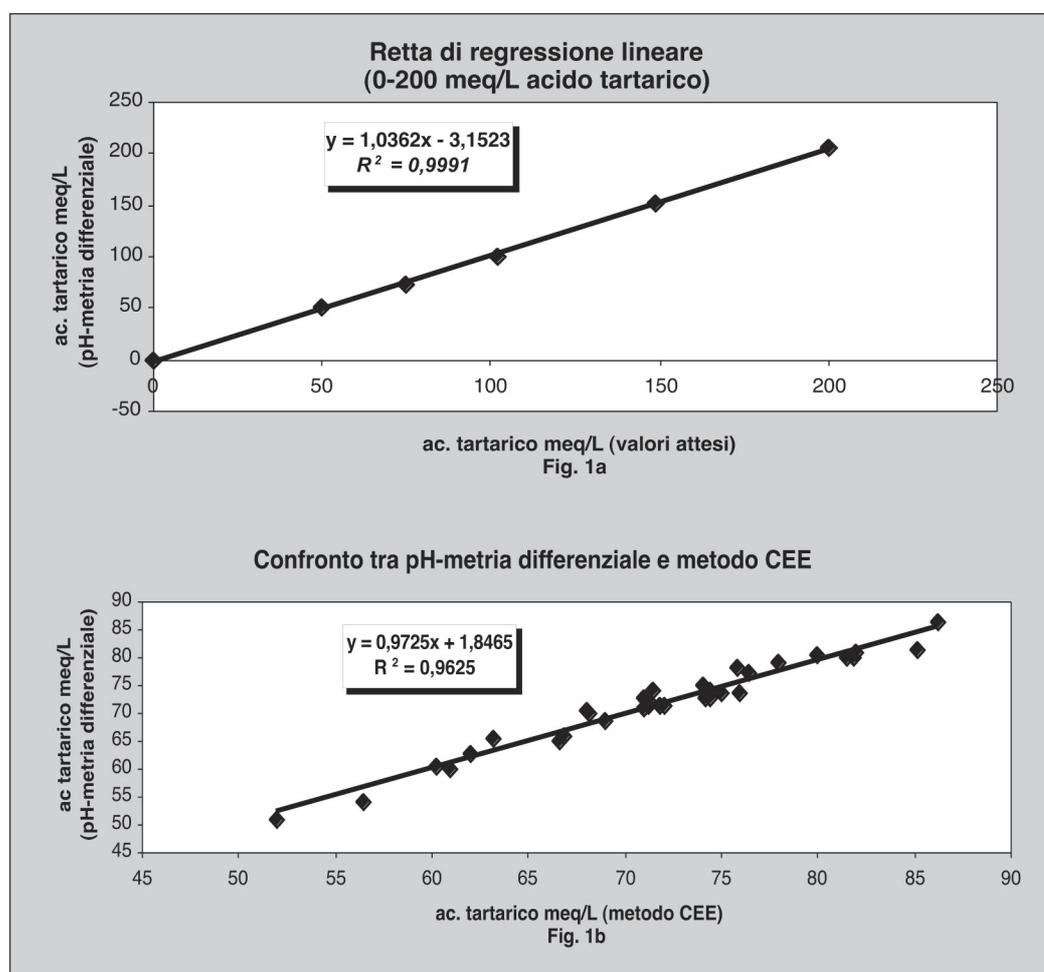


Tab 3A - Ripetibilità

	Media g/L	r	CV%
Standard	2,69	0,02	0,63
Chardonnay	2,68	0,02	0,75
Falanghina	2,81	0,02	0,71

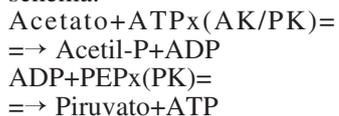
Tab. 3B - Riproducibilità

	Media g/L	R	CV%
Standard	2,68	0,02	0,75
Chardonnay	2,64	0,05	1,89
Falanghina	2,80	0,04	1,43

Fig. 3 - Determinazione dell'acido L-malico

$\Delta H^+ = \beta \times \Delta \text{pH}$
 $\beta = \text{potere tampone.}$

La determinazione dell'acido acetico viene effettuata secondo il seguente schema:



$\text{Piruvato} + \text{NADH} + \text{H}^+ \times (\text{LDH}) = \Rightarrow \text{Lattato} + \text{NAD}^+$

La variazione di concentrazione degli ioni H^+ , misurata in pHmetria differenziale, è direttamente proporzionale alla concentrazione di acido acetico presente nel campione.

Per la determinazione

dell'acido L-malico si dosa la variazione di concentrazione degli ioni H^+ determinata dall'enzima L-malico-deidrogenasi che, in presenza di NAD^+ , catalizza l'ossidazione dell'acido ad ossalacetato.

Infine la reazione più idonea alla determinazione del

glicerolo è quella catalizzata dall'enzima glicerocinasi secondo il seguente schema:
 $\text{Glicerolo} + \text{ATP} \times (\text{GlcK}) = \Rightarrow \text{Glicerolo-3P} + \text{ADP} + \text{H}^+$

Per ogni reazione, la variazione di concentrazione degli ioni H^+ , misurata in pHmetria differenziale, è direttamente proporzionale alla concentrazione di ognuno dei componenti in analisi.

Per ogni parametro analizzato sono schematizzati in singole figure i dati relativi all'accuratezza, ripetibilità, riproducibilità e linearità del metodo elettrochimico.

Somma degli acidi titolabili

Acidità totale (Fig. 1)

L'acidità di titolazione è definita come la somma degli acidi titolabili qualora si porti il prodotto a $\text{pH} = 7$ per addizione di una soluzione alcalina titolata; questo parametro, quindi, rappresenta la frazione indissociata (libera e quindi salificabile) degli acidi organici. L'acido carbonico ed il diossido di zolfo libero e combinato non sono compresi nell'acidità di titolazione.

La linearità (Fig. 1a) è stata valutata con 5 soluzioni acquose di acido tartarico a concentrazione compresa tra 0 e 200 meq/L (0-15 g/L di acido tartarico). La regressione lineare ottenuta è risultata ottima con un R^2 di 0,9991.

I campioni sono risultati in un range compreso tra 50 e 90 meq/L (3,75 - 6,75 g/L di acido tartarico), come conseguenza della diversità dei campioni di vino analizzati. Dall'esame dei dati ottenuti (Fig. 1b) l'accuratezza del metodo è risultata molto buona, infatti lo scarto medio dei dati a confronto è stato di $0,09 \pm 0,06$ g/L di acido tartarico evidenziando l'elevata corrispondenza tra le due metodiche.

Per quanto attiene alla ripetibilità (r) e riproducibilità (R), i risultati riportati in Fig.1 (Tab. 1A e Tab. 1B) sono più che soddisfacenti



in quanto il valore "r" ottenuto (max 0,7 meq/L) è inferiore a quello riportato nel metodo ufficiale (0,9 meq/L), come pure quello di "R" (max 1 meq/L) che, nel Reg. Ce, è pari a 5,1 meq/L per i vini rossi.

Dosaggio dell'acido acetico

Acidità volatile (Fig. 2)

Il regolamento Cee (1) riporta, per l'acidità volatile, la definizione data da Fonze-Diacon e Jaulmes nel 1930: l'acidità volatile è l'insieme degli acidi grassi della serie acetica che si trovano nel vino, dissociati ed indissociati. Sono esclusi dall'acidità volatile gli acidi lattico e succinico, come pure il biossido di carbonio ed il biossido di zolfo libero e combinato. Il principio del metodo ufficiale si basa sulla titolazione degli acidi volatili separati dal vino per trascinamento in corrente di vapore d'acqua e rettifica dei vapori, dopo aver liberato il vino dal biossido di carbonio e sottraendo dall'acidità del distillato l'acidità del biossido di zolfo sia libero che combinato che è stato a sua volta distillato. Il metodo in pH-metria differenziale dosa esclusivamente l'acido acetico; in considerazione che questo acido è il più largamente rappresentato nel vino tra gli acidi grassi volatili, si è ritenuto che tale metodica potesse essere comunque adeguata alle esigenze di un laboratorio enologico. In effetti tutti i dati relativi alla precisione ed all'accuratezza del metodo elettrochimico riassunti nella Fig. 2 confermano tale assunto.

La linearità, valutata in un range compreso tra 0 e 20 meq/L è ottima, con un coefficiente di correlazione di 0,9964 (Fig. 2a). Buona è anche l'accuratezza del metodo (Fig. 2b), infatti lo scarto medio ottenuto è risultato pari a $0,04 \pm 0,03$ g/L di acido acetico. La ripetibilità (r) (Tab. 2a) non supera i 0,7 meq/L e la ri-

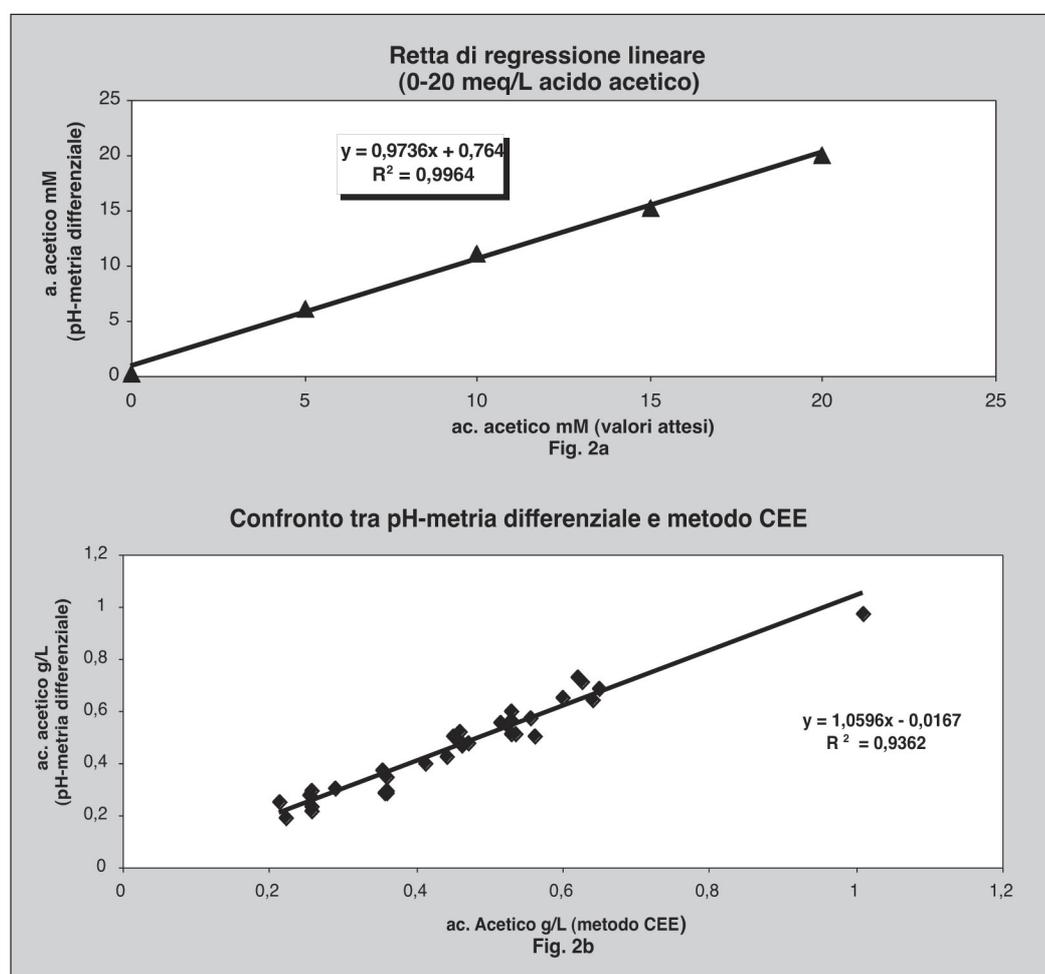
Tab 4A - Ripetibilità

	Media g/L	r	CV%
Standard	9,19	0,03	0,31
Vin Santo	5,14	0,02	0,39
Nebbiolo d'Alba	7,98	0,04	0,53

Tab. 4B - Riproducibilità

	Media g/L	R	CV%
Standard	9,18	0,08	0,89
Vin Santo	5,16	0,07	1,47
Nebbiolo d'Alba	7,94	0,13	1,61

Fig. 4 - Determinazione del glicerolo



producibilità (R) (Tab. 2b) è sempre inferiore a 1,3 meq/L, valori riportati nella metodica ufficiale.

Acido L-malico (Fig. 3)

La corretta determinazione dell'acido L-malico è indispensabile quando si voglia istituire il bilancio degli

acidi del vino, o seguire il processo di maturazione dell'uva, od ancora studiare il metabolismo dei lieviti e dei batteri lattici. Il metodo usuale è quello enzimatico, proposto da Hohorst (3) e validato dalla Cee (1), che è specifico e rapido; sullo stesso principio si basa quel-

lo elettrochimico. I dati riportati nella Fig. 3, relativi ai risultati ottenuti con la pH-metria differenziale al dosaggio dell'acido L-malico, mostrano che anche relativamente a questo parametro la metodica è accurata e precisa. Infatti il valore del coefficiente di correlazione



(Fig. 3A) pari a 0,9961, calcolato su sei soluzioni acquose con concentrazioni comprese tra 0 e 4,0 g/L di acido L-malico, evidenzia l'elevata linearità del metodo. Altrettanto dicasi per la sua riproducibilità e ripetibilità (Tab. 3A e 3B), in quanto le relative deviazioni standard non superano quelle riportate nel metodo ufficiale di confronto, che sono rispettivamente $r = 0,03 + 0,034 x_i$ ed $R = 0,05 + 0,071 x_i$ (x_i = concentrazione in acido malico del campione in g/L). Parimenti l'accuratezza del metodo (Fig. 3b), confrontato con quello enzimatico ufficiale (2) è ottima come dimostrato dal valore $R^2 = 0,9906$.

Fondamentale metabolita

Glicerolo (Fig. 4)

Il glicerolo è, fra i prodotti secondari di fermentazione, il più rappresentato. Poiché la formazione di glicerolo è correlata a quella del 2,3-butanediolo, la determinazione secondo i metodi ufficiali italiani (1), come pure secondo il "Recueil" O.I.V. (4), riguarda la somma dei due polialcoli secondo il metodo proposto da Usseglio-Tomasset, Castino (5). Per il dosaggio del solo glicerolo si preferisce, però, il metodo enzimatico (6) che, ovviamente, oltre ad essere sensibile risulta anche specifico. I parametri di validazione del metodo, ovvero la ripetibilità ($r < 0,05$ g/L), la riproducibilità ($R < 0,14$ g/L) e l'accuratezza (scarto medio di 0,5 g/L), riassunti insieme alla linearità nella Fig. 4, confermano che il metodo proposto è molto affidabile nel range 0 - 18,4 g/L. Il coefficiente di correlazione ottenuto nel calcolo della linea di regressione è pari a $R^2 = 1$.

Glucosio + Fruttosio (Fig. 5)

Gli zuccheri riduttori costituiscono l'insieme degli zuccheri con funzioni chetoniche ed aldeidiche; essi sono usualmente dosati utiliz-

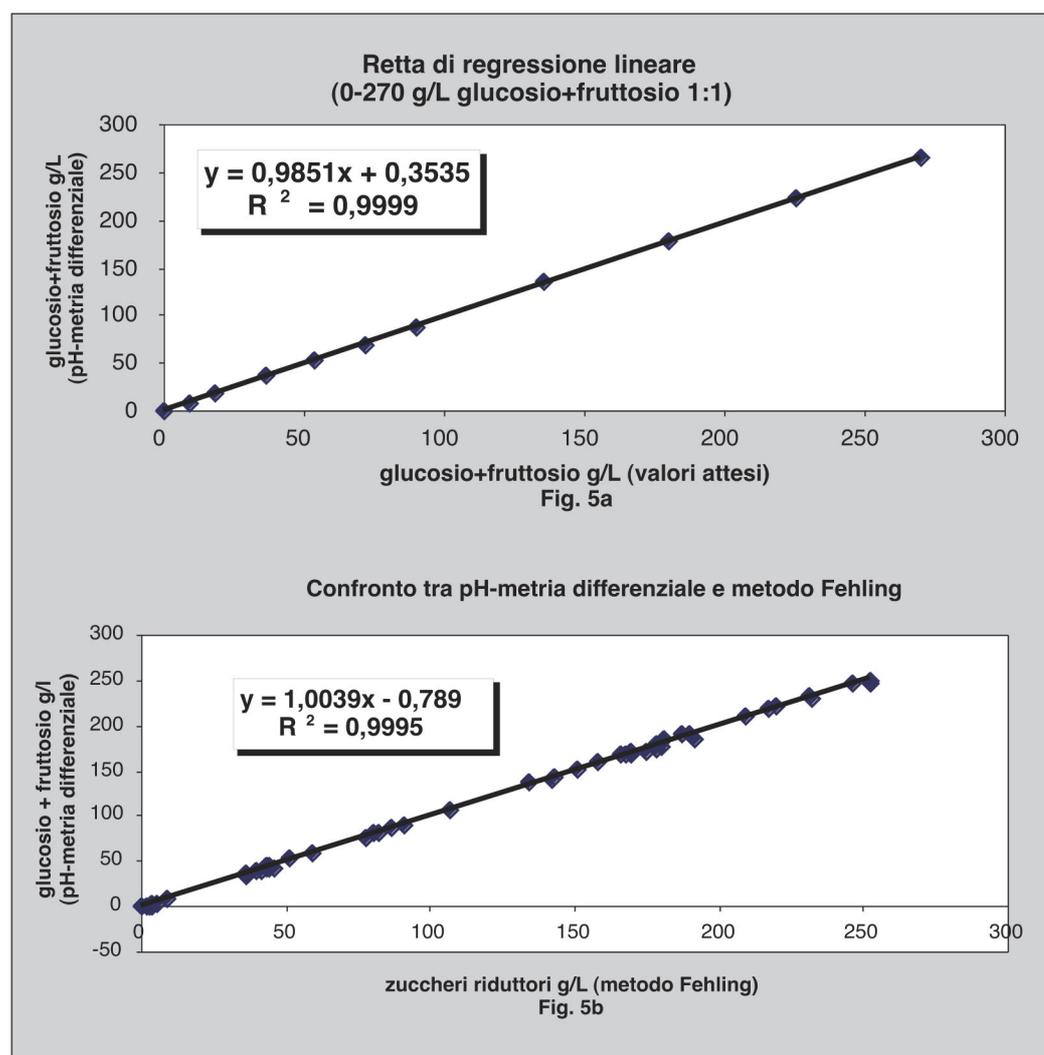
Tab 5A - Ripetibilità

Standard1	180,11	0,71	0,40
Vinsanto	90,84	0,63	0,69
Mosto ISE Velletri	223,39	0,61	0,27
standard2	35,73	0,14	0,39
Moscato Giallo	33,97	0,04	0,11
Nero d'Avola	7,57	0,09	1,25

Tab. 5B - Riproducibilità

	Media g/L	r	CV%
Standard1	180,41	0,83	0,46
Vinsanto	90,80	0,57	0,63
Mosto ISE Velletri	223,30	0,86	0,39
standard2	35,94	0,30	0,83
Moscato Giallo	34,00	0,19	0,55
Nero d'Avola	7,64	0,18	2,31

Fig. 5 - Determinazione del glucosio e fruttosio



Tab. 6 - Schema riepilogativo dei test effettuati

Fase	Descrizione attività	N° campioni	N° repliche	N° sedute di lavoro	Dati statistici riportati
Linearità	Eseguiti test di linearità su 5 diversi punti compresi nel range di linearità del kit	5 soluzioni acquose	2	1	Equazione lineare R ²
Ripetibilità	Testata ripetibilità su due campioni di vino	2 vini	10	1	Deviazione standard - CV%*
Riproducibilità	Testata riproducibilità su due campioni di vino	2 vini	3	3	Deviazione standard - CV%*
Accuratezza	Confrontati i risultati ottenuti in pH-metria differenziale con il metodo di routine del laboratorio su 34 vini	34 vini	2	2	% Accuratezza

* CV% = Deviazione standard/media x 100

zandone la facile ossidazione che permette loro di ridurre soluzioni cuproalcaline.

Per la loro determinazione è necessario che il prodotto vinoso sia accuratamente privato delle sostanze che potrebbero interferire nella reazione. A tale scopo il campione deve essere defecato ed il metodo da noi scelto, abitualmente usato nei laboratori enologici, utilizza l'acetato basico di piombo, che ha il vantaggio di decolorare bene i vini rossi. La determinazione mediante pH-metria differenziale degli zuccheri, dosati come glucosio e fruttosio, conferma la validità del metodo, già ampiamente verificata in precedenti lavori (7, 8). La linearità, valutata con soluzioni acquose di glucosio e fruttosio a contenuto dei due esosi compreso tra 0 e 270 g/L nel rapporto 1:1 è eccellente, con un valore di $R^2 = 0,9999$ (Fig. 5a). La correlazione con il metodo "Fehling" nell'intervallo di concentrazione 0-250 g/L è molto buona, infatti il coefficiente di correlazione quasi prossimo all'unità (0,9995) evidenzia l'elevata corrispondenza tra le due metodiche nell'intervallo di concentrazione di glucosio e fruttosio considerato (Fig. 5b). La riproducibilità e la ripetibilità (Tabelle 5A e 5B) si confermano ottime; infatti

anche per questo parametro i valori sia di "r" che di "R" sono inferiori a quelli riportati nel metodo Cee.

Considerazioni conclusive

La determinazione dell'acidità totale, dell'acido acetico, del glicerolo, dell'acido L-malico e del glucosio e fruttosio mediante la pH-metria differenziale presenta indubbi vantaggi rispetto alle metodiche ufficiali. Infatti questi metodi risultano, per tutti i parametri, affidabili e precisi, nonché rapidi (meno di tre minuti a determinazione). La procedura è completamente automatizzata e non richiede pretrattamento del campione, condizione che, tra l'altro, permette di utilizzare personale non specializzato. Quindi si può senz'altro considerare questo metodo valido per i controlli aziendali in quanto bene rispondono alle esigenze dei laboratori enologici che necessitano in breve tempo di un gran numero di riscontri analitici. ■

Riassunto

È stata valutata l'affidabilità della pH-metria differenziale, completamente automatizzata, di semplice e

rapida esecuzione per la determinazione nei mosti e nei vini di acido L-malico, acidità totale, glicerolo, acido acetico, glucosio e fruttosio. La tecnica, basata sulla correlazione tra differenze di pH, misurate con elettrodi capillari di vetro, tra il mezzo di riferimento e la soluzione dove avviene la reazione enzimatica, comporta l'utilizzo di quantità minime di campione non pretrattato e risulta affidabile e precisa. Pertanto la tecnologia esaminata risulta particolarmente adatta ad analisi di routine in alternativa alle metodologie ufficiali e/o usuali, in alcuni casi decisamente più laboriose.

Summary

The differential pH reliability, fully automatic, for L-malic acid, Total acidity, glycerol, acetic acid, glucose and fructose measurements in wine and must, was evaluated. The technology, based on the correlation between the variation of pH, measured by two capillary glass electrodes, and the amount of H⁺ produced or consumed by an enzymatic reaction, is simple and rapid; it needs small amount of untreated sample and it has a high accuracy. Consequently, this system, based on differential pH-technology, matches to routine determinations needs.

Bibliografia

1. Reg. Comm. CEE n. 2676/90 del 17 settembre 1990 che determina I metodi di analisi comunitari da utilizzare nel settore del vino (G.U. n. L272 del 3 ottobre 1990).
2. Ministero dell'Agricoltura e delle Foreste (M.A.F.) "Metodi ufficiali di analisi per i mosti, i vini e gli aceti", Roma 1965.
3. Hohorst M.J. (1963), Academic Press, N.Y., 328-332.
4. Recueil des Méthodes Internationales d'Analys des vins - Offece International de la Vigne et du Vin, 1978.
5. Castino M., Usseglio-Tomasset L. (1968) - Rivista Viticoltura ed Enologia, 21, 465-470.
6. Eggstein M., Kuhlmann E. (1974) - Methods of enzymatic analysis (Bergmeyer H.), vol. 4, 1825-2831, Verlag Chemie, weinheim/Acad. Press Inc., New York.
7. Gambuti A., Di Marzio L., Piombino P., Castellano L., Squillante E., Genovese A., Moio L. (2002) - Determinazione del glucosio e fruttosio nel vino mediante pH-metria differenziale. L'Enologo, 3, 77-81.
8. Cecchini F., Morassut M. (1995) - Determinazione del glucosio e del fruttosio nei mosti e nei vini mediante pH-metria differenziale. Boll. Chem. Igien., 46, 417-425.

