

1222•2022  
**800**  
ANNI



**UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
DI PADOVA**

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

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

Corso di Laurea in Scienze e Tecnologie  
Viticole ed Enologiche

**OTTIMIZZAZIONE DI UN METODO  
SEMPLICE E RAPIDO PER LA  
QUANTIFICAZIONE DI  
MANNOPROTEINE SU VINO**

Optimization of a fast and simple method for wine mannoprotein  
quantification

Relatore:  
Prof. Simone Vincenzi

Laureando:  
Samuele Buttazzo

Matricola n. 2007855

ANNO ACCADEMICO 2023/2024

## SOMMARIO

|  |    |
|--|----|
| <b>1. INTRODUZIONE</b> .....   | 4  |
| <b>1.1 Cosa sono le mannoproteine</b> .....  | 4  |
| <b>1.2 Funzione ed effetti delle mannoproteine nel vino</b> .....  | 6  |
| <b>1.3 Importanza della quantificazione delle mannoproteine</b> .....  | 8  |
| <i>1.3.1 Metodi di quantificazione delle mannoproteine</i> .....   | 9  |
| 1.3.1.1 Gascromatografia con rilevatore di spettrometria di massa (GC – MS).....   | 9  |
| 1.3.1.2 Tecniche di spettroscopia infrarossa in trasformata di Fourier (FT-IR) .....   | 10 |
| 1.3.1.3 Metodo Quirós et al. ....  | 10 |
| 1.3.1.4 Metodo per la quantificazione delle mannoproteine del vino bianco mediante un saggio competitivo indiretto di lectina enzimatica (CI – ELLSA) 10 |    |
| <b>2. SCOPO</b> .....  | 11 |
| <b>3. MATERIALI E METODI</b> .....   | 12 |
| <b>3.1 Preparazione delle soluzioni</b> .....  | 12 |
| 3.1.1 <i>Concanavalina A</i> .....   | 12 |
| 3.1.2 <i>Preparazione binding buffer</i> .....   | 12 |
| 3.1.3 <i>Vini</i> .....  | 12 |
| 3.1.4 <i>Proteine</i> .....  | 12 |
| 3.1.5 <i>Carbone utilizzato</i> .....  | 13 |
| 3.1.6 <i>Precipitazione dei polisaccaridi</i> .....  | 13 |
| 3.1.7 <i>Determinazione Polisaccaridi</i> .....  | 13 |
| 3.1.7 <i>Procedura di separazione/ quantificazione</i> .....   | 13 |
| <b>3.2 Analisi Statistica</b> .....  | 14 |

|          |   |           |
|----------|---|-----------|
| <b>4</b> | <b>RISULTATI E DISCUSSIONE.....</b>                                   | <b>14</b> |
| 4.1      | <b>Confronto dell'efficacia in acqua e in vino ultrafiltrato.....</b> | <b>14</b> |
| 4.2      | <b>Effetto del trattamento con carbone.....</b>                       | <b>17</b> |
| 4.3      | <b>Analisi del metodo su vino rosso.....</b>                          | <b>19</b> |
|          | <b>CONCLUSIONI.....</b>   | <b>20</b> |
|          | <b>BIBLIOGRAFIA.....</b>  | <b>22</b> |
|          | <b>SITOGRAFIA.....</b>  | <b>25</b> |

# 1. INTRODUZIONE

## 1.1 Cosa sono le mannoproteine

Le mannoproteine sono la seconda classe più abbondante di polisaccaridi presenti nel vino (Vidal et al., 2003; Guadalupe et al., 2007; Jégou et al., 2017). Essendo dei proteoglicani, a differenza delle glicoproteine (proteine legate a specifiche molecole di zucchero), sono molecole che contengono un'alta quantità di zucchero a "protezione" della proteina. Lo zucchero principale è il mannosio, da cui il nome mannoproteine. Queste proteine sono presenti in vari organismi biologici, inclusi funghi, lieviti e alcune piante; inoltre, sono caratterizzate dal loro alto contenuto di mannosio sotto forma di oligosaccaridi (brevi catene di molecole di zucchero) che sono attaccate in modo covalente allo scheletro proteico.

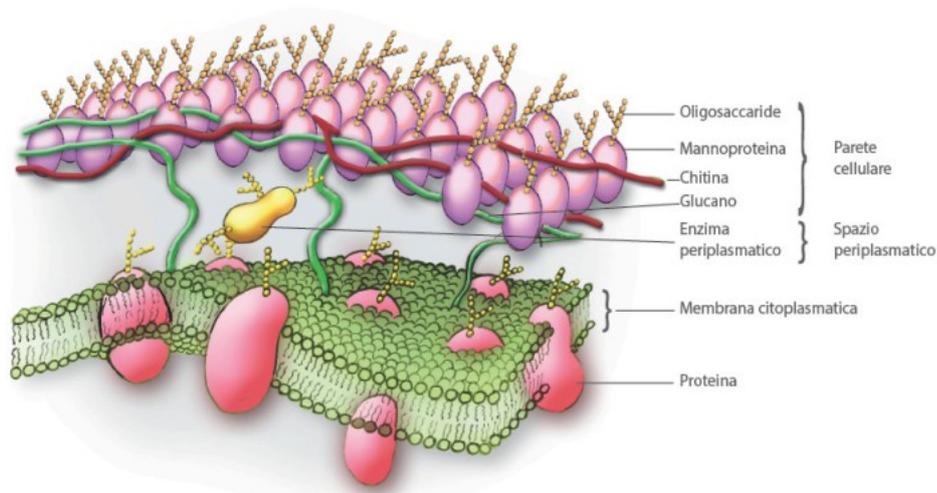


Figura 1a

Le mannoproteine si trovano nello strato più esterno della parete di *Saccharomyces cerevisiae* e ne costituiscono dal 25 al 50% (Figura 1). Possono essere estratte da cellule intere o da pareti isolate con metodi chimici o enzimatici. I primi utilizzano il trattamento in autoclave con alcali o con tampone citrato a pH 7; i secondi liberano le mannoproteine per digestione dei glucani e sono meno denaturanti per la struttura di queste rispetto ai metodi chimici (P. Ribereau – Gayon et al., ristampa 2020)

Le mannoproteine di *Saccharomyces cerevisiae* hanno pesi molecolari compresi tra 20000 ed oltre 450000 Da. Esse possiedono gradi di glicosilazione variabili, ma la

maggior parte contiene circa il 90% di mannosio e il 10% di peptidi (P. Ribereau – Gayon et al., ristampa 2020). La diversità nella composizione e nella struttura comporta differenti proprietà. Alcune risultano essere molecole con funzione enzimatica come l’invertasi (enzima che serve al lievito per idrolizzare il saccarosio del mosto in glucosio e fruttosio) o la fosfatasi acida (che serve per rimuovere i gruppi fosfato). Gran parte delle mannoproteine dei lieviti sono però ancorate alla parete, in particolare costituiscono lo strato più esterno legato allo strato sottostante di  $\beta$ -glucani. La parete dei lieviti contiene anche delle  $\beta$ -glucanasi di tipo 1 - 3 ed 1 - 6 che, nel corso della conservazione sulle fecce, sono implicate nei fenomeni di autolisi.

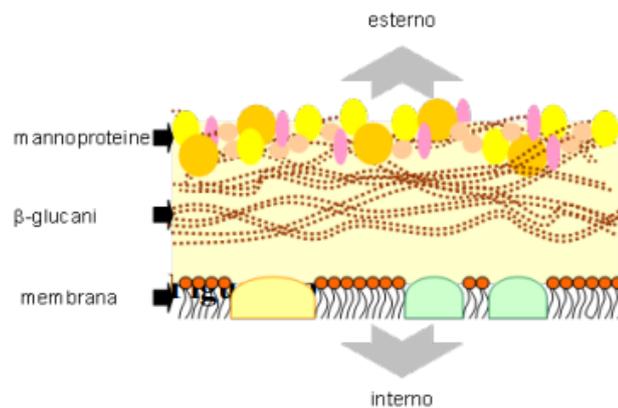


Figura 1b

Grazie all'azione delle  $\beta$  - 1,3 glucanasi del lievito che “smontano” la parete cellulare vengono liberate le mannoproteine. Questi proteoglicani possono essere rilasciati nel vino in due fasi distinte:

- Durante la fermentazione alcolica: il rilascio delle mannoproteine avviene naturalmente nel corso della fermentazione alcolica fin dall'inizio della crescita del lievito e per quanto riguarda *Saccharomyces cerevisiae* si attesta tra i 50 e i 150 mg/L (Rosi et al., 2000)
- Dopo la fermentazione alcolica: le mannoproteine vengono rilasciate quando le fecce di lievito (cellule non più in vita) rimangono a contatto col vino e vengono rimesse in sospensione, per agevolare il processo di autolisi.

Entrambi i tipi di rilascio dipendono da diversi fattori quali:

- Ceppo di lievito
  - Condizioni di fermentazione
  - Tempo e condizioni di permanenza dei lieviti (temperatura, agitazione...)
- (Guadalupe et al., 2014; Charpentier et al., 2004; Kemp et al., 2015; Alexandre et al., 2006; Vincenzi et al., 2011).

Il rilascio di mannoproteine, soprattutto quello che avviene dopo il termine della fermentazione alcolica, influenzando notevolmente sul profilo qualitativo dei grandi vini, è di rilevante importanza in ambito enologico. Nella pratica è noto come “*elevage sur lies*” il processo mediante il quale, dopo il termine del decorso fermentativo, le cellule di lievito non più vitali vengono mantenute nel vino e periodicamente rimesse in sospensione (*battonage*), in modo che le varie componenti secondarie all'autolisi vi vengano liberate ed agevolmente diffuse nel mezzo. In questo processo spontaneo sono coinvolti numerosi enzimi cellulari che degradano le diverse strutture della cellula comprese le pareti. In particolare, le frazioni mannoproteiche contraddistinte da masse attorno ai 20 kDa e comprese fra i 30 ed i 40 kDa, e da un elevato grado di glicosilazione si sono rivelate essere tra le più attive, nel vino, nell'inibizione delle precipitazioni del bitartrato di potassio (Lubbers et al., 1993; Moine-Ledoux et al., 1997), spiegando il miglioramento spontaneo della stabilità tartarica dei vini bianchi nel corso della conservazione sulle fecce (Moine e Debourdieu, 1995). È stato dimostrato che le mannoproteine, oltre a migliorare la stabilità tartarica, presentano delle proprietà stabilizzanti nei confronti delle precipitazioni proteiche (Ledoux et al., 1992; Waters et al., 1993). Il miglioramento della stabilità proteica dei vini bianchi nel corso della loro conservazione sulle fecce è stato attribuito ad una mannoproteina di peso molecolare pari a 31,8 kDa denominata MP32, anch'essa estraibile per digestione enzimatica dalle pareti dei lieviti utilizzando una preparazione industriale di  $\beta$ -glucanasi.

## **1.2 Funzione ed effetti delle mannoproteine nel vino**

La presenza di mannoproteine nei vini ha una grande rilevanza sia dal punto di vista tecnologico che sensoriale in quanto può avere effetti diretti o indiretti su diverse caratteristiche del vino (Caridi, 2006). In particolare, le mannoproteine possono:

- Agire come colloidali protettori aumentando così la stabilità del vino al caldo e al freddo.
- Scendendo nel dettaglio, le mannoproteine si occupano della:
  - Stabilizzazione delle proteine
  - Stabilizzazione del colore: si è scoperto che le mannoproteine permettono di prolungare la vita delle sostanze coloranti presenti nel vino, rallentandone l'evoluzione (María Oyon-Ardoiz et al., 2022)
  - Stabilità tartarica: l'acido tartarico presente nel vino tende a diminuire con l'avanzamento del processo di affinamento, andando così a formare sali di tartrato, i quali sono instabili in soluzione acquosa e tendono a cristallizzare e a precipitare formando conseguentemente un deposito sulla bottiglia. Le mannoproteine stabilizzano la presenza dei tartrati solubili nel vino andando a lavorare quindi sulle sensazioni di “sapidità” o “mineralità” di un vino

Inoltre:

- Contribuiscono alla crescita dei batteri malolattici (Guilloux-Benatier et al., 2003)
- Rafforzano le componenti aromatiche di un vino (Pérez-Magariño et al., 2015; Dufour et al., 1999). In particolare, le mannoproteine rallentano la percezione retrogusto-olfattiva, prolungando la sensazione di “persistenza” di questi aromi in bocca, aumentando quindi la qualità del vino
- Contribuiscono alle sensazioni gustative di struttura, rotondità e percezione in bocca.

Di particolare rilevanza è la diminuzione dell'astringenza, dal momento che le mannoproteine si legano ai tannini permettendo alla saliva di non legare con questi polifenoli che creano astringenza. In questo modo i tannini vengono resi

più morbidi e gradevoli al palato (Gawel et al., 2016; Vidal et al., 2004; Jones et al., 2008)

- Partecipare alla formazione e alla stabilizzazione della spuma dei vini spumanti: le mannoproteine rimangono sulla superficie della soluzione, così che nel momento in cui si verifica l'ascensione della bolla di CO<sub>2</sub> questa non viene immediatamente liberata, ma è trattenuta grazie all'aumento della tensione superficiale (la quale si verifica in virtù della presenza delle mannoproteine), stabilizzando così la schiuma e di conseguenza preservando l'effervescenza dello spumante indipendentemente dalla tipologia, quindi sia che questo sia prodotto col metodo Charmat - Martinotti che col metodo Classico (Guadalupe et al., 2014; Caridi, 2006; Vincenzi et al., 2014).

Oltre ai suddetti aspetti positivi dovuti alla presenza delle mannoproteine, vi sono alcune conseguenze negative, quali ad esempio:

- Problemi legati alla filtrabilità: in alcuni casi, una notevole presenza di mannoproteine può comportare l'intasamento dei filtri; d'altro canto, questo inconveniente non è di rilievo nel momento in cui la quantità di mannoproteine è trascurabile
- Problemi legati alla chiarifica: i polisaccaridi, essendo colloidali protettori, talvolta possono rendersi responsabili di alcuni rallentamenti e/o ritardi della chiarifica

### **1.3 Importanza della quantificazione delle mannoproteine**

Una volta compresa la notevole importanza che le mannoproteine assumono in ambito enologico, diventa fondamentale disporre di un metodo semplice e accurato per la quantificazione di queste nel vino. Ad ogni modo, il numero di metodi ad oggi proposto è limitato. Questi si basano principalmente su una o più fasi preliminari di separazione delle mannoproteine, solitamente, quindi, vengono isolati prima i polisaccaridi totali dal vino (ad esempio, mediante precipitazione con

etanolo, concentrazione attraverso l'ausilio dell'ultrafiltrazione o, estrazione chimica (Guadalupe et al., 2014)) e successivamente viene effettuata una cromatografia di affinità con la lectina Concanavalina A (ConA) come agente legante (Vidal et al., 2003; Goncalves et al., 2002; Rodrigues et al., 2012). Poiché questo tipo di approccio è il più efficace nel separare le frazioni polisaccaridiche mannosilate da quelle non mannosilate, esso è stato ampiamente utilizzato. In seguito alla separazione, le mannoproteine vengono quantificate attraverso metodologie piuttosto complicate, che richiedono tempo e sofisticate attrezzature di laboratorio.

### *1.3.1 Metodi di quantificazione delle mannoproteine*

#### *1.3.1.1 Gascromatografia con rivelatore di spettrometria di massa (GC – MS)*

Probabilmente l'approccio più utilizzato a questo scopo si basa sull'analisi della composizione zuccherina e sulla quantificazione mediante gascromatografia (GC) degli alditoli acetati parzialmente metilati. Ad esempio, è stato sviluppato un metodo per la quantificazione delle classi di polisaccaridi, incluse le mannoproteine nei mosti e nei vini basato sulla concentrazione dei polisaccaridi totali mediante precipitazione con etanolo seguita dalla loro metanolisi acida e derivatizzazione usando derivati di trimetilsilil (TMS) O-metil glicolile.

In uno studio (Guadalupe et al. 2012) è stata valutata l'idoneità della gascromatografia con rivelatore di spettrometria di massa (GC-MS) per determinare il contenuto di monosaccaridi del vino e quindi le relative famiglie di polisaccaridi. In primo luogo, sono stati valutati i fattori che influenzano la resa della precipitazione del polisaccaride e successivamente la tecnica di analisi GC-MS è stata confrontata con la gascromatografia con rivelatore a ionizzazione di fiamma (GC-FID). Sia GC-MS che GC-FID sono stati utilizzati per determinare il contenuto delle famiglie di polisaccaridi del vino in tre campioni di vino e non sono state osservate differenze significative. Infine, è stata applicata la cromatografia ad esclusione dimensionale ad alta risoluzione con rivelatore di indice di rifrazione (HRSEC-RID) per ottenere le distribuzioni di peso molecolare dei polisaccaridi del vino e per stimare il loro contenuto globale. La correlazione osservata tra i valori dei polisaccaridi ottenuti con il metodo GC e il metodo HRSEC-RID ha indicato

che quest'ultimo potrebbe servire come metodo rapido e semplice per fornire una stima dei polisaccaridi totali del vino sebbene non possa essere utilizzato per quantificare in modo preciso.

#### *1.3.1.2 Tecniche di spettroscopia infrarossa in trasformata di Fourier (FT-IR)*

In un altro lavoro (Coimbra et al., 2005) gli estratti ricchi di polisaccaridi, ottenuti mediante concentrazione del vino, dialisi e liofilizzazione, sono stati frazionati mediante precipitazione a concentrazioni crescenti di etanolo. È stata ottenuta un'ampia gamma di frazioni ricche di polisaccaridi. Successivamente, utilizzando la regione spettrale compresa tra 1200 e 800  $\text{cm}^{-1}$  degli spettri FTIR degli estratti secchi di polisaccaridi del vino, è stato possibile discriminare gli estratti in base alla loro composizione polisaccaridica. Inoltre, è stato possibile identificare i processi di vinificazione coinvolti e la loro influenza sui polisaccaridi del vino.

#### *1.3.1.3 Metodo Quirós et al.*

Un altro gruppo di ricerca (Quirós et al., 2012) ha messo appunto un metodo accurato per la quantificazione delle mannoproteine nei vini. È previsto l'isolamento dei polisaccaridi del vino mediante cromatografia ad esclusione dimensionale, idrolisi acida, eliminazione dell'acido mediante estrazione in fase solida a scambio anionico debole e analisi dei monosaccaridi mediante cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC) ad esclusione ionica. I vantaggi rispetto ai metodi esistenti in precedenza includono bassi volumi di campione, possibilità di elaborazione parallela per più campioni, assenza di fasi di precipitazione e chiara distinzione tra mannoproteine e altri polisaccaridi del vino (Quirós et al., 2012).

#### *1.3.1.4 Metodo per la quantificazione delle mannoproteine del vino bianco mediante un saggio competitivo indiretto di lectina enzimatica (CI – ELLSA)*

Un altro studio (Marangon et al., 2018) sviluppa e convalida un metodo innovativo, semplice e accurato per la quantificazione delle MP nei vini bianchi basato su un saggio competitivo con lectina (CI-ELLSA), utilizzando l'invertasi di lievito come standard. Il metodo utilizza la lectina concanavalina A (ConA) come ligando immobilizzato per mannoproteine e perossidasi, un enzima ricco di mannosio, come concorrente per ConA. Dopo l'aggiunta del substrato perossidasi, l'intensità del

segnale prodotto dall'attività di questo enzima (assorbanza a 450 nm) è inversamente proporzionale alla quantità di proteine mannosilate nel campione.

Un'esperienza simile a quella sopra citata, denominata saggio di assorbimento della lectina legato all'enzima (ELLSA), è stata utilizzata con successo per studiare diversi tipi di lectine e una descrizione completa del principio e dei metodi utilizzati è stata riportata da Wu e colleghi (Wu et al., 2009).

Come risulta evidente dagli studi citati, sebbene alcuni autori abbiano utilizzato con successo questi metodi per scopi di ricerca, alcune delle tecniche presentate sono spesso lunghe e complesse, e di conseguenza inadatte per l'uso nella quantificazione di mannoproteine nell'analisi di routine del vino. I metodi disponibili riportati in letteratura per la quantificazione delle mannoproteine non sono quindi adatti alla quantificazione su un gran numero di campioni e si basano su metodi indiretti per calcolare il contenuto di mannoproteine di un vino. Inoltre, la complessità e il numero di passaggi dei metodi proposti non garantiscono il recupero totale delle mannoproteine del vino originale. L'unico metodo che sembrerebbe essere effettivamente di facile utilizzo è quello citato al punto 1.3.1.4 CI – ELLSA. Quest'ultimo quantifica direttamente le mannoproteine senza idrolisi o derivatizzazioni sfruttando la loro affinità per uno specifico ligando (ConA). Questo metodo richiede però diversi passaggi di incubazione in piastra ELISA, ognuno dei quali introduce una possibile fonte di errore nella quantificazione

## **2. SCOPO**

Come analizzato preliminarmente nell'introduzione, i metodi e le tecniche di quantificazione delle mannoproteine presenti in un vino sono molteplici, ma la maggior parte di questi risultano macchinosi e complicati in fase di applicazione.

Pertanto, lo scopo di questo studio è individuare un metodo per quantificare le mannoproteine in maniera semplice ed efficace che sia valido per ogni tipologia di vino. In particolare, per la quantificazione su vini rossi, è stata analizzata la possibilità di utilizzare un trattamento preliminare con carbone vegetale verificando se esso permetta di eseguire l'analisi delle mannoproteine senza creare artefatti.

## 3. MATERIALI E METODI

### 3.1 Preparazione delle soluzioni

#### 3.1.1 *Concanavalina A*

È stata utilizzata una resina già pronta di Concanavalina A - Sepharose 4B (Sigma).

#### 3.1.2 *Preparazione binding buffer*

Per questa sperimentazione è stato necessario preparare un binding buffer che consiste in una soluzione tampone composta da 20 mM Tris pH 7.4, contenente 0.5M NaCl, 5mM magnesio cloruro, 5mM calcio cloruro e 5mM manganese cloruro (da scheda tecnica della resina).

#### 3.1.3 *Vini*

Per le prove di quantificazione in sistema semplificato, un vino Moscato bianco è stato ultrafiltrato in pressione di azoto mediante un sistema Amicon (Millipore) con membrana in acetato di cellulosa a 3000Da di cutoff (Sartorius). Per le prove di quantificazione su vino rosso è stato utilizzato un vino Sangiovese della vendemmia 2022.

#### 3.1.4 *Proteine*

Le proteine e mannoproteine sono state purificate da un vino Pinot grigio non chiarificato preventivamente con bentonite. Il vino è stato filtrato e poi ultrafiltrato con un sistema Amicon (Millipore) con membrana di cutoff 3000 Da. Il retentato è stato dializzato contro acqua (cutoff 3.500 Da) e liofilizzato. Questo estratto contiene tutte le proteine e gli altri composti ad alto peso molecolare (polisaccaridi e mannoproteine) del vino. Un'altra aliquota di vino, invece, è stata diluita dieci volte in tampone 20 mM Tris pH 7.4, contenente 0.5M NaCl, 5mM magnesio cloruro, 5mM calcio cloruro e 5mM manganese cloruro e caricata su una colonna ConA-Sepharose 4B. Dopo aver lavato con 5 volumi di tampone, l'eluizione selettiva è avvenuta con lo stesso tampone contenente 0.5M metil-mannopiranoside. L'estratto è stato dializzato contro acqua (cutoff 3.500 Da) e liofilizzato. Questo estratto contiene esclusivamente le mannoproteine del vino.

### *3.1.5 Carbone utilizzato*

Per le prove di rimozione dei polifenoli è stato utilizzato il carbone enologico Enoblack (Enoceca).

### *3.1.6 Precipitazione dei polisaccaridi*

Duecento microlitri di soluzione contenente i polisaccaridi (in triplicato) sono stati precipitati con 4 volumi di etanolo assoluto (Segarra et al., 1995), centrifugati e il pellet contenente le macromolecole è stato lavato per tre volte con 1 mL di etanolo. Il pellet è stato lasciato asciugare all'aria e quindi risospeso in un opportuno volume di acqua per le analisi successive.

### *3.1.7 Determinazione Polisaccaridi*

La determinazione dei polisaccaridi è stata svolta per via colorimetrica attraverso lo spettrofotometro Labtech It 4000 Plate reader a 490 nm.

Il campione opportunamente diluito in acqua (200 µl) è stato mescolato con 200 µl di fenolo 0.5% e successivamente 1 mL di acido solforico puro.

Data la reazione esotermica che si sviluppa dopo la miscelazione tra fenolo e acido solforico, i campioni sono stati lasciati raffreddare. Dopo 30 minuti, 200 µl della mix sono stati prelevati e trasferiti in un'apposita piastra ELISA glass coated a 96 pozzetti.

La retta di taratura è stata realizzata mediante diluizioni seriali di glucosio in acqua in un range da 0,2 a 0,125 mg/mL.

### *3.1.7 Procedura di separazione/quantificazione*

Il procedimento prevede la preparazione di mini-colonne contenenti 500 µL di resina ConA- Sepharose 4B. Sono state delle colonne da 1 mL con un filtro alla base, e dopo l'aggiunta della resina e il suo impaccamento, è stato posizionato un secondo filtro a contatto con la superficie della resina.



Una volta equilibrate con il binding buffer le colonnine erano pronte per l'utilizzo. Generalmente su ciascuna colonnina venivano caricati 2 mL di vino (diluito 10 volte in binding buffer), quindi si eseguiva un lavaggio con 5 volumi di binding buffer ed eluizione con 2 mL di binding buffer contenente 0.5M di metil-mannopiranosio.

### **3.2 Analisi Statistica**

Per tutte le analisi effettuate nel corso dell'elaborazione dei dati si è fatto uso del programma Excel. Le analisi ANOVA sono state effettuate con il programma XLStat, con un p – value inferiore a 0,05.

## **4 RISULTATI E DISCUSSIONE**

### **4.1 Confronto dell'efficacia in acqua e in vino ultrafiltrato.**

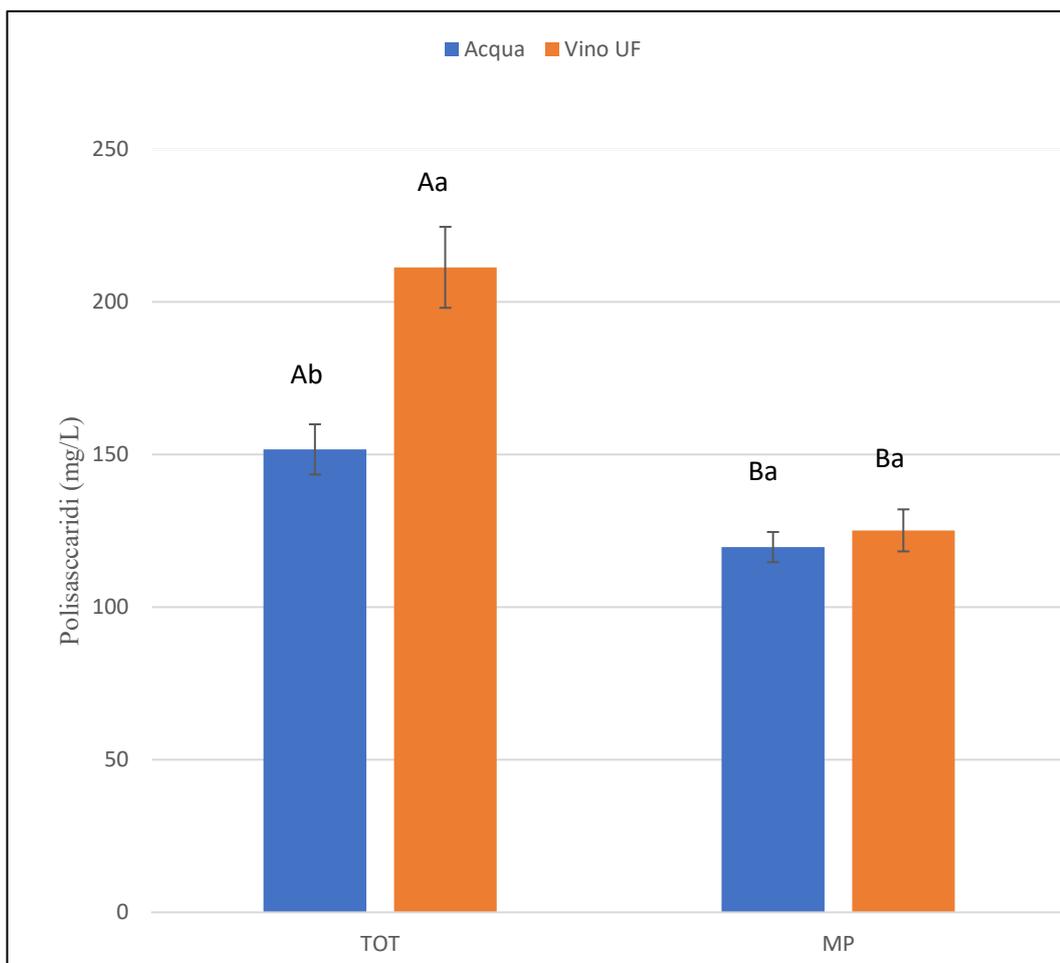
Una prima analisi è stata eseguita sulle proteine totali di Pinot grigio, che sono state risospese in acqua a 250 mg/L. Siccome la soluzione rimaneva un po' lattiginosa, è stata filtrata a 0.45 $\mu$ m (acetato di cellulosa).

Una aliquota di questa soluzione è stata precipitata con etanolo e sottoposta ad analisi dei polisaccaridi con il metodo del fenol solforico. Il risultato (colonna blu, TOT, Grafico 1) ha mostrato un contenuto di polisaccaridi pari a 150 mg/L. La

restante parte è probabilmente costituita dalle proteine che sono presenti nell'estratto.

Due mL dello stesso estratto sono stati caricati (in triplicato) su 3 colonnine di resina e, dopo eluizione, l'estratto ottenuto è stato nuovamente sottoposto ad analisi con il fenol solforico. La precipitazione ed il lavaggio con etanolo permettono di rimuovere l'elevata quantità di monosaccaridi (in questo caso metil-mannopiranosio usato come eluente) e di quantificare solo la parte corrispondente ai polisaccaridi. L'analisi (colonna blu, MP, Grafico 1) ha mostrato un contenuto di polisaccaridi significativamente più basso, pari a circa 120 mg/L. Siccome la differenza sta nel passaggio sulla colonna di ConA, i polisaccaridi presenti nell'estratto in questo caso dovrebbero essere costituiti solo da mannoproteine. Questo starebbe ad indicare che nell'estratto liofilizzato di partenza, su 250 mg, 150 mg sono di polisaccaridi, di cui 120 mg (80%) sono mannoproteine.

Questo risultato è ottenibile in poco tempo, con volumi piccoli, ed è possibile, avendo a disposizione più di una colonnina, fare più repliche in parallelo con la possibilità di poter eseguire anche un'analisi statistica.



*Grafico 1. Confronto della quantità di polisaccaridi totali e di mannoproteine su un estratto di macromolecole totali di vino (250 mg/L) risospese in acqua o in vino ultrafiltrato. Le lettere maiuscole indicano differenze significative tra TOT e MP, mentre le lettere minuscole indicano una differenza significativa tra solubilizzazione in acqua o in vino ultrafiltrato.*

Il vino, però, è una matrice più complessa dell'acqua, che contiene diverse sostanze che potrebbero interferire con la separazione su colonna di ConA. L'etanolo potrebbe modificare l'affinità della lectina per le mannoproteine, gli acidi potrebbero modificare il pH della soluzione modificando l'efficacia di ritenzione delle mannoproteine, senza contare la presenza di polifenoli che potrebbero interferire anch'essi nel legame tra lectina e mannosio.

Un primo passaggio di validazione è stato quello di risospendere le stesse proteine liofilizzate in un vino ultrafiltrato, che è stato, quindi, privato di tutte le

macromolecole, mantenendo però tutte le possibili sostanze interferenti a basso peso molecolare. Anche in questo caso è stata eseguita prima una quantificazione sulla soluzione di partenza (colonna arancione, TOT, Grafico 1). In questo caso i polisaccaridi totali sono risultati significativamente più alti rispetto alle stesse macromolecole risospese in acqua (circa 210 mg/L). Questo è stato imputato alla migrazione nel vino ultrafiltrato di una parte di oligosaccaridi del vino di partenza, sufficientemente piccoli da passare attraverso la membrana di ultrafiltrazione, ma abbastanza grandi da essere precipitati dall'etanolo nelle fasi di quantificazione. La conferma è stata ottenuta facendo una precipitazione del vino ultrafiltrato tal quale che ha mostrato effettivamente un contenuto di polisaccaridi di circa 60 mg/L (dati non mostrati). Lo stesso vino ultrafiltrato passato sulle colonnine di ConA non ha mostrato presenza di mannoproteine. Il passaggio della soluzione di vino modello con aggiunta di proteine sulle colonnine di ConA (colonna arancione, MP, Figura 1) ha mostrato un recupero di mannoproteine praticamente uguale a quello su vino. Questo dato conferma quindi che il metodo è applicabile anche su un vino (in questo caso un vino bianco) senza nessuna interferenza sul recupero e sulla quantificazione delle mannoproteine

## **4.2 Effetto del trattamento con carbone**

La quantificazione delle mannoproteine, come detto, è importante in tutti i vini, compresi quelli rossi, per cui si è voluto verificare se il metodo fosse applicabile anche ad un vino rosso.

Un primo tentativo è stato eseguito applicando alle colonnine del vino rosso con le stesse modalità usate per le prove precedenti. Nonostante la diluizione eseguita con il binding buffer, si è osservato che una parte del colore si lega irrimediabilmente alla resina, rendendola inutilizzabile (dati non mostrati).

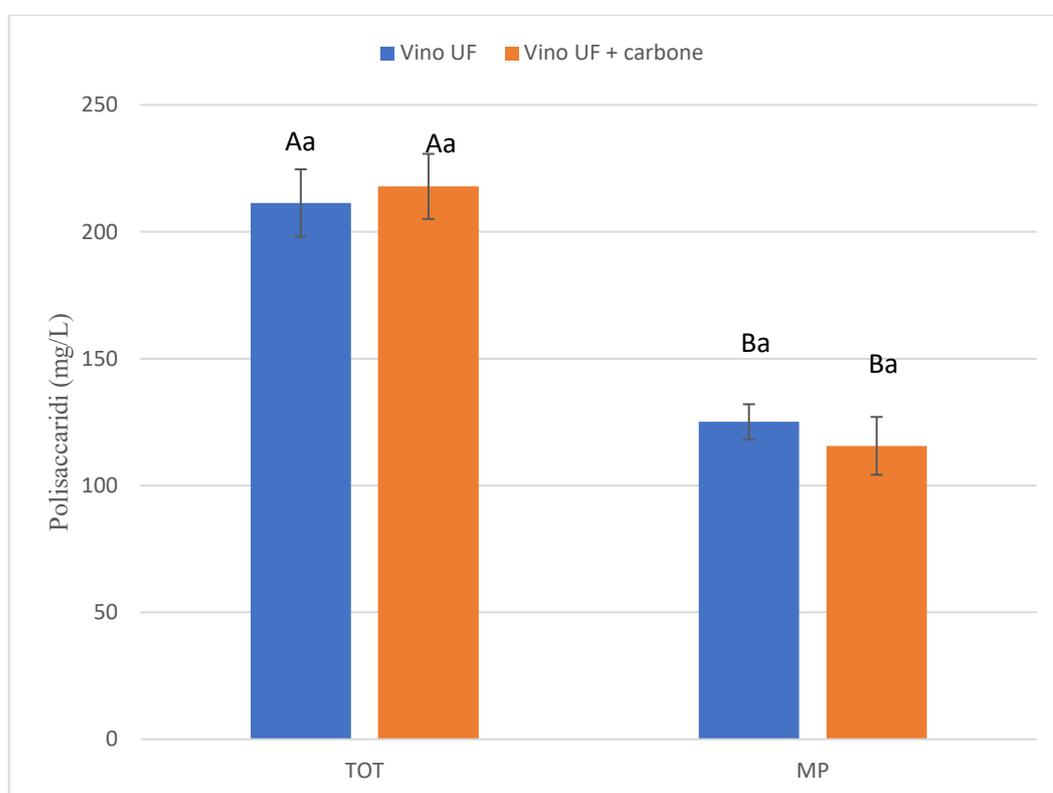
Una possibilità potrebbe essere quella di rimuovere i polifenoli mediante un trattamento con carbone, che normalmente viene utilizzato in vinificazione proprio a questo scopo. Da un punto di vista operativo, però, è essenziale verificare che questo trattamento non rimuova anche i polisaccaridi o le mannoproteine, creando degli artefatti.

Una prima prova è stata fatta quindi sulla stessa soluzione utilizzata in precedenza, cioè il vino bianco ultrafiltrato con aggiunta di 250 mg/L di proteine totali.

Una aliquota è stata trattata con carbone a 100 g/hL, e, dopo filtrazione, è stata analizzata sia prima che dopo passaggio su colonnine di ConA.

Come si vede dal Grafico 2, in cui è stato rimesso per confronto il vino ultrafiltrato senza trattamento, è evidente che il carbone non rimuove in maniera significativa né i polisaccaridi totali (colonne a sinistra) né le mannoproteine (colonne a destra).

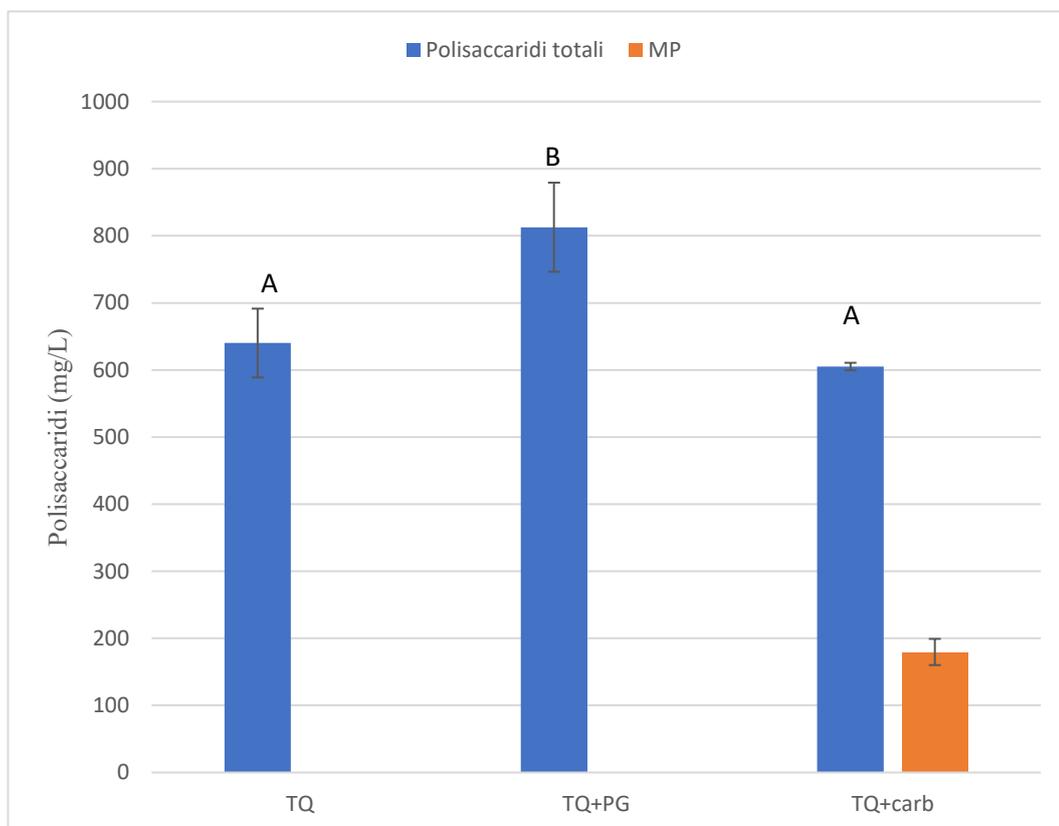
Questo step è stato fondamentale per confermare che un eventuale trattamento con carbone può essere eseguito anche su vino rosso senza rischio di rimuovere le molecole di interesse.



*Grafico 2. Effetto del trattamento con 100 g/hL di carbone su polisaccaridi totali e mannoproteine. Le lettere maiuscole indicano differenze significative tra TOT e MP, mentre le lettere minuscole indicano un effetto significativo del trattamento con carbone.*

### 4.3 Analisi del metodo su vino rosso

Una volta appurato che il carbone non influisce sul contenuto di mannoproteine è stata fatta la determinazione su un vino rosso. Vista l'esperienza precedente sul vino bianco, in cui è stato evidenziato che una parte dei polisaccaridi comunque migra nell'ultrafiltrato, si è deciso in questo caso di usare un approccio diverso, in cui le proteine totali di vino sono state aggiunte ad un vino rosso tal quale. Conoscendo il contenuto di polisaccaridi e mannoproteine dell'estratto (valori che sono stati determinati nelle prove precedenti) e facendo la quantificazione anche sul vino rosso tal quale, possiamo stimare quale sarà il contenuto atteso di polisaccaridi e mannoproteine nel vino in seguito all'aggiunta. Il vino rosso tal quale e con aggiunta di proteine sono stati quantificati direttamente senza passaggio su colonnina. L'analisi dei polisaccaridi totali mediante precipitazione con etanolo ha mostrato che in effetti in seguito all'aggiunta delle proteine si è verificato un aumento di circa 160 mg/L di polisaccaridi (confronto tra le prime due colonne, Grafico 3), corrispondente alla quantità effettivamente misurata nei test precedenti.



*Grafico 3. Confronto del contenuto di polisaccaridi totali e di mannoproteine tra il campione tal quale (TQ), il campione tal quale addizionato di mannoproteine (TQ + PG) e il campione tal quale trattato con carbone (TQ + carb).*

Si può notare come il contenuto di polisaccaridi nel vino rosso sia ben più elevato (640 mg/L) rispetto ad un vino bianco, questo è del tutto atteso considerando che il vino rosso prevede una macerazione con le parti solide dell'uva e, quindi, una maggiore estrazione di polisaccaridi totali.

Il vino rosso tal quale è stato anche trattato con 100 g/hL di carbone. Dopo centrifugazione si è notato che il campione era ancora leggermente colorato, per cui è stato fatto un ulteriore trattamento di altri 100 mg/L per rimuovere completamente ogni traccia di colore. Il vino così trattato è stato nuovamente analizzato per il contenuto di polisaccaridi che, come atteso, è rimasto invariato rispetto al vino non trattato (terza colonna blu, Grafico 3), confermando che il carbone non ha effetto sulla rimozione dei polisaccaridi.

Lo stesso vino trattato con carbone è stato anche passato sulle colonnine di ConA e le mannoproteine sono state quantificate come visto in precedenza. È stato ottenuto un valore di circa 180 mg/L, compatibile con i dati riportati in letteratura (Rosi et al., 2000). Si può notare anche come la percentuale di mannoproteine sui polisaccaridi totali scende dall'80% visto sul Pinot grigio a circa 30% per il Sangiovese preso in considerazione. Questo, come già detto in precedenza, è dovuto semplicemente alla maggiore estrazione di polisaccaridi che si verifica con una vinificazione in rosso, mentre apparentemente la presenza di polifenoli non incide in maniera così significativa sul rilascio di mannoproteine da parte dei lieviti.

I risultati hanno comunque dimostrato come sia possibile applicare questo metodo anche sulla quantificazione di mannoproteine nei vini rossi, semplicemente adottando l'accorgimento di eseguire un trattamento con carbone decolorante.

## **CONCLUSIONI**

Ad oggi è ben noto quale sia il ruolo chiave delle mannoproteine sia sul piano tecnologico che su quello organolettico per molteplici tipologie di vino, quello che manca però è un metodo semplice, rapido ed efficiente che permetta al produttore

di misurare in autonomia la quantità di mannoproteine presente all'interno della massa di vino, o semplicemente di valutare l'effetto di una pratica enologica (aggiunta di mannoproteine, sosta sui lieviti, ecc.) sul contenuto di mannoproteine del prodotto finale.

Quindi, poiché l'esistenza di un metodo di quantificazione accessibile a tutti risulterebbe un vantaggio per i produttori di vino, in questo studio si è cercato di mettere a punto un metodo che consenta di ottenere delle indicazioni precise sulla quantità di mannoproteine presenti nel vino in modo semplice e veloce, andando così a colmare questa lacuna.

La fase di sperimentazione è stata condotta in più step, ed ha permesso di dimostrare che il metodo è applicabile sia a vini bianchi, sia, cosa mai dimostrata prima, ai vini rossi.

Dunque, in seguito a questo studio e prendendo in considerazione i risultati ottenuti è possibile promuovere tale metodo di quantificazione delle mannoproteine come un meccanismo semplice, rapido ed efficace, il quale può essere una valida alternativa ai sistemi di quantificazione più macchinosi e complicati in fase di applicazione.

## BIBLIOGRAFIA

Alexandre, H.; Guilloux-Benatier, M. *Yeast autolysis in sparkling wine—A review*. *Aust. J. Grape Wine Res.* 2006, 12, 119–127.

Caridi, A. *Enological functions of parietal yeast mannoproteins*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 2006, 89, 417–422

Charpentier, C.; Dos Santos, A.M.; Feuillat, M. *Release of macromolecules by Saccharomyces cerevisiae during ageing of French flor sherry wine “Vin jaune”*. *Int. J. Food Microbiol.* 2004, 96, 253–262.

Coimbra, M.A.; Barros, A.S.; Coelho, E.; Gonçalves, F.; Rocha, S.M.; Delgadillo, I. *Quantification of polymeric mannose in wine extracts by FT-IR spectroscopy and OSC-PLSI regression*. *Carbohydr. Polym.* 2005, 61, 434–440

Dufour, C.; Bayonove, C.L. *Influence of wine structurally different polysaccharides on the volatility of aroma substances in a model system*. *J. Agric. Food Chem.* 1999, 47, 671–677

Dupin, I.V.; McKinnon, B.M.; Ryan, C.; Boulay, M.; Markides, A.J.; Jones, G.P.; Williams, P.J.; Waters, E.J. *Saccharomyces cerevisiae mannoproteins that protect wine from protein haze: Their release during fermentation and lees contact and a proposal for their mechanism of action*. *J. Agric. Food Chem.* 2000, 48, 3098–3105

Gawel, R.; Smith, P.A.; Waters, E.J. *Influence of polysaccharides on the taste and mouthfeel of white wine*. *Aust. J. Grape Wine Res.* 2016, 22, 350–357

Goncalves, F.; Heyraud, A.; Norberta de Pinto, M.; Rinaudo, M. *Characterization of white wine mannoproteins*. *J. Agric. Food Chem.* 2002, 50, 6097–6101

Guadalupe, Z.; Ayestaran, B. *Polysaccharide profile and content during the vinification and aging of Tempranillo red wines*. *J. Agric. Food Chem.* 2007, 55, 10720–10728

Guadalupe, Z.; Ayestarán, B.N.; Williams, P.; Doco, T. *Determination of must and wine polysaccharides by Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) and Size-Exclusion Chromatography (SEC)*. In *Polysaccharides: Bioactivity and*

*Biotechnology*; Ramawat, K.M.J., Ed.; Springer International Publishing: Cham, Switzerland, 2014; pp. 1–29. ISBN 978-3-319-03751-6

Guadalupe, Z.; Martínez-Pinilla, O.; Garrido, Á.; Carrillo, J.D.; Ayestarán, B. Quantitative determination of wine polysaccharides by gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS) and size exclusion chromatography (SEC). *Food Chem.* 2012, 131, 367–374

Guilloux-Benatier, M.; Chassagne, D. Comparison of components released by fermented or active dried yeasts after aging on lees in a model wine. *J. Agric. Food Chem.* 2003, 51, 746–751.

Jégou, S.; Hoang, D.A.; Salmon, T.; Williams, P.; Oluwa, S.; Vrineau, C.; Doco, T.; Marchal, R. Effect of grape juice press fractioning on polysaccharide and oligosaccharide compositions of Pinot meunier and Chardonnay Champagne base wines. *Food Chem.* 2017, 232, 49–59

Jones, P.R.; Gawel, R.; Francis, I.L.; Waters, E.J. The influence of interactions between major white wine components on the aroma, flavour and texture of model white wine. *Food Qual. Prefer.* 2008, 19, 596–607.

Kemp, B.; Alexandre, H.; Robillard, B.; Marchal, R. Effect of production phase on bottle-fermented sparkling wine quality. *J. Agric. Food Chem.* 2015, 63, 19–38

Lubbers, S.; Leger, B.; Charpentier, C.; Feuillat, M. Effect des colloïdes-protecteurs d'extraits de parois de levures sur la stabilité tartrique d'un vin modèle. *J. Int. Sci. Vigne Vin.* 1993, 27, 13–22.

María Oyon-Ardoiz, Elvira Manjon, María Teresa Escribano-Bailon, Ignacio García-Estévez Effect of mannoproteins from different oenological yeast on pigment composition and color stability of red wine, *LWT – Food Science and Technology*, 172 (2022) 114219

Matteo Marangon, Mara Vegro, Simone Vincenzi, Giovanna Lomolino, Alberto De Iseppi and Andrea Curioni A Novel Method for the Quantification of White Wine Mannoproteins by a Competitive Indirect Enzyme-Linked Lectin Sorbent Assay (CI-ELLSA). *Molecules* 2018, 23, 3070

*Trattato di Enologia I*; P. Ribereau – Gayon. D. Dubordieu, B. Donèche, A. Lonvaud; Edagricole; Ristampa 2020; ISBN 978 - 88 - 506 - 5507 - 6

Pérez-Magariño, S.; Martínez-Lapuente, L.; Bueno-Herrera, M.; Ortega-Heras, M.; Guadalupe, Z.; Ayestarán, B. Use of commercial dry yeast products rich in mannoproteins for white and rosé sparkling wine elaboration. *J. Agric. Food Chem.* 2015, 63, 5670–5681

Quirós, M.; Gonzalez, R.; Morales, P. A simple method for total quantification of mannoprotein content in real wine samples. *Food Chem.* 2012, 134, 1205–1210

Rodrigues, A.; Ricardo-Da-Silva, J.M.; Lucas, C.; Laureano, O. Characterization of mannoproteins during white wine (*Vitis vinifera* L. cv. Encruzado) ageing on lees with stirring in oak wood barrels and in a stainless steel tank with oak staves. *OENO One* 2012, 46, 321–329

Rosi I., Gheri A., Domizio P., Fia G. (2000). Production de macromolécules pariétales de *Saccharomyces cerevisiae* au cours de la fermentation et leur influence sur la fermentation malolactique. *Rev. des Oenol.*, 94, 18-20

Segarra I., Lao C., Lopez-Tamanes E., De La Torre-Boronat M.C. Spectrophotometric methods for the analysis of polysaccharide levels in winemaking products. *Am. J. Enol. Vitic.* (1995), 46, 4: 564-570.

Van Sluyter, S.C.; McRae, J.M.; Falconer, R.J.; Smith, P.A.; Bacic, A.; Waters, E.J.; Marangon, M. Wine protein haze: Mechanisms of formation and advances in prevention. *J. Agric. Food Chem.* 2015, 63, 4020–4030

Vidal, S.; Francis, L.; Williams, P.; Kwiatkowski, M.; Gawel, R.; Cheynier, V.; Waters, E. The mouth-feel properties of polysaccharides and anthocyanins in a wine like medium. *Food Chem.* 2004, 85, 519–525

Vidal, S.; Williams, P.; Doco, T.; Moutounet, M.; Pellerin, P. The polysaccharides of red wine: Total fractionation and characterization. *Carbohydr. Polym.* 2003, 54, 439–447

Vincenzi, S.; Marangon, M.; Tolin, S.; Curioni, A. Protein evolution during the early stages of white winemaking and its relations with wine stability. *Aust. J. Grape Wine Res.* 2011, 17, 20–27

*Vincenzi, S.; Crapisi, A.; Curioni, A. Foamability of Prosecco wine: Cooperative effects of high molecular weight glycoconjugates and wine PR-proteins. Food Hydrocoll. 2014, 34, 202–207*

*Waters, E.J.; Pellerin, P.; Brillouet, J.-M. A Saccharomyces mannoprotein that protects wine from protein haze. Carbohydr. Polym. 1994, 23, 185–191.*

*Wu, A.M.; Lisowska, E.; Duk, M.; Yang, Z. Lectins as tools in glycoconjugate research. Glycoconj. J. 2009, 26, 899–913.*

## **SITOGRAFIA**

[www.vigneviniequalita.edagricole.it](http://www.vigneviniequalita.edagricole.it)

[www.infowine.com](http://www.infowine.com)

[www.assoenologi.it](http://www.assoenologi.it)