



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI
PADOVA**

Dipartimento di Territorio e Sistemi Agro-Forestali

Corso di laurea triennale Scienze e Tecnologie Viticole Ed Enologiche

Tesi di laurea triennale

**STABILITA' PROTEICA DEI VINI E PROTEINE
COINVOLTE**

Relatore

Prof. RUZZA PAOLO

Correlatore

Dott. HONISCH CLAUDIA

Laureando: LATTANZI NICOLA

Matricola: 1191396

Anno Accademico 2021-2022

Sommario

RIASSUNTO	2
ABSTRACT	3
1. INTODUZIONE.....	4
2. STRUTTURA DELLE PROTEINE RESPONSABILI DELL'INSTABILITA' PROTEICA	7
2.1. PROTEINE PR	7
2.2. CHITINASI	8
2.3. THAUMATIN-LIKE PROTEIN (TLP)	12
3. FATTORI CHE CAUSANO L'INSTABILITA' PROTEICA.....	17
3.1. INFLUENZA DEGLI AGENTI RIDUCENTI	20
4. METODI DI STABILIZZAZIONE	23
4.1. LA BENTONITE	23
4.2. ULTRAFILTRAZIONE	26
4.3. CHITINA E CHITOSANO	27
4.4. MANNOPROTEINE	29
5. CONSERVAZIONE DEI VINI.....	30
6. CONCLUSIONE	31
7. BIBLIOGRAFIA	33
8. SITOGRAFIA	41
9. RINGRAZIAMENTI	42

RIASSUNTO

Le proteine nei vini tendono a denaturarsi ed a formare aggregati che portano alla formazione di torbidità e depositi, un fenomeno dovuto all'instabilità proteica, soprattutto nei vini bianchi.

Per l'industria enologica è molto importante prevenire questo fenomeno soprattutto nella vita di scaffale dei vini poiché questo determina un abbassamento della qualità percepita del prodotto e lo rende inappetibile al mercato, oltre che generare una cattiva reputazione nei confronti del produttore.

Per affrontare questa problematica è necessario individuare le proteine che, denaturandosi, sono responsabili dell'instabilità, per questo nella prima parte dell'elaborato verranno individuate e studiate le due proteine principalmente imputabili al fenomeno, chitina e thaumatin-like protein, espresse nella bacca di *Vitis Vinifera* per autodifesa nei confronti degli attacchi fungini che si possono verificare in vigna.

Verranno anche trattate le cause di denaturazione di queste proteine non solo per capire quali siano i fenomeni alla base di tale evento, ma anche per definire un piano di buona conservazione dei vini.

Esistono vari metodi per affrontare l'instabilità proteica, ne verranno affrontati alcuni, ogni uno dei quali porta a dei risultati differenti nella stabilizzazione proteica. Risulta importante capire le modifiche che questi trattamenti possono portare in quanto essi possono influenzare le caratteristiche organolettiche dei vini, quali la struttura e la spumosità data dalle proteine, la variazione delle sostanze volatili che contribuiscono al bouquet dei vini.

ABSTRACT

Some wine proteins are keen to denature and may form aggregates that lead to turbidity and deposits in wines, due to protein instability, especially in white wines.

It is very important for the wine industry to prevent this phenomenon that should not occur during the shelf life of wines, since it lowers of the quality of the product, making it unappetizing for the market, as well as generating a bad reputation towards the producer.

In ordert to face this problem it is necessary to identify the proteins that are responsible for the instability, therefore in the first part of this dissertation two proteins linked to this event, chitin and thaumatin-like protein, expressed in the berry of *Vitis Vinifera* to self-defend against fungal attacks that can occur in the vineyard, will be described.

The causes of denaturation of such proteins will also be treated, not only to understand the phenomena underlying these events, but also to define a good wine conservation plan.

There are various methods to deal with protein instability, some of them will be addressed, each leading to different results in protein stabilization. It is important to understand the changes that these treatments can bring as they can modify organoleptic features of wines, such as structure and frothiness given by proteins, as well as the variation in the volatile substances that contribute to the bouquet of wines.

1. INTODUZIONE

L'instabilità proteica è tipicamente considerata il difetto non microbiologico più comune nei vini bianchi (Bayly & Berg, 1967; Hsu & Heather, 1987; Waters et al., 1992) e coinvolge le proteine solubili che possono aggregarsi nel tempo in bottiglia formando torbidità e sedimenti amorfi. Sono state identificate tre classi di proteine dell'uva con bassa stabilità conformazionale: le β -glucanasi, le chitinasi e le thaumatin-like protein (Dufrechou et al., 2012; Dufrechou et al., 2013; Maragon et al., 2010; Marangon et al., 2014).

La prima fase della formazione della torbidità è causata dalla denaturazione delle proteine. Successivamente le interazioni tra le proteine denaturate o con altri componenti del vino, come i polifenoli, portano alla loro aggregazione e flocculazione (Falconer et al., 2010; Pocock & Waters, 2006). In generale, sono tre i meccanismi fisici di aggregazione di proteine/peptidi possibile: (1) un processo sequenziale in cui le unità monomeriche vengono aggiunte individualmente a una catena in crescita; (2) un'interazione multimerica caratterizzata dall'associazione di multimeri di qualsiasi dimensione; e (3) un evento di nucleazione con la lenta formazione di un nucleo fino al raggiungimento di una dimensione critica dell'aggregato, seguita poi da una rapida polimerizzazione (Fig. 1).

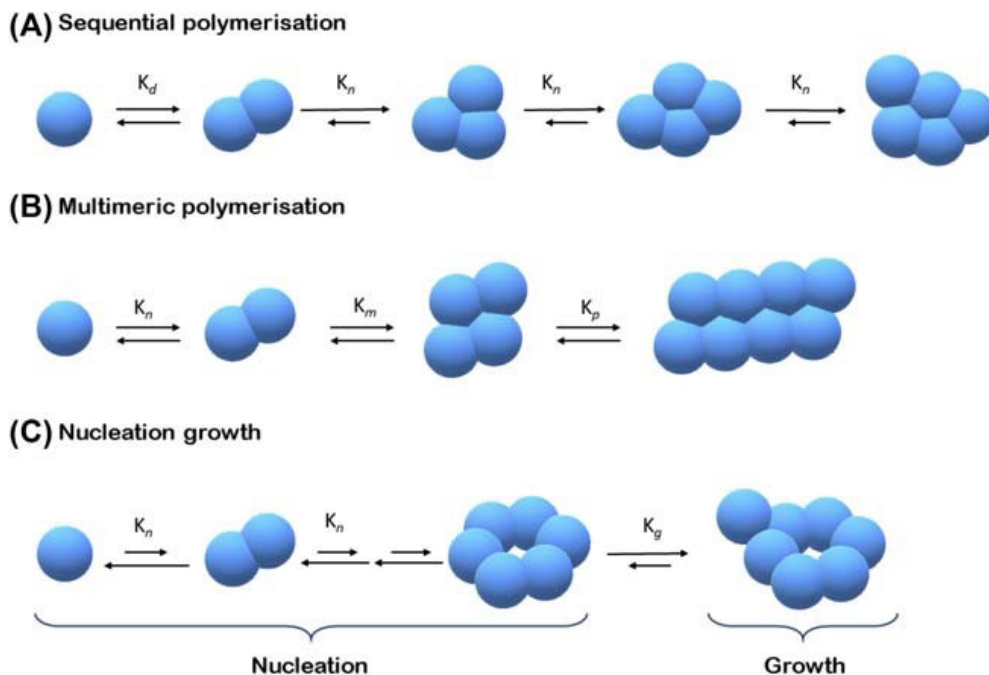


Figura 1. Modelli raffiguranti i tre meccanismi proposti di polimerizzazione e di aggregazione.

(Ruzza et al., 2020)

Tuttavia, è improbabile che i meccanismi illustrati in Fig. 1 siano applicabili alle proteine del vino poiché sembra che siano coinvolti altri componenti del vino, quali per esempio gli ioni solfato, in quanto nel vino modello queste proteine hanno dimostrato di non essere in grado di formare aggregati in seguito a riscaldamento (Pocock et al., 2007).

La formazione di torbidità nei vini è stata descritta come un processo multifattoriale in cui sono presenti diversi elementi, alcuni ben definiti quali la temperatura di conservazione o invecchiamento del vino, la concentrazione proteica, il pH, la forza ionica, gli acidi organici, l'etanolo, i composti fenolici, i metalli e il contenuto di solfati, mentre altri rimangono sconosciuti come dei componenti non proteici denominati fattore X (Batista et al., 2009; Batista et al., 2010; Dufrechou et al., 2012; Pocock et al., 2007).

L'instabilità proteica può verificarsi anche attraverso la miscelazione di vini stabili. La formazione di torbidità non costituisce un rischio per la salute dei consumatori (Marangon et al., 2011) né pregiudica le caratteristiche olfattive e gustative del vino (Dufrechou et al., 2012); tuttavia, la formazione di torbidità o depositi nei vini in bottiglia possono influire sulla loro commercializzazione, rendendoli inaccettabili per i consumatori a causa dell'aspetto visivo (Tabilo-Munizaga et al., 2014).

Le proteine nel vino sono presenti a basse concentrazioni, legate al contenuto proteico e alla composizione dell'uva, che dipendono anche dal vitigno e dalle condizioni di maturazione, nonché dal processo di vinificazione (Sauvage et al., 2010).

Questa instabilità è più importante nei vini bianchi, in quanto la limpidezza del vino bianco è un parametro essenziale di qualità sensoriale. La formazione di torbidità proteica del vino può verificarsi a causa dell'esposizione ad elevate temperature (come vedremo successivamente dipende dalla T_M della proteina instabile) durante lo stoccaggio o il trasporto del vino (Høj et al. 2000).

Le proteine più importanti che sono state correlate all'instabilità proteica del vino includono le chitinasi e le taumatin-like protein (Ferreira et al., 2002). Queste proteine si denaturano lentamente, flocculando e formando una torbidità nel vino (Waters et al., 1993); pertanto, questo fenomeno deve essere prevenuto rimuovendole dal vino, solitamente mediante chiarifica, prima dell'imbottigliamento del vino (Marangon et al., 2011).

L'instabilità proteica è attualmente risolta dall'eliminazione delle proteine instabili dal vino mediante specifici agenti chiarificanti. I chiarificanti sono sostanze che solitamente sono dotate di carica elettrica negativa e/o positiva che causano la flocculazione e precipitazione dei composti con carica opposta (Ribeiro et al., 2014). La chiarifica con bentonite è il processo più utilizzato per evitare l'instabilità proteica nel vino bianco, la cui dose è determinata preferibilmente in precedenza da test di stabilità (Lambri et al., 2012). Tuttavia, la chiarifica con bentonite può influenzare la qualità del vino, ad esempio alterandone il colore e rimuovendo i composti aromatici (Høj et al., 2000). Questo trattamento può quindi influenzare negativamente le caratteristiche sensoriali del vino (Lambri et al., 2010). Pertanto, sono state studiate tecniche alternative alla chiarificazione bentonitica quali l'ultrafiltrazione (Waters et al., 1992), l'aggiunta di enzimi proteolitici (Dizy et al., 1999), la pastorizzazione flash (Pocock et al., 2003), lo sviluppo di altri adsorbenti quali gel di silice, idrossiapatite e allumina (Sarmiento et al., 2000), ossido di zirconio (Marangon et al., 2011), zeoliti naturali (Mierczynska-Vasilev et al., 2019), chitina e chitosano (Vincenzi et al., 2005), carragenina (Ratnayake et al., 2019) e l'uso di alcune mannoproteine (Ribeiro et al., 2014).

2. STRUTTURA DELLE PROTEINE RESPONSABILI DELL'INSTABILITA' PROTEICA

2.1. PROTEINE PR

La stragrande maggioranza delle proteine del vino è stata recentemente identificata come proteine correlate alla patogenesi, o PR proteins. Durante la stagione, l'espressione di queste proteine sono indotte da attacchi fungini e dallo stato fenologico nelle foglie e negli acini d'uva, infatti esse svolgono un ruolo importante nella protezione contro i patogeni fungini.

Le proteine correlate alla patogenesi sono tipicamente acide, di bassa massa molecolare e altamente resistenti alla degradazione proteolitica e ai bassi valori di pH. Comprendono 14 famiglie di proteine (Van Loon, 1999), alcune delle quali sono state rilevate nella vite. È stato dimostrato che i membri di molte di queste famiglie hanno azioni dannose sulle strutture del parassita, attraverso un'attività antimicotica determinata attraverso prove *in vitro*, svolgono quindi un ruolo di difesa nella vite (Odjakova et al., 2001; Kombrink et al. 1997). Tra queste troviamo le proteine PR-5 (thaumatin-like protein e osmotine), le quali sono in grado di creare pori transmembrana e per tale motivo sono state ribattezzate permeatine; le proteine PR-2 (β -1,3-glucanasi) e le proteine PR-3 e PR-4 (chitinasi), enzimi che idrolizzano rispettivamente i β -1,3-glucani e la chitina, componenti strutturali delle pareti cellulari nella maggior parte dei funghi superiori.

A causa della loro resistenza all'attacco proteolitico e ai bassi valori di pH caratteristici dei vini, la vinificazione può essere vista come una "strategia di purificazione" per le proteine PR dell'uva. L'inevitabile conseguente accumulo di queste proteine nei vini diventa un problema tecnologico in quanto influiscono negativamente sulla limpidezza e stabilità dei vini. Viti geneticamente modificate che sottoesprimono le proteine PR porterebbero sicuramente a vini stabili ma aumenterebbero la suscettibilità delle piante all'attacco dei funghi, mentre la tendenza attuale sembra andare nella direzione opposta, ovvero si vuole indurre una maggiore espressione di queste proteine per ottenere piante con una maggiore resistenza agli agenti patogeni, una tendenza che però aumenterà i problemi associati all'instabilità proteica dei vini risultanti.

La produzione di proteine PR si verifica negli acini d'uva sani come parte del normale processo di maturazione, in particolare l'invasatura risulta essere un fattore scatenante per

l'espressione genica, accompagnata da un ulteriore aumento dell'espressione proteica con la maturazione della bacca, (Tattersall et al., 1997). Le due proteine solubili più importanti accumulate nell'uva durante la maturazione sono state identificate come chitinasi e thaumatin-like protein (Robinson et al., 2000). La sola chitinasi rappresenta la metà della proteina solubile nell'uva matura (Waters et al., 1998).

2.2. CHITINASI

In base alla loro funzione di difesa nelle piante, le chitinasi sono in grado di idrolizzare i legami glicosidici della chitina, un costituente delle pareti cellulari fungine (Oyeleye et al., 2018). Tra i diversi tipi di chitinasi, la più frequente descritta nei vini è quella appartenente alla classe IV (Gazzola et al., 2017).

Le chitinasi di classe IV, come quelle appartenenti alla classe I, sono caratterizzate dall'aver una regione N-terminale ricca di cisteina in grado di legare la chitina (dominio di legame della chitina), che è assente nelle altre classi (chitinasi di classe II e III). Le chitinasi di classe I e III sono espresse nelle radici e nelle foglie, ma non nelle bacche. Al contrario, la classe IV è espressa nelle bacche ma non nelle radici o nelle foglie, e una sua isoforma è costantemente presente durante la maturazione delle bacche (Robinson et al., 1997). Inoltre, è stato dimostrato che le chitinasi dell'uva di classe IV contengono una sequenza in grado di legare i flavonoidi e in particolare la quercetina e la catechina, che in questo modo sono coinvolte nella regolazione dell'attività chitinasica nell'acino (Filippi et al., 2016).

Tuttavia, la struttura molecolare tridimensionale della chitinasi dell'uva non è stata ancora determinata, anche se questa informazione potrebbe essere cruciale per delucidare il meccanismo coinvolto nella sua denaturazione e aggregazione nel vino. Dato che il genoma della *Vitis vinifera* è stato sequenziato (Velasco et al., 2007), la struttura tridimensionale delle chitinasi dell'uva di classe IV è stata ottenuta *in silico* utilizzando la sua sequenza e la struttura della chitinasi di *Oryza sativa* (PDB file: 2DKV), che però presenta un grado di similitudine solo del 45% (Fig. 2). Nella sua forma nativa, la chitinasi di classe IV dell'uva sembra essere una proteina globulare (Fig. 2) con un dominio che sporge. Questo dominio corrisponde al dominio di legame della chitina identificato anche nelle proteine isolate dal vino.

sp Q7DNA1 CH12_ORYSJ	MSTPRAAASLAKKAAALVALAVLAAALATAARAEQCGAQAGGARCPNCLCCSRWGWCGTTS	61
tr Q7XAU6 Q7XAU6_VITVI	-----MAAKLLTLVLVGLALFGAAVAQNC-----GCASGLCCSKYGYCGTGS	42
Q7XAU6:Active site		
sp Q7DNA1 CH12_ORYSJ	FCGDGCQSQCSCGGPTPTPTPPSPSDGVGSIVPRDLFERLLLHRNDGACPARGFYTYEAFL	122
tr Q7XAU6 Q7XAU6_VITVI	YCGDGCQSGPCD-----SSSGSGSSVSDIVTQSFDFGI-INQAASSCAGKNEYTRA AFL	95
Q7XAU6:Active site		
sp Q7DNA1 CH12_ORYSJ	AAAAAFPAPFGTGNTETRKREVAALFGQTSHETTGGWPTAPDGPFSWGYCFKQEQN-PPSD	182
tr Q7XAU6 Q7XAU6_VITVI	SALNSYSGFGNDGSTDANKREIAAFFAHVTHETG-----HFCYIEEIN GASHN	143
Q7XAU6:Active site		
sp Q7DNA1 CH12_ORYSJ	YCQP-SPEWPCAPGRKY YGRGPIQLSFNFNYGPAGRAIGVDLLSNPDLVATDATVSFKTAL	242
tr Q7XAU6 Q7XAU6_VITVI	YCDSSNTQYPCVSGQNY YGRGPLQLTWNYYNYGAAGNSIGFNGLSNPGIVATDVVTSFKTAL	204
Q7XAU6:Active site		
sp Q7DNA1 CH12_ORYSJ	WFWMT PQGNKPPSSHVDVITGRWAPSPADAAAGRAPGYGVITNIVNGGLECGHCPDDRVANR	303
tr Q7XAU6 Q7XAU6_VITVI	WFWMNNVHSV-----IGQGFATIRAINGAVECNGGNTAAVNARV	244
Q7XAU6:Active site		
sp Q7DNA1 CH12_ORYSJ	GFYQRYCGAFGIGTG NLD CYNQRPFN S GSSVGLAEQ	340
tr Q7XAU6 Q7XAU6_VITVI	QY YKDYCSQLGVSPGDNLTC-----	264
Q7XAU6:Active site		

Tabella 1. Sequenza amminoacidica della chitinasi di classe IV dell'uva da UniProt Q7XAU6 (sequenza inferiore) a confronto con la chitinasi di *Oryza sativa* da PDB file: 2DKV e UniProt Q7DNA1 (sequenza superiore) (allineamento realizzato con il programma "Align" di UniProt).

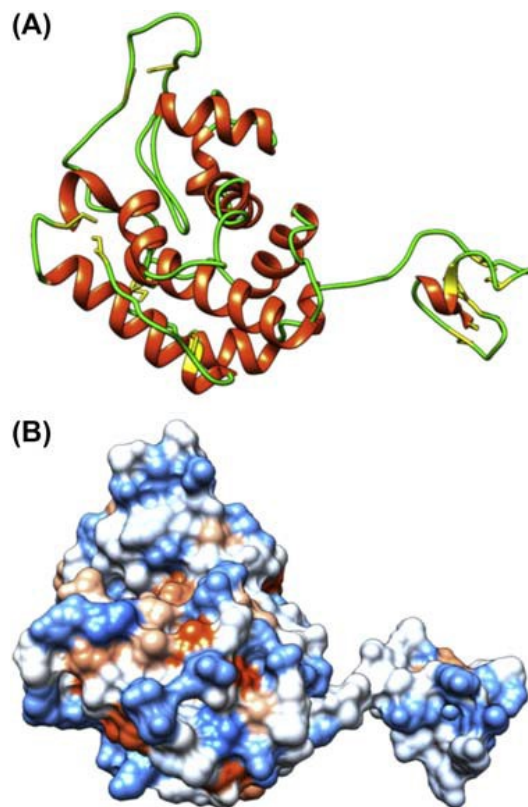


Figura 2. (A) Struttura tridimensionale prevista delle chitinasi dell'uva di classe IV (UniProt Q7XAU6) basata sull'allineamento con la controparte *Oryza sativa* (file PDB: 2DKV). La posizione dei residui di cisteina sono indicati in giallo. (Ruzza et al., 2020) (B) Mappatura dell'idrofobicità superficiale di chitinasi dell'uva di classe IV. L'idrofobicità dell'amminoacido si basa sul Kyte-Doolittle scala dal blu per il più idrofilo, al bianco, all'arancione/rosso per il massimo idrofobo (Kyte & Doolittle, 1982; Sanner, Olson e Spohner, 1996). Le immagini sono state generate utilizzando il software Chimera 1.13.1 (Pettersen et al., 2004).

Il dominio di legame nella regione C-terminale della proteina, nei residui 250-259 (Filippi et al., 2016) nella parte esterna della molecola (Fig. 2), sembra essere in grado di legare i flavonoidi, come la quercetina e la catechina, ed è stata avanzata l'ipotesi che tale legame abbia la capacità di influenzare la flessibilità conformazionale delle chitinasi, modulando così la sua attività enzimatica.

La chitinasi dell'uva contiene 14 residui di cisteina, ma solo 10 di essi sono coinvolti nella formazione di ponti disolfuro. Due di questi legami disolfuro si trovano nel dominio di legame della chitina. È stato dimostrato che nella forma ridotta le chitinasi dell'uva perdono la capacità di legarsi alla chitina (Vincenzi & Curioni, 2005), suggerendo così che l'integrità dei ponti disolfuro sia necessaria per la funzionalità della proteina, come mostrato anche nella chitinasi di classe I del seme di segale (Takeshi & Gunki, 1996). Gli altri tre ponti disolfuro sono posti all'estremità di differenti α -eliche, bloccando così il nucleo della proteina in una forma compatta (Fig. 2B). Ciò è dimostrato dal fatto che nella forma non ridotta la mobilità SDS-PAGE aumenta rispetto a quella in ambiente ridotto (Vincenzi & Curioni, 2005). Il sito attivo dell'enzima è quindi circondato da tre ponti disolfuro. Da un punto di vista evolutivo questo potrebbe essere visto come un modo per proteggere la funzione dell'enzima nella pianta. Allo stesso tempo, questa rigidità può tradursi nella ben nota resistenza dell'enzima alla proteolisi. Tuttavia, è importante notare che la sola temperatura è in grado di denaturare irreversibilmente le chitinasi dell'uva sia in vini modello che nei vini veri (Falconer et al., 2010; Marangon et al., 2011) provocandone l'aggregazione e la successiva precipitazione (Marangon et al., 2012).

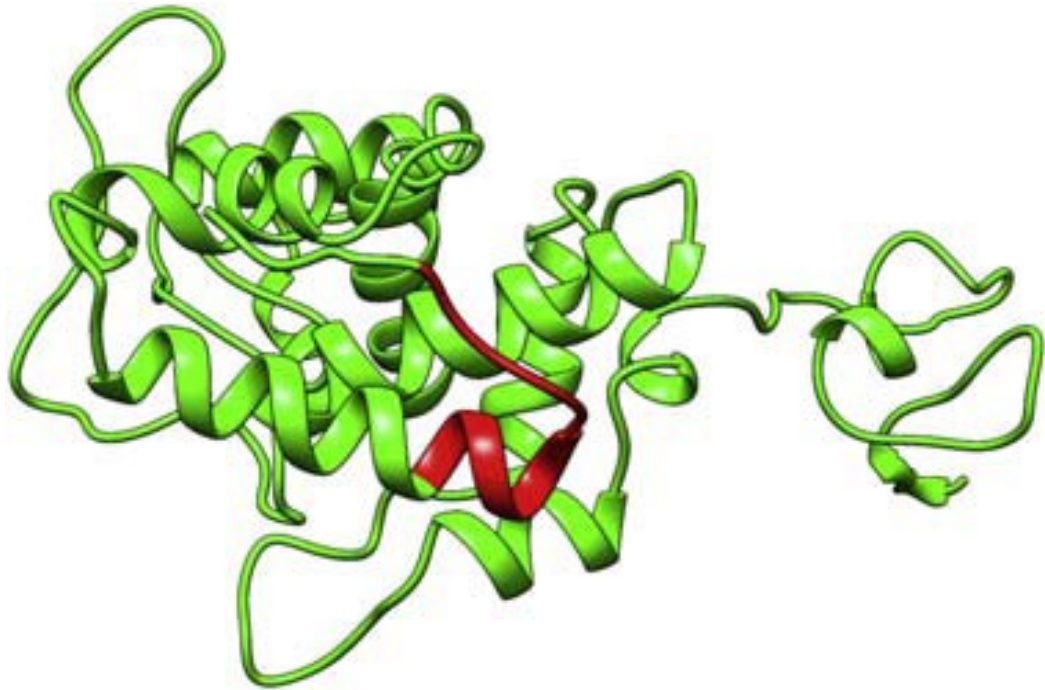


Figura 3. Dominio della chitinasi di classe IV dell'uva di legume ai flavonoidi (aa 250e259, parte raffigurata in rosso) vicino al C-terminale. La struttura tridimensionale si basa sull'allineamento con la controparte *Oryza sativa* (file PDB:2DKV). (Ruzza et al., 2020) L'immagine è stata generata utilizzando il Software Chimera 1.13.1 (Pettersen et al., 2004).

2.3. THAUMATIN-LIKE PROTEIN (TLP)

Le TLP sono caratterizzate da un alto grado di somiglianza di sequenza della Taumatina, una proteina dal sapore dolce isolata dagli arilli del seme di *Thaumatococcus daniellii* (Van der Wel et al., 1972). Come per altre proteine PR, le TLP si accumulano nei frutti in risposta agli stress di origine biotica e/o abiotica, in particolare come conseguenza delle ferite da insetti (Sudisha et al., 2012).

Cinque diverse TLP che condividono un alto grado di somiglianza di sequenza sono state identificate in *Vitis vinifera* dalla quale è stata isolata l'isoforma principale *Vitis vinifera* thaumatin-like protein 1 o VVTL1 (Pocock et al., 2000). Recentemente, Marangon et al. hanno ottenuto la struttura cristallografica di tre differenti TLP di *Vitis vinifera* denominati F2, H2 e I, (PDB file: 4JRU, 4MBT e 4L5H9). Queste proteine condividono un alto grado di somiglianza di sequenza con una TLP isolata dalla banana di cui si possiede la struttura cristallografica (PDB file: 1Z3Q). L'allineamento degli amminoacidi riportati in Tabella 2 indica una sovrapposizione del 79,6% tra le sequenze della TLP di banana e l'isoforma F2/4JRU e una sovrapposizione del 73,3% con le altre due isoforme di TLP isolate dal succo d'uva. Queste ultime, pur avendo sequenze identiche, hanno mostrato differenti proprietà (Van Sluyter et al., 2009), suggerendo la possibilità che queste differenze siano correlabili alla loro diversa stabilità. In particolare, è stato dimostrato che F2/4JRU è instabile al riscaldamento, mentre I/4L5H e H2/4MBT non risultano essere instabili al riscaldamento.

	1	11	21	31	41
Consensus	mrrssiLsis	--ifllfsLl	fTpsHAAATFx	IqNhCsYTVW	AAAvPGGGrq
Conservation					
O04708 V. vinif.	MRFTTLPIL	--IPLLLSLL	FTSTHAATFD	ILNKCTYTVW	AAASPGGRR
F6HUG9 V. Vinif.	MGLCKILSIS	--SFLLTALF	FTPSYAATFN	IQNHCsYTVW	AAAVPGGGMQ
O22322 Banana	GTRSSXLSLS	FFFFFFFSLl	VTLSHAATFX	IVNRCSYTVW	AAAVPGGGRQ
	51	61	71	81	91
Consensus	LdsGQSWtin	VNaGTTggRi	WgRTsCsFDa	sGrGkCeTGD	CgGLlQctaY
Conservation					
O04708 V. vinif.	LDsGQSWTIT	VNPGTTNARI	WGRTSCTFDA	NGRGKcETGD	CNGLLEcQGY
F6HUG9 V. Vinif.	LGsGQSWSLN	VNAGTTGGRV	WARTNCNFDA	SGNGKcETGD	CGGLLQCTAY
O22322 Banana	LNQgQSWTIN	VNAGTTGGRI	WGRTGCSFDG	SGRGRCQTGD	CGGVLsCTAY
	101	111	121	131	141
Consensus	GsPPNTLAEF	ALNqfnNLdf	fDISLVDGFN	vPMdfspTs-	GC-RGIqCaa
Conservation					
O04708 V. vinif.	GSPNTLAEF	ALNQPNNDY	IDISLVDGFN	IPMDFS----	GC-RGIQCSV
F6HUG9 V. Vinif.	GTBPNTLAEF	ALNQFSNLDF	FDISLVDGFN	VPMAFNPTS	GCTRGISCTA
O22322 Banana	GNPPNTLAEF	ALNQFNNDLF	FDISLVDGFN	VPMDFSPTSG	GC-RGIRCAA
	151	161	171	181	191
Consensus	DInGqCPaaL	kapGGCnNPC	TVFkTdeYCC	n--sGSCspT	dYSrFFk-rc
Conservation					
O04708 V. vinif.	DINGQCPEL	KAPGGCnNPC	TVFKTNEYCC	TDGPGSCGPT	TYSKFFKDRc
F6HUG9 V. Vinif.	DIVGECpaAL	KTTGGCnNPC	TVFKTDEYCC	N--sGSCSAT	DYSRFFKTRc
O22322 Banana	DINGQCPGAL	XAPGGCXNPC	TVFXTDXYCC	N--sGSCSPT	DYSRFF----
	201	211	221		
Consensus	pdaysyp-dd	-ts-ftc--g	tny-v-fcp		
Conservation					
O04708 V. vinif.	PDAYSYpQDD	KTSLFTCPsG	TNYKVTFcP		
F6HUG9 V. Vinif.	PDAYSYpKDD	QTSTFTCTAG	TNYEVVFcP		
O22322 Banana	-----	-----	-----		

Tabella 2. Allineamento di sequenze proteiche di Thaumatin-like protein di banana (UniProt O22322) con quelli di Vitis vinifera denominati F2/4JRU (UniProt F6HUG9), I/4L5H e H2/4MBT (UniProt O04708 per entrambi). (Ruzza et al., 2020) La tabella è stata generata da Chimera 1.13.1 software (Meng et al., 2006; Thompson et al., 1997).

La superfamiglia delle TLP possiede tre domini proteici stabilizzati dalla presenza di otto legami disolfuro altamente conservati (Fig. 4).

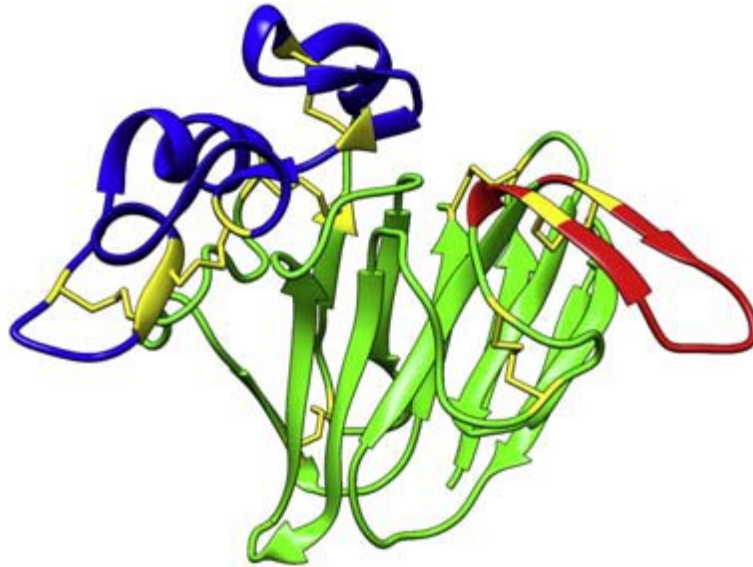


Figura 4. Struttura tridimensionale della proteina F2/4JRU (file PDB: 4JRU). Thaumatin-like protein i domini sono indicati in verde (Dominio I), blu (Dominio II), rosso (Dominio III), mentre i ponti disolfuro sono mostrati in giallo. (Ruzza et al., 2020) L'immagine è stata generata utilizzando il software Chimera 1.13.1 (Pettersen et al., 2004).

Il dominio I presenta la dimensione maggiore, rappresenta il nucleo centrale della proteina, ed è composto da foglietti- β stabilizzati da quattro ponti disolfuro. Il dominio II è composto da una lunga α -elica ($\alpha 5$) e da quattro brevi segmenti elicoidali ($\alpha 1$ - $\alpha 4$), contiene quattro ponti disolfuro che stabilizzano il dominio e lo collegano ai due foglietti- β del dominio I. L'ultimo dominio, composto da soli 32 aminoacidi, è caratterizzato dalla presenza di due foglietti- β , e dalla presenza di due ponti disolfuro, di cui uno lo collega al dominio I. La superficie della proteina F2/4JRU presenta una fessura tra i domini I e II, una caratteristica comune nelle TLP, che contiene quattro residui acidi altamente conservati (Glu107, Asp120, Asp125 e Asp206) (evidenziato in arancione in Fig. 5). È probabile che questa fessura acida sia associata alle proprietà antimicotiche nei confronti di *Phomopsis viticola* e *Botrytis cinerea* come mostrato da Monteiro et al. (2003).

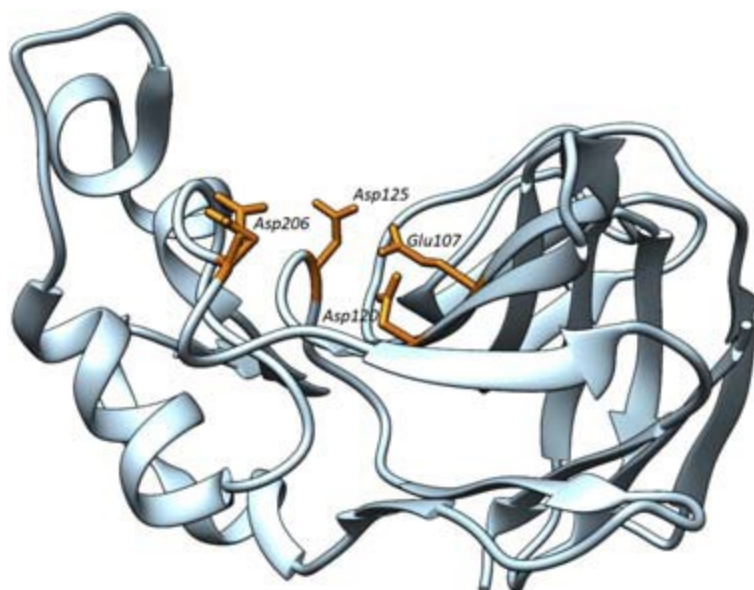


Figura 5. Struttura tridimensionale della proteina 4JRU in cui sono coinvolti i residui è indicata la formazione dei residui acidi (Glu107, Asp120, Asp125 e Asp206) in arancione. (Ruzza et al., 2020) L'immagine è stata generata utilizzando il software Chimera 1.13.1 (Pettersen et al., 2004).

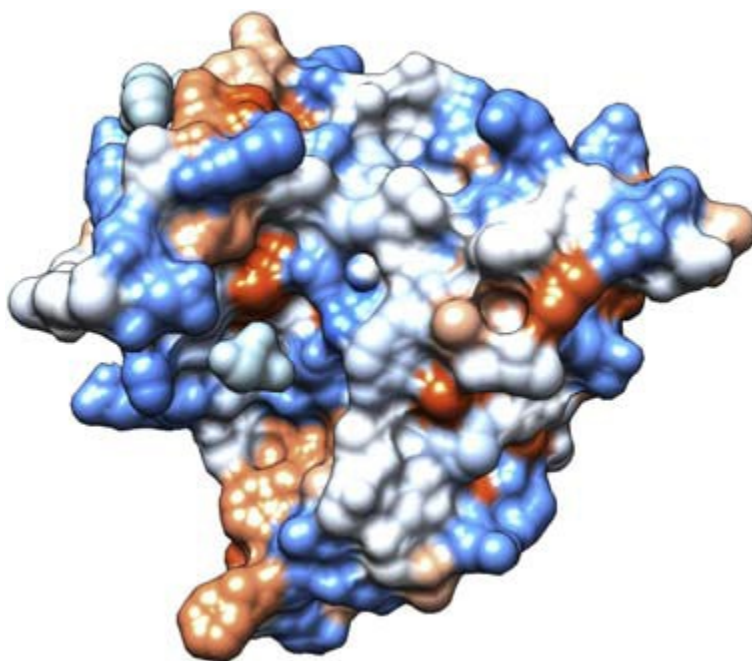


Figura 6. Mappatura dell'idrofobicità superficiale della TLP dell'uva F2/4JRU. (Ruzza et al., 2020) La colorazione della superficie molecolare si basa sulla scala Kyte-Doolittle da blue per le zone più idrofile, al bianco, all'arancione/rosso per le zone più idrofobiche (Kyte & Doolittle, 1982; Sanner, Olson, & Spohner, 1996). Le immagini sono state generate utilizzando il software Chimera 1.13.1 (Pettersen et al., 2004).

In Fig. 6 sono evidenziate le diverse aree della proteina che presentano un carattere idrofobico (Fig. 6, aree arancioni/rosse). Queste aree idrofobiche potrebbero rappresentare siti di legame per i tannini presenti nei vini, che sono indicati come principali fattori coinvolti nell'aggregazione proteica (Marangon et al. 2010). Questa interazione è stata dimostrata mediante studi di docking molecolare, secondo i quali la quercetina può legarsi alle TLP entrando nella fessura prima indicata e portando alla formazione di aggregati proteici con conseguente comparsa di torbidità nei vini bianchi (Toledo et al., 2017). Dato che la catechina è strutturalmente molto simile alla quercetina, è possibile che anche questa molecola possa entrare nella fessura delle TLP come unità terminale di una catena di tannini polimerici, sostenendo così l'idea che i tannini siano coinvolti nel meccanismo di aggregazione proteica nel vino. Pertanto, sembra che entrambe le principali proteine presenti nel vino, TLP e chitinasi, abbiano la tendenza a legare specificamente molecole di flavonoidi (Filippi et al., 2016; Toledo et al., 2017). In particolare, si potrebbe ipotizzare che le proteine autoctone dell'uva si legano ai flavonoidi non appena vengo rilasciati dalle cellule delle bacche. Nonostante la mancanza di prove analitiche a sostegno di questa teoria, durante la purificazione delle proteine dai succhi e dai vini è comune ottenere soluzioni proteiche dal colore giallastro, proprio a causa della presenza di tannini legati alle proteine. Inoltre, è stato dimostrato che il trattamento dei succhi e dei vini con polivinilpolipirrolidone (PVPP) comporta la rimozione dei composti fenolici ma anche di una certa percentuale di proteine, suggerendo che proteine e tannini siano associati. Il PVPP è utilizzato in enologia per la chiarifica dei mosti e dei vini, principalmente bianchi, per asportare la frazione fenolica ossidata ed ossidabile, in particolare di proantocianidine e catechine. Questa associazione proteina-tannino si verifica proprio all'inizio della lavorazione dell'uva e può essere responsabile della formazione di torbidità che sarà discussa nel seguente capitolo.

3. FATTORI CHE CAUSANO L'INSTABILITA' PROTEICA

La temperatura e il pH svolgono ruoli cruciali nel causare l'instabilità proteica. Mentre un aumento della temperatura è tipicamente associato alla formazione di aggregati, è stata osservata una maggiore instabilità a pH acidi (2,5 unità) rispetto a pH più elevati (Dufrechou et al., 2012). Il pH di 2,5 unità è lontano dal punto isoelettrico delle proteine del vino (4.5 e 5.0), dove presentano la più bassa solubilità. La maggiore instabilità può essere quindi spiegata da un aumento del misfolding proteico dovuto alle interazioni repulsive tra le cariche dei diversi gruppi funzionali dei singoli amminoacidi che destabilizzano la conformazione proteica (Dufrechou, et al. 2010).

La stabilità termica delle proteine del vino, determinata dai loro valori di temperatura di melting (T_M), e la loro idrofobicità sono state analizzate da Falconer et al. (2010) che hanno evidenziato come le proteine con valori di T_M di circa 55°/56°C, a differenza della maggior parte delle proteine presenti nel vino che presentano valori di T_M di 62°/63°C, avevano una maggiore tendenza ad aggregarsi e a formare precipitati. È stato riscontrato che le chitinasi hanno una stabilità termica inferiore e una grande tendenza a denaturarsi irreversibilmente, mentre le TLP sono inclini a denaturarsi in modo reversibile, adottando nuovamente la struttura nativa dopo il raffreddamento, ad eccezione dell'isoforma instabile F2/4JRU (Marangon et al., 2014). Infatti, dal confronto tra la struttura tridimensionale della TLP instabile (F2/4JRU) e quelle stabili (I/4L5H e H2/4MBT) emerge la presenza di differenze significative solo nel dominio I (β -sheet 9 e 10) e a livello delle α -eliche 2 e 3 (Marangon et al., 2014).

Oltre alle caratteristiche intrinseche delle proteine, i test termici effettuati in vino modello hanno rivelato che fattori quali la presenza di ioni solfato, la forza ionica, la presenza di polifenoli e di polisaccaridi, contribuiscono all'aggregazione delle proteine denaturate (Pocock et al., 2006), anche se altri fattori coinvolti rimangono sconosciuti.

Pocock et al. (2007) hanno suggerito che gli ioni solfato siano il fattore non proteico essenziale per la formazione di torbidità. Successivamente Stranks et al. (2009) hanno proposto un modello di aggregazione delle TLP in vino modello contenente solfato. Le TLP si aggregano grazie allo ione solfato e successivamente si verificano interazioni idrofobiche tra aggregati e monomeri, questo comporta che l'aggiunta consecutiva di monomeri all'aggregato

porti alla riduzione dei siti idrofobici esposti. Gli aggregati crescendo formano ammassi ancora più grandi riducendo la superficie disponibile per l'interazione con altri monomeri.

Un modello più completo che tiene conto delle chitinasi, delle diverse isoforme delle TLP e degli altri componenti del vino è stato sviluppato da Van Sluyter et al. (2015) per spiegare cosa porta alla formazione di torbidità nei vini in condizioni reali. Questo modello non distingue le proteine del vino sulla base della loro tipologia, ma della reversibilità del loro misfolding mediato dal calore. Per trattamento con alte temperature, tutte le proteine solubili del vino vengono denaturate (stato di misfolding). In seguito, proteine diverse si comportano in modo differente: le proteine in grado di assumere nuovamente il corretto folding per raffreddamento non formano aggregati, mentre quelle che non sono in grado di rifoldare correttamente vanno incontro ad aggregazione, evento favorito dalla presenza dei sali. Questo porta alla formazione di piccoli aggregati proteici invisibili ad occhio nudo. Dopo il raffreddamento, le proteine continuano a interagire e gli aggregati risultanti contengono componenti del vino non proteici come ioni solfato e composti fenolici fino al punto in cui la loro dimensione è sufficientemente grande per essere visibile come torbidità (Fig. 7).

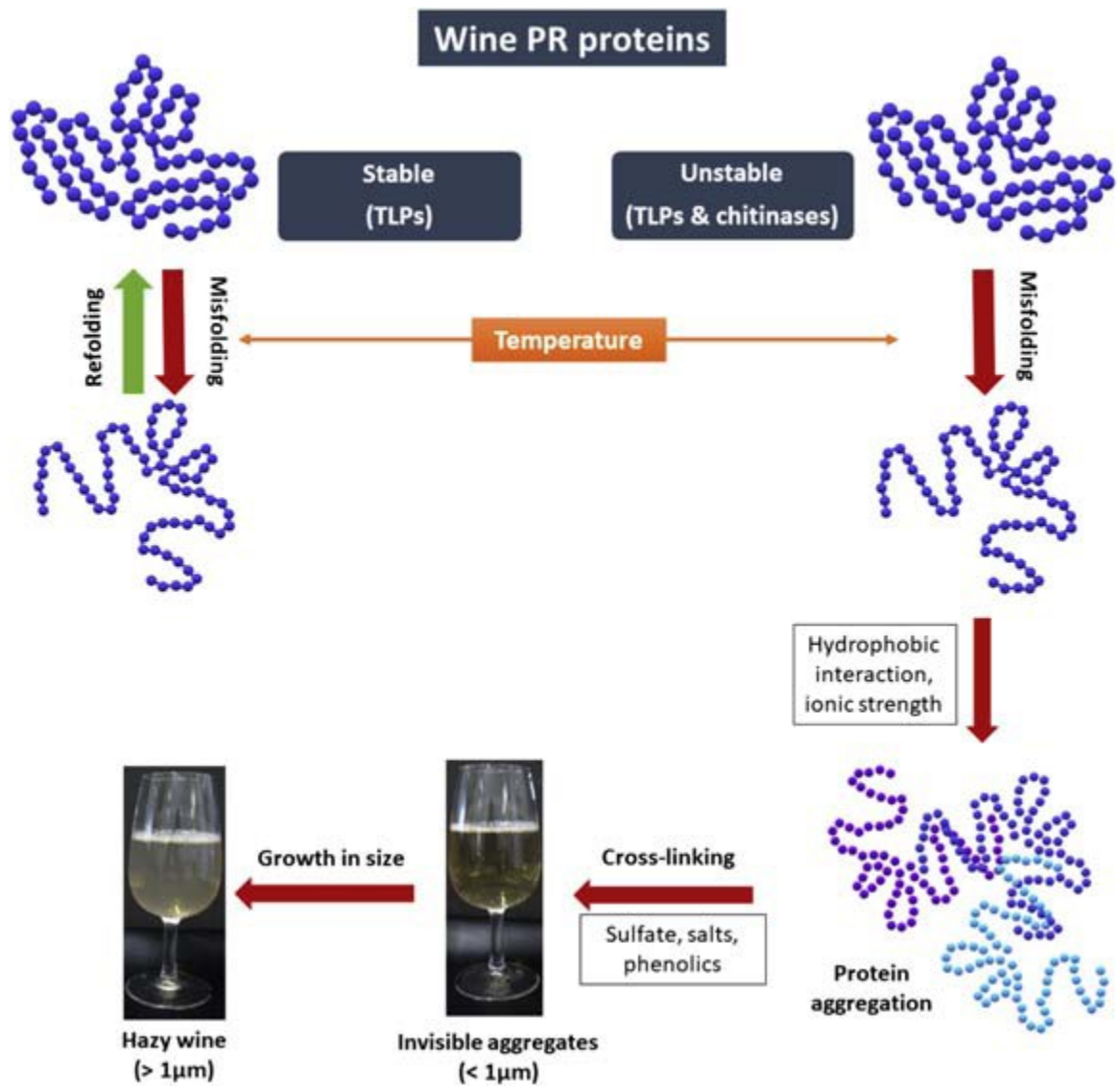


Figura 7. Comportamento delle proteine stabili e instabili nel vino (Ruzza et al., 2020).

3.1. INFLUENZA DEGLI AGENTI RIDUCENTI

Un ulteriore fattore che influenza l'aggregazione e la precipitazione delle proteine è la presenza di agenti riducenti (Chagas et al., 2016; Pocock et al., 2007), che nel vino sono rappresentati essenzialmente dall'anidride solforosa (SO₂) e dal glutatione (GSH).

L'anidride solforosa è stata utilizzata per molto tempo dai viticoltori come conservante grazie alle sue proprietà antimicrobiche ed antiossidanti. La concentrazione massima di anidride solforosa consentita nel vino è stabilita per legge. Nell'Unione Europea il limite consentito è di 160 mg/L nei vini rossi e 210 mg/L nei vini bianchi e rosati. L'anidride solforosa è anche prodotta dal lievito come normale intermedio metabolico. La quantità escretata nel vino è funzione del ceppo e delle condizioni di vinificazione, ma generalmente non supera i 10-20 mg/L.

Il glutatione (γ -glutamyl-L-cisteinil-glicina, GSH) è il composto solforato non proteico più abbondante presente nella maggior parte degli organismi viventi, compreso il lievito *Saccharomyces cerevisiae* (Bachhawat et al., 2009; Kritzinger et al., 2013). È inoltre un importante costituente dell'uva, del mosto e del vino dove possiede proprietà antiossidanti. Grazie a questa proprietà il glutatione può essere utilizzato nella vinificazione, e il suo utilizzo è stato recentemente autorizzato dall'OIV (Organizzazione Internazionale della Vigna e del Vino) (Risoluzione OIV-OENO 445e2015 e OIV-OENO 446e2015). Pertanto, gli agenti riducenti sono sempre presenti nel vino, determinando così un ambiente riducente che può influenzare la struttura tridimensionale delle proteine, riducendone i ponti disolfuro.

L'ipotesi che il meccanismo di riduzione delle proteine sia coinvolto nella stabilità proteica del vino e nella reattività proteica con i tannini è stata segnalata per la prima volta da Marangon et al. (2010). Utilizzando l'agente riducente ditioneitrato (DTT) gli autori hanno dimostrato un aumento della reattività tra i tannini e le proteine misfoldate. Favorendo la denaturazione della molecola proteica si hanno infatti più siti di legame idrofobici esposti e disponibili per reagire con i tannini del vino. Pertanto, è stato ipotizzato che la riduzione dei ponti disolfuro potrebbe essere un fenomeno potenzialmente coinvolto nella formazione di torbidità irreversibile.

Questa idea è stata ulteriormente suffragata quando la struttura tridimensionale delle diverse TLP nel vino sono state risolte (Marangon et al., 2014). È stato dimostrato che la

caratteristica che distingue isoforme stabili e instabili delle TLP è una regione esposta contenente un legame disolfuro la cui facilità di riduzione potrebbe spiegare le differenze di stabilità al calore osservate. Gli autori hanno inoltre suggerito che proprio l'anidride solforosa potrebbe essere un valido candidato per spiegare questo fenomeno.

Questa idea è stata successivamente confermata sperimentalmente da prove di stabilità termica eseguita in presenza di concentrazioni crescenti di anidride solforosa sulle proteine isolate dal vino. È stato dimostrato che l'aumento della concentrazione di anidride solforosa porta a un aumento della torbidità formata per riscaldamento (Chagas et al., 2016; Chagas et al., 2018). I risultati ottenuti da Chagas indicano che l'aggiunta di anidride solforosa può indurre la scissione reversibile dei ponti disolfuro delle TLP tramite sulfitolisi secondo la reazione descritta in Fig. 8 (Wurfel et al., 1993). Sulla base di questi dati, un nuovo modello per il meccanismo di aggregazione delle TLP nel vino è stato proposto, secondo il quale i residui di cisteina non potevano riformare i ponti disolfuro in quanto legati a SO₂. Quando ciò si verifica, interazioni idrofobiche e formazione di nuovi legami covalenti mediante ponti disolfuro danno luogo a riarrangiamenti dei legami disolfuro (Chagas et al., 2018). Bisogna considerare che durante la vinificazione grandi quantità di antiossidanti possono essere aggiunti al vino (principalmente anidride solforosa, ma anche glutathione, acido ascorbico, ecc.).

Gli autori hanno inoltre suggerito che la diminuzione del potenziale redox del vino che si verifica dopo l'imbottigliamento, favorita dal consumo di ossigeno libero da parte dei polifenoli del vino, potrebbe essere sufficiente per innescare questa denaturazione.

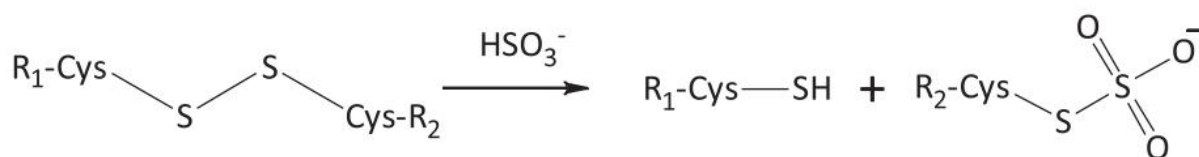


Figura 8. Proposta di reazione di SO₂ sul legame disolfuro. Adattato da Chagas et al., 2016.

L'influenza di un ambiente riducente, in grado di ridurre i ponti disolfuro, promuovendo così l'esposizione di siti idrofobici che favoriscono l'aggregazione proteica, è stata valutata utilizzando ditionitrito e tris(2-carbossietil) fosfina (TCEP). Sfortunatamente, il DTT è poco reattivo a pH acido, mentre la TCEP è reattiva in un intervallo di pH più ampio (Getz et al.,

1999). Sorprendentemente, in una soluzione di vino modello l'aggiunta di TCEP non ha portato alla formazione di una torbidità attesa, trascurabile rispetto a quella indotta da NaHSO_3 , suggerendo un meccanismo diverso dei due agenti riducenti (Marangon et al., 2010).

4. METODI DI STABILIZZAZIONE

In campo enologico sono diverse le tecniche applicabili ai vini per la stabilizzazione proteica ma quella che ha dimostrato maggior efficacia fino ad ora è la chiarifica con bentonite. Le tecniche alternative alla chiarificazione con bentonite, quali ultrafiltrazione, aggiunta di enzimi proteolitici, pastorizzazione flash e uso di adsorbenti alternativi per la rimozione delle proteine dal vino, finora hanno mostrato un successo limitato (Waters et al., 2005).

4.1. LA BENTONITE

La bentonite è un composto argilloso costituito principalmente da montomorillonite (silicato di alluminio idrato) a cui sono legate molecole di sodio o di calcio, e per essere attivata deve essere idratata in acqua, dove si rigonfia caricandosi negativamente.

Vi sono diverse varianti di bentonite:

- la bentonite sodica è ricca di ioni sodio, ha un'elevata capacità di rigonfiamento e un forte potere deproteinizzante; la sua sedimentazione è lenta e il deposito che si creerà sul fondo non è compatto, viene utilizzata per vini con elevata instabilità proteica;

- la bentonite calcica presenta ioni calcio, la distanza tra i foglietti è minore rispetto a quella sodica, presenta quindi un minore potere di interazione con le proteine rispetto alla precedente, è indicata per vini poco instabili, la sua decantazione è veloce e i depositi creati sono compatti; nell'utilizzo di questa tipologia di bentonite bisogna anche tenere conto del rilascio nel vino di ioni calcio che possono influenzare l'equilibrio legato all'acido tartarico nel vino e quindi alla stabilità tartarica;

- la bentonite attivata è una bentonite calcica trattata con ioni sodio che la rende rigonfiabile in un tempo minore e più efficace a bassi dosaggi; ha caratteristiche intermedie rispetto alle due illustrate precedentemente, è diffusa anche con il nome di gelbentonite.

L'aggiunta di bentonite è universalmente impiegata nell'industria enologica per la prevenzione della torbidità causata dalle proteine instabili del vino, in un processo noto come chiarificazione con bentonite. La bentonite, che al pH del vino presenta una carica netta negativa, interagisce elettrostaticamente con le proteine del vino cariche positivamente, inducendone la flocculazione (Lambri et al., 2010; Sauvage et al., 2010). È stato dimostrato

che la bentonite non è selettiva e non interagisce solo con le proteine, bensì rimuove anche altre specie o aggregati carichi (Lambri et al., 2010). Inoltre, non è chiaro se la bentonite rimuova selettivamente alcune frazioni proteiche (Sauvage et al., 2010) e se la sua azione cambia in funzione delle caratteristiche del vino (Achaerandio et al., 2001; Batista et al., 2009; Blade et al., 1988; de Bruijn et al., 2009; Xifang et al., 2007). Sauvage et al. (2010) hanno studiato la sensibilità della frazione proteica al trattamento termico correlandola alla sensibilità con la loro suscettibilità all'adsorbimento della bentonite, difatti con il vino Chardonnay sperimentale è stata trovata una correlazione tra la sensibilità delle proteine alla precipitazione indotta dal calore e la loro rimozione da parte della bentonite; le frazioni più termosensibili erano quelle che venivano anche adsorbite per prime.

Per determinare le dosi di bentonite bisogna attuare delle prove preliminari necessarie per determinare la stabilità del vino. Il test classico, descritto da Dubourdieu et al. (1988), prevede il riscaldamento del vino a 80°C per 30 minuti, condizione che determina la denaturazione delle proteine, successivamente il vino viene raffreddato per 45 minuti a 25°C. Questo processo causa la flocculazione delle proteine, e successivamente il vino è ispezionato visivamente per determinare la presenza di torbidità. Questo test è stato adottato universalmente per misurare la stabilità delle proteine e il potenziale di torbidità, nonostante il fatto che sia considerato troppo duro perché difficilmente il vino nella sua filiera subirà uno stress termico così elevato, portando a un potenziale uso eccessivo di bentonite (Waters et al., 2005).

Nel dettaglio, il test prevede che campioni di vino vengano addizionati di quantità crescenti di bentonite reidratata (ad esempio 20, 50 e 100 g/hL). I campioni sono lasciati per 24 h a 16-18°C, quindi la fase liquida limpida separata per filtrazione è sottoposta al saggio di riscaldamento di 80°C. I campioni che hanno subito lo stress termico sono analizzati al nefelometro, uno strumento che misura la torbidità in NTU (Nephelometric Turbidity Unit). La stabilità è espressa come differenza di torbidità del vino (DNTU) prima e dopo il trattamento termico. I vini sono considerati stabili se la differenza di torbidità non superava le 2 NTU tra il vino trattato e quello non trattato.

Attraverso questo metodo, procedendo per prove, è possibile determinare quale sia il dosaggio ottimale di bentonite.

Oltre al pregio di eliminare le proteine instabili all'interno del vino, l'utilizzo di bentonite presenta anche degli svantaggi. La perdita di aroma del vino in conseguenza ai trattamenti con bentonite è dovuta al verificarsi di molteplici tipologie di interazione. Oltre ad un effetto diretto della bentonite, si ipotizza la rimozione dei composti aromatici legati alle proteine adsorbite dalla bentonite. È stato studiato l'effetto dell'aggiunta di bentonite sui composti aromatici totali del vino modello con proteine del vino totali o in presenza solamente di thaumatin-like protein e chitinasi precedentemente isolate. I risultati hanno mostrato che in generale la bentonite da sola ha un basso effetto sulla perdita di terpeni, ma rimuove gli esteri etilici e gli acidi grassi. La presenza di proteine del vino nella soluzione trattata con bentonite tendeva ad aumentare la perdita di esteri con le catene di carbonio più lunghe (da etil ottanoato a etil decanoato), questo era significativo quando si utilizzavano le thaumatin-like protein e le chitinasi isolate. Si può ipotizzare quindi che l'idrofobicità può essere un fattore coinvolto nell'interazione degli aromi sia con la bentonite che con le proteine (Vincenzi et al., 2015). L'utilizzo di bentonite per la chiarifica di vini spumanti può portare anche ad una diminuzione di spumosità, questo è facilmente attribuibile alla bentonite che, non essendo selettiva per le proteine instabili, adsorbe anche quelle che svolgono un ruolo colloidale nel vino. Un altro fattore da tenere sicuramente in considerazione è la capacità della bentonite di adsorbire i composti coloranti dei vini quali i polifenoli, quindi, bisogna tenere in considerazione la possibile perdita di una frazione di questi nella chiarifica con bentonite.

4.2. ULTRAFILTRAZIONE

Johannes de Bruijn et al. (2011) hanno valutato l'efficienza dell'ultrafiltrazione come tecnica per la stabilizzazione proteica nei vini Sauvignon blanc, discriminando anche quali fossero le proteine responsabili della torbidità e quali invece fossero quelle in grado di stabilizzare il vino.

L'ultrafiltrazione è una tecnica che permette di separare macromolecole dei vini in base al loro peso molecolare. Le proteine con pesi molecolari di 18, 23, 33, 35, 40 e 60 kDa sono state identificate come i principali agenti promotori di torbidità per il Sauvignon blanc; poche invece le proteine che sono state identificate come termicamente stabili in questo intervallo di valori. Questo studio ha permesso di definire quali siano le proteine target da isolare dal vino per aumentare la stabilità proteica attraverso l'ultrafiltrazione. Questo metodo consente di isolare quindi tutte quelle proteine che sono instabili al calore con dimensioni comprese nell'intervallo tra 18 kDa e 60 kDa attraverso l'utilizzo di membrane selettive per questo range di pesi molecolari. Allo stesso tempo questa tecnica permette l'allontanamento delle proteine che invece riducono la formazione di torbidità caratterizzate dal possedere un peso molecolare tra i 100 kDa e i 300 kDa. Questa tecnica è utile per la chiarifica proteica, tuttavia porta anche alla diminuzione di molecole che contribuiscono alle caratteristiche organolettiche del vino, con diminuzione della struttura dei vini e della spumosità dei vini spumanti, oltre che all'eliminazione di quelle proteine che contribuiscono positivamente alla stabilità dei vini.

Per impiegare questa tecnica in maniera ottimale bisognerebbe costituire modelli complessi che separino solamente le proteine comprese nell'intervallo dai 18 kDa e 60 kDa, attraverso la costituzione di impianti complessi e con un costo elevato; per questo motivo si sceglie ancora la chiarifica con la bentonite in quanto di più semplice e veloce applicazione e con costi sicuramente più contenuti.

4.3. CHITINA E CHITOSANO

La chitina è un agente chiarificante promettente grazie alla sua capacità di conservare la sua attività biologica nel vino e la sua selettività verso le chitinasi (Vincenzi et al., 2005). Tuttavia, il regolamento dell'UE vieta l'uso della chitina nella vinificazione, mentre consente l'uso del chitosano (Regolamento (UE) 53/2011 della Commissione), un polimero ottenuto attraverso il processo di deacetilazione della chitina in condizioni alcaline (Bornet et al., 2008).

Il chitosano è strutturalmente lineare, è basico e carico positivamente a valori di pH inferiori alle 6,5 unità. Come risultato del processo di deacetilazione, è composto da D-glucosamina e N-acetil-glucosamina. A differenza della chitina, che è altamente idrofobica, il chitosano è solubile in soluzioni acide in base al suo grado di deacetilazione (Vårum et al., 1994) e mostra proprietà di grande interesse nell'industria alimentare, come la formazione di film, la chelazione di ioni metallici, l'attività antiossidante e di rimozione dei radicali, e presenta anche attività antimicrobica (Bornet & Teissedre, 2008; Crini et al., 2017; Dutta et al., 2009; Rocha, Coimbra & Nunes, 2017). Il chitosano fungineo di *Aspergillus niger* è l'unico tipo di chitosano accettato nella vinificazione (Regolamento della Commissione (UE) 53/2011) e l'aggiunta ai vini è finora finalizzata al controllo della popolazione di *Brettanomyces spp.* (Chinnici et al., 2014) e per la rimozione di ocratossina A, ferro, piombo, cadmio e rame (Bornet & Teissedre, 2008). Il limite di aggiunta di chitosano varia da 10 g/hl a 500 g/hl secondo l'obiettivo (regolamento (UE) 53/2011 della Commissione); ai fini della chiarifica questo limite è fissato a 100 g/hL (OIV, 2009a).

Uno studio condotto da Benucci, et al. (2016) ha valutato l'utilizzo del chitosano come supporto per i trattamenti enzimatici sulle proteine del vino, la riduzione del potenziale di torbidità nel Sauvignon blanc è stata verificata mediante interazione tra bromelina del gambo di ananas e perline di chitosano. Tuttavia, pochi autori hanno studiato l'effetto del chitosano come unico coadiuvante nei vini bianchi. Chinnici et al. (2014) hanno sottolineato la capacità del chitosano di agire come sostituto dell'SO₂, riducendo l'imbrunimento e proteggendo i tioli dall'ossidazione, almeno nelle soluzioni di vino modello. Un ridotto imbrunimento è stato già osservato da Spagna et al. (1996), che ipotizzarono la rimozione delle procianidine e degli acidi cinnamici dal vino.

In merito all'applicazione del chitosano nella vinificazione mancano dati riguardanti il suo effetto sulla rimozione delle proteine instabili al calore dai vini e sulle relative conseguenze sul potenziale di torbidità e sulla stabilità. Il chitosano, essendo un derivato della chitina, potrebbe essere in grado di interagire con le chitinasi dell'uva, le proteine più diffuse che formano la torbidità nel vino (Marangon et al., 2011; Waters et al., 1998).

Sono state eseguite prove su un vino bianco aromatico per valutare se il chitosano, come coadiuvante unico, fosse in grado di rimuovere le proteine instabili, se vi fossero altre modificazioni nella composizione generale del vino e se molecole come composti fenolici, minerali e sostanze volatili potessero essere influenzate da un trattamento chiarificatore con chitosano.

I composti fenolici non hanno subito cambiamenti di concentrazione significativi, oltretutto era già stato dimostrato che il chitosano protegge le catechine dall'ossidazione tanto da essere considerata un'interessante alternativa all'anidride solforosa (Chinnici et al., 2014).

È stata notata una riduzione di minerali quali calcio, ferro, potassio e sodio, mentre rame, zinco, manganese e magnesio non sono stati influenzati in modo significativo. Per ragioni enologiche, la riduzione di ferro, rame, calcio e potassio sono di grande interesse, infatti i primi due sono fondamentali per l'ossidazione che porta a fenomeni di imbrunimento, mentre gli ultimi due sono responsabili dell'instabilità tartarica (Ribéreau-Gayon et al., 2006). Il contenuto di tartrato di idrogeno di potassio e di tartrato di calcio sono ulteriormente ridotti e, di conseguenza, la stabilità tartarica del vino è migliorata. Non è possibile stabilire se la rimozione di potassio e calcio sia dovuta all'adsorbimento diretto o all'adsorbimento di cristalli di tartrato di dimensioni nanometriche sul chitosano o ad entrambi i meccanismi.

Per quanto concerne i composti aromatici, si è visto che il chitosano ha abbassato i livelli di terpeni con una rimozione sostanziale soprattutto di aromi varietali come nerolo e geraniolo nei vini trattati, anche se le loro forme glicosilate non sono state alterate, assicurando una buona riserva di forme libere nel vino, mentre per i composti aromatici fermentativi non è stato possibile capire se l'influenza del chitosano sia significativa, come si è invece visto con la bentonite (Lambri et al., 2013; Sanborn et al., 2010).

Nonostante il basso contenuto di chitinasi nel vino, ne è stata osservata una significativa rimozione indotta da parte del chitosano, mentre le frazioni VVTL1 e VVTL2 più stabili non sono state influenzate in modo significativo (Colangelo et al., 2018). Come previsto, ciò ha comportato una maggiore stabilità del vino trattato con chitosano. Date le interazioni riportate tra alcune isoforme di taumatine e alcuni esteri etilici, la mancata rimozione delle frazioni VVTL1 e VVTL2 delle taumatine potrebbe avere un ruolo nel ridotto impatto del chitosano su questi composti volatili. In generale, i composti aromatici fermentativi non sono stati influenzati dal trattamento con chitosano (Colangelo et al., 2018).

4.4. MANNOPROTEINE

Uno studio condotto da Waters et al. (2000) ha dimostrato che le mannoproteine possono migliorare la stabilità proteica dei vini e anche la loro qualità sensoriale, come la sensazione in bocca, detta anche mouthfeel. Diversi preparati a base di mannoproteine presentano prestazioni differenti sulla stabilizzazione delle proteine del vino e questo è correlato alla loro composizione chimica. Ad esempio, mannoproteine che contengono un più alto rapporto mannosio/glucosio sono capaci di rendere più stabili le proteine del vino termicamente suscettibili a degradazione.

È di fondamentale importanza conoscere la composizione chimica delle diverse mannoproteine per migliorare il processo di stabilizzazione attraverso la composizione in zuccheri e proteine dei formulati commerciali. Nel vino bianco oltre a contribuire alla stabilizzazione proteica, queste hanno effetto sui composti fenolici, quindi sulle caratteristiche cromatiche e sensoriali di vino.

5. CONSERVAZIONE DEI VINI

La corretta conservazione dei vini svolge un ruolo fondamentale nell'evitare la formazione di instabilità proteica, in quanto l'incombere di tale problematica si verifica principalmente in questo momento della filiera. Naturalmente uno dei primi passi da attuare è quello di chiarifica del vino prima della commercializzazione, questo permette di scongiurare qualsiasi imprevisto che il produttore potrebbe incontrare anche durante la conservazione. Avendo illustrato in precedenza quali siano le cause dell'instabilità proteica, si può quindi definire un piano efficace di conservazione per evitare questo fenomeno. La maggiore problematica che favorisce la formazione di torbidità è la temperatura, per questo un buon piano di conservazione deve prevedere il mantenimento di una corretta temperatura. Le alte temperature, ma anche frequenti sbalzi di temperatura, accelerano la denaturazione delle proteine termicamente instabili che portano alla loro denaturazione e quindi al verificarsi della loro flocculazione in un lasso di tempo più o meno ampio a seconda dello stress termico che il vino ha subito. Essendo la temperatura un fattore controllabile, per evitare questo fenomeno, il vino dovrebbe essere mantenuto a temperatura costante, idealmente a 20 °C. Un altro fattore, che potrebbe contribuire a questa problematica è l'esposizione alla luce che può eccitare le proteine suscettibili di instabilità causandone la denaturazione. Questo fenomeno sembra incidere in maniera di gran lunga minore rispetto alla temperatura sulla stabilità proteica, tuttavia non deve essere trascurato, poiché contribuisce ad altri aspetti negativi nei vini quali il gusto luce. Questo fenomeno è facilmente controllabile dal produttore ed è buona norma utilizzare recipienti che filtrano la radiazione solare come le bottiglie di vetro colorate (marrone scuro, verde scuro, ambrate) ed evitare in qualsiasi caso l'esposizione diretta alla luce del vino.

6. CONCLUSIONE

In questo elaborato sono state descritte le proteine responsabili del fenomeno di instabilità nel vino, le cause della loro denaturazione e i diversi metodi che si possono adottare per prevenire questi difetti. Risulta molto importante attuare dei rigorosi controlli per individuare e caratterizzare il grado di instabilità proteica del vino. Un buon piano di controllo e di stabilizzazione diviene di fondamentale importanza affinché il prodotto finito non presenti degli inconvenienti che possano minare la qualità percepita del prodotto e la sua vendita.

Diversi sono i trattamenti che permettono di stabilizzare il vino dal punto di vista proteico, ogni uno ha i suoi vantaggi e svantaggi, la scelta tra i diversi metodi è affidata all'esperienza e alla conoscenza dell'enologo, ma anche alla tipologia di prodotto finale che si vuole ottenere.

La bentonite risulta essere ancora il metodo più efficace e sicuro da impiegare, in quanto il suo utilizzo nell'industria enologica è stato approfonditamente studiato, ed è risaputo ormai che essa adsorbe i composti aromatici direttamente oppure in via indiretta eliminando proteine che sono ad essi legate, quindi nel caso in cui si decidesse di effettuare questo trattamento risulterà di fondamentale importanza individuare, attraverso tentativi, il dosaggio più basso che permetta di stabilizzare il vino andando a preservare il più possibile le componenti aromatiche del prodotto finito.

Il chitosano è una molecola la cui efficacia è stata recentemente scoperta, esso permette infatti di eliminare le proteine instabili, e risulta molto interessante in quanto sembrerebbe avere un'azione meno aggressiva nei confronti delle componenti aromatiche dei vini. Ciononostante, non può essere trascurata l'osservazione statisticamente significativa della sua capacità di ridurre i tioli, mentre non si hanno ancora dati certi circa la sua azione su altre componenti del vino. Inoltre, risulta interessante la sua attività di stabilizzazione tartarica poiché tende ad eliminare gli ioni coinvolti nella formazione di complessi dell'acido tartarico. Anche nel caso del chitosano è opportuno individuare la minima dose utile alla stabilizzazione in quanto anche esso ha un'azione, seppur minima e non completamente definita, sui composti aromatici.

L'ultrafiltrazione si è dimostrata efficace ma, di contro, ha mostrato di eliminare le proteine colloidali dei vini, incidendo notevolmente, oltre che sulle qualità organolettiche come corpo e spumosità dei vini (quest'ultima parametro di qualità dei vini spumati), anche

sulla stabilità tartarica. Questa tecnica richiederebbe studi più sofisticati con l'impiego di sistemi di membrane più complessi al fine di eliminare solo le proteine coinvolte nell'instabilità proteica e al tempo stesso mantenere le proteine colloidali ed evitare uno scadimento organolettico del vino.

Le mannoproteine, infine, rappresentano un metodo molto interessante per stabilizzare le proteine dei vini, soprattutto quelle con un elevato rapporto mannosio/glucosio. Esse hanno inoltre mostrato di migliorare la sensazione che il vino trasmette in bocca (mouthfeel). Questa tecnica è però più indicata per la stabilizzazione proteica solo in vini che hanno una bassa instabilità, ma non garantiscono la sicurezza di stabilità che si ha con l'utilizzo di bentonite o chitosano.

7. BIBLIOGRAFIA

- Achaerandio, I.; Pachova, V.; Guell, C.; & Lopez, F. (2001). Protein adsorption by bentonite in a white wine model solution: effect of protein molecular weight and ethanol concentration. *American Journal of Enology and Viticulture*, 52, 122e126.
- Bachhawat, A. K.; Ganguli, D.; Kaur, J.; Kasturia, N.; Thakur, A.; Kaur, H.; et al. (2009). Glutathione production in yeast. In Satyanarayana, Tulasi, Kunze, & Gotthard (Eds.), *Yeast biotechnology: Diversity and applications* (1st ed., pp. 259e280). Netherlands: Springer, Dordrecht.
- Batista, L.; Monteiro, S.; Loureiro, V. B.; Teixeira, A. R.; & Ferreira, R. B. (2009). The complexity of protein haze formation in wines. *Food Chemistry*, 112(1), 169e177. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.05.070>.
- Batista, L.; Monteiro, S.; Loureiro, V. B.; Teixeira, A. R.; & Ferreira, R. B. (2010). Protein haze formation in wines revisited. The stabilising effect of organic acids. *Food Chemistry*, 122(4), 1067e1075. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.03.076>.
- Batista, L.; Monteiro, S.; Loureiro, V. B.; Teixeira, A. R.; & Ferreira, R. B. (2009). The complexity of protein haze formation in wines. *Food Chemistry*, 112, 169e177.
- Bayly, F. C.; & Berg, H. W. (1967). Grape and wine proteins of white wine varieties. *American Journal of Enology and Viticulture*, 18(1), 18e32.
- Benucci, I.; Lombardelli, C.; Cacciotti, I.; Liburdi, K.; Nanni, F.; & Esti, M. (2016). Chitosan beads from microbial and animal sources as enzyme supports for wine application. *Food Hydrocolloids*, 61, 191–200.
- Blade, W. H.; & Boulton, R. (1988). Adsorption of protein by bentonite in a model wine solution. *American Journal of Enology and Viticulture*, 39, 193e199.
- Bornet, A.; & Teissedre, P. L. (2008). Chitosan, chitin-glucan and chitin effects on minerals (iron, lead, cadmium) and organic (ochratoxin A) contaminants in wines. *European Food Research and Technology*, 226(4), 681–689.

- Chagas, R.; Ferreira, L. M.; Laia, C. A.; Monteiro, S.; & Ferreira, R. B. (2016). The challenging SO₂-mediated chemical build-up of protein aggregates in wines. *Food Chemistry*, 192, 460e469. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.07.052>.
- Chagas, R.; Laia, C.; Ferreira, R.; & Ferreira, L. (2018). Sulfur dioxide induced aggregation of wine thaumatin-like proteins: Role of disulfide bonds. *Food Chemistry*, 259, 166e174. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.03.115>.
- Chinnici, F.; Natali, N.; & Riponi, C. (2014). Efficacy of chitosan in inhibiting the oxidation of (+)-catechin in white wine model solutions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(40), 9868–9875.
- Colangelo, D. Torchio, F.; De Faveri, D. M.; Lambri M. (2018). The use of chitosan as alternative to bentonite for wine fining: Effects on heat-stability, proteins, organic acids, colour, and volatile compounds in an aromatic white wine. *Food Chemistry* 264, 301–309.
- Crini, G.; Morin-Crini, N.; Fatin-Rouge, N.; Deon, S.; & Fievet, P. (2017). Metal removal from aqueous media by polymer-assisted ultrafiltration with chitosan. *Arabian Journal of Chemistry*, 10, S3826–S3839.
- de Bruijn, J.; Loyola, C.; Flores, A.; Hevia, F.; Melin, P.; & Serra, I. (2009). Protein stabilisation of Chardonnay wine using trisacryl and bentonite: a comparative study. *International Journal of Food Science and Technology*, 44, 330e336.
- de Bruijn, J.; Martinez-Oyanedel, J.; Loyola, C.; Seiter, J.; Lobos & Perez-Arias (2011). Fractionation of Sauvignon wine macromolecules by ultrafiltration and diafiltration: impact of protein composition on white wine haze stability, *International Journal of Food Science and Technology*, 46, 1691–1698.
- Dizy, M.; Bisson, L.F. (1999). White wine protein analysis by capillary zone electrophoresis. *American Journal of Enology and Viticulture*, 50, 120–127.
- Dubourdieu, D.; Serrano, M.; Vannier, A. C.; & Ribereau-Gayon, P. (1988). Etude comparée des tests de stabilité proteique. *Connaissance de la Vigne et du Vin*, 22, 261e274.

- Dufrechou, M.; Poncet-Legrand, C.; Sauvage, F. X.; & Vernhet, A. (2012). Stability of white wine proteins: Combined effect of pH, ionic strength, and temperature on their aggregation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(5), 1308e1319. <http://dx.doi.org/10.1021/jf204048j>.
- Dufrechou, M.; Sauvage, F. X.; Bach, B.; & Vernhet, A. (2010). Protein aggregation in white wines: Influence of the temperature on aggregation kinetics and mechanisms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(18), 10209e10218. <http://dx.doi.org/10.1021/jf1017687>.
- Dufrechou, M.; Vernhet, A.; Roblin, P.; Sauvage, F. X.; & Poncet-Legrand, C. (2013). White wine proteins: How does the pH affect their conformation at room temperature? *Langmuir*, 29(33), 10475e10482. <http://dx.doi.org/10.1021/la401524w>.
- Dutta, P. K.; Tripathi, S.; Mehrotra, G. K.; & Dutta, J. (2009). Perspectives for chitosan based antimicrobial films in food applications. *Food Chemistry*, 114(4), 1173–1182.
- Falconer, R. J.; Marangon, M.; Van Sluyter, S. C.; Neilson, K. A.; Chan, C.; & Waters, E. J. (2010). Thermal stability of thaumatin-like protein, chitinase, and invertase isolated from Sauvignon blanc and Semillon juice and their role in haze formation in wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(2), 975e980. <http://dx.doi.org/10.1021/jf902843b>.
- Ferreira, R.B.; Piçarra-Pereira, M.A.; Monteiro, S.; Loureiro, V.B.; Teixeira, A.R. (2002). The wine proteins. *Trends in Food Science & Technology*. 12, 230–239.
- Filippi, A.; Petrusa, E.; Rajcevic, U.; Curin Serbec, V.; Passamonti, S.; Renzone, G.; et al. (2016). Flavonoid interaction with a chitinase from grape berry skin: Protein identification and modulation of the enzymatic activity. *Molecules*, 21(10), 1300.
- Gazzola, D.; Pasini, G.; Tolin, S.; Curioni, A.; & Vincenzi, S. (2017). Characterisation of chitinase isoforms from grape juice. *Italian Journal of Food Science*, 29.
- Getz, E. B.; Xiao, M.; Chakrabarty, T.; Cooke, R.; & Selvin, P. R. (1999). A comparison between the sulfhydryl reductants tris(2-carboxyethyl)phosphine and dithiothreitol for use in protein biochemistry. *Analytical Biochemistry*, 273(1), 73e80. <http://dx.doi.org/10.1006/abio.1999.4203>.

- Høj, P.B.; Tattersall, D.B.; Adams, K.; Pocock, K.F.; Hayasaka, Y.; van Heeswijck, R.; Waters, E. (2000). The 'haze proteins' of wine—A summary of properties, factors affecting their accumulation in grapes, and the amount of bentonite required for their removal from wine. In Proceedings of the ASEV 50th Anniversary Meeting, Seattle, WA, USA, 19–23 June; American Society of Enology and Viticulture: Davis, CA, USA,; pp. 149–154
- Hsu, J.-C.; & Heatherbell, D. A. (1987). Isolation and characterization of soluble proteins in grapes, grape juice, and wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 38(1), 6e10.
- Kombrink, E.; and Somssich, I.E. (1997). Pathogenesis-related proteins and plant defense. In *The Mycota (Plant Relationships)* (Carrol, G. and Tudzynski, P., eds), Springer, pp. 107–128.
- Kritzinger, E. C.; Bauer, F. F.; & du Toit, W. J. (2013). Role of glutathione in winemaking: A review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(2), 269e277. <http://dx.doi.org/10.1021/jf303665z>.
- Kyte, J.; & Doolittle, R. F. (1982). A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *Journal of Molecular Biology*, 157(1), 105e132. [http://dx.doi.org/10.1016/0022-2836\(82\)90515-0](http://dx.doi.org/10.1016/0022-2836(82)90515-0).
- Lambri, M.; Dordoni, R.; Giribaldi, M.; Riva Violetta, M.; & Giuffrida, G. (2013). Effect of pH on the protein profile and heat stability of an Italian white wine. *Food Research International*, 54(2), 1178–1186.
- Lambri, M.; Dordoni, R.; Silva, A.; Faveri, D.M. (2012). Comparing the impact of bentonite addition for both must clarification and wine fining on the chemical profile of wine from Chambave Muscat grapes. *International Journal of Food Science & Technology*, 47, 1–12.
- Lambri, M.; Dordoni, R.; Silva, A.; Faveri, D.M. (2010). Effect of bentonite fining on odor-active compounds in two different white wine styles. *American Journal of Enology and Viticulture*, 61, 225–233
- Marangon, M.; Gazzola, D.; Van Sluyter, S. C.; Curioni, A.; Waters, E. J.; Vernhet, A., et al. (2012). Study of the heat induced aggregation behavior of wine macromolecules by means of scanning ion occlusion sensing and dynamic light scattering techniques. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society*, 244.
- Marangon, M.; Sauvage, F.-X.; Waters, E. J.; & Vernhet, A. (2011). Effects of ionic strength and sulfate upon thermal aggregation of grape chitinases and thaumatin-like proteins in a model system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(6), 2652e2662. <http://dx.doi.org/10.1021/jf104334v>.

- Marangon, M.; Van Sluyter, S. C.; Waters, E. J.; & Menz, R. I. (2014). Structure of haze forming proteins in white wines: *Vitis vinifera* thaumatin-like proteins. *PLoS One*, 9(12), e113757. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0113757>.
- Marangon, M.; Vincenzi, S.; Lucchetta, M.; & Curioni, A. (2010). Heating and reduction affect the reaction with tannins of wine protein fractions differing in hydrophobicity. *Analitica Chimica Acta*, 660(1e2), 110e118. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2009.10.038>.
- Meng, E. C.; Pettersen, E. F.; Couch, G. S.; Huang, C. C.; & Ferrin, T. E. (2006). Tools for integrated sequence structure analysis with UCSF Chimera. *BMC Bioinformatics*, 7, 339. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2105-7-339>.
- Monteiro, S.; Piçarra-Pereira, M. A.; Teixeira, A. R.; Loureiro, V. B.; & Ferreira, R. B. (2003). Environmental conditions during vegetative growth determine the major proteins that accumulate in mature grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(14), 4046e4053. <http://dx.doi.org/10.1021/jf020456v>.
- Odjakova, M.; and Hadjiivanova, C. (2001) The complexity of pathogen defence in plants. *Bulgarian Journal of Plant Physiology*. 27, 101–109.
- Oyeleye, A.; & Normi, Y. M. (2018). Chitinase: Diversity, limitations, and trends in engineering for suitable applications. *Bioscience Reports*, 38(4). <http://dx.doi.org/10.1042/bsr20180323>. BSR2018032300.
- Pettersen, E. F.; Goddard, T. D.; Huang, C. C.; Couch, G. S.; Greenblatt, D. M.; Meng, E. C.; et al. (2004). UCSF Chimera a visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of Computational Chemistry*, 25(13), 1605e1612. <http://dx.doi.org/10.1002/jcc.20084>.
- Pocock, K. F.; & Waters, E. J. (2006). Protein haze in bottled white wines: How well do stability tests and bentonite fining trials predict haze formation during storage and transport? *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 12(3), 212e220. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1755-0238.2006.tb00061.x>.
- Pocock, K. F.; Alexander, G. M.; Hayasaka, Y.; Jones, P. R.; & Waters, E. J. (2007). Sulfate a candidate for the missing essential factor that is required for the formation of protein haze in white wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(5), 1799e1807. <http://dx.doi.org/10.1021/jf062658n>.

- Pocock, K. F.; Hayasaka, Y.; McCarthy, M. G.; & Waters, E. J. (2000). Thaumatin-like proteins and chitinases, the haze-forming proteins of wine, accumulate during ripening of grape (*Vitis vinifera*) berries and drought stress does not affect the final levels per berry at maturity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(5), 1637e1643. <http://dx.doi.org/10.1021/jf9905626>.
- Pocock, K.F.; Høj, P.B.; Adams, K.S.; Kwiatkowski, M.J.; Waters, E.J. (2003), Combined heat and proteolytic enzyme treatment of white wines reduces haze forming protein content without detrimental effect. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 9, 56–63.
- Ribeiro, T.; Fernandes, C.; Nunes, F.M.; Filipe-Ribeiro, L.; Cosme, F. (2014). Influence of the structural features of commercial mannoproteins in white wine protein stabilization and chemical and sensory properties. *Food Chemistry*, 159, 47–54.
- Ribéreau-Gayon, P.; Glories, Y.; Maujean, A.; & Dubourdieu, D. (2006). *Handbook of enology. The chemistry of wine stabilization and treatments*. Chichester: John Wiley & Sons.
- Robinson, S. P.; Jacobs, A. K.; & Dry, I. B. (1997). A class IV chitinase is highly expressed in grape berries during ripening. *Plant Physiology*, 114(3), 771e778. <http://dx.doi.org/10.1104/pp.114.3.771>.
- Robinson, S.P.; and Davies, C. (2000) *Molecular biology of grape berry ripening*. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 6, 175–188.
- Rocha, M. A. M.; Coimbra, M. A.; & Nunes, C. (2017). Applications of chitosan and their derivatives in beverages: A critical review. *Current Opinion in Food Science*, 15, 61–69.
- Ruzza, P.; Honisch, C.; Marangon, M.; Curioni, A.; Bakalinskye A.; and Vincenzi S., (2020). Influence of the reducing environment in the misfolding of wine proteins, *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*, <https://doi.org/10.1016/bs.apcsb.2019.08.004>.
- Sanborn, M.; Edwards, C. G.; & Ross, C. F. (2010). Impact of fining on chemical and sensory properties of Washington State Chardonnay and Gewürztraminer wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 61(1), 31–41.

- Sanner, M. F.; Olson, A. J.; & Spehner, J. C. (1996). Reduced surface: An efficient way to compute molecular surfaces. *Biopolymers*, 38(3), 305e320. [http://dx.doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0282\(199603\)38:3%3c305::aid-bip4%3e3.0.co;2-y](http://dx.doi.org/10.1002/(sici)1097-0282(199603)38:3%3c305::aid-bip4%3e3.0.co;2-y).
- Sarmiento, M.R.; Oliveira, J.C.; Boulton, R.B. (2000). Selection of low swelling materials for protein adsorption from white wines. *International Journal of Food Science & Technology*, 35, 41–47.
- Sauvage, F. X.; Bach, B.; Moutounet, M.; & Vernhet, A. (2010). Proteins in white wines: thermo-sensitivity and differential adsorption by bentonite. *Food Chemistry*, 118, 26e34.
- Spagna, G.; Pifferi, P. G.; Rangoni, C.; Mattivi, F.; Nicolini, G.; & Palmonari, R. (1996). The stabilization of white wines by adsorption of phenolic compounds on chitin and chitosan. *Food Research International*, 29(3–4), 241–248.
- Stranks, S. D.; Ecroyd, H.; Van Sluyter, S.; Waters, E. J.; Carver, J. A.; & von Smekal, L. (2009). Model for amorphous aggregation processes. *Physical Review*, 80(5), 051907. <http://dx.doi.org/10.1103/PhysRevE.80.051907>.
- Sudisha, J.; Sharathchandra, R. G.; Amruthesh, K. N.; Kumar, A.; & Shetty, H. S. (2012). Pathogenesis related proteins in plant defense response. In J. M. Méridon, & K. G. Ramawat (Eds.), *Plant defence: Biological control* (1st ed., Vol. 12, pp. 379e403). Villenave d’Ornon, France: Springer Nature.
- Tabilo-Munizaga, G.; Gordon, T.A.; Villalobos-Carvajal, R.; Moreno-Osorio, L.; Salazar, F.N.; Perez-Won, M.; Acuña, S. (2014). Effects of high hydrostatic pressure (HHP) on the protein structure and thermal stability of Sauvignon blanc wine. *Food Chemistry*, 155, 214–220.
- Takeshi, Y.; & Gunki, F. (1996). Limited proteolysis and reduction-carboxymethylation of Rye seed chitinase-a: Role of the chitin-binding domain in its chitinase action. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 60(7), 1081e1086. <http://dx.doi.org/10.1271/bbb.60.1081>.
- Tattersall, D.B. et al. (1997) Identification and characterization of a fruit-specific, thaumatin-like protein that accumulates at very high levels in conjunction with the onset of sugar accumulation and berry softening in grapes. *Plant Physiology*, 114, 759–769.

- Thompson, J. D.; Gibson, T. J.; Plewniak, F.; Jeanmougin, F.; & Higgins, D. G. (1997). The CLUSTAL_X windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 25(24), 4876e4882. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/25.24.4876>.
- Toledo, L. N.; Salazar, F. N.; & Aquino, A. J. A. (2017). A theoretical approach for understanding the haze phenomenon in bottled white wines at molecular level. *South African Journal for Enology & Viticulture*, 38(1). <http://dx.doi.org/10.21548/38-1-837>.
- van der Wel, H.; & Loeve, K. (1972). Isolation and characterization of thaumatin I and II, the sweet-tasting proteins from *Thaumatococcus daniellii* benth. *European Journal of Biochemistry*, 31(2), 221e225. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1432-1033.1972.tb02522.x>.
- van Loon, L.C. (1999). Occurrence and properties of plant pathogenesis related proteins. In *Pathogenesis-Related Proteins in Plants* (Datta, S.K. and Muthukrishnan, S., eds) pp. 1–19, CRC Press. 9(12), e113757. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0113757>.
- Van Sluyter, S. C.; Marangon, M.; Stranks, S. D.; Neilson, K. A.; Hayasaka, Y.; Haynes, P. A.; & Waters, E. J. (2009). Two-step purification of pathogenesis-related proteins from grape juice and crystallization of thaumatin-like proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(23), 11376e11382. <http://dx.doi.org/10.1021/jf902365r>.
- Van Sluyter, S. C.; McRae, J. M.; Falconer, R. J.; Smith, P. A.; Bacic, A.; Waters, E. J.; et al. (2015). Wine protein haze: Mechanisms of formation and advances in prevention. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(16), 4020e4030. <http://dx.doi.org/10.1021/acs.jafc.5b00047>.
- Vårum, K. M.; Ottøy, M. H.; & Smidsrød, O. (1994). Water- solubility of partially Nacetylated chitosans as a function of pH – effect of chemical composition and depolymerization. *Carbohydrate Polymers*, 25, 65–70.
- Velasco, R.; Zharkikh, A.; Troggio, M.; Cartwright, D. A.; Cestaro, A.; Pruss, D.; et al. (2007). A high quality draft consensus sequence of the genome of a heterozygous grapevine variety. *PLoS One*, 2(12), e1326. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0001326>

- Vincenzi, S.; & Curioni, A. (2005). Anomalous electrophoretic behavior of a chitinase isoform from grape berries and wine in glycol chitin containing SDS-PAGE gels. *Electrophoresis*, 26(1), 60e63.
- Vincenzi, S.; Polesani, M.; & Curioni, A. (2005). Removal of specific protein components by chitin enhances protein stability in a white wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 56(3), 246–254.
- Vincenzi, S.; Mosconi, S.; Zoccatelli, G.; Pellegrina, C.D.; Veneri, G.; Chignola, R.; Peruffo, A.; Curioni, A.; Rizzi, C. (2005) Development of a new procedure for protein recovery and quantification in wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 56, 182–187.
- Vincenzi, S.; Panighel, A.; Gazzola, D.; Flamini, R.; Curioni, A. (2015). Study of Combined Effect of Proteins and Bentonite Fining on the Wine Aroma Loss. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63, 2314–2320.
- Waters, E. J.; Hayasaka, Y.; Tattersall, D. B.; Adams, K. S.; & Williams, P. (1998). Sequence analysis of grape (*Vitis vinifera*) berry chitinases that cause haze formation in wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(12), 4950–4957.
- Waters, E. J.; Wallace, W.; & Williams, P. J. (1992). Identification of heat-unstable wine proteins and their resistance to peptidases. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40(9),
- Waters, E.; Dupin, I.; & Stockdale, V. (2000). A review of current knowledge on polysaccharides which protect against protein haze in white wine. *Australian Grapegrower Winemaker*, 438, 13–16.
- Wurfel, M.; Haberlein, I.; & Follmann, H. (1993). Facile sulfitolysis of the disulfide bonds in oxidized thioredoxin and glutaredoxin. *European Journal of Biochemistry*, 211(3), 609e614. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1432-1033.1993.tb17588.x>.
- Xifang, S. Chun, L.; Zhansheng, W.; Xiaolin, X.; Ling, R.; & Hongsheng, Z. (2007). Adsorption of protein from model wine solution by different bentonites. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 15, 632e638.

8. SITOGRAFIA

<https://www.uniprot.org/align>

RINGRAZIAMENTI

Desidero rivolgere un sentito ringraziamento al Prof. P. Ruzza per avermi offerto l'opportunità di partecipare a questo progetto, per la disponibilità e la pazienza dimostrate nei miei confronti e per la passione e le competenze trasmesse con i suoi insegnamenti.

Ringrazio infine la mia famiglia per avermi sempre garantito il supporto necessario, nonché gli amici, i compagni di corso e quanti mi hanno accompagnato verso questo nuovo inizio.